

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

**PRÉ-MELHORAMENTO GENÉTICO, FLORAÇÃO *IN VITRO* E
CRIOPRESERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DO CERRADO**

Luciano Lajovic Carneiro

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Goiânia

2014

LUCIANO LAJOVIC CARNEIRO

**PRÉ-MELHORAMENTO GENÉTICO, FLORAÇÃO *IN VITRO* E
CRIOPRESERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DO CERRADO**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Tadeu Faria

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas

Goiânia

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Carneiro, Luciano Lajovic
PRÉ-MELHORAMENTO GENÉTICO, FLORAÇÃO IN VITRO E
CRIOPRESERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DO CERRADO
[manuscrito] / Luciano Lajovic Carneiro. - 2014.
91 f.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov; co-orientador Ricardo
Tadeu de Faria.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Agronomia (EA) , Programa de Pós-Graduação em Genética &
Melhoramentos de Plantas , Goiânia, 2014.

Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. polinização. 2. compatibilidade intraespecífica. 3. cultura de tecidos
vegetais. 4. florescimento in vitro. 5. conservação. I. Sibov, Sérgio
Tadeu, orient. II. Faria, Ricardo Tadeu de, co-orient. III. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Luciano Lajovic Carneiro		
E-mail:	luciancar8@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	nenhum		
Agência de fomento:	Fundação de Auxílio a Pesquisa do Estado de Goiás	Sigla:	FAPEG
País:	Brasil	UF:	Go CNPJ:
Título:	Pré-melhoramento genético, floração <i>in vitro</i> e criopreservação de orquídeas nativas do Cerrado		
Palavras-chave:	polinização, compatibilidade intraespecífica, cultura de tecidos, florescimento, conservação		
Título em outra língua:	Pre-breeding, <i>in vitro</i> flowering and cryopreservation of Cerrado wild orchids		
Palavras-chave em outra língua:	pollination, compatibility, tissue culture, <i>in vitro</i> flowering, conservation		
Área de concentração:	Melhoramento genético de plantas		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	27/11/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Genética e melhoramento de plantas		
Orientador (a):	Sérgio Tadeu Sibov		
E-mail:	stsibov@yahoo.com.br		
Co-orientador (a):*	Ricardo Tadeu de Faria - 07474424878		
E-mail:	faria@uel.br		

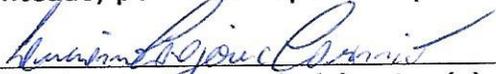
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.



 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 22 / 12 / 2015

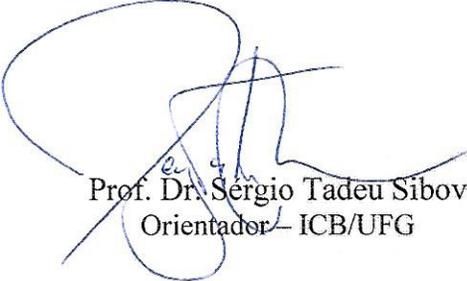
¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Aos meus pais
Luiz Borges Carneiro
Lilia Lajovic Carneiro
e meu irmão Marcos
pelos bons exemplos,
extrema atenção
e incentivo.

LUCIANO LAJOVIC CARNEIRO

TÍTULO: **“Pré-melhoramento genético, floração *in vitro* e criopreservação de orquídeas nativas do Cerrado”.**

Tese DEFENDIDA em 27 de Novembro de 2014, e APROVADA pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov
Orientador – ICB/UFG



Prof.ª. Dr.ª. Virgínia Silva Carvalho
UENF



Prof. Dr. Renato Fernandes Galdiano Jr.
unesp



Prof. Dr. Wagner de Melo Ferreira
UFT



Prof. Dr. Izulmé Rita Imaculada Santos
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, nas pessoas das Coordenadoras Professora Dra. Patrícia Guimarães Santos Melo e Professora Dra. Mariana Pires de Campos Telles e da Secretária Jéssica Almeida Silva e demais funcionários.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (Reuni/MEC), pela bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelos auxílios financeiros.

Ao PRPPG – UFG, pelo auxílio financeiro à minha participação no VII *Internacional Simposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*. E especialmente à Karen e ao Joaquim por me atenderem com toda simpatia e atenção.

Ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, pela utilização de equipamentos e instalações.

Ao meu Orientador Professor Dr. Sérgio Tadeu Sibov, por fornecer todas as condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho, pela paciência, apoio e dedicação, pelas várias correções e por auxiliar na execução deste documento.

Ao meu Coorientador Professor Dr. Ricardo Tadeu de Faria, pelas sugestões, por me receber atenciosamente em Londrina e disponibilizar seu tempo e toda estrutura.

À Professora Dra. Maurizia F. Carneiro, pela atenção e simpatia e por disponibilizar plantas da Coleção de Orquídeas do Cerrado do Centro de Treinamento da Emater-GO para este trabalho.

Ao Professor Doutor José Ângelo Rizzo e à Márcia Yuriko Hashimoto Curado de Sena, por sempre me receberem com simpatia e atenção no Herbário da UFG.

À Professora Dra. Maria Helena, do Laboratório de Anatomia Vegetal, do Instituto de Ciências Biológicas/UFG, por disponibilizar equipamentos de imagem e microscópio.

À Professora Dra. Lucilia do Instituto de Química da UFG, por me auxiliar com os cálculos estequiométricos para as modificações no meio de cultura.

Ao Professor Dr. Roberto Takane, pelas longas conversas sempre interessantes, principalmente sobre floricultura e orquídeas, em todas as vezes que veio à Goiânia.

Ao Professor Dr. Gilberto Barbante Kerbauy, por me receber no laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal da USP com toda simpatia e atenção, e auxiliar com minhas primeiras dúvidas sobre o florescimento *in vitro*.

A Marcia Calil da Biblioteca Central – UFG, pelos diversos artigos obtidos pelo Comut.

À Msc. Edilene Preti Ferrari, doutoranda da Universidade Estadual de Londrina, por me auxiliar no início com os métodos de criopreservação no laboratório de fitotecnia da UEL.

Ao Geraldo L. da Silva, por ser prestativo e atencioso no laboratório de Fitotecnia da Universidade Estadual de Londrina.

À Msc. Daniella Mota Silva, por me acompanhar e incentivar na maior parte deste trabalho com atenção e dedicação.

A todos do Laboratório de cultura de tecidos vegetais – UFG, especialmente aos alunos que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho em algum momento. Acássio, Carlos, Diego Almeida, Gabriel, Gessika, Paulo Hernandez, Nycolle, Celia, Arnúbia, Rafaela, e Cris Hanny.

À Msc. Kellen Brandão, pelas longas conversas inspiradoras sobre artigos, orquídeas e micorrizas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, mesmo que não tenham sido citados.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO GERAL	12
GENERAL ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE	18
2.1.1 Mercado	19
2.1.2 Orquídeas do Cerrado	20
2.1.3 Gênero <i>Cohniella</i>	20
2.1.4 Gênero <i>Cyrtopodium</i>	21
2.1.5 Gênero <i>Epidendrum</i>	22
2.1.6 Gênero <i>Lockhartia</i>	23
2.2 POLINIZAÇÃO	24
2.3 MELHORAMENTO GENÉTICO DE ORQUÍDEAS	26
2.4 FLORAÇÃO <i>IN VITRO</i>	27
2.5 CRIOPRESERVAÇÃO	32
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
3 COMPATIBILIDADE INTRA E INTERESPECÍFICA NA POLINIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS DO CERRADO	47
RESUMO	47
ABSTRACT	48
3.1 INTRODUÇÃO	49
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.2.1 Material vegetal	50
3.2.2 Polinizações intraespecíficas	50
3.2.3 Polinizações interespecíficas	51
3.2.4 Teste de viabilidade com 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	51
3.2.5 Germinação <i>in vitro</i>	51
3.2.6 Delineamento e análises	52
3.3 RESULTADOS	52
3.4 DISCUSSÃO	58
3.5 CONCLUSÕES	60
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
4 INDUÇÃO A FLORAÇÃO PRECOCE <i>IN VITRO</i> DE ORQUÍDEAS DO CERRADO	63
RESUMO	63
ABSTRACT	63

4.1	INTRODUÇÃO.....	64
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	66
4.2.1	Material vegetal	66
4.2.2	Cultivo <i>in vitro</i>	66
4.2.3	Tratamentos para indução floral	66
4.2.4	Efeito da água de coco	68
4.2.5	Coleta de dados e análise estatística	68
4.3	RESULTADOS	68
4.4	DISCUSSÃO.....	73
4.5	CONCLUSÕES	75
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
5	CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS DO CERRADO..	79
	RESUMO	79
	ABSTRACT	80
5.1	INTRODUÇÃO	81
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	82
5.2.1	Material vegetal	82
5.2.2	Tratamentos para Criopreservação	82
5.2.3	Teste de viabilidade	83
5.2.4	Germinação das sementes criopreservadas	84
5.3	RESULTADOS	84
5.4	DISCUSSÃO.....	86
5.5	CONCLUSÕES	88
5.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Espécies de orquídeas nativas do Cerrado utilizadas nos experimentos de polinização intraespecífica e de cruzamentos interespecíficos, período de floração e número de indivíduos trabalhados. Plantas pertencentes à Coleção de Bromélias e Orquídeas do Cerrado – UFG e Coleção de Orquídeas do Cerrado - Emater-GO. Ambas localizadas no município de Goiânia, GO.....	50
Tabela 3.2	Tempo de maturação das cápsulas indicado em dias após a polinização cruzada para as sete espécies.	53
Tabela 3.3	Compatibilidade intraespecífica para as sete espécies avaliadas. Tratamentos realizados (autopolinização manual e espontânea e polinização cruzada), número total de flores, fecundação obtida e a viabilidade das sementes utilizando o conjunto de sementes de duas cápsulas.	55
Tabela 3.4	Compatibilidade interespecífica dentro dos gêneros <i>Cyrtopodium</i> e <i>Epidendrum</i> , número (N) de flores; fecundação e a viabilidade das sementes obtidas.....	56
Tabela 4.1	Formação de hastes florais em <i>Cohniella cepula</i> distribuídas por dias após os tratamentos (DAT), porcentagem total de hastes florais formadas, teste de Duncan (nível de significância de 5%) e o total de flores completas formadas:	70
Tabela 4.2	Efeito da adição de água de coco ao meio para indução floral <i>in vitro</i> em <i>Cohniella cepula</i>	70
Tabela 5.1	Tratamentos indicando as respectivas soluções utilizadas para a criopreservação de sementes das espécies de orquídeas: <i>Epidendrum desciflorum</i> , <i>Epidendrum nocturnum</i> , <i>Epidendrum secundum</i> , <i>Cyrtopodium eugenii</i> , <i>Cyrtopodium sainttlegerianum</i> , <i>Cohniella cepula</i> e <i>Lockhartia goyazensis</i>	83
Tabela 5.2	Porcentagem de viabilidade das sementes criopreservadas verificada após tratamento com solução de 2,3,5 cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) por 24 h. A tabela indica os resultados para todos os tratamentos e para as sete espécies de orquídeas estudadas.....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** Cápsulas de *Cohniella cepula* (A) e *Epidendrum secundum* (B) colhidas após a completa maturação. Setas indicam o início da abertura natural das cápsulas, barra = 1 cm. 53
- Figura 3.2** A: *Epidendrum densiflorum* com cápsulas no início do desenvolvimento (15dias); seta indica cápsula abortada após 15 dias formada por autopolinização manual. B: *Cyrtopodium sainttlegerianum* com cápsulas após quatro meses. Setas indicam cápsulas formadas por autofecundação em processo de abortamento após quatro meses 56
- Figura 3.3** Sementes viáveis das espécies trabalhadas coradas em vermelho pelo teste com com solução de 2,3,5 cloreto de trifetil tetrazólio tetrazólio (TTC). Sementes não viáveis permaneceram não coradas. A) *Cyrtopodium eugenii*; B) *Cyrtopodium sainttlegerianum*; C) *Epidendrum secundum*; D) *Cohniella cepula*; E) *Epidendrum nocturnum*; F) *Lockhartia goyasensis*. Setas indicam sementes com múltiplos embriões. Fotos LCTV/UFG..... 57
- Figura 3.4** Desenvolvimento do híbrido, cruzamento entre *C. eugeni* e *C. saintlegerianum* ; A – após quatro meses; B - após seis meses de inoculado no meio de cultura MS. Vários estádios de protocormos presentes em um mesmo vidro..... 58
- Figura 3.5** Desenvolvimento diferenciado entre espécies de *Epidendrum* e seu híbrido após quatro meses inoculados em meio de cultura MS. A - *Epidendrum secundum*; B – híbrido entre *E. nocturnum* e *E. secundum*; C – *E. nocturnum*. Barra = 1cm 58
- Figura 4.1** Distribuição das porcentagens de formação de hastes florais em *Cohniella cepula* por tratamento. As barras indicam uma relação direta entre o aumento na concentração de 6-benzilaminopurina (BAP) e a porcentagem de hastes formadas..... 69
- Figura 4.2** Indução floral precoce *in vitro* em *Cohniella cepula*. A = Três botões em desenvolvimento (tratamento F8); B = flor completamente formado em meio a inúmeros brotos (tratamento F5); C = flor completamente formada em plantas pouco desenvolvidas (tratamento F14); D = flor completamente formada em planta bem formada (tratamento F4)..... 71
- Figura 4.3** Hastes florais e botões em *Cohniella cepula* que pararam seu desenvolvimento *in vitro* e secaram em diferentes estados. A) botões no início do desenvolvimento; B) Botão floral completo prestes a

	abrir; C) haste ramificada com vários botões no meio do desenvolvimento. Barra = 1cm.	71
Figura 4.4	<i>Epidendrum secundum</i> em tratamentos com redução da concentração de nitrogênio e aumento do fósforo, apresentando grande quantidade de raízes e cor avermelhada das folhas.	72
Figura 4.5	<i>Cyrtopodium eugenii</i> no tratamento F11, com redução de nitrogênio e aumento do fósforo, apresentando bom desenvolvimento e maiores bulbos.	73
Figura 4.6	<i>Epidendrum secundum</i> submetido ao tratamento F20, com alta concentração de BAP.	73
Figura 5.1	Diferença na viabilidade de sementes de <i>Cohniella cepula</i> após tratamentos com solução de 2,3,5 cloreto de trifênil tetrazólio (TTC) por 24 h. Sementes coradas de vermelho são viáveis enquanto sementes brancas estão inviáveis. A) Tratamento T1 (Sementes em criotubo direto para o NL (sem solução de criopreservação). B) tratamento T4 0,4 M sacarose (20 min) + PVS2 + phloroglucinol (10 min).	86

RESUMO GERAL

CARNEIRO, L.L. **Pré-melhoramento genético, floração *in vitro* e criopreservação de orquídeas nativas do Cerrado**. 2014. 91 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.¹

A grande maioria das espécies de orquídeas é polinizada por insetos, principalmente abelhas, borboletas e mariposas. A família Orchidaceae é, em geral, considerada alógama, mas informações sobre o tipo de reprodução não são conhecidas para a maioria das espécies. Pouca informação existe sobre orquídeas do Cerrado, o que prejudica o melhoramento destas espécies e adia sua utilização no desenvolvimento de novas cultivares para o mercado de ornamentais. Métodos recentes de biotecnologia vegetal podem auxiliar tanto o melhoramento quanto a conservação destas espécies, como a indução a floração precoce *in vitro*, técnica importante principalmente para espécies de ciclo longo, e a criopreservação, como ferramenta para o desenvolvimento de bancos de germoplasma, essenciais tanto para o melhoramento quanto para a conservação da variabilidade genética. Este trabalho teve como objetivos contribuir para o melhoramento e conservação de orquídeas com distribuição no Cerrado Brasileiro. Foi avaliada a autocompatibilidade para sete espécies: *Cohniella cepula*, *Cyrtopodium eugenii*, *Cyrtopodium saintlegerianum*, *Epidendrum densiflorum*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum* e *Lockhartia goyazensis*. Apenas três foram autocompatíveis: *E. nocturnum*, *E. secundum* e *L. goyazensis*. Foi avaliada a compatibilidade interespecífica dentro dos gêneros *Cyrtopodium* e *Epidendrum* utilizando cruzamentos recíprocos. Apenas *C. eugenii* e *E. nocturnum* produziram sementes viáveis. Para a indução floral precoce *in vitro* foram testadas diferentes composições nutricionais e concentrações de benzilaminopurina (BAP) no meio MS modificado. Apenas *C. cepula* apresentou respostas positivas aos tratamentos, com formação de até 46% de hastes florais. O efeito do BAP ficou evidente nos resultados dos tratamentos. Foi testada a criopreservação por vitrificação de sementes das sete espécies de orquídeas, obtidas de cápsulas originadas de fecundação cruzada. As respostas aos crioprotetores foram parcialmente distintas para os

tratamentos de criopreservação avaliados, dependendo da espécie. A maioria das sementes testadas não apresentou diferenças significativas entre o congelamento em nitrogênio líquido e o controle sem o crioprotetor e sem o congelamento. O congelamento sem crioprotetor foi bem sucedido para todas as espécies mantendo a viabilidade das sementes, para *C. cepula* em 63%, *C. eugenii* em 59%, *C. saintlegerianum* 70%, *E. densiflorum* 42%, *E. nocturnum* 31%, *E. secundum* 69% e *L. goyazensis* em 52%. Apenas *E. nocturnum* e *C. cepula* apresentaram redução significativa da viabilidade quando submetidas ao congelamento direto em nitrogênio líquido, sem crioprotetor. Os resultados apresentados neste trabalho são úteis ao desenvolvimento de programas de melhoramento para orquídeas e para conservação destas espécies.

Palavras-chave: polinização, compatibilidade intraespecífica, cultura de tecidos, florescimento *in vitro*, conservação, Cerrado

¹ Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.

GENERAL ABSTRACT

CARNEIRO, L.L. **Pre-breeding, *in vitro* flowering and cryopreservation of Cerrado wild orchids.** 2014. 91 f. Thesis (Doctor in Agronomy: Genetic and Plant Breeding) – College of Agronomy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.¹

The vast majority of orchids species are pollinated by insects, mainly bees, butterflies and moths. The orchid family is generally considered allogamic, but information about the type of reproduction are unknown for most species. Little information exist about orchids of Cerrado, which hinders plant breeding of these species and postpones their use in developing new varieties for the ornamental market. Recent methods of plant biotechnology can assist both plant breeding and conservation of these species, such as induction of early *in vitro* flowering as important technique particularly for species with a long cycle, and cryopreservation as a tool for the conservation of genetic variability. This study aims to contribute to the improvement and conservation of orchids with distribution in the Brazilian Cerrado. Selfcompatibility was evaluated for seven species: *Cohniella cepula*, *Cyrtopodium eugenii*, *C. saintlegerianum*, *Epidendrum densiflorum*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum* e *Lockhartia goyazensis*. Only three were autocompatible: *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum* and *Lockhartia goyazensis*. Interspecific compatibility was assessed for *Cyrtopodium* and *Epidendrum* genera, using reciprocal crosses. Just *E. nocturnum* and *C. eugenii* produced viable seeds. For early *in vitro* floral induction 20 different treatments were used through nutritional changes and use of cytokinin (BAP) in modified MS medium. Only *C. cepula* showed positive responses to treatment with formation of 46% floral stems. The effect of BAP was evident in the results. Cryopreservation was tested by vitrification of seeds of seven species of orchids, obtained from outcrossing. The responses to cryopreservation were partially different for each species. Most seeds tested showed any significant differences between freezing in liquid nitrogen without cryoprotectants and control without freezing. The freezing without cryoprotectant was successful to maintaining seed viability for all species, *C. cepula* 63%, *C. eugenii* 59%, *C. saintlegerianum* 70%, *E. densiflorum* 42%, *E. nocturnum* 31%, *E. secundum* 69% and *L. goyazensis* 52%. Only *E. nocturnum* and *C.*

cepula showed a significant reduction in viability when submitted to freezing in liquid nitrogen. The results presented here are useful for the development of breeding programs for orchids and conservation of these species.

Keywords: pollination, fecundation, compatibility, tissue culture, *in vitro* flowering, conservation, Brazilian Cerrado

¹ Adviser: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG

1 INTRODUÇÃO GERAL

As orquídeas representam o segundo maior grupo de plantas entre as Angiospermas, com cerca de 850 gêneros e mais de 26 mil espécies, excluindo-se o número de híbridos artificiais conforme registrado no *World Orchid Checklist* (Govaerts et al., 2011). No Brasil, ocorrem 2447 espécies devidamente aceitas para a família Orchidaceae (Barros et al., 2014).

São utilizadas principalmente para ornamentação, mas existem exceções utilizadas na medicina popular, especialmente na China e Índia (Chugh et al., 2009) e na indústria alimentícia com a produção de baunilha pelo fruto das espécies do gênero *Vanilla* (Tan et al., 2010). As orquídeas em seu ambiente natural são alvos de coleta predatória e sofrem com a degradação e perda de habitats, resultando na extinção de populações nativas no âmbito local e regional (Swarts & Dixon, 2009; Hosomi et al., 2012; Vij & Pathak, 2012).

Como a exigência de mudas para suprir o mercado de plantas ornamentais é elevada, a utilização de técnicas de cultivo *in vitro* é necessária pois, além de evitar a retirada das plantas de seu hábitat natural, permite a produção de grande quantidade de mudas com elevada qualidade fitossanitária. Diversas espécies de orquídeas pertencentes aos gêneros *Cattleya* Lindl. (Yam & Arditti, 2009; Schneiders et al., 2012), *Dendrobium* Sw. (Faria et al., 2004a), *Cymbidium* Sw. (Hossain et al., 2009), *Vanda* (Johnson & Kane, 2007), dentre outras, já possuem protocolos de propagação estabelecidos. Entretanto, informações sobre métodos de cultivo e protocolos de multiplicação para espécies de orquídeas do Cerrado são pouco desenvolvidos, evidenciando a necessidade de trabalhos na área de germinação, multiplicação, conservação e melhoramento genético para tais espécies.

A crescente necessidade mundial por variabilidade genética para os programas contínuos de melhoramento, assim como, os riscos da erosão genética causada pelo próprio melhoramento tornam imperativa a conservação de espécies e manutenção de bancos de germoplasma. O sistema reprodutivo complexo das orquídeas é o principal responsável pela grande variabilidade desta família. A compreensão dos mecanismos de polinização e

fecundação é essencial para a hibridização, tendo em vista que o melhoramento genético de orquídeas é baseado principalmente no desenvolvimento de híbridos (Arditti, 1984; Elliott, 2010).

Métodos para indução de floração *in vitro* através do balanço fitohormonal e nutricional podem ser úteis para o melhoramento genético, conservação por meio da obtenção de sementes, desenvolvimento de híbridos, estudos de segregação e para acelerar o melhoramento genético pela redução do tempo entre gerações. Experimentos *in vitro* são úteis, pois as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *ex vitro* são conservadas no material vegetal *in vitro* (Torres et al., 1998). Dessa forma, os meios nutritivos baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro*.

Sementes de orquídeas podem ser classificadas como ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias dependendo da espécie. Entretanto, a conservação de sementes de orquídeas pelo método tradicional (-18°C e 5% de umidade) não é o indicado para longos períodos de tempo em bancos de germoplasma (Seaton et al., 2010).

Métodos de criopreservação permitem a conservação de recursos genéticos vegetais por longos períodos. Porém, é um processo bastante detalhado e oferece alguns riscos com relação ao acesso ao material vegetal e a retomada do desenvolvimento, quando não realizado de forma adequada (Pilatti et al., 2010).

Assim, o presente trabalho teve como principais objetivos iniciar o melhoramento genético de espécies de orquídeas com distribuição no Cerrado Brasileiro usando tanto o processo convencional de hibridização quanto métodos de biotecnologia vegetal por meio da cultura de tecidos vegetais e a indução a floração precoce *in vitro*. Além de contribuir de forma significativa para a preservação das espécies através da criopreservação, processo importante para o desenvolvimento de bancos de germoplasma e, conseqüentemente, também para o melhoramento, por preservar a variabilidade genética de espécies nativas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

A família Orchidaceae tem 26.567 espécies e 850 gêneros aproximadamente (Govaerts et al., 2011). É considerada a maior família das monocotiledôneas, pois constitui de 7 a 10% do total de fanerógamas (Souza & Lorenzi, 2008). São organismos extremamente especializados que ocupam diversos habitats e apresentam várias adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas (Silva et al., 2006). Estão presentes em diferentes ambientes, e encontram-se em maior diversidade nos trópicos, principalmente em regiões montanhosas (Faria et al., 2004b).

No Brasil, as orquídeas ocorrem em todas as formações vegetais. São perenes e herbáceas, podendo ser quanto ao hábito, epífitas, terrícolas, rupícolas, saxícolas, paludícolas, ou saprofíticas. O crescimento pode ser do tipo monopodial ou simpodial (Dressler, 1983). Apresentam inflorescências racemosas ou paniculadas, terminais ou laterais, algumas vezes reduzidas à flor. As flores usualmente são caracterizadas por três sépalas e três pétalas livres, sendo que a mediana é diferenciada em labelo, o qual comporta a coluna, estrutura na qual estão localizados a abertura do estigma e as polínias (Dressler, 1983).

O labelo atua como plataforma de pouso, guia mecânica e é o maior atrativo para os polinizadores, graças ao seu formato e cor, além da função de auxiliar a transferência das polínias de uma flor para outra (Faria et al., 2004a). As polínias são formadas por conjuntos de *pollinium*, os quais são compartimentos que guardam os grãos de pólen, são mais comuns dois a quatro *pollinium* por flor, mas existem muitas exceções (Kauth et al., 2008)

Após a fecundação as orquídeas formam frutos capsulares deiscentes formados por três fendas, que podem possuir milhares de sementes minúsculas sem endosperma. O tamanho das sementes pode variar de 0,05 a 6 mm dependendo da espécie, uma diferença de aproximadamente 120 vezes da maior para a menor. O peso varia de 0,31 a 24 µg, e as

cápsulas que contém as sementes também podem variar de tamanho dependendo da espécie, e podem conter de 20 a mais de 4 milhões de sementes em uma única cápsula (Arditti & Ghani, 2000).

Apesar da grande quantidade de sementes por cápsula, em ambiente natural poucas germinam, pois não possuem reservas nutritivas necessárias para iniciar a germinação (Yamazaki & Miyoshi, 2006). Dessa forma, torna-se necessária associação simbiótica das orquídeas com fungos micorrízicos, iniciada antes da germinação das sementes (Yam & Arditti, 2009).

Alguns gêneros possuem grande importância econômica para a floricultura, como por exemplo o gênero *Cattleya* (Nunes, 2009), *Oncidium* (Faria et al., 2004a), *Phalaenopsis* (Chugh et al., 2009), *Dendrobium* (Ferreira et al., 2006; Faria et al., 2013) e *Cymbidium* (Kostenyuk et al., 1999), que se destacam pela exuberante ornamentação e, provavelmente, parte da importância comercial destes gêneros está relacionada a existência de protocolos específicos para a multiplicação *in vitro*.

As peculiaridades de cada gênero ou espécie de orquídea são responsáveis por intensificar a importância econômica destas plantas. Espécies do gênero *Vanilla* são amplamente utilizadas para dar aroma e sabor a alimentos, os gêneros *Dendrobium* e *Gastrodia* incluem espécies de importância fitoterápica (Hossain, 2011).

2.1.1 Mercado

No mercado brasileiro de plantas ornamentais, as orquídeas ocupam o segundo lugar em área cultivada na categoria de flores em vaso, sendo o Estado de São Paulo responsável por 70% da produção nacional (Mesquita et al., 2007). As orquídeas são as principais espécies comercializadas com 20,55% de participação no mercado da floricultura considerando as vendas finais ao consumidor (Sebrae, 2010).

O faturamento do setor de floricultura em 2013 foi da ordem de R\$ 5,2 bilhões, considerando apenas o consumidor final, e representa um setor que tem mostrado crescimento econômico de 15% a 17% anualmente desde 2006 (IBRAFLOR, 2014). O crescimento constante deste setor exige o desenvolvimento de novas cultivares e híbridos constantemente (Takane et al., 2010).

O Brasil atua no mercado externo tanto como importador quanto como exportador de mudas de orquídeas. Mudas foram exportadas em 2013 principalmente para: EUA

(32,60%), Itália (29,68%), Holanda (16,35%), Japão (10,25%), Bélgica (5,74%) e Canadá (3,24%), além de outros dez destinos de menor expressividade de compras (Junqueira & Peetz, 2014).

Foram importadas mudas de orquídeas da Holanda (65,88%), Tailândia (29,45%), Japão (2,98%), EUA (1,57%) e Equador (0,12%). As importações de mudas de orquídeas somaram, em 2012, US\$ 8,870 milhões, com um aumento de 31,47% em relação ao ano anterior. Já em 2013, o valor de importação atingiu US\$ 10.739 milhões, superando em 21,07% os resultados do ano anterior (Junqueira & Peetz, 2014).

2.1.2 ORQUÍDEAS DO CERRADO

Dentre as espécies vegetais do Cerrado, a família Orchidaceae está entre as cinco famílias mais representativas. Os gêneros mais significativos são *Cattleya* Lindl., *Catasetum* Rich. Kunth., *Cleistes* Rich. Lindl., *Epidendrum* Lindl. e *Cyrtopodium* Rchb. (Menezes, 2000). O gênero *Cattleya* possui quatro espécies com bastante destaque no Estado Goiás e no Distrito Federal: *Cattleya bicolor* Lindl., *C. nobilior* Rchb., *C. walkeriana* Gardn. e *C. araguaiensis* Pabst. São espécies já bastante conhecidas no mercado, principalmente em exposições e no mercado de colecionadores.

O Cerrado possui ainda muitas espécies com potencial ornamental e econômico pouco explorado. São conhecidos 132 gêneros e 688 espécies com distribuição geográfica conhecida para o domínio Cerrado, sendo que destas 434 são endêmicas do Brasil (Barros, 2014). São espécies adaptadas a longos períodos de estiagem sendo resistentes à desidratação e situações de baixa umidade relativa do ar. Existindo também espécies que são induzidas a floração pelo efeito do fogo, em áreas submetidas a queimadas regularmente (Oliveira et al., 1996).

2.1.3 GÊNERO *COHNIELLA*

Cohniella é um gênero neotropical amplamente distribuído na América do Sul e Central. Este gênero apresenta plantas de médio a grande porte com pequenos pseudobulbos, folhas suculentas cônicas (Teretifolia) tingidas ou pontilhadas com vermelho ou roxo. São conhecidas 13 espécies sendo todas epífitas. O número cromossômico do grupo varia de $2n = 26$ a 36. Indivíduos de uma mesma espécie

apresentam geralmente grande variabilidade morfológica, vegetativa e floral. Este grupo pertencia inicialmente ao gênero *Oncidium* (Fernández-Concha, 2010) que posteriormente foi subdividido em *Oncidium*, *Cohniella*, *Lophiaris* e *Trichocentrum*.

Cohniella cepula (Hoffmanns.) Carnevali & G. Romero, espécie utilizada neste trabalho, possui ampla distribuição ao sul da Bacia Amazônica e em grande parte do bioma Cerrado. Possui grande variabilidade morfológica, assim como a maioria das espécies do gênero e, frequentemente, é confundida ou considerada sinônimo de *Cohniella cebolleta*. As espécies são diferenciadas em parte por sua distribuição geográfica e principalmente pela pequena diferença no comprimento da coluna e no ângulo formado entre a coluna e o labelo (Fernández-Concha et al., 2010).

A literatura sobre o cultivo comercial ou o cultivo *in vitro* sobre este gênero é rara. Estudos sobre este grupo estão no início e os efeitos de diferentes meios de cultura, reguladores de crescimento, e até mesmo o sistema reprodutivo das espécies deste gênero são desconhecidos.

2.1.4 GÊNERO *CYRTOPODIUM*

O gênero *Cyrtopodium* Rchb. f é composto por 50 espécies de origem neotropical distribuídas do sul da Florida até o norte da Argentina (Romero-González et al., 2008). O centro de diversidade do gênero é o Cerrado brasileiro, onde ocorrem pelo menos 29 espécies desse grupo (Batista et al., 2005).

As orquídeas do gênero *Cyrtopodium* possuem inflorescências geralmente vigorosas e em grande número, apresentam brácteas em sua base de tamanhos diferenciados, onduladas e coloridas (Pridgeon, 2006). Os pseudobulbos das espécies de *Cyrtopodium* podem ser fusiformes, cilíndrico-fusiformes ou cônico-ovóides e podem variar consideravelmente em tamanho desde pequenos com alguns centímetros ou medindo até mais de um metro de altura. As diversas espécies podem ser terrestres, saxícolas, rupícolas ou epífitas. São encontradas em ambientes secos, rochosos ou em solos encharcados (veredas no Cerrado). Apresentam folhas bastante longas multinervuradas, herbáceas e caducas (Dressler, 1981; Menezes, 2000).

Cyrtopodium saintlegerianum Rchb. f é uma espécie epífita típica da região Centro-Oeste, especialmente distribuída no Planalto Central brasileiro, mas com ampla distribuição geográfica no Brasil. Pode ser encontrada na metade superior de troncos de

palmeiras do gênero *Acrocomia* (macaúba) formando grandes touceiras de raízes pneumatóforas (Menezes, 2000).

Não há informação sobre cultivo ou multiplicação *in vivo* ou *in vitro* para *C. eugenii* ou *C. saintlegerianum* publicadas em artigos ou livros. O número cromossômico de *C. eugenii* é de $2n=44$ (Félix & Guerra, 2000), não consta na literatura o número cromossômico de *C. saintlegerianum* até o momento.

Cyrtopodium eugenii Rchb. f. & Warm. é encontrado principalmente em solos pedregosos nas formações rupestres e florescendo entre os meses de maio e setembro, durante a estação seca (Hall et al., 2013; Hall, 2009). Ainda segundo o mesmo autores as inflorescências de *C. eugenii* chegam a possuir mais de cinquenta flores que abrem sucessivamente e permanecem abertas por até vinte dias. Suas flores são amarelo-pálidas com máculas castanhas, e com o labelo amarelo-vivo, destacando-se na paisagem seca do cerrado, a única espécie apresentada como possível polinizador é *Centris (Trachina) fuscata*, uma espécie de abelha encontrada na Serra de Caldas Novas (Hall, 2009).

2.1.5 GÊNERO *EPIDENDRUM*

O gênero *Epidendrum* L., possui maior número de espécies dentro da família Orchidaceae com aproximadamente 1500 espécies conhecidas (Pinheiro et al., 2009b). Tem como principais características caules longos, eretos e finos, raramente intumescidos em pseudobulbos, folhas geralmente opostas e labelo fundido à coluna. No Brasil, são conhecidas 135 espécies e destas 83 são endêmicas (Barros et al., 2014).

Por ser um grupo muito grande apresenta problemas taxonômicos, existindo muitos sinônimos e espécies tão semelhantes que exigem biometria detalhada de estruturas florais para identificação das espécies (Pinheiro & Barros, 2007a). Outra opção é a utilização de ferramentas moleculares para a identificação taxonômica (Pessoa et al., 2012).

Este gênero é alvo de pesquisas relacionadas com o cultivo *in vitro*, principalmente, com a finalidade de compreender aspectos taxonômicos, morfológicos e cromossômicos (Assis, 2009). Apresenta alta variação morfológica contínua entre suas populações impulsionando o agronegócio florícola nacional, além de ser utilizada na produção de híbridos multifloros (Pinheiro & Barros, 2007b).

Epidendrum densiflorum Hook. pode atingir 93 cm de altura, possui caule não ramificado, cauloma não intumescido em pseudobulbo, folhas coriáceas, dísticas ao longo do caule, estreito-elípticas com base em bainha amplexicaule e ápice agudo. Produz inflorescência em panícula, terminal, multiflora, arqueada e congesta. As flores são geralmente alvo-esverdeadas, ressupinadas, pediceladas, ecalcaradas com pedicelo e ovário não encobertos pelas brácteas. O labelo é alvo, trilobado e plano. Esta é a espécie maior e mais robusta do gênero em Goiás, pode ser diferenciada das outras espécies do gênero na região pelo labelo trilobado com o lobo mediano bífido (Hall et al., 2013). Pode florescer o ano todo (Stancik et al., 2009).

Epidendrum secundum Jacq. está entre as espécies mais populares do gênero, é comercializada em mercados locais como flor de corte ou de vaso e é utilizada na produção de híbridos multifloros (Massaro et al., 2012). É uma espécie considerada altamente polimórfica, apresentando variações morfológicas contínuas ao longo das populações (Pinheiro & Barros, 2007b). Quanto ao número cromossômico é poliploide, com diferentes números cromossômicos: 28; 40; 50; 54; 56; 68 e 84 (Assis, 2009; Pinheiro et al., 2009b). As inflorescências apresentam de 16 a 57 cm de comprimento, do tipo corimbo ou racemo, possuindo de 12 a 80 flores, com pétalas e sépalas de coloração variável entre lilás, rosa, alva e ou amarelada (Stancik et al., 2009).

Epidendrum nocturnum Jacq. a planta adulta pode atingir 50 cm de altura, com caule simples, comprimido e espessura constante. Folhas dísticas, cartáceas, elípticas a lanceoladas, planas e ápice arredondado. Inflorescência com 1 cm de comprimento em racemo, apical, ereta e brácteas florais membranáceas. Produz de 1 a 6 flores por inflorescência, sépalas e pétalas geralmente creme-esverdeadas, labelo alvo, delgado, plano, trilobado. São citados diferentes números cromossômicos para a espécie: 40; 42; 45; 48; 80 e 85 (Felix & Guerra, 2010). Os mesmos autores observaram que quase sempre as plantas analisadas apresentavam frutos com botão floral ainda fechado, sugerindo cleistogamia.

2.1.6 GÊNERO *LOCKHARTIA*

O gênero *Lockhartia* agrupa 27 espécies epífitas de pequeno a médio porte com distribuição nas Américas do Sul e Central. No Brasil, existem 7 espécies sendo 4 endêmicas (Barros, 2014). A espécie *Lockhartia goyazensis* Rchb. f. é caracterizada por

possuir folhas complanadas, dísticas, imbricadas, triangulares e curtas, com cápsulas pequenas e inúmeras sementes minúsculas (Pessoa & Alves, 2012). Possui um calo maciço que cobre aproximadamente 50% do labelo, essa espécie é frequentemente confundida com *L. ludibunda* (Blanco, 2014).

2.2 POLINIZAÇÃO

A grande maioria das espécies de orquídeas é fecundada por insetos, principalmente abelhas, borboletas e mariposas. Quanto ao tipo de reprodução, as orquídeas podem ser autógamas ou alógamas, sendo as alógamas mais frequentes (Arditti, 1992; Jeffrey et al., 1970). São poucas as espécies que possuem mecanismos para realizar a autofecundação espontânea, como ocorre com a espécie *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Gonzalez-Diaz & Ackerman, 1988) e *Paphiopedilum parishii* (Chen et al., 2012).

Borboletas e mariposas estão entre os polinizadores mais eficientes para o gênero *Epidendrum*. Borboletas da subfamília Ithomiinae podem viver bastante tempo e percorrer grandes distâncias transportando polínias, atuando como eficientes polinizadores (Devries & Stiles, 1990). A polinização é o mecanismo primordial para a perpetuação das plantas superiores, e pode ser realizada de forma controlada pelo homem em determinados sistemas produtivos.

Em Orchidaceae, a ocorrência de autopolinização é evitada, principalmente, devido à existência de mecanismos florais, como a presença do rostelo. Em alguns casos, quando esses mecanismos florais são ineficientes ou inexistentes, barreiras genéticas, como a presença de alelos recessivos letais, podem evitar que frutos sejam formados por meio de autopolinização devido à ocorrência de abortamento (Johansen, 1990; Tremblay, 1992).

Para algumas espécies do gênero *Epidendrum*, podem haver barreiras físicas como descrito para a espécie *Epidendrum paniculatum* que possui o polinário maior que a abertura formada entre o labelo da flor e a coluna, quando turgido, dificultando a deposição sobre o estigma, sendo necessário que ocorra a desidratação das polínias (Pansarin, 2003). Esse mecanismo deve obrigar o polinizador a permanecer tempo suficiente impedido de visitar outras flores da mesma planta, possibilitando que se afaste em direção a outras plantas, evitando assim a autopolinização. Mecanismo semelhante foi observado em algumas espécies do gênero *Bulbophyllum* (Borba & Semir, 1999), em *Cirrhaea*

dependens (Rchb. f.), em *Stanhopea lietzei* (Regel) Schltr. e *Stanhopea insignis* Frost ex Hook. (Pansarin, 2003) e em *Trigonidium obtusum* Lindl. (Singer, 2003).

Muitos artigos fornecem protocolos eficientes para a germinação assimbiótica de orquídeas, entretanto, raramente são descritos os métodos de polinização para obtenção das cápsulas de sementes (Kauth et al., 2008). Um protocolo pouco detalhado para a polinização manual de orquídeas pode ser obtido no trabalho de Lo et al. (2004) e uma descrição bastante didática para polinização de orquídeas que possuem a estrutura reprodutiva (coluna) evidente pode ser obtida no artigo de Kauth et al. (2008). Para espécies de orquídeas que possuem a coluna fundida ao labelo, como ocorre no gênero *Epidendrum*, em orquídeas com flores muito pequenas (ex.: gênero *Lockartia*) ou que possuem a coluna não muito evidente, a polinização é uma tarefa complexa, principalmente para pessoas com pouca experiência.

A polinização e obtenção de cápsulas de orquídeas é técnica relativamente fácil quando aplicada a espécies de flores grandes e genealogia conhecida. Mas existem alguns problemas que podem dificultar o processo, como épocas de florescimento diferentes entre as espécies que se pretende cruzar, barreiras de incompatibilidade genética, e eventualmente, problemas mais danosos a produtores como a produção de híbridos mal formados que serão detectados após muitos anos, geralmente entre quatro a oito anos, durante a primeira floração (Faria et al., 2012).

A formação de cápsulas não é evidência absoluta de ocorrência da fecundação. É possível que sejam formadas cápsulas sem produção de sementes ou até mesmo a formação de sementes inviáveis. O pólen é uma fonte rica em hormônios, e a simples deposição sobre a superfície estigmática pode induzir o desenvolvimento do ovário na maioria das plantas (Stephenson, 1981).

Experimentos de polinização em orquídeas devem ser realizados com cautela, pois a polinização manual e produção de cápsulas demandam muita energia e podem representar diminuição no crescimento futuro. Para a espécie *Cypripedium acaule*, a reprodução representa alto custo na sobrevivência individual. Plantas que produzem cápsulas em anos consecutivos apresentam redução no crescimento, diminuição da área foliar e menor probabilidade de florescimento no ano seguinte (Primack & Hall, 1990).

2.3 MELHORAMENTO GENÉTICO DE ORQUÍDEAS

Compreender os mecanismos de polinização e fecundação são essenciais para a hibridização, pois o melhoramento genético de orquídeas é baseado principalmente no desenvolvimento de híbridos (Elliott, 2010). O gênero *Cattleya* está entre os primeiros submetidos a cruzamentos controlados para fins de melhoramento genético, e as variáveis consideradas no melhoramento geralmente são a cor, o tamanho da flor, textura, forma, quantidade de flores e armação da haste (Takane et al., 2010).

O melhoramento genético convencional para orquídeas é um processo longo e demorado, pois a maioria das espécies pode levar de 3 a 10 anos para atingir a idade adulta (Sudhakaran et al., 2006). Alguns trabalhos têm focado seus esforços em desenvolver métodos alternativos de melhoramento como a indução a poliploidia (Chen et al., 2009, 2010; Tang & Chen, 2007) e o desenvolvimento de orquídeas transgênicas (Chai et al., 2002; Hossain et al., 2013).

Os esforços para obter variedades mais precoces são constantes, como observado no desenvolvimento de novos híbridos em diversos trabalhos (Lone et al., 2008; Faria et al., 2009; Cardoso, 2010, 2012; Faria et al., 2011, 2013). O desenvolvimento de híbridos é o principal método de melhoramento usado para orquídeas (Arditti, 1984; Davidson, 1994; Kerbauy, 1995; Kao et al., 2001; Lone et al., 2008; Elliott, 2010).

O melhoramento genético de orquídeas para o aprimoramento das variáveis de interesse comercial como a resistência às doenças, estabilidade na propagação clonal, precocidade, controle da floração, a produção de aroma e a qualidade na apresentação geral das flores e partes vegetativas é realizado com maior intensidade em Taiwan, Japão, Estados Unidos, Alemanha e Holanda onde os esforços são constantes (Hsu et al., 2010; Hsu et al., 2011; Hsiao et al., 2011; Hossain et al., 2013). Vários trabalhos relacionados a transformação genética, mecanismos moleculares e fisiológicos também tem sido produzidos para auxiliar os programas de melhoramento (Hsiao et al., 2011).

Taiwan é considerado um dos países que mais produz e exporta orquídeas. O sucesso deste país é atribuído ao grande número de híbridos desenvolvidos, mais de 2600 registrados, e à estreita colaboração entre governo, indústria e academia, os países que mais importam orquídeas de Taiwan são Estados Unidos, Japão, Coreia, China e países da União Europeia (Hsu et al., 2010).

A maioria dos híbridos modernos de *Phalaenopsis* é representada por variedades tetraploides ($4x = 76$) e triploides ($3x = 57$) originados dos cruzamentos entre variedades diploides ($2n = 38$; $x = 19$) e tetraploide. A maioria das variedades triploides obtidas são inférteis entretanto, é necessário observar que muitos cruzamentos inter e intragenêricos falham independentemente da ploidia dos parentais (Tang & Chen, 2007; Hsu et al., 2010).

A maioria dos híbridos modernos de orquídeas perdeu seu aroma nos processos tradicionais de melhoramento. O estudo da herança dos caracteres relacionados ao aroma em orquídea é complexo e difícil (Hsiao et al., 2011).

Para formação de novos híbridos, vários fatores estão relacionados com o comportamento dos cromossomos durante o pareamento. Mesmo em espécies que apresentam o mesmo número cromossômico o tamanho do genoma pode variar consideravelmente, o que poderia dificultar a formação de híbridos (Kao et al., 2001). Outros fatores que interferem no pareamento são a morfologia dos cromossomos, a distribuição de sequências específicas do DNA, a presença de proteínas relacionadas ao DNA, o padrão de condensação da cromatina e a estrutura da heterocromatina (Schwarzacher, 2003).

O maior risco no desenvolvimento de novas cultivares em programas de melhoramento é a redução da variabilidade genética. A utilização constante apenas de materiais elite leva ao estreitamento da base genética dos novos híbridos. Este processo é observado nos híbridos modernos de *Phalaenopsis* (Belarmino & Mii, 2000). Também é possível constatar a redução da variabilidade em híbridos modernos quando comparados com população naturais das espécies que deram origem a estes híbridos (Gawenda et al., 2011).

2.4 FLORAÇÃO *IN VITRO*

Métodos clássicos de melhoramento genético de plantas apresentam limitações quando a espécie alvo apresenta longo tempo entre as gerações, dormência sazonal ou requer muitos anos para atingir a maturidade sexual (Confalonieri & Balestrazzi, 2003). O desenvolvimento de métodos para cultivo *in vitro*, indução floral e engenharia genética tem aumentado as possibilidades de desenvolver novos genótipos que apresentem resistência a pragas, tolerância a herbicidas, maiores taxas de crescimento, melhorias significativas em características desejadas ou redução de características indesejadas (Confalonieri &

Balestrazzi, 2003). O cultivo *in vitro* amplia as possibilidades de aplicação de métodos de melhoramento para qualquer espécie vegetal.

O aprimoramento e domínio dos métodos de indução floral prometem causar efeitos significativos em vários segmentos. Impactos significativos ocorreriam na indústria de produção de orquídeas, com o melhoramento genético pela seleção de características de importância econômica como tamanho, forma e cor, seleção de genótipos desejáveis para a propagação massal, potencial para comercialização de orquídeas miniaturas floridas para presente e decoração e a conquista do conhecimento sobre os mecanismos de desenvolvimento floral (Hossain et al., 2013; Sim et al., 2007).

Apesar da importância e do potencial econômico, o grau de conhecimento existente sobre a floração de orquídeas tropicais e sub-tropicais é ainda pequeno, e não é satisfatoriamente conclusivo. São escassos os estudos sobre a indução e o desenvolvimento floral de orquídeas tropicais, assim como abordagens científicas sobre qualidade das flores, indispensáveis para o aprimoramento das técnicas de cultivo e comercialização (Vaz & Kerbauy, 2008).

A floração está diretamente relacionada com os tecidos meristemáticos, responsáveis por fornecer novas células para que a planta produza órgãos durante toda a sua vida. A atividade contínua deste tipo de tecido depende de genes reguladores que equilibram a proliferação de células meristemáticas com as células recrutadas para a organogênese (Lemos, 2010). Durante o desenvolvimento floral, o equilíbrio é modificado para privilegiar a organogênese, causando o fim do meristema após produzir determinado número de estruturas florais (Sablowski, 2007).

Representada por uma sequência de etapas, a transição da fase juvenil para a fase adulta envolve a substituição do meristema vegetativo, seja apical ou lateral, por um reprodutivo, suficientemente apto a produzir flores ou inflorescências (Vaz & Kerbauy, 2000). Os estádios vegetativos, de transição pré-floral e floral do meristema são reconhecidos como fases de um processo contínuo, único e integrado, podendo-se distinguir duas etapas fisiologicamente distintas: a iniciação e o desenvolvimento floral (Bernier, 1988).

Mais recentemente, Teixeira da Silva et al. (2014a) dividiram de forma didática o fenômeno do florescimento *in vitro* em três estádios: 1º indução floral (mudança do meristema vegetativo para reprodutivo); 2º determinação floral (desenvolvimento do meristema floral) e 3º desenvolvimento do órgão floral (diferenciação do meristema

floral). Os autores defendem e esclarecem as vantagens das técnicas *in vitro* para estudar o florescimento permitindo o melhor controle do ambiente e dos componentes do meio envolvidos. Apesar desta divisão ser citada pela primeira vez em trabalhos para plantas *in vitro*, esta mesma divisão das fases do florescimento é utilizada à muito tempo dentro da fisiologia vegetal (Taiz e Zeiger, 2002).

A transição do estágio vegetativo para o floral estaria associada à aquisição de competência das células meristemáticas caulinares para uma nova via de desenvolvimento, através da ativação de vários genes, associados à percepção do estímulo indutor, à produção e ao transporte de sinais originados além do meristema, à sensibilidade deste meristema, à iniciação e ao desenvolvimento floral (Bernier et al., 1993; Mcdaniel, 1992, 1996; Yu & Goh, 2000).

Condições promotoras do crescimento reduziriam a duração do período juvenil, enquanto a fase adulta seria mais longa e estável (Thomas & Vince-Prue, 1997), principalmente para espécies de ciclo longo. Os eventos localizados especificamente no meristema caulinar, coletivamente denominados de evocação floral, conduzem às modificações em níveis mais elevados de organização, resultando na formação das flores (Bernier, 1988; Mcdaniel, 1992).

Existem três modelos hipotéticos propostos que tentam explicar a indução floral: 1ª - hipótese do florigeno (Chailakhyan, 1936); 2ª - diversidade nutricional e relação carbono/nitrogênio (C/N) (Sachs & Hackett, 1969) e 3ª - controle multifatorial (Bernier, 1988). Há também o conhecimento de inúmeros genes envolvidos na transição e desenvolvimento floral.

A hipótese da floração sobre o controle de uma substância específica produzida nas folhas, representa o conceito do florigeno elaborado por Chailakhyan (1936), baseado em experimentos de enxertia entre espécies compatíveis. Também foi proposto o envolvimento de uma substância transmissível, porém inibitória da floração, o anti-florigeno que interferiria sobre a síntese, o transporte e a ação do sinal floral. A floração, independente da diversidade dos processos indutores, seria promovida por meio do balanço de substâncias promotoras e inibitórias, regulado por meio de diferentes mecanismos nas plantas, ou dependente de alterações na sensibilidade do ápice a estes compostos. Entretanto, apesar do direcionamento de muitas pesquisas à identificação do florigeno, a existência de uma substância transmissível e universal não foi comprovada (Thomas & Vince-Prue, 1997; Levy & Dean, 1998).

A hipótese de diversidade nutricional, sugerida por Sachs & Hackett em 1969 e revista por estes autores em 1983, sugere que tratamentos indutores promoveriam alterações na partição de nutrientes entre fontes e drenos, responsáveis por uma maior disponibilidade de assimilados no ápice caulinar durante a indução floral (Bernier et al., 1993). A participação de açúcares e compostos nitrogenados na floração, ou seja, a relação carbono/nitrogênio, foi sugerida primeiramente em 1918 por J. Klebs e por Lang em 1965, como sendo fator importante para a indução floral (Thomas & Vince-Prue, 1997).

A hipótese sobre os fotoassimilados serem os únicos componentes importantes na transição floral foi rejeitada por Bernier e colaboradores em 1981, sugerindo que a floração estaria sob controle multifatorial (Bernier, 1988). Fatores químicos promotores e inibitórios, dentre estes os fotoassimilados e hormônios conhecidos, ou até mesmo o transporte de RNAm específicos seriam induzidos por uma ampla gama de estímulos ambientais e atuariam em conjunto nos vários órgãos da planta (Kim et al., 2001; Li et al., 2011).

A diversidade observada nas respostas florais seria resultante da limitação de fatores diferentes entre as espécies ou em condições ambientais particulares (Bernier, 1988). Alterações no potencial das membranas por meio de sinal floral de natureza bio-elétrica foram sugeridos como indutores da floração. Porém, a maioria dos pesquisadores considera que o sinal floral seja uma substância química móvel na planta e transmissível (Mcdaniel, 1996).

A floração *in vitro* foi parcialmente estabelecida para algumas espécies de plantas. Entre as espécies induzidas à floração *in vitro* estão: o arroz, que possui método bem controlado e já utilizado em programas de melhoramento genético em pequena escala (Cha-Um et al., 2012) e *Arabidopsis thaliana* (Ochatt & Sangwan, 2010). Para algumas espécies já induzidas à floração *in vitro*, ainda não há controle efetivo sobre o processo. Como exemplos, cana (Virupakshi et al., 2002) e algumas espécies de bambu (John et al., 1995; John & Nadgauda, 1999).

O primeiro trabalho de floração *in vitro* foi realizado por Knudson (1930). A pesquisa iniciou-se em 1920 com a germinação de um híbrido de *Laeliocattleya* que foi mantida até 1928, quando foi obtida a floração *in vitro* de uma planta já adulta. Knudson realizou essa pesquisa com o objetivo de derrubar a hipótese de que as orquídeas não seriam capazes de florescer na ausência de fungos micorrízicos (Chia et al., 1999).

Outro trabalho importante de indução floral *in vitro* de orquídeas foi de Kerbauy

(1984), usando segmentos da haste floral para clonagem de *Oncidium varicosum* “Baldin” obteve sucesso no florescimento *in vitro* levantando a hipótese de que a origem do explante e a quantidade de hormônios endógenos teriam grandes influências no procedimento de indução floral realizado. No entanto, não existem outros trabalhos que tenham testado esta hipótese.

Livingston (1962) foi o primeiro a relatar a floração *in vitro* após dois anos de cultivo de plantas de *Oncidium pusillum* (L.) Rchb.f. (sinônimo de *Psycmorchis pusilla* (L.) Dodson & Dressler, nome atualmente aceito: *Erycina pusilla* (L.) N.H. Williams & M.W. Chase). Porém, a durabilidade das flores foi de apenas dois dias no frasco. Esta espécie foi exaustivamente trabalhada por Vaz & Kerbauy (2000; 2008) e por Chiu et al. (2011). *Erycina pusilla* é uma espécie nativa do Brasil, e é considerada orquídea de difícil cultivo por orquidófilos nas regiões onde predominam os domínios Cerrado e Caatinga.

Os avanços nas técnicas de cultivo *in vitro* têm permitido a ampliação das pesquisas na área de floração de orquídeas (Yu & Goh, 2000). Apesar dos avanços, muitos dos trabalhos publicados são de difícil repetibilidade, pois, na maioria das vezes utilizam genótipos desenvolvidos regionalmente e não apresentam detalhes precisos sobre os métodos, equipamentos e produtos utilizados. Este fato foi duramente criticado por Arditti (2008).

Entre os sucessos obtidos com floração *in vitro*, poucos representam a precocidade drástica, ou seja, a obtenção de floração *in vitro* em tempo extremamente reduzido. Os melhores exemplos foram obtidos a partir da semente ou plântulas até a floração em aproximadamente seis meses para as seguintes espécies de ciclo longo: palmeira *Phoenix dactylifera* (Masmoudi-Allouche et al., 2010), bambus *Dendrocalmos brandisii* e *Dendrocalmos strictus* (John & Nadgauda, 1999), e orquídeas *Dendrobium nobile* (Sim et al., 2007; Hee et al., 2009; Wang et al., 2009) e *Cymbidium niveo-marginatum* (Kostenyuk et al., 1999).

O balanço adequado entre os macronutrientes é outro fator influente sobre o desenvolvimento floral. Para Kerbauy (1997) o sucesso do florescimento *in vitro* depende das condições adequadas do meio de cultura, principalmente, das proporções ideais dos sais minerais (micro e macronutrientes). Kostenyuk et al. (1999) apresentaram a floração de *Cymbidium* com meio de cultura MS modificado, com baixa concentração de nitrogênio e elevada concentração de potássio. Sim (2007) sugere a utilização de meios de cultura com duas fases, uma sólida e outra líquida, argumentado que esta constituição promove a

floração em orquídeas provavelmente devido ao estresse osmótico e mudança nos padrões de absorção dos nutrientes.

Em *Arabidopsis* foram identificadas quatro vias de controle da transição floral: o fotoperíodo, a vernalização, genes autônomos e a via de resposta ao ácido giberélico (GA₃) (Mouradov et al., 2002; Périlleux & Bernier, 2002; Komeda, 2004; Corbesier & Coupland, 2005; Zeevaart, et al., 2006; Ochatt & Sangwan, 2010). Essas vias são em geral reguladas pela atividade de genes repressores, interagindo sobre os genes responsáveis pela identidade do meristema floral, possivelmente através de modificações na metilação de DNA. Podem representar um mecanismo de inibição da floração em plantas com tamanho ou idade não adequados (Levy & Dean, 1998).

As análises gênicas têm sustentado a hipótese multifatorial da floração, estando a transição floral sob controle de vários genes (Levy & Dean, 1998). São conhecidos mais de 80 genes envolvidos nos diferentes estádios de transição e desenvolvimento floral, sugerindo processos aparentemente organizados de maneira hierárquica, coordenada e sequencial (Araki, 2001).

2.5 CRIOPRESERVAÇÃO

A conservação de plantas *ex situ* torna-se ainda mais difícil devido à existência de muitas espécies que possuem sementes que perdem a viabilidade ao serem desidratadas ou congeladas (sementes recalcitrantes). Esta característica impossibilita que sejam conservadas em bancos de sementes convencionais. É consenso que para a conservação destas espécies podem ser usadas as técnicas de cultura *in vitro* a médio prazo (1 a 5 anos) e a criopreservação para longo prazo (tempo indeterminado) (Reed, 2008; Ashmore et al., 2011; Reed et al., 2011).

A criopreservação representa o conjunto de técnicas para manter materiais biológicos preservados por longo prazo a temperaturas ultra baixas. São úteis para montar bancos de germoplasma auxiliando o melhoramento genético vegetal, assim como para conservar espécies ameaçadas de extinção (Reed, 2008). Para as espécies em extinção e para espécies selvagens sobre as quais não existem informações disponíveis, existe o problema adicional relacionado à quantidade limitada de material vegetal disponível para experimentação, tornando a aplicação de testes de criopreservação um desafio ainda maior (Sarasán et al., 2006).

Na preservação de materiais biológicos a -196°C em nitrogênio líquido todos os processos metabólicos são essencialmente paralisados e mantidos em estado latente, proporcionando conseqüentemente, preservação indefinida. Apesar do conceito relativamente simples, a técnica apresenta como desafio o controle da formação de cristais de gelo no interior das células, o que pode danificá-las (Reed, 2008).

Técnicas de cultura de tecidos e micropropagação *in vitro* são ferramentas úteis para muitas finalidades, e podem ser utilizadas de acordo com as necessidades de cada espécie. Podem ser utilizadas, por exemplo, para obter material vegetal mais adequado para a criopreservação (ex.: meristemas, protocormos, embriões somáticos, culturas de calos) (Reed, 2001; Sen-Rong & Ming-Hua, 2012). Para espécies que possuem sementes estéreis ou não disponíveis, ou para espécies muito raras existem tão poucos indivíduos que a retirada de uma única planta da população pode representar um evento negativo. A multiplicação *in vitro* de partes da planta representa técnica menos invasiva e permite amostragem eficiente de grande número de plantas mesmo em populações pequenas, quando as sementes não estão disponíveis (Reed et al., 2011).

Muitas regiões ricas em biodiversidade (*hotspots*) ao redor do mundo estão em risco, fato que tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas sobre conservação de plantas *in vitro* e criopreservação em muitos países, como Austrália (Ashmore et al. 2011), Malásia (Normah & Makeen, 2008) e África do Sul (Berjak et al., 2010). Mais de 50% de todas as plantas no mundo são endêmicas dos 34 *hotspots* globais, que representavam 15,7% da superfície continental e que atualmente estão reduzidas a 2,3% (IUCN, 2010). No Brasil, a grande maioria das espécies de orquídeas tem sua perpetuação ameaçada devido às coletas predatórias e perdas de habitats, sendo as espécies de maior interesse popular as mais ameaçadas como ocorre com a orquídea *Cattleya walkeriana* (Faria et al., 2002).

A criopreservação permite aumentar a eficiência dos bancos de germoplasma que são importantes para programas de melhoramento genético por conservar em espaço reduzido e com menor custo grande quantidade de material elite, pré-melhorado e selvagem (Bowes, 1999). Para orquídeas, os bancos de germoplasma são fundamentais devido à pouca durabilidade das sementes, principalmente com relação as espécies de orquídeas de regiões tropicais (Neto & Custódio, 2005). Além disso, o tamanho diminuto das sementes, ou dos protocormos, torna-se uma vantagem na criopreservação, pois

possibilita o armazenamento de quantidades ainda maiores de material vegetal quando comparado a outras culturas.

O método de criopreservação mais utilizado para a maioria das plantas é a vitrificação, e é testado com frequência para sementes e tecidos de orquídeas. Neste método o material vegetal é imerso em solução crioprotetora por determinado tempo e em seguida é submetido ao congelamento rápido em nitrogênio líquido (Reed, 2008).

O método convencional para conservação de sementes não é o indicado para orquídeas para longos períodos de tempo em bancos de germoplasma (Seaton et al., 2010). Sementes da orquídea *Phaius tankervilleae* armazenadas a 5% de umidade e a 4°C perdem drasticamente a viabilidade após seis meses (Hirano et al., 2009). Entretanto, a família Orchidaceae possui grande número de espécies e enorme diversidade, por isso qualquer generalização é arriscada.

Os testes para controlar o congelamento celular de forma adequada podem ser feitos utilizando substâncias consideradas crioprotetoras, antes do congelamento do tecido vegetal. As soluções crioprotetoras mais testadas atualmente são compostas por glicerol, sacarose, manitol, prolinas e polietilenoglicol (Gonzalez-Arno et al., 2008) e ainda a glucose e meso-inositol (Huehne & Bhinija, 2012). São utilizadas também substâncias como o phloroglucinol (Vendrame & Faria, 2011) e a solução de vitrificação PVS2 (Sakai et al., 1990), que apesar da toxidez, são utilizadas na criopreservação por impedirem a formação de cristais de gelo capazes de perfurar e danificar as células (Reed, 2008).

A solução de vitrificação PVS2 é a utilizada com maior frequência, e apresenta resultados variados dependendo da espécie e se aplicado em sementes ou tecidos jovens. Em algumas espécies de orquídeas quando as sementes foram tratadas com PVS2 e congeladas em nitrogênio líquido a viabilidade se manteve próxima do valor de viabilidade das sementes não tratadas antes do congelamento com para sete espécies de *Cymbidium* testadas por Hirano et al. (2011) e para sementes de *Vanda coerulea* (Thammasiri & Soamkul, 2007). A viabilidade das sementes destas espécies foi completamente perdida após congelamento sem o uso do crioprotetor PVS2 (Carvalho, 2006).

A solução de phloroglucinol foi utilizada na concentração de 1% junto a solução de PVS2 tanto para criopreservação de protocormos de *Dendrobium nobile* proporcionando a sobrevivência de 68% do material (Vendrame & Faria, 2011) quanto para sementes (Galdiano et al., 2013).

Além da redução no espaço de armazenamento de material e o tempo de preservação indeterminado, há vantagens da criopreservação relacionadas à redução nos custos associados à manutenção de coleções *in vivo*. O custo de manutenção do germoplasma criopreservado é limitado ao abastecimento regular e seguro de nitrogênio líquido. Nos Estados Unidos, o levantamento dos custos de conservação levou a conclusão de que a manutenção de um acesso de germoplasma de frutíferas mantido em campo custaria anualmente 900 dólares, quando armazenado *in vitro* sob crescimento mínimo 23 dólares e apenas 1 dólar quando criopreservado (Engelmann, 2010). Entretanto não existem cálculos publicados até o momento quanto ao custo inicial da implantação de banco de germoplasma criopreservados.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKI, T. Transition from vegetative to reproductive phase. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 63–68, 2001.

ARDITTI, J. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 89, n. 4, p. 359–381, 1984.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: Wiley-Blackwell, 1992, 500p.

ARDITTI, J. **Micropropagation of orchids**. Oxford, Blackwell Publishing. 2008, 756p.

ARDITTI, J.; GHANI, A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, Lancaster, v. 145, n. 110, p. 367–421, 2000.

ASHMORE, S. E.; HAMILTON, K. N.; OFFORD, C. A. Conservation technologies for safeguarding and restoring threatened flora: case studies from Eastern Australia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Chesterfield, v. 47, n. 1, p. 99–109, 2011.

ASSIS, F. N. M. DE. **Variação numérica e evolução cariotípica em *Epidendrum* L. (OCHIDACEAE: EPIDENDROIDEAE)**. 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal da Paraíba - UFPb, Areia, 2009.

BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. **Orchidaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Disponível em:
<<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do?lingua=en>>.
Acessado em 10 de outubro de 2014.

BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. D. B.; PELLIZZARO, K. F. Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guará, DF, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 19, n. 2, p. 221–232, 2005.

BELARMINO, M. M.; MII, M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. **Plant Cell Reports**, Spring, v. 19, n. 5, p. 435–442, 2000.

BERJAK, P.; BARTELS, P.; BENSON, E. E.; HARDING, K.; MYCOCK, D. J.; PAMMENTER, N. W.; WESLEY-SMITH, J. Cryoconservation of South African plant genetic diversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 47, n. 1, p. 65–81, 2010.

BERNIER, G. The control of floral evocation and morphogenesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 175–219, 1988.

BERNIER, G.; HAVELANGE, A.; HOUSSA, C.; PETITJEAN, A.; LEJEUNE, P. Physiological signs that induce flowering. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 5, n. 1, p. 1147–1155, 1993.

BLANCO, M. Four new species of *Lockhartia* (Orchidaceae, Oncidiinae). **Phytotaxa**, Auckland, v. 162, n. 3, p. 134–146, 2014.

BORBA, E. L.; SEMIR, J. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: A different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 217, n. 3-4, p. 197–204, 1999.

BOWES, B. G. **A Colour Atlas of plant propagation and conservation**. Londres: Manson publishing, 1999. p. 225.

CARDOSO, J. C. Laeliocattleya 'Brazilian Girl Rosa': cultivar de orquídea para cultivo em vaso. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 28, n. 1, p. 378–381, 2010.

CARDOSO, J. C. *Dendrobium* "Brazilian Fire 101" - New option of color of flowers for the orchid market. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, n. 3, p. 561–564, 2012.

CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006. 69 f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, 2006.

CHAI, M. et al. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 213–224, 2002.

CHAILAKHYAN, M. K. Internal factors of plant flowering. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–36, 1936.

CHA-UM, S.; SAMPHUMPHUANG, T.; KIRDMANEE, C. *In vitro* flowering of indica rice (*Oryza sativa* L. spp. indica). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 48, n. 2, p. 259–264, 2012.

CHEN, L.; LIU, K.; XIAO, X.; TSAI, W.; HSIAO, Y.; HUANG, J.; LIU, Z. The anther steps onto the stigma for self-fertilization in a slipper orchid. **PloS one**, São Francisco, v. 7, n. 5, p. 37478, 2012.

CHEN, W. H.; TANG, C. Y.; KAO, Y. L. Ploidy doubling by in vitro culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 229–238, 2009.

CHEN, W.; TANG, C.; KAO, Y. Polyploidy and variety improvement of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 878, n. 1, p. 133–138, 2010.

CHIA, T. F.; ARDITTI, J.; SEGEREN, M. I.; HEW, C. S. Review: *in vitro* flowering of orchids. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 14, n. 1, p. 60–76, 1999.

CHIU, Y. T.; Lin, C. S.; Chang, C. In vitro fruiting and seed production in *Erycina pusilla* (L.) NH Williams and MW Chase. **Propagation of Ornamental Plants**, Sofia, v. 11, n. 3, p. 131-136, 2011.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v. 122, n. 4, p. 507–520, 2009.

CONFALONIERI, M.; BALESTRAZZI, A. *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 109–138, 2003.

DAVIDSON, B. *Dendrobium* breeding trends. **American Orchid Society Bulletin**, Coral Gables v. 63, p. 638–645, 1994.

DEVRIES, P. J.; STILES, F. G. Attraction of pyrrolizidine alkaloid seeking Lepidoptera to *Epidendrum paniculatum* orchids. **Biotropica**, Malden, v. 22, n. 3, p. 290, 1990.

DRESSLER, R. L. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press, 1981, 332 p.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. p. 314

ELLIOTT, B. The Royal Horticultural Society and its orchids: a social history. **The Royal Horticultural Society**, London, v. 2, n. 1, p. 3–53, 2010.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 47, n. 1, p. 5–16, 2010.

FARIA, R. T. DE; 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.

FARIA, R. T. DE; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. DO V. R.; MÜLLER, C. *In vitro Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 22, n. 4, p. 780–783, 2004a.

FARIA, R. T. DE; VICENTE, A. P. R. M.; COSTA, T. M. M.; FONSECA, I.C.B.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L. S. A. Seleção de genótipos de *Dendrobium* (Orchidaceae) na fase de propagação in vitro. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 309–314, 2004b.

FARIA, R. T. DE; TAKAHASHI, L. S. A.; LONE, A. B.; BASBOSA, C. M.; TAKAHASHI, A.; SILVA, G. L. UEL 7: nova cultivar de *Dendrobium*. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 29, n. 3, p. 441–442, 2011.

FARIA, R. T. DE; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecnas, 2012. p. 124.

FARIA, R. T. DE; TAKAHASHI, L. S.; LONE, A. B. UEL 6: nova cultivar de *Dendrobium*. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 27, n. 1, p. 114–115, mar. 2009.

FARIA, R. T. DE; TAKAHASHI, L. S. A.; LONE, A. B.; SOUZA, G. R. B.; SILVA, G. L.; HOSHINO, R. T. UEL8: nova cultivar de *Dendrobium*. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 31, n. 3, p. 509–511, 2013.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 163, n. 2, p. 234–278, 2010.

FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto v. 23, n. 4, p. 957–978, 2000.

FERNÁNDEZ-CONCHA, G. C.; IX, W. R. C.; Narváez, R. B.; Romero-González, G. A. A synopsis of *Cohniella* (Orchidaceae, Oncidiinae). **Brittonia**, New York, v. 62, n. 2, p. 153–177, 2010.

FERREIRA, W. D.; KERBAUY, G. B.; COSTA, A. P. P. Micropropagation and genetic stability of a *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Chesterfield, v. 42, n. 6, p. 568–571, 2006.

GALDIANO, R. F.; MACEDO LEMOS, E. G.; VENDRAME, W. A. Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 139–148, 2013.

GAWENDA, I.; SCHRÖDER-LORENZ, A.; DEBENER, T. Markers for ornamental traits in *Phalaenopsis* orchids: population structure, linkage disequilibrium and association mapping. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 305–316, 2011.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 1–13, 2008.

GONZALEZ-DIAZ, D.; ACKERMAN, J. D. Pollination, fruit set and seed production in the orchid *Oeceoclades maculata*. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 3, n. 3, p. 150–155, 1988.

GOVAERTS, R.; KRATOCHVIL, K.; GERLANCH, G.; CARR, G.; ALRICH, P.; PRIDGEON, A. M.; CAMPACCI, M. A.; HOLLAND BAPTISTA, D.; CRIBB, P.; GEORGE, A.; KREUZ, K.; WOOD, J.J.; **World checklist of Orchidaceae 2011**. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/monocots/>>. Acesso em: 8 jun. 2014.

HALL, C. F. Orchidaceae do Parque estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás, Brasil. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 6, n. 1, p. 87–88, 2009.

HALL, C. F.; KLEIN, V. L. G.; BARROS, F. DE. Orchidaceae no município de Caldas Novas, Goiás, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 4, p. 685–704, 2013.

HEE, K. H.; YEOH, H. Y.; LOH, C. S. *In vitro* flowering and *in vitro* pollination: methods that will benefit the orchid industry. **Proceedings of NIOC**, Nagoya, v.1, n.1, p. 20-24, 2009.

HIRANO, T.; GODO, T.; MIYOSHI, K.; ISHIKAWA, K.; ISHIKAWA, M.; MII, M. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 3, n. 1, p. 103–109, 2009.

HIRANO, T., YUKAWA, T.; MIYOSHI, K.; MII, M. Wide applicability of cryopreservation with vitrification method for seeds of some *Cymbidium* species. **Plant Biotechnology**, Nara, v. 28, n. 1, p. 99–102, 2011.

HOSOMI, S. T.; CUSTÓDIO, C. C.; MACHADO-NETO, N. B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Chesterfield, v. 48, n. 1, p. 127–136, 2012.

HOSSAIN, M. M. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances - An overview. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 102–40, 2011.

HOSSAIN, M. M.; KANT, R.; VAN, P. T.; WINARTO, B.; ZENG, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The application of Biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 32, n. 2, p. 69–139, 2013.

HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; PATHAK, P. Cost effective protocol for *in vitro* mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. a medicinally important orchid. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 9, n. 6, p. 444–453, 2009.

HSIAO, Y.; PAN, Z.; HSU, C.; YANG, Y.; HSU, Y.; CHUANG, Y.; SHIH, H.; CHEN, W.; TSAI, W.; CHEN, H. Research on orchid biology and biotechnology. **Plant & cell physiology**, Oxford, v. 52, n. 9, p. 1467–86, 2011.

HSU, C. C.; CHUNG, Y.; CHEN, T.; LEE, Y.; KUO, Y.; TSAI, W.; HSIAO, Y.; CHEN, Y.; WU, W.; CHEN, H. An overview of the *Phalaenopsis* orchid genome through BAC end sequence analysis. **BMC plant biology**, London v. 11, n. 1, p. 3, 2011.

HSU, S.; CHUANG, H.-T.; SHEN, T.-M. Breeding Barriers in Red *Phalaenopsis* Orchids. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 878, n. 29, p. 145–152, 2010.

HUEHNE, P. S.; BHINIJA, K. Application of cryoprotectants to improve low temperature storage survival of orchid seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 186–193, 2012.

IBRAFLOR, I. B. DE F. **Informativo: dados do mercado de flores e plantas ornamentais**. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=223>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

IUCN. **IUCN Red List of Endangered Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 8 maio 2012.

IX, W. C.; FERNÁNDEZ-CONCHA, G. C. A revision of *Cohniella* Pfitzer (Orchidaceae) in Mexico. **Journal of the Torrey Botanical Society**, Lawrence, v. 137, n. 2, p. 180–213, 2010.

JEFFREY, D. C.; ARDITTI, J.; KOOPOWITZ, H. Sugar content in floral and extra floral exudates of orchids: pollination myrmecology and chemotaxonomy implication. **New Phytologist**, Lancaster, v. 69, n. 1, p. 187–195, 1970.

JOHANSEN, B. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 103, n. 2, p. 165–196, 1990.

JOHN, C. K.; NADGAUDA, R. S. Review in vitro-induced flowering in bamboos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 35, n. 2, p. 309–315, 1999.

JOHN, C. K.; NADGAUDA, R. S.; MASCARENHAS, A. F. Floral biology and breeding behaviour in *Bambusa arundinacea*. **Journal of Cytology and Genetics**, New Delhi, v. 30, p. 101–107, 1995.

JOHNSON, T. R.; KANE, M. E. Asymbiotic germination of ornamental Vanda: *in vitro* germination and development of three hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 251–261, 2007.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, S. Balanço do comércio exterior da floricultura Brasileira 2013. **Hortica**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2014.

KAO, Y.; CHANG, S.; LIN, T.; HSIEH, C.; CHEN, Y. H.; CHEN, W. H.; CHEN, C. C. Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. **Annals of Botany**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 387–395, 2001.

KAUTH, P. J.; JOHNSON, T. R.; STEWART, S. L.; KANE, M. E. A classroom exercise in hand pollination and *in vitro* asymbiotic orchid seed germination. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 93, n. 2, p. 223–230, 2008.

KERBAUY, G. B. *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum* mericlones (Orchidaceae). **Plant Science Letters**, Clare, v. 35, n. 1, p. 73–75, 1984.

KERBAUY, G. B. Biofábrica de orquídeas. In: GERALD, L. T. S. (Ed.). **Biofábrica produção industrial de plantas “in vitro”**. São Carlos: UFSCar, 1995. p. 22–24.

KNUDSON, L. Flower Production by Orchid Grown Non-Symbiotically. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 89, n. 2, p. 192–199, 1930.

KOSTENYUK, I.; OH, B. J.; SO, I. S. Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak *in vitro*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 1, p. 1–5, 1999.

LEMO, E. E. P. Organogênese. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. v. 1, p. 103–128.

LEVY, Y.; DEAN, C. The transition to flowering. **The Plant cell**, Waterbury, v. 10, n. 12, p. 1973–90, 1998.

LIVINGSTON, R. B. *Oncidium pusillum* - Blooming in flask! **American Orchid Society Bulletin**, Coral Gables, v. 31, p. 1007, 1962.

LO, S.; NALAWADE, S. M.; KUO, C.; CHEN, C.; TSAY, H. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino —A medicinally important orchid. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 5, p. 528–535, 2004.

LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; FARIA, R. T. DE; TAKAHASHI, L. S. A.; FONSECA, I. C. B. Seleção de genótipos de *Dendrobium phalaenopsis* (Orchidaceae) nas fases de propagação *in vitro* e aclimatização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2008.

MASMOUDI-ALLOUCHE, F.; MEZIOU, B.; KRIAÂ, W.; GARGOURI-BOUZID, R.; DRIRA, N. *In vitro* flowering induction in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 29, n. 1, p. 35–43, 2010.

MASSARO, R.; CORDEIRO, G. M.; SOUZA-LEAL, T. DE; PEDROSO-DE-MORAES, C. Desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. em meios de cultivo simplificados. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Brasília, v. 5, n. 2, p. 337–351, 2012.

MCDANIEL, C. N. Induction and determination: developmental concepts. **Flowering Newsletter**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 3–6, 1992.

MCDANIEL, C. N. Developmental physiology of floral initiation in *Nicotiana tabacum* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 465–475, 1996.

- MENEZES, L. C. **Genus *Cyrtopodium*: Brazilian species**. Brasília: IBAMA, 2000, 208 p.
- MESQUITA, E. E.; FONTES, A. A.; RODRIGUES, D. T.; GROSSI, J. A. S.; ALVAREZ, V. V. H. Crescimento de *Epidendrum ibaguensis* e *Laelia purpurata* em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas v. 13, n. 1, p. 1813–1816, 2007.
- NETO, N. B. M.; CUSTÓDIO, C. C. Orchid conservation through Seed Banking: ins and outs. **Selbyana**, Sarasota, v. 26, n. 1, p. 229–235, 2005.
- NORMAH, M. N.; MAKEEN, A. M. Cryopreservation of excised embryos and embryonic axes. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York: Springer, 2008. p. 211–240.
- NUNES, C. M. C. **Fenologia, Biologia floral e Germinação in vitro de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. F. Warm. (ORCHIDACEAE)**. 2009, 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, 2009.
- OCHATT, S. J.; SANGWAN, R. S. *In vitro* Flowering and Seed Set: Acceleration of Generation Cycles. In: DAVEY, M. R.; PAUL ANTHONY (Eds.). **Plant Cell Culture**. Londres: Wiley-Blackwell, 2010. p. 358.
- OLIVEIRA, R. S.; BATISTA, J. A. N.; PROENÇA, C. E. B.; BIANCHETTI, L. Efeito do fogo na floração de espécies de Orchidaceae em Cerrado. In: MIRANDA, H. S.; DIAS, B. F. S.; SAITO, C. H. (Eds.). **Impacto de queimadas em área de cerrado e restinga**. Brasília: Universidade de Brasília, 1996. p. 61–67.
- PANSARIN, E. R. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 203–211, 2003.
- PESSOA, E.; ALVES, M. *Lockhartia viruensis* (Orchidaceae-Oncidiinae), a new species from Roraima state, Brazilian Amazonia region. **Brittonia**, New York, v. 64, n. 2, p. 162–164, 2012.
- PESSOA, E. M.; ALVES, M.; ALVES-ARAÚJO, A.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Integrating different tools to disentangle species complexes : A case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). **Taxon**, Bratislavia, v. 61, n. p. 721–734, 2012.
- PILATTI, F. K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E. E.; VIANA, A. M. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 47, n. 1, p. 82–98, 2010.
- PINHEIRO, F.; PALMA-SILVA, C.; BARROS, F.; FÉLIX, L. P.; LEXER, C.; COZZOLINO, S.; FAY, M. F. Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*, and cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae). **Conservation Genetics Resources**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 505–511, 2009a.

PINHEIRO, F.; KOEHLER, S.; CORRÊA, A. M.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; BARROS, F. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 283, n. 3-4, p. 165–177, 2009b.

PINHEIRO, F.; BARROS, F. DE. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 563–570, 2007a.

PINHEIRO, F.; BARROS, F. DE. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. **Nordic Journal of Botany**, Denmark, v. 25, n. 1, p. 129–136, 2007b.

PRIDGEON, A. M. **The illustrated encyclopedic of orchids**. New York: Oxford University Press, 2006, 304 p.

PRIMACK, R. B.; HALL, P. Costs of Reproduction in the Pink Lady's Slipper Orchid: A Four-Year Experimental Study. **The American Naturalist**, Chicago, v. 136, n. 5, p. 638, 1990.

REED, B. M. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York: Springer, 2008, p. 532.

REED, B. M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. **Cryoletters**, v. 22, n. 1, p. 97–104, 2001.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 47, n. 1, p. 1–4, 24, 2011.

ROMERO-GONZÁLEZ, G. A.; BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. D. B. A Synopsis of the Genus *Cyrtopodium* (Catasetinae: Orchidaceae). **Harvard Papers in Botany**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 189–206, 2008.

SABLOWSKI, R. Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 899–907, 2007.

SACHS, R. M.; HACKETT, W. Control of vegetative and reproductive development in seed plants. **Horticultural science**, Prague, v. 4, p. 103–107, 1969.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, n. 1, p. 30–33, 1990.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Ceres, v. 59, n. 2, p. 185–191, 2012.

SCHWARZACHER, T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent in situ hybridization data in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 380, p. 11–23, 2003.

SEATON, P. T.; HU, H.; PERNER, H.; PRITCHARD, H. W. Ex Situ Conservation of Orchids in a Warming World. **The Botanical Review**, New York, v. 76, n. 2, p. 193–203, 2010.

SEBRAE. **Série Manuais Técnicos Instrucionais para o Setor de Floricultura e Plantas Ornamentais envasadas**. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/146CC263F3C433F2832577C90061FF98/\\$File/NT0004516E.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/146CC263F3C433F2832577C90061FF98/$File/NT0004516E.pdf)>. Acesso: 8 de maio de 2012.

SEN-RONG, H.; MING-HUA, Y. A simple and efficient protocol for cryopreservation of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 287–296, 2012.

SILVA, I. V. DA; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A.; EUCLYDES, R. M. A. Estratégias anatômicas foliares de treze espécies de Orchidaceae ocorrentes em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 20, n. 3, p. 741–750, 2006.

SIM, G. G. E.; LOH, C. S. C.; GOH, C. C. J. High frequency early in vitro flowering of *Dendrobium* Madame Thong-In (Orchidaceae). **Plant cell reports**, New York, v. 26, n. 4, p. 383–93, 2007.

SINGER, R. B. Orchid pollination: recent developments from Brazil. **Lankesteriana**, Costa Rica, v. 7, n. 1, p. 111–114, 2003.

SOUZA, V.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 768 p.

STANCIK, J. F.; GOLDENBERG, R.; BARROS, F. DE. O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 864–880, 2009.

STEPHENSON, A. G. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 12, n. 1, p. 253–279, 1981.

SUDHAKARAN, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J.; SREERAMANAN, S. Test tube bouquets - *in vitro* flowering. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (Ed.). **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues**. 1st vol. II ed. Isle-Worth: Global Science Books, 2006. p. 336–346.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of botany**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 543–56, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3ed., Ed. Pub. Sinauer, 2002, 624 p.

TAKANE, R. J.; YAHAGISAWA, S. S.; PIVETTA, K. F. L. **Cultivo Moderno de Orquídeas Cattleya e seus híbridos**. Fortaleza, 2010, 179 p.

TAN, B. C.; CHIN, C. F.; ALDERSON, P. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 457–463, 2010.

TANG, C. Y.; CHEN, W. H. Breeding and development of new varieties in Phalaenopsis. In: CHEN, W. H.; CHEN, H. H. (Eds.). **Orchid Biotechnology**. Singapore: World Scientific, 2007. p. 1–22.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; KERBAUY, G. B.; ZENG, S.; CHEN, Z.; DUAN, J. *In vitro* flowering of orchids. **Critical reviews in biotechnology**, Philadelphia, v. 34, n. 1, p. 56–76, 2014.

THAMMASIRI, K.; SOAMKUL, L. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by vitrification. **Science Asia**, Bangkok, v. 33, n. 2, p. 223–227, 2007.

THOMAS, B.; VINCE-PRUE, D. The physiology of photoperiodic floral induction. In: THOMAS, B.; VINCE-PRUE, D. (Eds.). **Photoperiodism in Plants**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 143–179.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.2, Brasília: Embrapa, 1998, 864 p.

TREMBLAY, R. L. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, n. 3, p. 642–650, 1992.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B. *In vitro* precocious orchid flowering : A strategy for basic research and commercial approaches. **Global Science**, v. 5, n. 41, p. 421–426, 2008.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B. Effects of mineral nutrients on *in vitro* growth and flower formation of *Psychomorphis pusilla* (Orchidaceae). **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 520, p. 149–156, 2000.

VENDRAME, W. A.; FARIA, R. T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 131–135, 2011.

VIJ, S. P.; PATHAK, P. Orchid Diversity: Conservation and Utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, New Delhi, v. 82, n. 2, p. 295–300, 2012.

VIRUPAKSHI, S.; MANJUNATHA, B. R.; NAIK, G. R. *In vitro* flower induction in callus from a juvenile explant of sugarcane, *Saccharum officinarum* L., Var. CoC 671. **Current Science**, Bengaluru, v. 83, n. 10, p. 1195–1197, 2002.

WANG, Z. H.; WANG, L.; YE, Q. S. High frequency early flowering from *in vitro* seedlings of *Dendrobium nobile*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 328–331, 2009.

YAM, T. W.; ARDITTI, J. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 3, n. 1, p. 1–56, 2009.

YAMAZAKI, J.; MIYOSHI, K. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). **Annals of botany**, Oxford, v. 98, n. 6, p. 1197–206, 2006.

YU, H.; GOH, C. J. Differential gene expression during floral transition in an orchid hybrid *Dendrobium* Madame Thong-In. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 9, p. 926–931, 2000.

3 COMPATIBILIDADE INTRA E INTERESPECÍFICA NA POLINIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS DO CERRADO

RESUMO

A grande maioria das espécies de orquídeas é polinizada por insetos, principalmente abelhas, borboletas e mariposas. Quanto ao tipo de reprodução as orquídeas podem ser autógamas ou alógamas, sendo as alógamas mais frequentes. Apesar desta afirmação ser considerada para toda a família Orchidaceae, informações sobre o tipo de reprodução não são conhecidas para a maioria das espécies. O objetivo foi avaliar a compatibilidade intraespecífica para sete espécies: *Cohniella cepula*, *Cyrtopodium eugenii*, *Cyrtopodium saintlegerianum*, *Epidendrum densiflorum*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum* e *Lockhartia goyazensis* e identificar os potenciais cruzamentos interespecíficos dentro dos gêneros *Cyrtopodium* e *Epidendrum*. Foram utilizados três tratamentos: autopolinização manual, autopolinização espontânea e polinização cruzada. Entre as sete espécies de orquídeas estudadas apenas três demonstraram ser autocompatíveis. O número de cápsulas formadas nas espécies autocompatíveis foi semelhante tanto para autopolinizações quanto para polinizações cruzadas. Nas espécies autoincompatíveis, *C. cepula*, *C. eugenii*, *C. saintlegerianum* e *E. densiflorum* a autopolinização e fecundação foram prevenidas através de abortamentos de flores entre 5 a 15 dias após a autopolinização ou abortamentos de frutos, o mesmo ocorreu com os cruzamentos interespecíficos incompatíveis. Em *C. saintlegerianum* cápsulas completamente formadas após a autopolinização, ou após as polinizações com polínias de *C. eugenii*, foram abortadas após quatro meses contendo apenas palha ou estavam completamente vazias. Nos cruzamentos recíprocos interespecíficos apenas *C. eugenii* e *E. nocturnum* produziram sementes viáveis. Nenhuma das plantas produziu cápsulas espontaneamente, demonstrando a importância dos polinizadores naturais e da polinização manual para a perpetuação das espécies.

Palavras-chave: Orchidaceae, compatibilidade, alogamia, autogamia, cruzamentos, híbridos

COMPATIBILITY INTRA AND INTERESPECIFIC IN CERRADO ORCHIDS POLLINATION

ABSTRACT

The vast majority of orchids species are pollinated by insects, mainly bees, butterflies and moths. Regarding the type of reproduction orchids can be autogamous or allogamous, and the most frequent are allogamous. Despite this statement be considered for the entire orchid family, information about the type of reproduction is unknown for most species. The objective was to evaluate the intraspecific compatibility for seven species: *Cohniella cepula*, *Cyrtopodium eugenii*, *Cyrtopodium saintlegerianum*, *Epidendrum densiflorum*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum* and *Lockhartia goyazensis*, and identify interspecific potential breeding within the genus *Epidendrum* and *Cyrtopodium*. Three treatments were used: manual pollination, spontaneous pollination and crosspollination. Among the seven orchids species only three were shown to be self-compatible. The number of capsules formed in self-compatible species was similar for both self-pollination and for cross pollinations. For self-incompatible species, *C. cepula*, *C. eugenii*, *C. saintlegerianum* and *E. densiflorum* the fertilization have been prevented through flowers abortion between 5-15 days after pollination or fruit abortion, the same occurred with incompatible interspecific crosses. For *C. saintlegerianum* the fully formed capsules after self-pollination, or after pollination with pollinias of *C. eugenii*, were aborted after four months containing only straw or were completely empty. For reciprocal interspecific breeding just *C. eugenii* and *E. nocturnum* produced capsules and viable seeds. Any plants produced capsules spontaneously, demonstrating the importance of natural pollinators and artificial pollination for the perpetuation of these species.

Keywords: Orchidaceae, autogamy, allogamy, breeding, hybrids

3.1 INTRODUÇÃO

A compreensão sobre o sistema reprodutivo constitui parte fundamental para o melhoramento genético de qualquer espécie. Para a maioria das espécies de orquídeas do Cerrado essa informação não é conhecida. Entretanto, os trabalhos relacionados ao sistema reprodutivo das orquídeas citam que a grande maioria das espécies é fecundada por insetos, principalmente abelhas, borboletas e mariposas (Pansarin & Amaral, 2008; Vale et al., 2011).

Trabalhos sobre biologia reprodutiva em Orchidaceae afirmam que a maioria das espécies são alógamas e autocompatíveis, mas existem exceções (Jeffrey et al., 1970; Arditti, 1992). Para *Epidendrum nocturnum* parece ocorrer apomixia, quando fecundado com pólinias inviáveis (Stort & Pavanelli, 1985). Eventos de apomixia, autogamia e cleistogamia também são citados ocorrendo em algumas espécies de orquídeas (Pillon & Chase, 2007; Cohen & Ackerman, 2009; Felix & Guerra, 2010).

Em Orchidaceae, a ocorrência de autopolinização é evitada, principalmente, devido à existência de mecanismos florais (Pansarin, 2003). Em alguns casos, quando esses mecanismos florais são ineficientes ou inexistentes, barreiras genéticas, como a presença de alelos recessivos letais, podem evitar que frutos sejam formados por meio de autopolinização devido à ocorrência de abortamentos (Johansen, 1990; Tremblay, 1992).

Experimentos de polinização em orquídeas devem ser realizados com cautela, pois a polinização manual e produção de cápsulas demandam muita energia e podem representar diminuição no crescimento futuro e representam alto custo na sobrevivência individual (Primack & Hall, 1990). Além disso, as sementes devem ser colhidas completamente maduras, ou seja, logo após o início da abertura natural das cápsulas para garantir a maior durabilidade no processo de armazenamento (Seaton et al., 2010).

Este trabalho teve como objetivo determinar a existência de autocompatibilidade ou incompatibilidade na polinização intraespecífica de sete espécies de orquídeas de ocorrência no Cerrado e os potenciais cruzamentos interespecíficos dentro dos gêneros *Cyrtopodium* e *Epidendrum*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Para os experimentos de polinização e hibridização foram selecionadas orquídeas saudáveis e vigorosas, cultivadas em telados, pertencentes à Coleção de Bromélias e Orquídeas do Cerrado, localizada na Escola de Agronomia – Universidade Federal de Goiás e na Coleção de Orquídeas do Cerrado do Centro de Treinamento da Emater-GO. As duas coleções estão localizadas no município de Goiânia, GO. A seguir são apresentadas as espécies utilizadas nos experimentos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Espécies de orquídeas nativas do Cerrado utilizadas nos experimentos de polinização intraespecífica e de cruzamentos interespecíficos, período de floração e número de indivíduos trabalhados. São apresentados os números de flores avaliadas como receptoras de pólen em cada tratamento, autopolinização manual (AM), avaliadas quanto à autopolinização espontânea (AE), polinização cruzada (PC) e cruzamentos interespecíficos (CI). Plantas pertencentes à Coleção de Bromélias e Orquídeas do Cerrado – UFG e Coleção de Orquídeas do Cerrado - Emater-GO. Ambas localizadas no município de Goiânia, GO.

Espécies	Floração	Número de indivíduos	Número de flores			
			AM	AE	PC	CI
<i>Cohniella cepula</i>	ago-set	26	52	104	52	-
<i>Cyrtopodium eugenii</i>	maio-jul	6	18	30	18	6
<i>Cyrtopodium saintlegerianum</i>	jul-set	4	16	30	16	6
<i>Epidendrum densiflorum</i>	out-dez	6	20	500	20	20
<i>Epidendrum nocturnum</i>	dez-mar	8	16	16	16	12
<i>Epidendrum secundum</i>	jan-dez	2	8	10	8	12
<i>Lockhartia goyazensis</i>	jun-jul	3	5	5	5	-

3.2.2 Polinizações intraespecíficas

A compatibilidade intraespecífica foi avaliada nas florações de 2012 e 2013, para as sete espécies: *C. cepula*, *C. eugenii*, *C. saintlegerianum*, *E. densiflorum*, *E. nocturnum*, *E. secundum* e *L. goyazensis*. Para avaliar o nível de compatibilidade intraespecífica foram realizados três tratamentos: autopolinização espontânea, autopolinização manual e

polinização cruzada; cada indivíduo foi submetido aos três tratamentos. A presença de polinizadores naturais foi evitada pelos telados, nos quais as orquídeas são mantidas. As orquídeas foram observadas duas vezes por semana durante o período de floração e a polinização foi realizada na antese com as flores completamente abertas, com a utilização de pinça de ponta fina. Cada flor polinizada foi identificada com etiqueta contendo data e o tratamento realizado. Foram anotados os abortamentos quando ocorridos e as cápsulas formadas foram coletadas após a completa maturação, ou seja, logo após o início da abertura natural das cápsulas.

3.2.3 Polinizações interespecíficas

Os testes de compatibilidade interespecífica foram realizados na floração de 2013, através de cruzamentos recíprocos entre duas espécies do gênero *Cyrtopodium*: *C. eugenii* e *C. saintlegerianum*, e entre três espécies do gênero *Epidendrum*: *E. densiflorum*, *E. nocturnum* e *E. secundum*. Foram anotados os abortamentos quando ocorridos e as cápsulas formadas foram coletadas 15 dias antes do tempo mínimo conhecido para maturação e abertura natural para evitar que as sementes fossem dispersas no ambiente.

3.2.4 Teste de viabilidade com 2,3,5 cloreto de trifênil tetrazólio (TTC)

Para confirmar a viabilidade das sementes foi realizado o teste com solução de 2,3,5 cloreto de trifênil tetrazólio (TTC). Foram colocadas 10 mg de sementes em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e acrescentado 1 mL da solução de TTC a 1%. Os tubos foram mantidos no escuro a 40°C por 24 h (Piña-Rodrigues et al., 2004). Após o tratamento com TTC, as sementes foram contadas em microscópio estereoscópico sendo utilizados aumentos adequados para cada tamanho de semente (*E. secundum* 10X, *C. eugenii*, *C. saintlegerianum*, *E. densiflorum* e *E. nocturnum* 20X, *C. cepula* e *L. goyazensis* 35X) para avaliar a porcentagem de viabilidade. Foram contadas no mínimo 500 sementes em 10 amostras e foram consideradas viáveis as sementes coradas pelo TTC (sementes vermelhas), e inviáveis as sementes que se mantiveram sem alterar a coloração natural (em geral brancas ou amareladas dependendo da espécie).

3.2.5 Germinação *in vitro*

Para que fosse evidenciada a capacidade das sementes em germinar e seguir com crescimento normal, uma cápsula de cada cruzamento foi utilizada para germinação assimbiótica *in vitro* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Em câmara de fluxo laminar, as cápsulas ou sementes foram desinfestadas por quinze minutos em 15% da solução comercial de hipoclorito de sódio (NaOCl – solução comercial QBoa com 2,0% de cloro ativo) e lavadas por três vezes consecutivas em água destilada e autoclavada.

O meio MS utilizado foi suplementado com 3% de sacarose e 0,3% de Gelzan® para torná-lo semissólido. O pH foi ajustado para 5,7 - 5,8. Após o preparo do meio, este foi autoclavado à temperatura de 120°C, por vinte minutos. Após a inoculação das sementes, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura controlada de 25°C ± 2, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias.

3.2.6 Delineamento e análises

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e número de repetições equivalentes ao número disponível de orquídeas e flores (Tabela 3.1). A fecundação foi avaliada com relação à formação de cápsulas e número de abortamentos, enquanto que a viabilidade das sementes foi avaliada pela porcentagem de sementes coradas pelo teste de TTC. A ocorrência de poliembrionia também foi registrada.

3.3 RESULTADOS

O período de floração pode ter variações dependendo da região. Para as espécies estudadas e mantidas sob telado o período de floração foi mantido ao longo de dois anos (Tabela 3.1). O tempo de maturação das cápsulas, considerando o momento de abertura natural (Figura 3.1) é distinto para cada espécie havendo pequena variação no tempo para o início da abertura das cápsulas (Tabela 3.2).



Figura 3.1 Cápsulas de *Cohniella cepula* (A) e *Epidendrum. secundum* (B) colhidas após a completa maturação. Setas indicam o início da abertura natural das cápsulas, barra = 1 cm.

Tabela 3.2 Tempo de maturação das cápsulas indicado em dias após a polinização cruzada para as sete espécies.

Espécies	Tempo de Maturação das cápsulas (dias)
<i>Cohniella cepula</i> X <i>C. cepula</i>	52-65
<i>Cyrtopodium eugenii</i> X <i>C. eugenii</i>	335-365
<i>Cyrtopodium saintlegerianum</i> X <i>C. saintlegerianum</i>	350-370
<i>Epidendrum densiflorum</i> X <i>E. densiflorum</i>	365
<i>Epidendrum nocturnum</i> X <i>E. nocturnum</i>	110-130
<i>Epidendrum secundum</i> X <i>E. secundum</i>	50- 68
<i>Lockhartia goyazensis</i> X <i>L. goyazensis</i>	90-95

Entre as sete espécies de orquídeas estudadas, três demonstraram ser autocompatíveis. O número de cápsulas formadas nas espécies autocompatíveis, *E. secundum*, *E. nocturnum* e *L. goyazensis* foi semelhante tanto para autopolinizações quanto para polinizações cruzadas (Tabela 3.3).

Nas espécies autoincompatíveis, *C. cepula*, *C. eugenii*, *C. saintlegerianum* e *E. densiflorum* a autopolinização e fecundação foram prevenidas por abortamentos de flores entre 5 a 15 dias após a autopolinização ou abortamentos de frutos. Em *C. saintlegerianum* cápsulas completamente formadas por autopolinização foram abortadas após quatro meses contendo apenas palha ou estavam completamente vazias (Figura 3.2).

Nos cruzamentos recíprocos para avaliar a compatibilidade interespecífica apenas três dos oito cruzamentos potenciais realizados foram bem sucedidos, apenas *C. eugenii* e *E. nocturnum* produziram cápsulas. Para os demais cruzamentos os abortamentos ocorreram da mesma forma como observado nos testes de compatibilidade intraespecífica. Não ocorreu reciprocidade nos cruzamentos realizados (Tabela 3.4).

Foi observado maior quantidade de sementes poliembriônicas para os cruzamentos entre *C. eugenii* e *C. saintlegerianum* (21,57%) do que observado naturalmente para cruzamentos intraespecíficos de *C. eugeni* (5,55%). Também foram observadas sementes poliembriônicas para *E. nocturnum* (0,61%). Sementes com mais do que um embrião não foram observadas nos demais cruzamentos (Figura 3.3).

Tabela 3.3 Compatibilidade intraespecífica para as sete espécies avaliadas. Tratamentos realizados (autopolinização manual e espontânea e polinização cruzada), número total de flores, fecundação obtida e a viabilidade das sementes utilizando o conjunto de sementes de duas cápsulas.

Espécies	Tratamentos	Fecundação (%)	Sementes viabilidade (%)
<i>Cohniella cepula</i>	Auto. manual	0	
	Auto. espontânea	0	
	Poli. cruzada	94,23	89,67
<i>Cyrtopodium eugenii</i>	Auto. manual	0	
	Auto. espontânea	0	
	Poli. cruzada	100	92,22
<i>Cyrtopodium saintlegerianum</i>	Auto. manual	0	
	Auto. espontânea	0	
	Poli. cruzada	68,75	91,87
<i>Epidendrum densiflorum</i>	Auto. manual	0	
	Auto. espontânea	0	
	Poli. cruzada	10	18,71
<i>Epidendrum nocturnum</i>	Auto. manual	100	23,8
	Auto. espontânea	0	
	Poli. cruzada	100	25,76
<i>Epidendrum secundum</i>	Auto. manual	100	72,48
	Auto. espontânea	0	
	Poli. cruzada	87,5	74,74
<i>Lockhartia goyazensis</i>	Auto. manual	80	65,56
	Auto. espontânea	0	
	Poli. cruzada	60	83,29



Figura 3.2 A: *Epidendrum densiflorum* com cápsulas no início do desenvolvimento (15dias); seta indica cápsula abortada após 15 dias formada por autopolinização manual. B: *Cyrtopodium saintlegerianum* com cápsulas após quatro meses. Setas indicam cápsulas formadas por autofecundação em processo de abortamento após quatro meses

Tabela 3.4 Compatibilidade interespecífica dentro dos gêneros *Cyrtopodium* e *Epidendrum*, são apresentados os cruzamentos recíprocos, número de flores; fecundação e a viabilidade das sementes obtidas.

Receptor	Doador	Nº flores	Fecundação (%)	Viabilidade (%)
<i>C. saintlegerianum</i>	<i>C. eugenii</i>	6	0	-
<i>C. eugenii</i>	<i>C. saintlegerianum</i>	6	100	77,36
<i>E. secundum</i>	<i>E. nocturnum</i>	6	0	-
<i>E. nocturnum</i>	<i>E. secundum</i>	6	100	2
<i>E. secundum</i>	<i>E. densiflorum</i>	6	0	-
<i>E. densiflorum</i>	<i>E. secundum</i>	12	0	-
<i>E. nocturnum</i>	<i>E. densiflorum</i>	6	33,3	0,5
<i>E. densiflorum</i>	<i>E. nocturnum</i>	8	0	-

As sementes germinadas em meio de cultura MS se desenvolveram normalmente. As sementes geradas do cruzamento entre *C. eugenii* e *C. sainttlegerianum* demoraram entre três a quatro meses para iniciar a germinação (Figura 3.4), assim como as sementes obtidas por fecundação cruzada de *C. eugenii*, sugerindo algum tipo de dormência. O híbrido do cruzamento entre *E. nocturnum* e *E. secundum* apresentou maior desenvolvimento que as espécies em meio de cultura após quatro meses (Figura 3.5). *E. nocturnum* apresentou dificuldade de desenvolvimento em meio de cultura MS, estando com tamanho reduzido quando comparado visualmente com *E. secundum* e o híbrido.

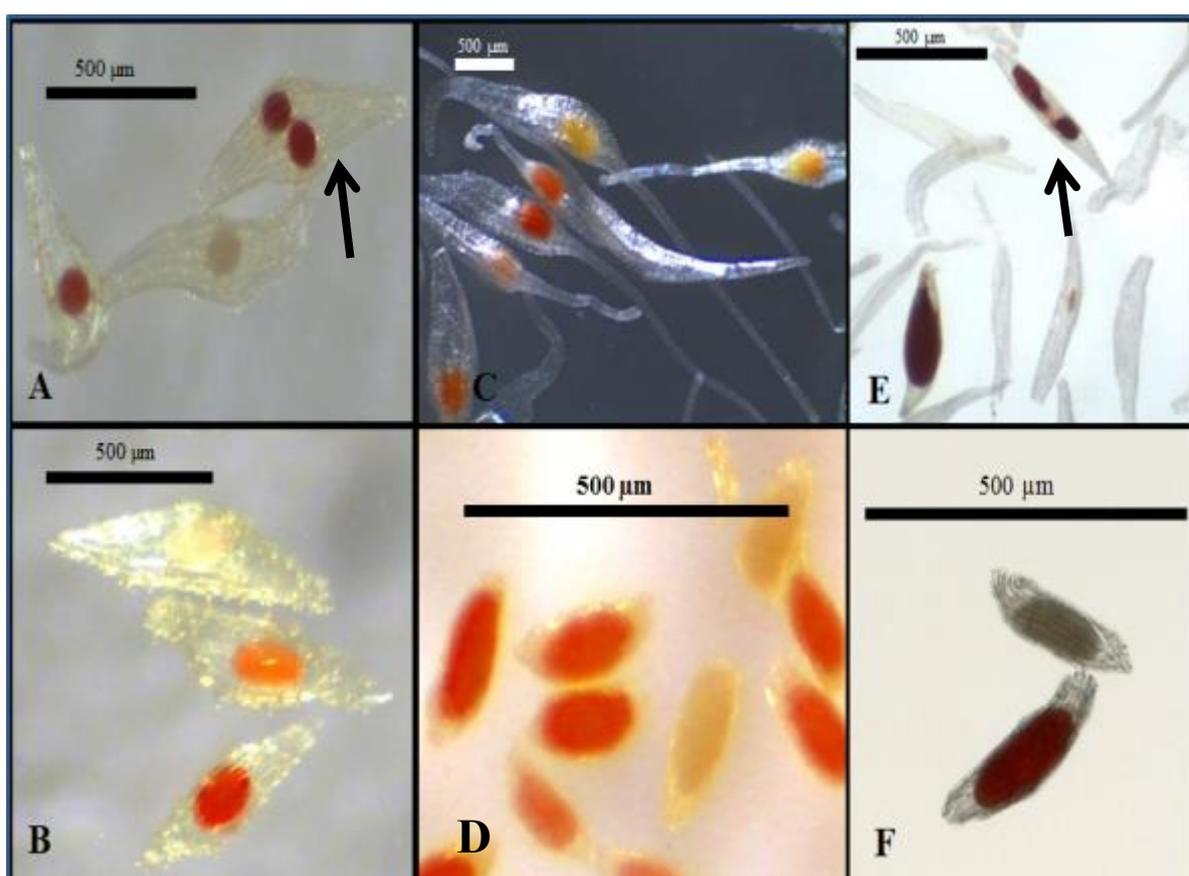


Figura 3.3 Sementes viáveis das espécies trabalhadas coradas em vermelho pelo teste com solução de 2,3,5 cloro de trifênil tetrazólio tetrazólio (TTC). Sementes não viáveis permaneceram não coradas. A) *Cyrtopodium eugenii*; B) *Cyrtopodium sainttlegerianum*; C) *Epidendrum secundum*; D) *Cohniella cepula*; E) *Epidendrum nocturnum*; F) *Lockhartia goyasensis*. Setas indicam sementes com múltiplos embriões. Fotos LCTV/UFG.

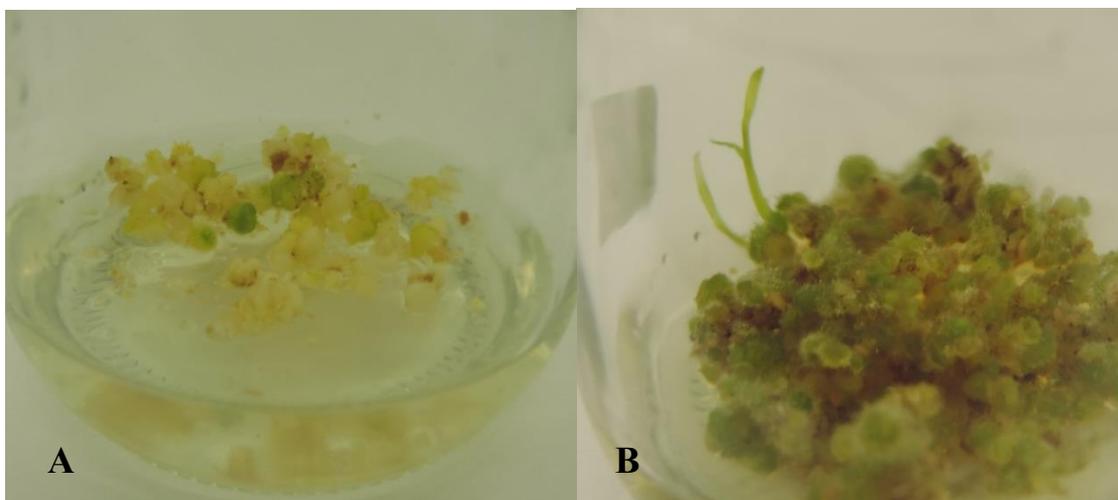


Figura 3.4 Desenvolvimento do híbrido, cruzamento entre *C. eugeni* e *C. saintlegerianum*; A – após quatro meses; B - após seis meses de inoculado no meio de cultura MS. Vários estádios de protocormos presentes em um mesmo vidro.

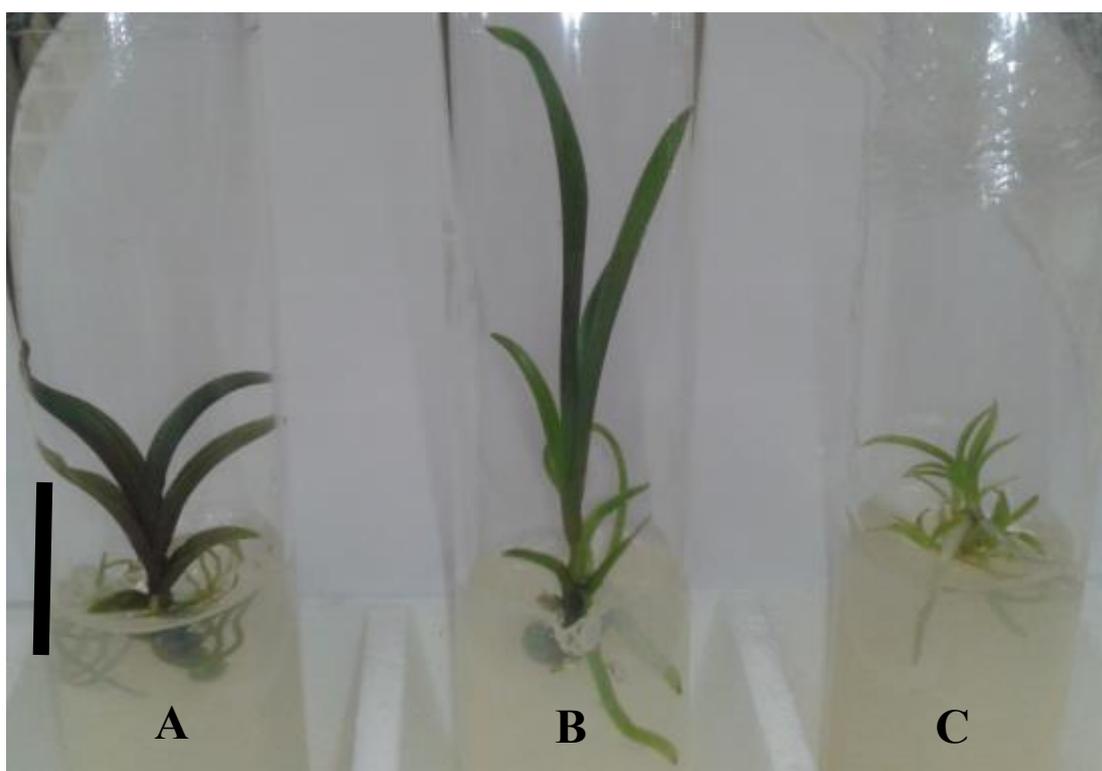


Figura 3.5 Desenvolvimento diferenciado entre espécies de *Epidendrum* e seu híbrido após quatro meses inoculados em meio de cultura MS. A - *Epidendrum secundum*; B – híbrido entre *E. nocturnum* e *E. secundum*; C – *E. nocturnum*. Barra = 1cm

3.4 DISCUSSÃO

Após o contato entre a polínia e o estigma inicia-se o desenvolvimento do tubo polínico. Para que este alcance os óvulos e desencadeie o processo de fecundação pode levar mais de 12 dias, como demonstrado para *Epidendrum paniculatum* por Pansarin

(2003). Esse tempo necessário para que ocorra a fecundação pode explicar o tempo de espera para que seja observado o abortamento nos casos de incompatibilidade.

Alguns autores afirmam que a maioria das espécies é autocompatível, apesar da polinização cruzada ser mais frequente, a autopolinização é impedida pela presença de mecanismos florais (Dressler, 1981, 1993; Catling & Catling, 1991). Entretanto, para as espécies estudadas a autoincompatibilidade foi alta.

A incompatibilidade pode ocorrer a partir da formação anormal e incompleta dos tubos polínicos no estigma, como para *E. paniculatum* (Pansarin, 2003) ou por barreiras genéticas que podem induzir o abortamento de flores autopolinizadas (Tremblay, 1994).

Apesar das espécies de *Cyrtopodium* aqui estudadas serem autoincompatíveis foi relatado (Pansarin et al., 2008) que *Cyrtopodium polyphyllum* produz sementes viáveis por autopolinização auxiliada por abelhas a até mesmo pela chuva (92% de viabilidade com 3% de poliembrionia). Vários outros gêneros possuem tanto espécies autoincompatíveis quanto espécies autocompatíveis como *Pleurothallis* (Borba et al., 2001), *Phalaenopsis* (Arends, 1970), *Cymbidium*, *Maxillaria* (Catling & Catling, 1991).

Apesar do longo tempo de espera para atingir a maturidade das cápsulas e sua abertura natural, muitas orquídeas podem ser germinadas com bastante antecedência com o uso de sementes imaturas. Entretanto, para o armazenamento eficiente das sementes e para assegurar a viabilidade por pelo menos 3 anos é necessário que as sementes sejam colhidas completamente maduras (Seaton et al., 2010).

O menor número de sementes viáveis obtidas na autopolinização manual observadas para a espécie *L. goyazensis* pode representar problemas relacionados à depressão endogâmica. Já foram relatados para orquídeas além da depressão endogâmica, a redução no número de sementes produzidas ou a redução de viabilidade das sementes em consequência da autopolinização (Bellusci et al., 2009; Faast et al., 2011).

Para *Epidendrum nocturnum* não houve alteração no número ou na viabilidade das sementes obtidas por autopolinização e por fecundação cruzada. Entretanto, foram observadas a formação de plantas aclorofiladas *in vitro* (Figura 3.6) originadas de sementes obtidas por autopolinização que não foram capazes de se desenvolver por muito tempo. Todas as plantas aclorofiladas morreram após seis meses a partir da germinação.



Figura 3.6 Plantas de *Epidendrum nocturnum* crescendo *in vitro* em meio MS. A foto indica indivíduo aclorofilado. Ao fundo, no mesmo frasco, plantas com cor verde escuro originadas da mesma cápsula de sementes obtidas por autopolinização.

A formação de sementes com múltiplos embriões é processo conhecido para algumas orquídeas. Em geral, está relacionado a produção de sementes por apomixia (Pansarin et al., 2008), ou seja, sementes com embriões múltiplos dão origem a clones da planta matriz.

Nenhuma das plantas produziu cápsulas espontaneamente, demonstrando a importância dos polinizadores naturais para a perpetuação das espécies em seus habitats e da polinização manual para a propagação das espécies com fins comerciais e conservacionistas em bancos de germoplasma.

3.5 CONCLUSÕES

A autocompatibilidade ocorreu para três das sete espécies avaliadas, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum* e *Lockhartia goyazensis*, as demais espécies neste trabalho foram autoincompatíveis. A autopolinização tem consequências negativas para as espécies *Epidendrum nocturnum* devido ao desenvolvimento de plantas aclorofiladas e para a espécie *Lockhartia goyazensis* devido a redução da viabilidade das sementes.

Nos cruzamentos interespecíficos não ocorreu compatibilidade recíproca entre espécies do mesmo gênero. Apenas as espécies *Cyrtopodium eugenii* e *Epidendrum nocturnum* produziram sementes. Porém, podem existir clones da planta matriz em meio aos híbridos formados devido a presença de sementes com múltiplos embriões, formados por apomixia.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: Wiley-Blackwell, 1992, 691 p.
- ARENDS, J. C. Cytological observations on genome homology in eight interespecific hybrids of *Phalaenopsis*. **Genetica**, Chan, v. 41, n. 1, p. 88–100, 1970.
- BELLUSCI, F.; PELLEGRINO, G.; MUSACCHIO, A. Different levels of inbreeding depression between outcrossing and selfing *Serapias* species. **Biologia plantarum**, Heidelberg, v. 53, n. 1, p. 175–178, 2009.
- BORBA, E. L.; SEMIR, J.; SHEPHERD, G. J. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 89–99, 2001.
- CATLING, P. .; CATLING, V. R. A synopsis of breeding systems and pollination in North American orchids. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 6, p. 187–210, 1991.
- COHEN, I. M.; ACKERMAN, J. D. *Oeceoclades maculata*, an alien tropical orchid in a Caribbean rainforest. **Annals of Botany**, Oxford, p. 557–563, 2009.
- DRESSLER, R. L. **The orchids: Natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press, 1981, 332 p.
- DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983, 214 p.
- FAAST, R.; FACELLI, J. M.; AUSTIN, A. D. Seed viability in declining populations of *Caladenia rigida* (Orchidaceae): are small populations doomed? **Plant biology**, Stuttgart, v. 13 , n.1, p. 86–95, 2011.
- FELIX, L. P.; GUERRA, M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 163, n. 2, p. 234–278, 2010.
- JEFFREY, D. C.; ARDITTI, J.; KOPOWITZ, H. Sugar content in floral and extra floral exudates of orchids: pollination myrmecology and chemotaxonomy implication. **New Phytologist**, Lancaster, v. 69, n. 1, p. 187–195, 1970.
- JOHANSEN, B. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 103, n. 2, p. 165–196, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and Bio Assays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

PANSARIN, E. R. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 203–211, 2003.

PANSARIN, E. R.; AMARAL, M. C. E. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? **Plant biology**, Stuttgart, v. 10, n. 2, p. 211–219, 2008.

PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. **Plant biology**, Stuttgart, v. 10, n. 5, p. 650–9, 2008.

PILLON, Y.; CHASE, M. W. Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. **Conservation biology**, San Diego, v. 21, n. 1, p. 263–265, 2007.

PIÑA-RODRIGUES, F. C.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: A. G. Ferreira; F. Borghetti (Eds.); **Germinação - do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. p.283–297, 2004.

PRIMACK, R. B.; HALL, P. Costs of Reproduction in the Pink Lady's Slipper Orchid: A Four-Year Experimental Study. **The American Naturalist**, Chicago, v. 136, n. 5, p. 638, 1990.

SEATON, P. T.; HU, H.; PERNER, H.; PRITCHARD, H. W. Ex Situ Conservation of Orchids in a Warming World. **The Botanical Review**, New York, v. 76, n. 2, p. 193–203, 2010.

STORT, M. N. S.; PAVANELLI, E. A. D. S. Formation of multiple or adventive embryos in *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 331–336, 1985.

TREMBLAY, R. L. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, n. 3, p. 642–650, 1992.

TREMBLAY, R. L.; ACKERMAN, J. D.; ZIMMERMAN, J. K.; CALVO, R. N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 84, n. 1, p. 1–54, 2004.

VALE, Á.; NAVARRO, L.; ROJAS, D.; ÁLVAREZ, J. C. Breeding system and pollination by mimicry of the orchid *Tolumnia guibertiana* in Western Cuba. **Plant Species Biology**, Malden, v. 26, n. 2, p. 163–173, 2011.

4 INDUÇÃO A FLORAÇÃO PRECOCE *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS DO CERRADO

RESUMO

A indução a floração precoce *in vitro* é importante aliado do melhoramento genético de espécies de ciclo longo como as orquídeas. Espécies de orquídeas do Cerrado têm sua importância negligenciada e precisam da atenção do melhoramento para se tornarem importantes cultivares no mercado de ornamentais. A indução da floração precoce *in vitro* foi avaliada para quatro espécies *Cohniella cepula*, *Cyrtopodium eugenii*, *Epidendrum secundum* e *Lockhartia goyazensis* por meio de alterações no equilíbrio nutricional e do uso de regulador de crescimento. Apenas *C. cepula* respondeu eficientemente aos tratamentos, apresentando até 46% de emissão de hastes florais. O uso de 6-benzilaminopurina (BAP) e de água de coco foram fundamentais para a maior indução floral, entretanto a redução da concentração de nitrogênio e o aumento de fósforo ao meio de cultura não foram variáveis importantes. A indução floral precoce *in vitro* pode favorecer a seleção precoce do perfilhamento de hastes florais em *C. cepula*. Tais resultados estão mais estreitamente relacionados à predisposição genética e ao uso de reguladores de crescimento.

Palavras-chave: Orchidaceae; florescimento; seleção, melhoramento de plantas

ABSTRACT

The precocious flowering induction *in vitro* is an important ally to the breeding species of long cycle like orchids. The Cerrado orchid species has neglected their importance and need the attention of genetic breeding to become important cultivars in the ornamental market. The *in vitro* early flowering induction was tested for four species:

Cohniella cepula, *Cyrtopodium eugenii*, *Epidendrum secundum* and *Lockhartia goyazensis* by changes in nutritional balance and the use of growth regulator. Only *C. cepula* responded effectively to treatments, with up to 46% emission of floral stems. The use of 6-benzilaminopurine (BAP) and coconut water were critical for the best results, but reducing the nitrogen concentration and increase phosphorus concentration in the culture medium were not significant variables. Early selection for *in vitro* floral induction can favor early tillering of flower stalks in *C. cepula*. These results are more closely related with genetic predisposition and the use of growth regulator.

Keywords: Orchidaceae, flowering, selection, plant breeding

4.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos para cultivo *in vitro*, indução floral *in vitro* e engenharia genética tem aumentado as possibilidades de desenvolver novos genótipos em uma série de espécies vegetais de importância econômica. Os objetivos são melhorias significativas em características desejadas ou redução de características indesejadas (Confalonieri & Balestrazzi, 2003; Hossain et al., 2013). O cultivo *in vitro* amplia as possibilidades de aplicação de métodos de melhoramento para qualquer espécie vegetal.

A floração *in vitro* é útil ao melhoramento genético e à compreensão da fisiologia e organogênese envolvidas neste processo. É importante, principalmente, para espécies de ciclos longos, por exemplo, as florestais (Confalonieri & Balestrazzi, 2003) e algumas ornamentais como as orquídeas. A organogênese permite a partir de material vegetal jovem, o desenvolvimento de flores para diversas finalidades, sejam estudos de fisiologia e desenvolvimento floral (Vaz & Kerbauy, 2008), segregação de caracteres florais (Sim et al., 2007), obtenção de sementes (Hee et al., 2007; Chiu et al., 2011) e avanços no melhoramento genético (Kostenyuk et al., 1999).

A interação de grande número de variáveis envolvidas no florescimento *in vitro* torna o processo um verdadeiro desafio. A maioria destas interações são ainda incompreendidas no desenvolvimento *in vitro* quando relacionadas a floração. Entre os

fatores fisiológicos mais relevantes estão a disponibilidade de nitrogênio em diferentes formas e concentrações, aumento da concentração de fósforo, o acúmulo de carboidratos nos tecidos vegetais e a relação com os reguladores de crescimento (Teixeira da Silva et al., 2014a).

O tipo e a concentração do nitrogênio alteram diretamente a produção de hormônios endógenos na planta, principalmente as auxinas, citocininas e o etileno. A interação entre auxinas-citocininas e o etileno são responsáveis por direcionar grande parte do desenvolvimento vegetal (Shimasaki, 1992; Peres & Kerbauy, 1999; Ogura-Tsujita & Okubo, 2006).

O fósforo é utilizado em todos os processos em que há gasto de energia, pois faz parte do trifostato de adenosina (ATP) e é fundamental nos períodos de floração, frutificação e de desenvolvimento das raízes (Malavolta, 2006). Praticamente todas as formulações de adubação mineral para períodos de florescimento possuem enriquecimento com fósforo.

A adição de componentes orgânicos ao meio de cultura como polpa de banana ou água de coco é realizada a muito tempo com efeitos positivos para o desenvolvimento das orquídeas (Kyte & Kleyn, 1996). Mais recentemente foi observado o efeito positivo da água de coco adicionada ao meio de cultura, no processo de indução floral *in vitro* devido à grande quantidade de citocininas presentes neste componente e que se mantem após a autoclavagem (Hee et al., 2007; Sim et al., 2007; Sim et al., 2008).

São necessários de três a doze anos para que ocorra naturalmente o florescimento na maioria das espécies de orquídeas (Hossain, 2013). A indução a floração precoce *in vitro* pode ter impactos significantes no melhoramento genético e na produção de orquídeas além de fornecer modelos para o estudo da iniciação e desenvolvimento floral (Sim et al., 2007) e auxiliar na compreensão dos processos de organogênese para muitas espécies (Teixeira da Silva, 2013; Teixeira da Silva et al., 2007, 2014b).

Existe pouco conhecimento sobre orquídeas do Cerrado. A literatura referente ao cultivo, fisiologia e utilização deste grupo é escassa. Assim, o objetivo deste trabalho foi induzir o florescimento *in vitro* em quatro espécies de orquídeas do Cerrado: *Cohniella cepula*, *Cyrtopodium eugenii*, *Epidendrum secundum* e *Lockhartia goyazensis* que representam uma pequena amostra da grande diversidade da família Orchidaceae no domínio Cerrado.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Foram obtidas sementes de quatro espécies de orquídeas *Cohniella* (Hoffmanns.) Carnevali & G. Romero, *Cyrtopodium eugenii* Rchb.f., *Epidendrum secundum* Jacq. e *Lockhartia goyazensis* Rchb.f. de cápsulas originadas de fecundação cruzada. Foram selecionados indivíduos saudáveis e vigorosos pertencentes à Coleção de Bromélias e Orquídeas do Cerrado, localizada na Escola de Agronomia – Universidade Federal de Goiás e na Coleção de Orquídeas do Cerrado do Centro de Treinamento da Emater-GO. As duas coleções estão localizadas no município de Goiânia, GO.

4.2.2 Cultivo *in vitro*

Uma cápsula de cada espécie foi utilizada para germinação assimbiótica *in vitro* das sementes em meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Em câmara de fluxo laminar, as cápsulas foram tratadas por quinze minutos em hipoclorito de sódio 15% (NaOCl – solução comercial com 2,0% de cloro ativo) e lavadas por três vezes consecutivas em água destilada e autoclavada.

O meio MS utilizado foi suplementado com 3% de sacarose e 0,3% de Gelzan® para torná-lo semissólido. O pH foi ajustado para 5,7 - 5,8. Após o preparo do meio, este foi autoclavado à temperatura de 120°C, por vinte minutos. Após a inoculação das sementes, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura controlada de 25°C ± 2, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias.

4.2.3 Tratamentos para indução floral

Para os tratamentos de indução da floração foi utilizado como meio básico o MS com modificações. O meio foi suplementado com 100 mL/L de água de coco, 3% de sacarose. Foram realizados quatro tratamentos quanto a concentração total de nitrogênio relativa à concentração original do meio MS (concentrações = 1x; 0,2x; 0,1x; 0,05x), e

duas concentrações de fósforo (concentrações de 1x; 5x), foram utilizadas concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) de 0 à 88,8mM, formando o total de 20 tratamentos (Tabela 4.1). O pH foi ajustado para 5,7 - 5,8 e o meio foi semisolidificado com 0,3% de Gelzan®. Os meios foram autoclavados à temperatura de 120°C, por vinte minutos. Foi utilizada a água de coco verde, obtido no mercado local. Todos os tratamentos foram nomeados com a letra F por serem tratamentos para a indução floral.

Para a espécie *C. cepula* foram utilizadas plantas com cinco meses e foram utilizadas 42 plantas por tratamento. Para *E. secundum* e *L. goyazensis* foram utilizadas plantas com seis meses e foram utilizadas 30 plantas por tratamento. Para *C. eugenii* foram utilizadas plantas com oito meses após a germinação e foram inoculadas 20 plantas por tratamento. O delineamento foi o inteiramente casualizado.

Após a introdução das plantas nos tratamentos, estas foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25°C ± 2, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 25 µmol.m⁻²s⁻¹ obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias.

Tabela 4.1 Tratamentos que foram utilizados para indução da floração. Nitrogênio (concentração equivalente do meio MS) e fósforo (concentração equivalente do meio MS) indicam a concentração final multiplicada do nutriente no meio MS modificado. BAP = 6-benzilaminopurina.

Tratamentos	Nitrogênio	Fósforo	BAP (mM)
F1 (controle)	1	1	0
F2	1	1	4,44
F3	1	1	22,2
F4	1	1	44,4
5F	1	1	88,8
F6	0,20	5	0
F7	0,20	5	4,44
F8	0,20	5	22,2
F9	0,20	5	44,4
F10	0,20	5	88,8
F11	0,10	5	0
F12	0,10	5	4,44
F13	0,10	5	22,2
F14	0,10	5	44,4
F15	0,10	5	88,8
F16	0,05	5	0
F17	0,05	5	4,44
F18	0,05	5	22,2
F19	0,05	5	44,4
F20	0,05	5	88,8

4.2.4 Efeito da água de coco

Para avaliar o efeito da água de coco sobre a indução floral foram realizados três tratamentos. Foi utilizado o meio MS modificado suplementado com 44,4mM de BAP, 3% de sacarose, o pH foi ajustado para 5,7 - 5,8 e foi semisolidificado com 0,3% de Gelzan® e autoclavado à temperatura de 120°C, por vinte minutos.

Os três tratamentos consistiram no uso do meio MS modificado sem a adição de água de coco, com 100 mL/L de água de coco e com 200 mL/L de água de coco. Estes tratamentos foram realizados apenas para a espécie *C. cepula* e foram utilizadas plantas com 8 meses sendo inoculadas 42 plantas por tratamento.

4.2.5 Coleta de dados e análise estatística

Foram coletados os dados de presença e ausência de floração por plântula em cada tratamento com 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos para a espécie *C. cepula*, para as demais espécies os tratamentos foram observados até 240 dias após os tratamentos iniciarem. Os dados de porcentagem de florescimento foram transformados ($\arcsen\sqrt{X/100}$) e submetidos a análise de variância e teste de Tukey (nível de significância 5%).

4.3 RESULTADOS

Apenas *C. cepula* respondeu eficientemente aos tratamentos, apresentando até 46% de emissão de hastes florais. O uso de BAP e de água de coco foram fundamentais para os melhores resultados, entretanto a redução da concentração de nitrogênio e o aumento de fósforo no meio de cultura não foram variáveis importantes.

Não houve formação de hastes florais em meios de cultura com concentração de BAP menor que 1 mg/L (Tabela 4.1). Enquanto o número de plantas induzidas a floração aumentou juntamente com concentrações acima de 22,2mM de BAP (Figura 4.1). Demonstrando a importância desta citocinina para que ocorresse a transição floral.

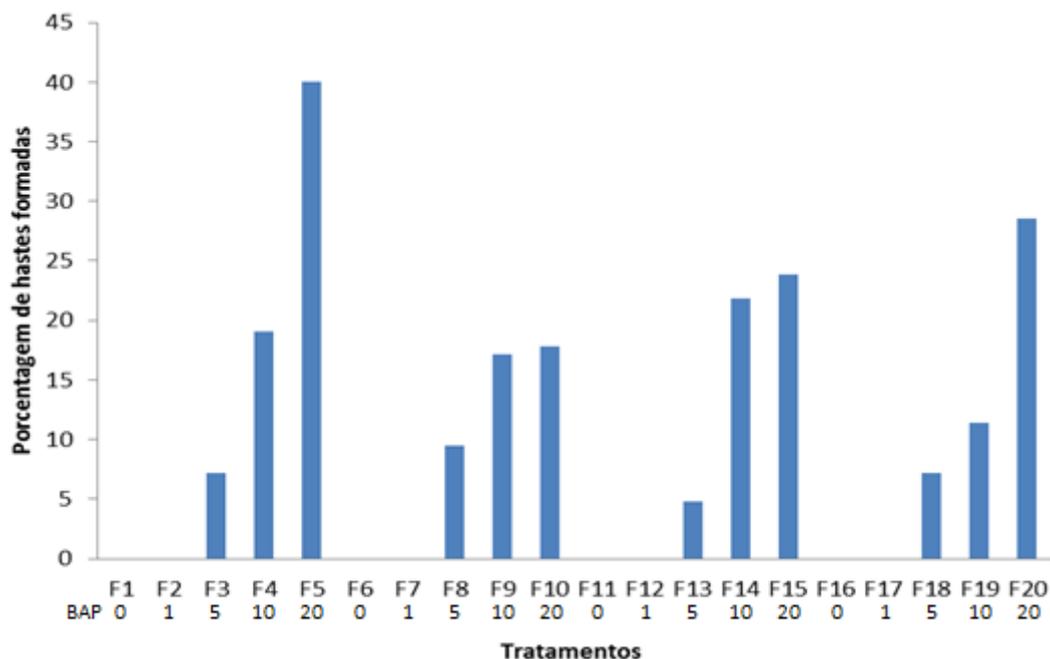


Figura 4.1 Distribuição das porcentagens de formação de hastes florais em *Cohniella cepula* por tratamento. As barras indicam uma relação direta entre o aumento na concentração de 6-benzilaminopurina (BAP) e a porcentagem de hastes formadas.

Mesmo em concentrações muito baixas de nitrogênio ocorreu a formação de hastes florais, sendo o tratamento F20 o segundo com maior número de hastes, não havendo diferença significativa deste com o melhor tratamento F5. Entretanto, as plantas tratadas com baixas concentrações de nitrogênio apresentaram os menores tamanhos.

O maior número de hastes florais foi observado 90 dias após os tratamentos iniciados. A formação de hastes ficou bem distribuída por todo o período de 120 dias, mostrando falta de sincronismo na resposta a indução floral precoce *in vitro*.

A diferença entre os tratamentos com ou sem água de coco foi significativa. Entretanto não houve diferença entre os tratamentos com 100 mL.L⁻¹ ou 200 mL.L⁻¹ adicionados ao meio MS modificado (Tabela 4.2).

A grande maioria das hastes florais formadas apresentava apenas um botão floral, mas também foram formadas hastes com mais de dois botões (Figura 4.2). Não foi avaliada a possibilidade do número de botões estar relacionado com o tamanho da planta. Foram observadas hastes florais perfilhadas, com mais de uma ramificação (Figura 4.3) e não perfilhadas que representaram a maior parte das hastes.

Em condição *ex vitro*, as flores de plantas adultas permanecem abertas por aproximadamente 25 dias, enquanto que as flores *in vitro* duraram de 5 a 7 dias apenas.

Tabela 4.1 Formação de hastes florais em *Cohniella cepula* distribuídas por dias após os tratamentos (DAT), porcentagem total de hastes florais formadas, teste de Tukey (nível de significância de 5%) e o total de flores completas formadas:

T	N plant.	Hastes florais formadas (DAT)			Hastes florais formadas		Flores completas formadas	
		60	90	120	Total(%)	TUKEY*	N plant.	%
F1	42	0	0	0	0	e	0	0
F2	42	0	0	0	0	e	0	0
F3	42	1	1	1	7,14	bc	0	0
F4	42	3	2	3	19,05	a	2	4,76
F5	35	3	5	6	40,0	a	2	5,71
F6	28	0	0	0	0	e	0	0
F7	35	0	0	0	0	e	0	0
F8	42	2	1	1	9,52	b	0	0
F9	35	0	6	0	17,14	ab	2	5,71
F10	28	1	3	1	17,86	ab	1	3,57
F11	35	0	0	0	0	e	0	0
F12	42	0	0	0	0	e	0	0
F13	42	0	2	0	4,76	c	1	2,38
F14	32	0	7	0	21,88	ab	1	3,13
F15	42	0	10	0	23,81	ab	1	2,38
F16	42	0	0	0	0	e	0	0
F17	42	0	0	0	0	e	0	0
F18	42	0	3	0	7,14	bc	0	0
F19	35	0	4	0	11,43	ab	0	0
F20	42	0	11	1	28,57	ab	0	0

*Medidas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4.2 Efeito da adição de água de coco ao meio para indução floral *in vitro* em *Cohniella cepula*, teste de Tukey (nível de significância de 5%)

Tratamentos	Hastes formadas após 120 dias (%)*
Sem água de coco	24,99 b
100 mL.L ⁻¹ água de coco	46,66 a
200 mL.L ⁻¹ água de coco	44,99 a

*Medidas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

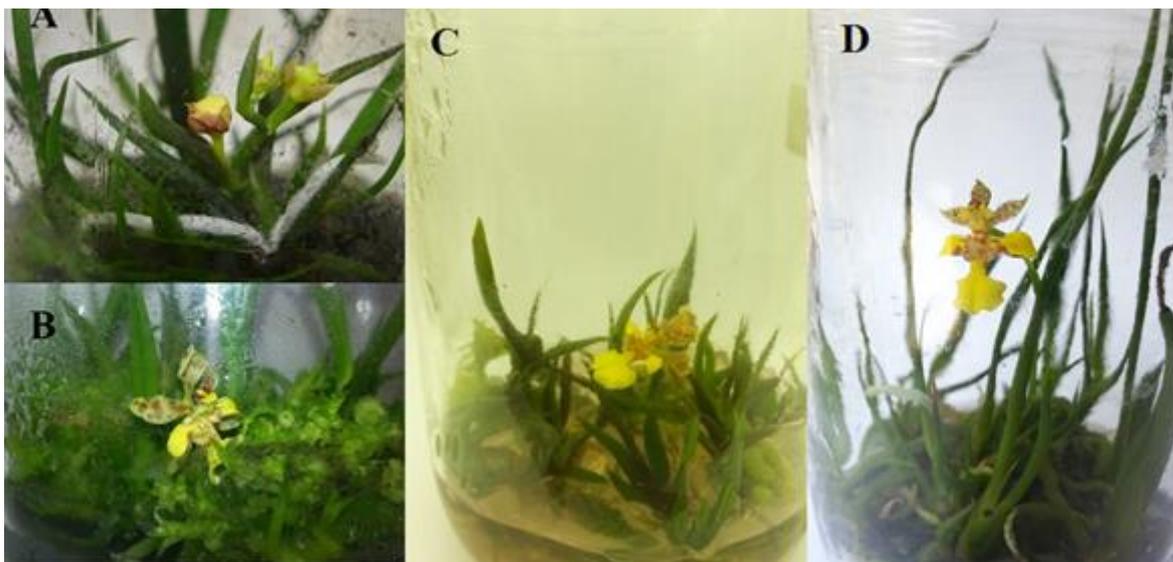


Figura 4.2 Indução floral precoce *in vitro* em *Cohniella cepula*. A = Três botões em desenvolvimento (tratamento F8); B = flor completamente formada em meio a inúmeros brotos (tratamento F5); C = flor completamente formada em plantas pouco desenvolvidas (tratamento F14); D = flor completamente formada em planta bem formada (tratamento F4).



Figura 4.3 Hastes florais e botões em *Cohniella cepula* que pararam seu desenvolvimento *in vitro* e secaram em diferentes estados. A) botões no início do desenvolvimento; B) Botão floral completo prestes a abrir; C) haste ramificada com vários botões no meio do desenvolvimento. Barra = 1cm.

As demais espécies utilizadas para este trabalho e submetidas aos tratamentos *C. eugenii*, *E. secundum* e *L. goyazensis*, responderam apenas da forma já prevista na literatura. Ou seja, com aumento no comprimento das raízes nos tratamentos com redução de nitrogênio e aumento de fósforo, na ausência de regular de crescimento. Redução do crescimento e amarelecimento nos tratamentos com redução da concentração de nitrogênio. Houve aumento no número de brotos conforme o aumento na concentração de BAP e redução na quantidade e comprimento de raízes também com o aumento na concentração de BAP para todas as quatro espécies.

Houve mortalidade de aproximadamente 20% para as espécies *C. eugenii* e para *E. secundum* nos tratamentos acima de 44,4mM de BAP, o mesmo não ocorreu com *C. cepula* e com *L. goyazensis*. Entre as particularidades estão as mudança da coloração das folhas das plantas de *E. secundum* de verde para vermelho e rosa nos tratamentos com redução de nitrogênio e aumento do fósforo (Figura 4.4). A aparência relativamente mais robusta de *C. eugenii* nos tratamentos F11 (Figura 4.5), aparentando maior diâmetro dos bulbos. A espécie *E. secundum* produziu maior número de brotos (até 31 brotos por explante, Figura 4.6) com o aumento na concentração de BAP, enquanto que *L. goyazensis* apresentou poucos brotos em qualquer concentração (de 1 a 6 brotos).

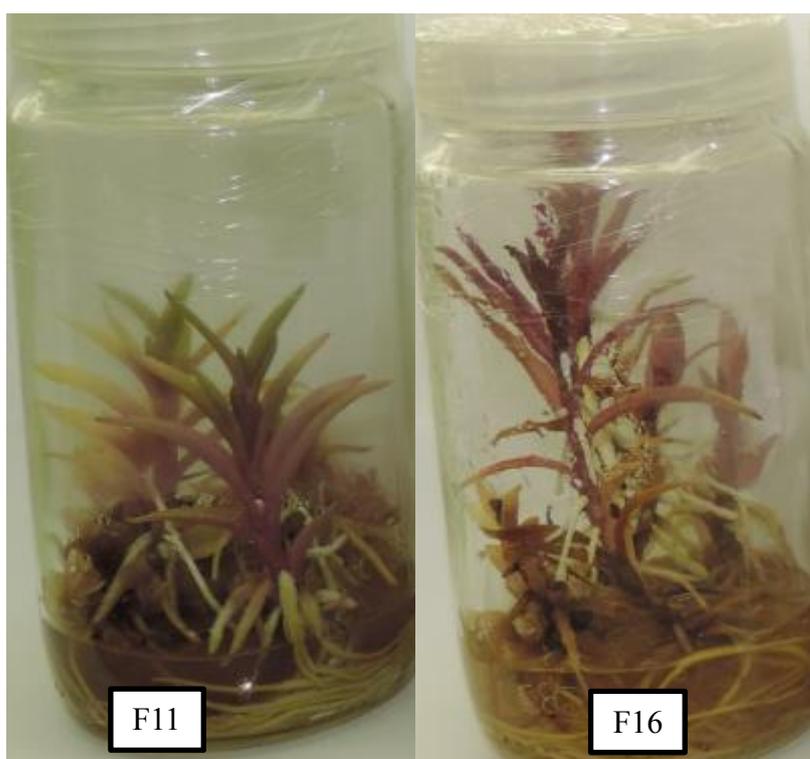


Figura 4.4 *Epidendrum secundum* em tratamentos com redução da concentração de nitrogênio e aumento do fósforo, apresentando grande quantidade de raízes e cor avermelhada das folhas.



Figura 4.5 *Cyrtopodium eugenii* no tratamento F11, com redução de nitrogênio e aumento do fósforo, apresentando bom desenvolvimento e maiores bulbos.



Figura 4.6 *Epidendrum secundum* submetido ao tratamento F20, com alta concentração de BAP.

4.4 DISCUSSÃO

Os fatores responsáveis pela indução floral não estão totalmente esclarecidos tanto para a espécie *C. cepula* quanto para outros trabalhos relacionados com o florescimento *in vitro*. Entretanto, a predisposição genética e o uso de reguladores de crescimento devem estar mais estreitamente relacionados à indução floral precoce *in vitro*.

Os níveis de citocininas endógenas podem ser alterados conforme a concentração ou a origem do nitrogênio disponível para as plantas, segundo testes alterando-se a concentração e o uso de nitrato (NO₃⁻), amônia (NH₄⁺) ou ureia no desenvolvimento de *Epidendrum fulgens* e em bromélias epífitas (Mercier & Kerbauy, 1991; Mercier et al., 1997). A redução na concentração do nitrogênio em meio de cultura pode reduzir a produção de etileno e aumentar a produção de brotos, como ocorre em *Cymbidium karan* (Ogura & Okubo, 2006).

A baixa concentração de nitrogênio é citada como favorável para a indução floral *in vitro* em vários trabalhos com orquídeas (Kostenyuk, 1999; Vaz e Kerbauy 2000; Tee 2008). Entretanto, para este trabalho a redução da concentração total do nitrogênio em meio de cultura não influenciou a indução floral de forma positiva.

Aumentos da concentração de outros nutrientes em relação aos meios básicos também são citados, como o aumento da concentração de cálcio e potássio no meio VW para *Psychmorchis pusilla* (Vaz & Kerbauy, 2000b). O aumento na concentração de fósforo para indução floral precoce *in vitro* de *Cymbidium nyveo-marginato* (Kostenyuk, 1999).

Concentrações mais altas de citocinina foram mais efetivas na indução floral precoce *in vitro* de *C. cepula*. Reguladores de crescimento, especialmente as citocininas tem sido associadas com a indução floral e desenvolvimento em muitas orquídeas (Chia et al., 1999; Kostenyuk et al., 1999; Wang et al., 2009).

As citocininas podem estar envolvidas no controle da expressão de genes relacionados ao meristema floral, mas também podem afetar negativamente o desenvolvimento dos órgãos florais como ocorre em *Arabidopsis* (Venglat & Sawhney, 1996).

Para a orquídea *Psychmorchis pusilla* o uso de 1 a 4μM de BA (bezilaminoadenina) no meio de cultura estimula a indução floração, entretanto, os botões florais se desenvolvem de forma anormal (Vaz & Kerbauy, 2008a). Os eventos de surgimento da haste floral, crescimento da haste, desenvolvimento dos botões e a antese estão associados com diferentes composições dos meios de cultura, temperatura e fotoperíodo (Vaz & Kerbauy, 2008). Níveis elevados de citocinina afetaram negativamente o desenvolvimento floral em algumas orquídeas *in vitro*, como para *Phalaenopsis* (Duan & Yazawa, 1995) e para *Dendrobium* var. Chao Praya (Hee et al., 2007).

A adição de 20% de água de coco foi eficiente para induzir a floração *in vitro* em 65% dos indivíduos em *Dendrobium* Madame Thong-In (Sim et al., 2007). Em análise

química detalhada da água de coco foram encontrados 12 tipos diferentes de citocinina que se mantem ativas mesmo após a autoclavagem (Sim et al., 2008).

Os resultados dos testes de indução floral têm apresentado grandes diferenças entre diversos autores. As diferenças estão relacionadas a forma de resposta das diferentes espécies e variedades testadas, às diferentes metodologias empregadas, diferentes condições de incubação dos experimentos e até mesmo a origem e qualidade dos reagentes utilizados. Até o momento, não foi identificado um mecanismo principal de indução ao florescimento *in vitro* precoce ou um padrão específicos no método de indução (Teixeira da Silva et al., 2014a).

Para a espécie *Cohniella cepula* os indivíduos adultos apresentam hastes florais únicas ou perfilhadas, sendo provavelmente esta uma característica genética. O perfilhamento das hastes florais é característica fenotípica de grande importância comercial para plantas ornamentais. Em muitas plantas a característica número de flores e perfilhamento da haste está mais relacionada à genética do que o tamanho do indivíduo (Coen & Meyerowitz, 1991; Worley & Barrett, 2000). A indução floral precoce *in vitro* poderia favorecer a seleção precoce desta característica no melhoramento genético subsequente para esta espécie.

4.5 CONCLUSÕES

Apenas a espécie *C. cepula* produziu hastes florais e flores *in vitro*. A predisposição genética é fator importante para a indução a floração precoce *in vitro*. A utilização de uma citocinina em altas concentrações e a presença também de citocininas na água de coco adicionada ao meio são importantes para a indução a floração precoce *in vitro*. A alteração nas concentrações do nitrogênio e do fósforo do meio MS não tem efeito para a indução na espécie *Cohniella cepula*. A indução a floração precoce *in vitro* e as variáveis envolvidas no processo são espécie dependentes.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHIA, T. F.; ARDITTI, J.; SEGEREN, M. I.; HEW, C. S. Review: *in vitro* flowering of orchids. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 14, n. 1, p. 60–76, 1999.

CHIU, Y.; LIN, C.; CHANG, C. *In vitro* fruiting and seed production in *Erycina Pusilla* (L.) NH Williams and MW Chase. **Propagation of Ornamental Plants**, Sofia, v. 11, n. 3, p. 131–136, 2011.

COEN, E. S.; MEYEROWITZ, E. M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**, London, v. 353, n. 6339, p. 31–37, 1991.

CONFALONIERI, M.; BALESTRAZZI, A. *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 109–138, 2003.

DUAN, J.-X.; YAZAWA, S. Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 71–74, 1995.

HEE, K. H.; LOH, C. S.; YEOH, H. H. Early *in vitro* flowering and seed production in culture in *Dendrobium Chao Praya Smile* (Orchidaceae). **Plant cell reports**, New York, v. 26, n. 12, p. 2055–62, 2007.

HOSSAIN, M. M.; KANT, R.; VAN, P. T.; Kant, R.; Van, P. T.; Winarto, B.; Zeng, S.; Teixeira da Silva, J. A. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 32, n. 2, p. 69–139, 2013.

KOSTENYUK, I.; OH, B. J.; SO, I. S. Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak *in vitro*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 1, p. 1–5, 1999.

KYTE, L.; KLEYN, J. **Plants from test tubes: introduction to micropropagation**. Timber Press, 1996, 240 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronomica Ceres, 2006, 638 p.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 138, n. 2, p. 195–199, 1991.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E. Effects of NO₃⁻, NH₄⁺ and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. **Plant Cell and Environment**, Malden, v. 20, n. 3, p. 387–392, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and Bio Assays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

OGURA-TSUJITA, Y.; OKUBO, H. Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins in *in vitro* shoot formation from rhizomes of *Cymbidium kanran*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 42, n. 6, p. 614–616, 2006.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 12, p. 1002–1006, 1999.

SHIMASAKI, K. The role of ethylene in the plantlet formation of *Cymbidium kanran* from rhizome culture. **Plant Tissue Culture Letters**, Nairobi, v. 9, n. 1, p. 202–205, 1992.

SIM, G. E.; GOH, C. J.; LOH, C. S. Induction of *in vitro* flowering in *Dendrobium Madame Thong-In* (Orchidaceae) seedlings is associated with increase in endogenous N(6)-(Delta (2)-isopentenyl)-adenine (iP) and N (6)-(Delta (2)-isopentenyl)-adenosine (iPA) levels. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 8, p. 1281–9, 2008.

SIM, G. G. E.; LOH, C. S. C.; GOH, C. C. J. High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium Madame Thong-In* (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, n. 4, p. 383–93, 2007.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Orchids : advances in tissue culture, genetics, Phytochemistry and transgenic biotechnology. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**, Oakland, v. 7, n. 1, p. 1–52, 2013.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; ACETO, S.; LIU, W.; YU, H.; KANNO, A. Genetic control of flower development, color and senescence of *Dendrobium* orchids. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 175, p. 74–86, 2014. Elsevier B.V.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; KERBAUY, G. B.; ZENG, S.; CHEN, Z.; DUAN, J. *In vitro* flowering of orchids. **Critical reviews in biotechnology**, Philadelphia, v. 34, n. 1, p. 56–76, 2014.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; VAN, K. T. T.; BIONDI, S.; NHUT, D. T.; ALTAMURA, M. M. Thin cell layers: developmental building blocks in ornamental biotechnology. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**, Oakland, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2007.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B. Effects of mineral nutrients on *in vitro* growth and flower formation of *Psychomorchis pusilla* (Orchidaceae). **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 520, n. 1, p. 149–156, 2000.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. *In vitro* flowering studies in *Psychomorchis pusilla*. In: Teixeira da Silva, J. A. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues**. Islenworth, UK: Global Science Book Ltd., 2008, p. 427–432.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B. *In Vitro* Precocious orchid flowering: A strategy for basic research and commercial approaches. In: Teixeira da Silva, J. A. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues**. Islenworth, UK: Global Science Book Ltd., 2008, p. 421–426.

WANG, Z.; WANG, L.; YE, Q. High frequency early flowering from *in vitro* seedlings of *Dendrobium nobile*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 328–331, 2009

WORLEY, A. C.; BARRETT, S. C. H. Evolution of floral display in *Eichhornia paniculata* (pontederiaceae): direct and correlated responses to selection on flower size and number. **Evolution**, Malden, v. 54, n. 5, p. 1533–1545, 2000.

5 CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS DO CERRADO

RESUMO

As orquídeas representam um grupo ameaçado em seu ambiente natural por coletas predatórias e pela perda de habitats. São espécies importantes para o mercado de floricultura e necessitam de pesquisa para o melhoramento genético e para sua conservação em bancos de germoplasma. Neste sentido, a criopreservação tem demonstrado ser um método eficiente para conservação de sementes de orquídeas por longos períodos de tempo. Este trabalho teve o objetivo de testar a criopreservação de sementes obtidas de cápsulas originadas de fecundação cruzada de sete espécies de orquídeas de ocorrência no Cerrado: *Cohniella cepula*, *Cyrtopodium eugenii*, *Cyrtopodium sainttlegerianum*, *Epidendrum densiflorum*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum*, e *Lockhartia goyazensis*. As sementes das espécies testadas responderam de forma parcialmente distinta para os tratamentos de criopreservação avaliados. A maioria das espécies testadas não apresentou diferenças significativas para a viabilidade das sementes submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido e o controle. O congelamento sem crioprotetor foi bem sucedido para todas as espécies mantendo a viabilidade das sementes, para *C. cepula* em 63%, *C. eugenii* em 59%, *C. sainttlegerianum* 70%, *E. densiflorum* 42%, *E. nocturnum* 31%, *E. secundum* 69% e *L. goyazensis* em 52%. Apenas *E. nocturnum* e *C. cepula* apresentaram redução significativa da viabilidade quando submetidas ao congelamento apenas em nitrogênio líquido. De forma geral a criopreservação de sementes das espécies avaliadas pode ser feito sem o uso de soluções crioprotetoras, desde que desidratadas previamente.

Palavras-chave: vitrificação, desidratação de sementes, conservação de sementes

ABSTRACT

CRYOPRESERVATION OF CERRADO ORCHIDS SEEDS

Orchids represent a group threatened in their natural environment by predatory collections and loss of habitats. Orchids are important mainly for floriculture market and need search for preservation in germplasm banks, which are important for plant breeding and conservation. Cryopreservation has been shown to be effective in conserving orchid seeds and development of germplasm banks. This study aimed to test the cryopreservation of seeds from capsules obtained by cross pollination of seven orchids species occurring in Cerrado: *Cohniella cepula*, *Cyrtopodium eugenii*, *Cyrtopodium saintlegerianum*, *Epidendrum densiflorum*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum*, and *Lockhartia goyazensis*. The tested seeds had different behavior after cryopreservation treatments. There were no significant differences between seeds freezing in liquid nitrogen and control. The seeds frozen without cryoprotectant was successful for all species maintaining seed viability, for *C. cepula* 63%, *C. eugenii* 59%, *C. saintlegerianum* 70%, *E. densiflorum* 42%, *E. nocturnum* 31%, *E. secundum* 69% and *L. goyazensis* 52%. Only for *E. nocturnum* and *C. cepula* there were significant reduction in viability when subjected to freezing in liquid nitrogen. Generally, to cryopreservation of orchids seeds evaluated it can be done without the use of cryoprotectant solutions, since previously dehydrated procedure.

Keyword: vitrification, dehydratetion of seeds, preserved seeds

5.1 INTRODUÇÃO

A criopreservação permite aumentar a eficiência dos bancos de germoplasma que são importantes para programas de conservação e melhoramento genético (Ishikawa et al., 1997; Bowes, 1999; Santos, 2000; Vendrame et al., 2007) por possibilitar a conservação em espaço reduzido e com menor custo de grande quantidade de material elite, pré-melhorado e selvagem. Para orquídeas, os bancos de germoplasma são fundamentais devido à pouca durabilidade das sementes, principalmente com relação as espécies de orquídeas de regiões tropicais (Neto & Custódio, 2005). Além disso, o tamanho diminuto das sementes, ou dos protocormos, torna-se uma vantagem na criopreservação de orquídeas, pois possibilita o armazenamento de quantidades ainda maiores de material vegetal quando comparado a outras culturas (Vendrame et al., 2007).

A grande diversidade da família Orchidaceae parece demonstrar também grande variação de respostas quando espécies distintas são submetidas aos testes de criopreservação. Entre as espécies já testadas para estes métodos, existe material criopreservado de forma eficiente, mas também existem espécies cujo material utilizado na criopreservação apresenta baixa taxa de sobrevivência (Thammasiri, 2008; Vendrame et al., 2014). Existem várias opções de métodos de criopreservação e, por ser área relativamente nova, pouco ainda se sabe quanto ao comportamento dos tecidos vegetais de diferentes espécies quando submetidos a estes métodos (Vendrame et al., 2014).

Além da redução no espaço de armazenamento do material e o tempo de preservação a longo prazo, há vantagens da criopreservação relacionadas à redução nos custos associados à manutenção de coleções *in vivo*. O custo do germoplasma criopreservado é quase limitado ao abastecimento regular e seguro de nitrogênio líquido. Nos Estados Unidos, o levantamento dos custos de conservação levou a conclusão de que a manutenção de um acesso de germoplasma de frutíferas mantido em campo custaria anualmente 900 dólares, quando armazenado *in vitro* sob crescimento mínimo 23 dólares e apenas 1 dólar quando criopreservado (Engelmann, 2010).

As orquídeas em seu ambiente natural são alvos de coleta predatória e sofrem com a degradação e perda de habitats, resultando na extinção de populações nativas no âmbito local e regional (Swarts & Dixon, 2009; Hosomi et al., 2012; Vij & Pathak, 2012). Coleta predatória e perda de habitat também são os principais motivos que colocam sob ameaça muitas espécies de orquídeas no Brasil. Espécies de maior interesse popular, geralmente,

são as mais ameaçadas como ocorre com a orquídea *Cattleya walkeriana* em seu ambiente natural (Faria et al., 2002).

Devido à importância econômica e ecológica das orquídeas do Cerrado e a falta de conhecimento sobre conservação deste grupo, este trabalho teve como objetivo estabelecer métodos adequados de criopreservação para sementes de orquídeas do Cerrado, mais especificamente para sete espécies distribuídas em quatro gêneros distintos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal

Foram selecionados indivíduos saudáveis e vigorosos pertencentes à Coleção de Bromélias e Orquídeas do Cerrado, localizada na Escola de Agronomia – Universidade Federal de Goiás e da Coleção de Orquídeas do Cerrado do Centro de Treinamento da Emater-GO, localizado próximo à Escola de Agronomia da UFG. Foram obtidas sementes maduras de cápsulas originadas de fecundação cruzada de sete espécies de orquídeas *Epidendrum desciflorum*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum*, *Cyrtopodium eugenii*, *Cyrtopodium sainttlegerianum*, *Cohniella cepula* e *Lockhartia goyazensis*.

5.2.2 Tratamentos para Criopreservação

As sementes foram retiradas das cápsulas e armazenadas em envelopes de papel por 30 dias à 6°C ±1°C em vidros vedados contendo sílica gel. Após os 30 dias as sementes foram testadas para verificar o teor de umidade, para isso foi utilizado o método em estufa a 105°C por 24h (Villela & Peres, 2004).

Os tratamentos consistiram em testes baseados no método de vitrificação, a partir da imersão das sementes em diferentes soluções de criopreservação (Tabela 5.1) seguindo-se a imersão das sementes em criotubos diretamente no nitrogênio líquido (NL) para o congelamento rápido. As soluções de sacarose e glicerol foram utilizadas à temperatura ambiente (Nishizawa et al., 1993). As soluções de PVS2 (Sakai et al., 1990) e PVS2 com 1% de phloroglucinol foram utilizadas a aproximadamente 0°C. O tempo de espera das

sementes imersas nestas soluções foi realizada em banho de gelo (Tabela 5.1). A solução de PVS2 foi composta por 30% glicerol, 15% etilenoglicol, 15% dimetil sulfóxido (DMSO) e 0,4 mol.L⁻¹ de sacarose em água destilada.

Foi utilizado um controle (T0) no qual as sementes foram testadas sem uso de soluções de criopreservação e sem o congelamento em NL e um tratamento (T1) no qual as sementes foram submetidas apenas ao congelamento em NL. Foram utilizadas 10 µg de sementes por tratamento. As sementes permaneceram em NL por 24h.

Tabela 5.1 Tratamentos indicando as respectivas soluções utilizadas para a criopreservação de sementes das espécies de orquídeas: *Epidendrum desciflorum*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum*, *Cyrtopodium eugenii*, *Cyrtopodium saintlegerianum*, *Cohniella cepula* e *Lockhartia goyazensis*.

Trat.	Soluções de criopreservação e procedimentos
T0	Nenhum tratamento e sem congelamento em nitrogênio líquido (NL)
T1	Sementes em criotubo direto para o NL (sem solução de criopreservação)
T2	0,4 M sacarose (20 min)
T3	0,4 M sacarose (20 min) + PVS2 (10 min)
T4	0,4 M sacarose (20 min) + PVS2 + phloroglucinol (10 min)
T5	2,0 M glicerol (20 min)
T6	2,0 M glicerol (20 min) + PVS2 (10 min)
T7	2,0 M glicerol (20 min) + PVS2 com 1% phloroglucinol (10 min)
T8	0,4 M sacarose + 2,0 M glicerol (20 min)
T9	0,4 M sacarose + 2,0 M glicerol (20 min) + PVS2 (10 min)
T10	0,4 M sacarose + 2,0 M glicerol (20 min) + PVS2 + phloroglucinol (10 min)

Após serem retiradas do NL, as sementes foram submetidas ao descongelamento rápido em banho maria à 40°C por 2 min. As soluções de criopreservação foram retiradas dos criotubos com uma seringa descartável em seguida as sementes foram lavadas por três vezes com água destilada.

5.2.3 Teste de viabilidade

Após a lavagem, a viabilidade das sementes foi avaliada com a utilização da solução de 2,3,5 cloreto de trifetil tetrazólio (TTC). Foi acrescentado 1 mL da solução de

TTC a 1% sobre as sementes. Os criotubos foram mantidos no escuro a 40°C por 24 h (Piña-Rodrigues et al., 2004). Após o tratamento com TTC, as sementes foram contadas em microscópio estereoscópico sendo utilizados aumentos adequados para cada tamanho de semente (*E. secundum* 10X, *C. eugenii*, *C. saintlegerianum*, *E. densiflorum* e *E. nocturnum* 20X, *C. cepula* e *L. goyazensis* 35X) para avaliar a porcentagem de viabilidade. Foram contadas no mínimo 500 sementes em 10 amostras e foram consideradas viáveis as sementes coradas pelo TTC (sementes vermelhas), e inviáveis as sementes que se mantiveram sem alterar a coloração natural (em geral brancas ou amareladas dependendo da espécie).

Os dados de porcentagem de viabilidade para cada espécie foram transformados ($\arcsen\sqrt{X/100}$) e submetidos a análise de variância e teste de Tukey (nível significância 5%).

3.2.4 Germinação das sementes criopreservadas

As sementes dos tratamentos T1 (apenas congelamento em NL) para todas as espécies foram submetidas à descontaminação e semeadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) ou 1/2MS modificado (Faria et al., 2012) para confirmação da viabilidade e germinação das sementes descongeladas.

5.3 RESULTADOS

As sementes utilizadas para os tratamentos de criopreservação apresentavam umidade aproximada de 11% ($\pm 1\%$), depois de retiradas dos vidros com sílica gel.

As sementes das espécies de orquídeas testadas responderam de forma parcialmente distinta para os tratamentos de criopreservação avaliados. Todas as espécies avaliadas apresentaram viabilidade alta no tratamento composto apenas pelo congelamento em NL (T1) (Tabela 5.1). A maioria das espécies testadas não apresentou diferenças significativas entre o tratamento T1 e o controle T0. Apenas *E. nocturnum* e *C. cepula* apresentaram redução significativa da viabilidade quando submetidas ao tratamento T1, comparando com o controle T0.

Sementes de *C. cepula* apresentaram comportamento diferente das demais espécies, tendo perdido totalmente a viabilidade na maioria dos tratamentos com crioprotetores (Tabela 5.2 e Figura 5.1).

Não foram observadas grandes diferenças para a maioria das espécies testadas quanto aos tratamentos avaliados. Para *C. sainttlegerianum*, *E. nocturnum* e *E. densiflorum* não houve diferença significativa entre os tratamentos T2 à T10.

Tabela 5.2 Porcentagem de viabilidade das sementes criopreservadas verificada após tratamento com solução de 2,3,5 cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) por 24 h. A tabela indica os resultados para todos os tratamentos e para as sete espécies de orquídeas estudadas.

T.	<i>C.saint</i>	<i>C.eug</i>	<i>E.sec</i>	<i>E.noc</i>	<i>E.dens</i>	<i>C.cep</i>	<i>L.goy</i>
T0	69,03 ab	57,40 ab	59,30 a	48,54 a	49,38 a	85,67 a	53,27 a
T1	70,15 a	59,55 a	69,15 a	31,86 b	42,85 ab	63,62 b	51,99 a
T2	50,66 c	43,44 e	26,14 cd	19,54 b	35,16 c	0 f	42,03 bc
T3	52,08 c	44,68 de	26,82 d	22,29 b	35,35 c	0 f	42,4 bc
T4	61,93 bc	56,85 abc	36,17 cd	23,87 b	36,27 bc	2,54 e	47,96 ab
T5	52,45 c	42,96 e	37,41 bc	24,07 b	36,09 bc	0 f	39,61 c
T6	62,28 bc	51,12 bcd	46,91 b	29,78 b	38,41 bc	9,7 c	47,52 abc
T7	61,72 bc	50,12 cd	47,81 b	31,06 b	38,72 bc	7,27 d	43,77 bc
T8	58,12 c	50,77 cd	10,29 e	19,44 b	32,81 c	5,05 d	48,48 ab
T9	59,19 bc	52,59 bc	11,29 e	21,32 b	35,86 bc	0 f	48,23 ab
T10	59,49 bc	53,54 bc	13,3 e	22,35 b	34,83 c	0 f	48,78 ab

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5% de significância). *C.saint.*: *Cyrtopodium sainttlegerianum*, *C.eug.*: *Cyrtopodium eugenii*, *E.sec.*: *Epidendrum secundum*, *E.noc.*: *Epidendrum nocturnum*, *E.dens.*: *Epidendrum densiflorum*, *C.cep.*: *Cohniella cepula*, *L.goy.*: *Lockhartia goyazensis*.

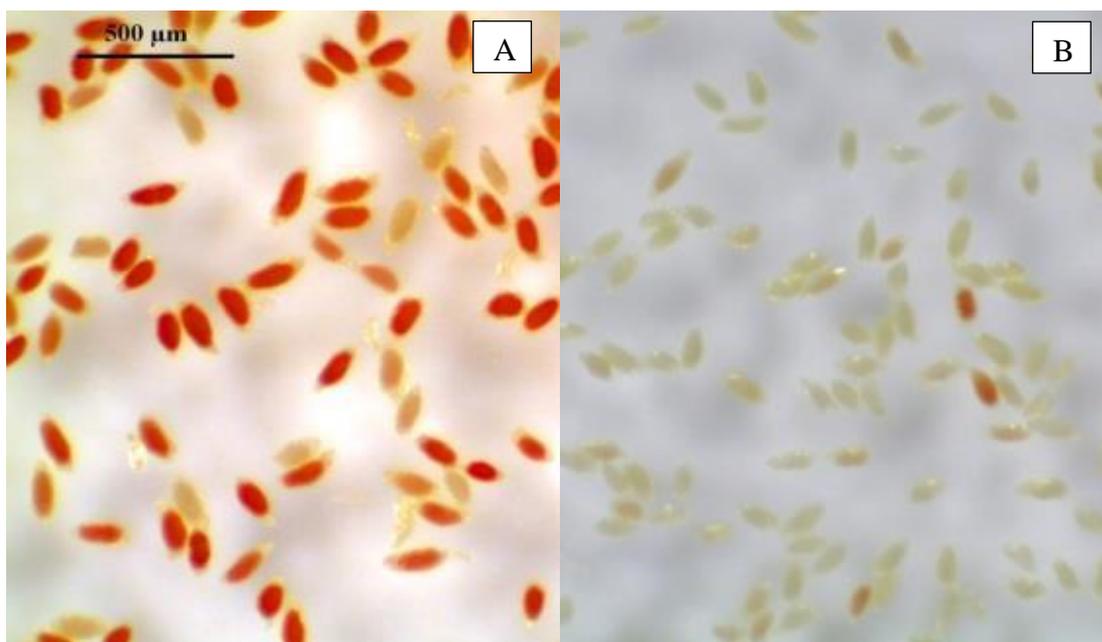


Figura 5.1 Diferença na viabilidade de sementes de *Cohniella cepula* após tratamentos com solução de 2,3,5 cloreto de trifênil tetrazólio (TTC) por 24 h. Sementes coradas de vermelho são viáveis enquanto sementes brancas estão inviáveis. A) Tratamento T1 (Sementes em criotubo direto para o NL (sem solução de criopreservação). B) tratamento T4 0,4 M sacarose (20 min) + PVS2 + phloroglucinol (10 min).

As plantas germinadas a partir de sementes descongeladas do nitrogênio apresentaram germinação e desenvolvimento inicial normal quando comparadas visualmente com plantas germinadas de sementes não submetidas ao congelamento.

5.4 DISCUSSÃO

A criopreservação tem demonstrado ser um método seguro para manter bancos de germoplasma para sementes de orquídeas. Plantas de *Cyrtopodium hatschbachii* obtidas de sementes criopreservadas por encapsulamento foram submetidas a avaliações cromossômicas e fenotípicas e apresentaram os mesmos resultados quando comparados a plantas não criopreservadas (Surenciski et al., 2007). Sementes de *Oncidium flexuosum* foram criopreservadas eficientemente (79% de germinação) com o método de vitrificação, sem riscos à estabilidade genética (Galdiano et al., 2013).

Thammasiri e Soamkul (2007) elaboraram testes de criopreservação para sementes de *Vanda coerulea* utilizando apenas a solução de PVS2 e obtiveram até 67% de sobrevivência em sementes que tinham inicialmente 33% de umidade. Neste caso, o PVS2

foi utilizado para desidratar as sementes e para proteger o material vegetal do congelamento. Quando estas mesmas sementes foram submetidas apenas ao NL nenhuma semente sobreviveu devido à alta umidade dos tecidos vegetais.

A umidade das sementes deve ser observada antes de submetidas a criopreservação. As sementes de orquídeas *Phalaenopsis amabilis* se tornam resistentes a desidratação após a maturação quando a umidade das sementes atinge 55% (Lee et al., 2008). A maioria das sementes de orquídeas apresenta 50% de umidade, valor que é maior do que a maioria das espécies de importância agrícola (Schwallier et al., 2011).

Neste trabalho, a desidratação inicial em vidro vedado contendo sílica gel, no qual as sementes foram armazenadas logo após terem sido retiradas das cápsulas e que levou o teor de umidade a 11%, pode ter sido o principal fator para a sobrevivência das sementes congeladas diretamente em NL sem o uso de soluções crioprotetoras. A baixa umidade das sementes favorece a sobrevivência de sementes submetidas ao congelamento em NL ou quando armazenadas em sistema convencional de baixa temperatura e umidade (Hirano et al., 2005, 2009).

O melhor tratamento para criopreservar protocormos de *Dendrobium nobie* foi a utilização de 2 M de glicerol como crioprotetor por 20 minutos seguido de PVS2 com 1% de phorogucinol por 10 min levando a sobrevivência de 68% dos protocormos congelados. O uso de sacarose como crioprotetor teve forte efeito negativo reduzindo a sobrevivência em 90% (Vendrame & Faria, 2011). No mesmo trabalho quando os protocormos foram submetidos apenas ao congelamento em NL, sem o tratamento prévio com crioprotetores, não houve protocormos sobreviventes após o descongelamento, provavelmente devido à grande quantidade de água presente nos tecidos vegetais jovens.

Neste trabalho, as sementes da espécie *C. cepula* perderam completamente a viabilidade em alguns dos tratamentos com crioprotetores, enquanto para as espécies *C. sainttlegerianum*, *E. nocturnum* e *E. densiflorum* não houve diferença significativa entre os tratamentos. Estes resultados corroboram dados de Nikishina et al. (2007) que indicam que o comportamento de sementes submetidas à criopreservação pode ser espécie dependente.

O uso de phloroglucinol foi eficiente como crioprotetor para sementes de *Oncidium flexuosum* quando usado na concentração de 1% junto com PVS2 resultando em 79% de germinação (Galdiano et al., 2013). Neste trabalho, o uso de PVS2 com adição de 1% de phloroglucinol foi eficiente para conservar sementes de *C. sainttlegerianum*, *C. eugeni* e *L.*

goyasensis, com resultados semelhantes ao controle, mas também às sementes submetidas apenas ao congelamento em NL.

Os resultados da criopreservação de sementes de orquídeas tem apresentado grande variação. Os melhores resultados variam de 99% a 15% de sobrevivência em diferentes espécies utilizando diversos métodos de criopreservação (Vendrame, 2014). Apesar de 15% de sobrevivência para sementes de *Dendrobium cariniferum* parecer um valor baixo, este é um resultado satisfatório, pois existem milhares de sementes dentro de pequenas cápsulas (Thammasiri, 2008).

Mesmo com todo o sucesso alcançado nos últimos anos com o desenvolvimento de diversos métodos de criopreservação para atender a diferentes espécies, o crescimento no número de espécies em risco de extinção em todo o mundo representa um alerta quanto a necessidade de métodos ainda mais eficazes quanto a sua agilidade e possibilidade de trabalhar com maior número de espécies e em menor tempo (Kaczmarczyk et al., 2010).

5.5 CONCLUSÕES

Sementes de orquídeas respondem de forma diferenciada às soluções crioprotetoras, dependendo da espécie. Porém, se previamente desidratadas utilizando apenas um ambiente de armazenamento fechado com sílica gel, sementes das espécies *Cohniella cepula*, *Cyrtopodium eugenii*, *Cyrtopodium sainttlegerianum*, *Epidendrum densiflorum*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum*, e *Lockhartia goyazensis* podem ser criopreservadas utilizando apenas nitrogênio líquido, sem a utilização de soluções crioprotetoras. Além disso, depois de submetidas ao descongelamento rápido, sementes criopreservadas, das sete espécies, mantêm sua viabilidade e são capazes de germinar normalmente.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOWES, B. G. **A Colour Atlas of plant propagation and conservation**. Londres: Manson publishing, 1999, 225 p.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 47, n. 1, p. 5–16, 2010.

FARIA, R. T. DE; 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.

FARIA, R. T. DE; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenaz, 2012, 124 p.

GALDIANO, R. F.; MACEDO LEMOS, E. G.; VENDRAME, W. A. Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 139–148, 2013.

HIRANO, T.; GODO, T.; MII, M.; ISHIKAWA, K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant cell reports**, New York, v. 23, n. 8, p. 534–539, 2005.

HIRANO, T.; GODO, T.; MIYOSHI, K.; ISHIKAWA, K.; ISHIKAWA, M.; MII, M. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 3, n. 1, p. 103–109, 2009.

HOSOMI, S. T.; CUSTÓDIO, C. C.; SEATON, P. T.; MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 48, n. 1, p. 127–136, 2012.

ISHIKAWA, K.; HARATA, K.; MII, M.; SAKAI, A.; YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 11, p. 754–757, 1997.

KACZMARCZYK, A.; TURNER, S. R.; BUNN, E.; MANCERA, R. L.; DIXON, K. W. Cryopreservation of threatened native Australian species—what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 47, n. 1, p. 17–25, 2010.

LEE, Y.; YEUNG, E. C.; LEE, N.; CHUNG, M. C. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: embryo development. **Botanical Studies**, Taipei, v. 49, n. 1, p. 139–146, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and Bio Assays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NETO, N. B. M.; CUSTÓDIO, C. C. Orchid conservation through Seed Banking: Ins and Outs. **Selbyana**, Sarasota, v. 26, n. 1, p. 229–235, 2005.

NIKISHINA, T. V. et al. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 54, n. 1, p. 121–127, 2007.

NISHIZAWA, S. et al. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, Clare, v. 91, n. 1, p. 67–73, 1993.

PIÑA-RODRIGUES, F. C.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação - do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283–297.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, n. 1, p. 30–33, 1990.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, n. ed. Especial, p. 70–84, 2000.

SCHWALLIER, R.; BHOOPALAN, V.; BLACKMAN, S. The influence of seed maturation on desiccation tolerance in *Phalaenopsis amabilis* hybrids. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 136–140, 2011.

SURENCISKI, M. R.; DEMATTEIS, M.; FLACHSLAND, E. A. Chromosome stability in cryopreserved germplasm of *Cyrtopodium hatschbachii* (Orchidaceae). **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v. 44, n. 4, p. 287–292, 2007.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of botany**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 543–56, 2009.

THAMMASIRI, K. Cryopreservation of some Thai orchid species. **Proceedings of the International Workshop on Ornamental Plants**, v. 788, p. 53–62, 2008.

THAMMASIRI, K.; SOAMKUL, L. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by vitrification. **ScienceAsia**, Bangkok, v. 33, n. 2, p. 223–227, 2007.

VENDRAME, W.; Faria, R. T. De; Sorace, M.; Sahyun, S. A. Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 3, p. 213–229, 2014.

VENDRAME, W. A.; CARVALHO, V. S.; DIAS, J. M. M. *In vitro* germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 188–193, 2007.

VENDRAME, W. A.; FARIA, R. T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 131–135, 2011.

VIJ, S. P.; PATHAK, P. Orchid Diversity: Conservation and Utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 82, n.4 , p. 295–300, 2012.

VILLELA, F. A.; PERES, W. B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação - do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 265–282.