



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS *Phalaenopsis* POR  
SEGMENTOS DE INFLORESCÊNCIAS E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

CESAR AUGUSTO ZANELLO

Araras  
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS *Phalaenopsis* POR  
SEGMENTOS DE INFLORESCÊNCIAS E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

**CESAR AUGUSTO ZANELLO**

ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN CARLOS CARDOSO

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Produção  
Vegetal e Bioprocessos Associados  
como requisito parcial à obtenção do  
título de MESTRE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL E BIOPROCESSOS  
ASSOCIADOS

Araras

2018

Zanello, Cesar Augusto

PROPAGAÇÃO IN VITRO DE ORQUÍDEAS Phalaenopsis POR  
SEGMENTOS DE INFLORESCÊNCIAS E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA /  
Cesar Augusto Zanello. -- 2018.  
90 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus  
Araras, Araras

Orientador: Jean Carlos Cardoso

Banca examinadora: Márcia Maria Rosa Magri; Elizabeth Ann Veasey

Bibliografia

1. Embriogênese somática. 2. Phalaenopsis. 3. micropropagação. I.  
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Cesar Augusto Zanello, realizada em 25/05/2018:

---

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso  
UFSCar

---

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri  
UFSCar

---

Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey  
ESALQ/USP

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, pela vida e saúde proporcionada a mim, me permitindo concluir mais essa etapa.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida, pelo amor, pela paciência, por estarem sempre ao meu lado me apoiando de todas as formas, e por acreditarem no meu potencial até mais do que eu mesmo. Sem vocês não seria possível.

À minha irmã Tayana pelo companheirismo, pela amizade e por todo o incentivo dado a mim durante todo o tempo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso pela contribuição inestimável para minha formação acadêmica me orientando desde a graduação, pela valiosa orientação neste trabalho, pela amizade, pelos conselhos, pelos ensinamentos, por toda confiança depositada em mim e pela oportunidade de poder trabalhar e aprender tanto ao lado de alguém que é uma referência profissional para mim.

Ao meu amigo Willian que dividiu o espaço no laboratório durante esses dois anos e auxiliou nas coletas de dados, montagem de experimentos e pelo companheirismo dentro e fora da universidade. Ao meu amigo Gilmar que mesmo de longe esteve presente sempre que possível e pelo auxílio nas análises estatísticas. Aos meus vizinhos e amigos Luciano e Patrícia que sempre estiveram presentes tanto nas horas de lazer quanto nas de trabalho, auxiliando de todas as formas. A todos os demais amigos que contribuíram de alguma forma.

Aos professores do CCA/UFSCar que contribuíram em minha formação acadêmica até aqui.

Ao Orquidário Monreale que foi peça fundamental para realização deste trabalho, pelo cultivo e manutenção das plantas e fornecimento de material vegetal.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Fisiologia Vegetal e todos os amigos que fiz nele, por ajudarem de diversas formas.

Ao Centro de Ciências Agrárias da UFSCar por ter sido minha segunda casa nestes quase oito anos, e todos seus funcionários.

Ao Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados (PPGPVBA) e seu corpo docente por todo o suporte necessário.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Muito obrigado!

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE ABREVIÇÕES.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	03
REVISÃO DA LITERATURA.....	04
1 Importância da floricultura no Brasil .....	04
2 Importância da família Orchidaceae e do gênero <i>Phalaenopsis</i> na floricultura.....	05
3 Propagação <i>in vitro</i> e embriogênese somática.....	08
LITERATURA CITADA.....	12
<b>CAPÍTULO 1. Efeito de reguladores vegetais em segmentos de inflorescências de dois híbridos comerciais de <i>Phalaenopsis</i>.....</b>	<b>19</b>
1 Resumo.....	19
2 Introdução.....	20
3 Materiais e Métodos.....	21
3.1 Genótipos utilizados e condições de cultivo .....	21
3.2 Efeito de reguladores vegetais no estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos de inflorescência de híbridos de <i>Phalaenopsis</i> .....	22
3.3 Enraizamento e aclimatização de plantas.....	25
4 Resultados e Discussão.....	26
4.1 Efeito de reguladores vegetais no estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos de inflorescência de híbridos de <i>Phalaenopsis</i> .....	26
4.2 Enraizamento e aclimatização de plantas .....	33
5 Conclusões.....	36
6 Literatura citada.....	37

<b>CAPÍTULO 2. Embriogênese somática de segmentos foliares de cultivares híbridas de <i>Phalaenopsis</i></b> .....	41
1 Resumo.....	41
2 Introdução.....	42
3 Materiais e Métodos.....	43
3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos foliares de cultivares híbridas de <i>Phalaenopsis</i> .....	44
3.2 Solução salina e tipos e concentrações de reguladores vegetais na indução de PLBs em segmentos foliares de cultivares de <i>Phalaenopsis</i> .....	45
3.3 Influência da quantidade de segmentos foliares por frasco na regeneração somática de segmentos foliares <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis</i> .....	47
3.4 Tipos de corte e combinações de reguladores vegetais na indução de PLBs em segmentos foliares de <i>Phalaenopsis</i> .....	47
3.5 Efeito do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de brotações para excisão de segmentos foliares na obtenção de embriões somáticos e de <i>Phalaenopsis</i> .....	49
3.6 Efeito do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de brotações para excisão de segmentos foliares e suplementação do meio de cultura com água de coco na obtenção de embriões somáticos de <i>Phalaenopsis</i> .....	50
4 Resultados e Discussão.....	51
4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos foliares de genótipos comerciais de <i>Phalaenopsis</i> .....	51
4.2 Solução salina e tipos e concentrações de reguladores vegetais na indução de PLBs em segmentos foliares de cultivares de <i>Phalaenopsis</i> .....	53
4.3 Influência da quantidade de segmentos foliares por frasco na regeneração somática de segmentos foliares <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis</i> .....	57
4.4 Tipos de corte e combinações de reguladores vegetais na indução de PLBs em segmentos foliares de <i>Phalaenopsis</i> .....	60

4.5	Efeito do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de brotações para excisão de segmentos foliares na obtenção de embriões somáticos de <i>Phalaenopsis</i> .....	63
4.6	Efeito do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de brotações para excisão de segmentos foliares e suplementação do meio de cultura com água de coco na obtenção de embriões somáticos de <i>Phalaenopsis</i> .....	65
5	Conclusões.....	67
6	Literatura citada.....	68
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	76

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Capítulo 1</b>	
Tabela 1. ANOVA e teste de médias para porcentagem de segmentos de inflorescência vivos, porcentagem de brotações em haste floral e vegetativa, e taxa de multiplicação, no estabelecimento <i>in vitro</i> de gemas provenientes de hastes florais de duas cultivares de <i>Phalaenopsis</i> .....	27
Tabela 2. ANOVA e teste de médias para porcentagem de segmentos de inflorescência vivos (PSV) e taxa de multiplicação (TM) em três repicagens para 2 cultivares de <i>Phalaenopsis</i> híbrido.....	32
Tabela 3. Médias referentes a diferença entre avaliação final (60 dias após o transplante) e inicial do número de folhas, de raízes e massa fresca (g) de plantas de <i>Phalaenopsis</i> .....	34
<b>Capítulo 2</b>	
Tabela 1. ANOVA e teste de médias para porcentagem de contaminação e de segmentos vivos de segmentos foliares de <i>Phalaenopsis</i> submetidos ao processo de assepsia para estabelecimento de protocolo de propagação <i>in vitro</i> .....	51
Tabela 2. Porcentagem de segmentos foliares verdes, porcentagem de segmentos foliares com PLBs e número de PLBs por segmento foliar, de explantes foliares em dois híbridos comerciais de <i>Phalaenopsis</i> .....	55
Tabela 3. Porcentagem de segmentos foliares verdes, de segmentos foliares com PLBs e número de PLBs/ segmento foliar de explantes foliares de <i>Phalaenopsis</i> em diferentes densidades por frasco .....	57
Tabela 4. Porcentagem de segmentos foliares com PLBs e número de PLBs por segmento foliar, de explantes foliares de <i>Phalaenopsis</i> .....	61
Tabela 5. Porcentagem de segmentos foliares com PLBs e Número de PLBs por segmento foliar em <i>Phalaenopsis</i> 'Ph501' .....	63
Tabela 6. Porcentagem de segmentos foliares com PLBs e Número de PLBs por segmento foliar em <i>Phalaenopsis</i> 'Ph501' .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Capítulo 1</b>	
Figura 1. A- cultivar 'Ph501'; B- cultivar 'Ph908'.....	22
Figura 2. Coleta de hastes florais e etapas do processo de assepsia e inoculação dos explantes .....	23
Figura 3. Tipos de brotação provenientes de segmentos de haste floral. A- desenvolvimento vegetativo com formação direta de brotações; B- indução de nova haste floral.....	26
Figura 4. Diferenças fenotípicas de hastes florais entre as cultivares.....	29
Figura 5. Contaminação de segmentos de inflorescências provenientes de hastes florais por leveduras.....	30
Figura 6. Escurecimento do meio de cultura devido à oxidação fenólica dos segmentos de inflorescência introduzidos em cultivo <i>in vitro</i> .....	31
Figura 7. Plântulas de <i>Phalaenopsis</i> após 60 dias de aclimatização nos substratos: A: vermiculita; B: esfagno; C: pó de coco .....	35
<b>Capítulo 2</b>	
Figura 1. Tipos de corte realizados nas folhas para indução de PLBs.....	48
Figura 2. Segmentos foliares com alta taxa de fenolização após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	53
Figura 3. Oxidação fenólica de segmentos foliares provenientes de plantas em condições de campo, após 60 dias em câmara escura (A) e 30 dias após serem transferidos para iluminação artificial (B) .....	54
Figura 4. Desenvolvimento de embriões somáticos (PLBs) a partir de segmento foliar de <i>Phalaenopsis</i> 'Ph908' .....	59
Figura 5. (A) Segmentos foliares após 60 dias em câmara escura com embriões em início de desenvolvimento apresentando colocação esbranquiçada; (B) Embriões em desenvolvimento após 30 dias em regime de luz, já apresentando coloração verde escura; (C) desenvolvimento de PLBs após 60 dias em iluminação artificial prontos para serem separados do segmento foliar e individualizados .....	64

## ÍNDICE DE ABREVIações

**ANA** – Ácido naftalenoacético

**BA** – 6- Benziladenina

**CV** – Coeficiente de variação

**cv.** - Cultivar

**F** – Valor da análise de variância

**GA<sub>3</sub>** – Ácido giberélico

**IBRAFLOr** – Instituto Brasileiro de Floricultura

**MS** – Meio nutritivo de Murashige e Skoog, 1962

**MS 1/2** – Meio nutritivo de Murashige e Skoog com metade da concentração dos sais

**NDM** – Meio nutritivo New Dogashima Medium

**PLBs** – protocorm *like* bodies, sigla utilizada para embriões somáticos em estágio globular

**PPM** – partes por milhão

**TDZ** - Thidiazuron

## PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS *Phalaenopsis* POR SEGMENTOS DE INFLORESCÊNCIAS E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

**Autor: CESAR AUGUSTO ZANELLO**

**Orientador: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO**

### RESUMO

As orquídeas do gênero *Phalaenopsis* são as mais importantes no segmento de flores de vaso na floricultura nacional, sendo atualmente líder em volume de produção e comercialização. No entanto, a obtenção de mudas de qualidade genética e fitossanitária por um preço competitivo tem sido um dos principais entraves para os produtores. Desse modo o estabelecimento de protocolos de aplicabilidade comercial e que visem a produção de mudas clonais de híbridos é de grande interesse para a autossuficiência desse setor. Para isso a micropropagação, por meio da produção de embriões somáticos (*Protocorm like bodies* - PLBs) ou gemas adventícias em segmentos de tecidos somáticos *in vitro*, pode ser uma alternativa viável para a produção de mudas de *Phalaenopsis*. Este trabalho teve como objetivo estabelecer protocolos de micropropagação eficientes para híbridos de *Phalaenopsis* utilizando técnicas de indução de brotações em segmentos de inflorescência e indução e regeneração de embriões somáticos (PLBs) *in vitro* a partir de segmentos foliares de híbridos comerciais. Em função dos resultados obtidos, conclui-se que o uso do meio de cultura NDM acrescido de 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA, 1,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, pH 5,7, é o mais indicado para propagação de *Phalaenopsis* utilizando segmentos de inflorescência na indução de brotações *in vitro*, sendo capaz de gerar até 1,7 brotações/segmento e 71,5% de segmentos vivos. A contaminação dos segmentos de inflorescência por leveduras foi a principal dificuldade encontrada, chegando a média de 30% de segmentos contaminados. Já para a indução de PLBs a partir de segmentos foliares, o uso conjunto dos reguladores vegetais BA e TDZ na concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> cada se mostrou benéfica para a regeneração de PLBs, enquanto que as diferentes formulações salinas utilizadas (MS e NDM) tiveram pouca influência. Os melhores resultados obtidos foram de 41% de segmentos em regeneração e até 5,3 PLBs/ segmento com o uso de folhas com 20 dias de subcultivo segmentadas em Thin Cell Layer. Nas condições de cultivo avaliadas, não foi possível obter embriões utilizando como explante segmentos de folhas jovens coletadas de plantas em condições de casa de vegetação. De acordo com os resultados obtidos foi possível comprovar a influência do fator genótipo na indução e regeneração de PLBs.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*; propagação clonal; citocininas.

# **IN VITRO MICROPROPAGATION OF ORCHID *Phalaenopsis* BY INFLORESCENCE SEGMENTS AND SOMATIC EMBRYOGENESIS**

**Author: CESAR AUGUSTO ZANELLO**

**Adviser: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO**

## **ABSTRACT**

The orchids of the genus *Phalaenopsis* are the most important in the segment of potted flowers in the national floriculture, being currently leader in volume of production and commercialization. However, obtaining genetic and phytosanitary quality seedlings at a competitive price has been one of the main obstacles for producers. Thus, the establishment of protocols of commercial applicability and that aim the production of clonal seedlings of hybrids is of great interest for the self-sufficiency of this sector. For this, micropropagation, through the production of somatic embryos (PLBs) or adventitious buds in somatic tissue segments *in vitro*, may be a viable alternative for the production of *Phalaenopsis* seedlings. This work aimed to establish efficient micropropagation protocols for *Phalaenopsis* hybrids using shoot induction techniques in inflorescence segments and induction and regeneration of somatic embryos (PLBs) *in vitro* from leaf segments of commercial hybrids. Based on the results, it was concluded that the use of the NDM culture medium plus 0.1 g L<sup>-1</sup> inositol, 20 g L<sup>-1</sup> sucrose, 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA, 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BA, 1.5 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, pH 5.7, is the most suitable for propagation of *Phalaenopsis* using inflorescence segments in the induction of shoots *in vitro*, being able to generate up to 1.7 shoots / segment and 71.5% of living segments. The contamination of the segments of inflorescence by yeast was the main difficulty found, reaching an average of 30% of contaminated segments. As for the induction of PLBs from leaf segments, the use of plant regulators BA and TDZ at a concentration of 1.5 mg L<sup>-1</sup> each was beneficial for the regeneration of PLBs, whereas the different salt formulations used (MS and NDM) had little influence. The best results were 41% of regenerating segments and up to 5.3 PLBs / segment with the use of leaves with 20 days of subcultivation segmented in Thin Cell Layer. Under the culture conditions evaluated, it was not possible to obtain embryos using as explant segments of young leaves collected from plants under greenhouse conditions. According to the results, it was possible to prove the influence of the genotype factor on the induction and regeneration of PLBs.

**Keywords:** *in vitro* culture; clonal propagation; cytokinins.

## INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae representa uma das três maiores famílias de plantas com flores, com cerca de 28 mil espécies (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016) e é considerada a maior em número de espécies dentre as monocotiledôneas (CHASE, 2004). Somente no Brasil, são reconhecidas mais de 2300 espécies em cerca de 200 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2005). As plantas desta família são conhecidas também por apresentarem distribuição bastante ampla no globo terrestre (BATISTA et al., 2005).

Dentre os mais de 700 gêneros reconhecidos atualmente dentro desta família (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016) um deles, o gênero *Phalaenopsis*, tem apresentado grande destaque e importância comercial na floricultura brasileira e mundial devido a sua infinidade de cores, formato de flores (KHODDAMZADEH et al., 2011) e inflorescências, bem como a grande durabilidade de suas flores e capacidade de transporte a longas distâncias (CARDOSO et al., 2016).

O gênero *Phalaenopsis* é originário do sudeste asiático e é caracterizado por plantas monopodiais, alternifólias, terminando com um meristema vegetativo e sua principal característica atrativa para o comércio são suas longas inflorescências provenientes das axilas foliares, que formam conjuntos de flores arredondadas com grande variação de cores (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007).

A formação de brotos laterais é algo incomum neste gênero e devido a isto, a propagação vegetativa convencional por estaquia ou emissão de brotações é inviável para fins comerciais. Além disso, por se tratar de uma planta de desenvolvimento monopodial, o uso de seu meristema apical para propagação *in vitro* é indesejável

pois para tanto seria necessário causar a morte das plantas matrizes (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007).

Outro método possível de propagação é por meio da germinação de sementes *in vitro*, porém sendo pouco desejável para produções de flores em larga escala, visto que esta técnica apresenta como grande desvantagem a desuniformidade genética das plantas obtidas (ISHII et al., 1998), gerando variações na morfologia, no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas, além da variabilidade de formas e cores das flores, o que pode ser interessante para o melhoramento genético, mas indesejável na produção comercial de flores, seja para vaso ou para corte. Isso porque a indução do florescimento na espécie é feita de forma artificial utilizando baixas temperaturas durante período determinado de tempo visando a produção de inflorescências (WANG, 1995). A variabilidade genética associada as plantas obtidas de sementes leva a uma desuniformidade na resposta a indução do florescimento, bem como no desenvolvimento das inflorescências e flores para o mercado.

Considerando o exposto acima, se faz necessário o desenvolvimento de métodos de propagação clonal desta espécie utilizando partes da planta matriz que não comprometam sua sobrevivência e que garantam a manutenção da uniformidade e das características genéticas obtidas nos híbridos comerciais e que são de interesse horticultural e ornamental.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Este trabalho teve como principal objetivo estabelecer protocolos de micropropagação para híbridos de *Phalaenopsis* utilizando a indução de brotações em segmentos de inflorescências, além de indução e regeneração *in vitro* de PLBs a partir de segmentos foliares.

### Objetivos específicos

- (1) Verificar o efeito de duas cultivares na indução de embriogênese somática (indução de PLBs) em híbridos de *Phalaenopsis*;
- (2) Avaliar o método mais eficiente de assepsia para segmentos foliares provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação;
- (3) Avaliar o efeito de diferentes meios de cultura e reguladores vegetais na indução de brotações e PLBs em *Phalaenopsis*;
- (4) Avaliar o efeito da quantidade de segmentos foliares introduzidos por frasco na sobrevivência e regeneração dos mesmos;
- (5) Avaliar o tipo de corte e a melhor idade para segmentos foliares na indução e regeneração de PLBs;
- (6) Avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com água de coco na indução e regeneração de PLBs a partir de segmentos foliares cultivados *in vitro*.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **1. Importância da floricultura no Brasil**

Ao longo das últimas décadas o aumento mundial no consumo de flores e plantas ornamentais tem sido acompanhado pela expansão da floricultura nacional, com aumento do consumo interno desses produtos (SOUSA et al., 2011).

A floricultura brasileira é uma atividade de grande importância no agronegócio nacional, que apresenta desde 2006 taxas de crescimento anual entre 8 e 15% em volume de produção, e até 17% em valor. Somente entre os anos de 2012 e 2013 houve aumento de 12% no faturamento, chegando a marca de 5,2 bilhões de reais (DUVAL, 2014).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Floricultura (Ibraflor), no ano de 2014 o faturamento do setor chegou a R\$ 5,7 bilhões e em 2015 atingiu a marca de R\$ 6 bilhões com perspectiva de crescimento de 6 a 8% para 2016, o que mostra de fato a importância do setor no agronegócio brasileiro e sua capacidade de se manter em crescimento mesmo diante da atual crise econômica.

A floricultura tem obtido grande destaque perante os demais segmentos do agronegócio nacional devido tanto aos altos investimentos, principalmente em tecnologia de produção como o cultivo protegido, substratos, condicionadores de solo e fertirrigação, além da propagação e produção de mudas (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008), como também pelo alto faturamento do setor, que se dá tanto no mercado interno quanto no mercado externo (GIACON, 2015).

Alguns fatores característicos do nosso país favorecem muito o desenvolvimento desta atividade, como a amplitude térmica, umidade, temperatura, solo, bem como a grande biodiversidade encontrada nas diferentes regiões do país, contribuindo para a produção de uma grande gama de espécies diferentes de flores e plantas ornamentais (GIACON, 2015).

A produção se divide entre o cultivo de flores e plantas verdes envasadas (50%), flores e folhagens de corte (40%) e plantas ornamentais para o paisagismo (10%) (CORREA et al., 2007) e conta com cerca de 8 mil produtores divididos em cada um destes segmentos (DUVAL, 2014).

Essa atividade, ligada ao setor de Horticultura, é caracterizada pela ampla necessidade de mão de obra, em quantidade e qualidade, e pela geração de renda, chegando ao montante de até 100 mil reais por hectare/ano, dependendo da espécie cultivada, o que desperta grande interesse em pequenos agricultores, visto que a área média cultivada das propriedades gira em torno de 3,5 a 6,5 ha (DUVAL, 2014). Além disso, dentre os segmentos da agricultura, a floricultura se destaca como a que apresenta retorno mais rápido dos investimentos aplicados (FAVA et al., 2014).

A floricultura nacional é responsável por gerar mais de 215 mil empregos diretos, divididos entre a produção (36,3%), distribuição (3,9%), varejo (56%) e outras funções (3,8%), além de diversos outros que são gerados indiretamente pelo setor na fabricação de insumos (IBRAFLOR, 2016).

Por se tratar de um produto comercializado principalmente pelo seu valor visual e estético a exigência do mercado consumidor por estes atributos é de grande importância, o que faz da floricultura uma atividade que busca constantemente por melhoria dos padrões de qualidade como, longevidade e qualidade de folhas e flores no pós colheita, desenvolvimento de novas variedades de cores, arquitetura de planta e forma de flores, entre outros (CARVALHO et al., 2013).

## **2. Importância da família Orchidaceae e do gênero *Phalaenopsis* na floricultura**

Dentre as plantas de maior representatividade na floricultura nacional e mundial, se encontram os híbridos do gênero *Phalaenopsis*. Trata-se de um dos

gêneros de maior importância econômica (LEE, 2011) dentre os mais de 700 gêneros pertencentes à família botânica Orchidaceae.

A família Orchidaceae está entre as maiores dentre as angiospermas com cerca de 25 mil espécies (PRIDGEON et al., 2009; CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016) que podem ser encontradas em qualquer região vegetada do planeta, com predominância nas regiões tropicais; e podem crescer no solo, sobre pedras e de forma epífita (PAULA; SILVA, 2004) variando de acordo com a região de ocorrência.

Uma característica comum é que as plantas normalmente possuem flores hermafroditas, simétricas, trímeras, com três sépalas e três pétalas sendo uma delas modificada, conhecida como labelo; podendo ocorrer com certa raridade flores unissexuais, a exemplo do gênero *Catasetum*, (BARROS et al., 2008). Uma outra característica comum é a diversidade de porte, desde plantas pequenas com flores medindo alguns milímetros até plantas de porte superior a três metros de altura com hastes florais igualmente grandes (CARDOSO; ISRAEL, 2005).

Devido às suas características visuais, muitas espécies desta família têm grande valor comercial e por isso sofrem com o extrativismo, além da depredação e destruição do seu habitat pela expansão da agricultura (CARDOSO; ISRAEL, 2005) e juntos, esses problemas podem contribuir fortemente para a redução drástica na população de diversas espécies. Pensando nisso, o desenvolvimento de híbridos comerciais e de técnicas de propagação em laboratório tornam-se fundamentais para a conservação destes exemplares, permitindo a diminuição do extrativismo e a possibilidade de propagação visando a conservação de determinadas espécies.

Dentre as orquídeas com grande impacto comercial estão as do gênero *Phalaenopsis*. Essas orquídeas são originárias da Índia, Filipinas, Nova Guiné e Austrália (PAULA; SILVA, 2004). Conhecida vulgarmente como 'orquídea mariposa', trata-se de uma planta com crescimento monopodial e geralmente epífita, com 63 espécies, 7 híbridos naturais (AOS, 2016), além de outros milhares de híbridos artificiais. Suas folhas são carnosas, e a inflorescência pode apresentar grande variação, desde curta com poucas flores, até hastes ramificadas e com dezenas de flores, com floração de grande durabilidade e que em alguns casos apresentam fragrância (AOS, 2016).

O gênero *Phalaenopsis* tem como grande diferencial ornamental e comercial, periodicidade de florescimento a cada seis meses, além de apresentar boa resposta

à indução artificial para floração, através do uso de frio, luz ou giberelinas, o que torna a planta muito mais atrativa para os produtores (LEE, 2011).

A importância dos *Phalaenopsis* na floricultura europeia tem sido destaque, sendo esse segmento em expansão desde 2004, ano em que somou um crescimento de 30% em valor. Nos Estados Unidos, no mesmo ano, a comercialização de *Phalaenopsis* se tornou a segunda maior entre todas as flores de vaso (CHONE; OLIVEIRA, 2005). No Brasil, somente em 2014 foram produzidos cerca de 7,8 milhões de vasos de *Phalaenopsis* (FARIA; COLOMBO, 2015) e, de acordo com o Instituto Brasileiro de Floricultura, as plantas deste gênero já lideram as vendas no setor de flores de vaso, seguido por *Kalanchoe*, *Anthurium*, Crisântemo e Lírio.

Uma das maiores dificuldades enfrentadas atualmente pelos produtores tem sido a aquisição de mudas de boa qualidade por preços competitivos. De forma geral, a muda nacional é mais viável economicamente, mas apresenta riscos quanto à fitossanidade e qualidade genética do material, uma vez que comumente tratam-se de mudas não certificadas (LINS; COELHO, 2004), enquanto que a importação de mudas certificadas tem como principal entrave o aumento significativo nos custos de produção (CHONE; OLIVEIRA, 2005; SUZUKI, 2014) devido ao pagamento de royalties (CARDOSO, 2013) e custos de importação.

De fato, os produtores demonstram maior confiança nas mudas importadas, produzidas por multinacionais comumente chamadas de *Breeders*, em geral localizadas em países desenvolvidos como Holanda e Estados Unidos. Somente entre 2010 e 2012 a importação de mudas de orquídeas e outras espécies teve um salto de U\$ 7,3 milhões para U\$ 13 milhões. Normalmente, esses materiais importados são cultivares protegidas, tornando o produtor dependente da importação das mudas e ocasionando um aumento nos custos de produção através do pagamento dos *royalties* a estas empresas. Dessa maneira, o estabelecimento de programas de melhoramento genético e tecnologias de propagação de flores nacionais é condição essencial para a autossuficiência do setor (CARDOSO, 2013).

Baseado nisto, o desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação *in vitro* com a produção de mudas de alta qualidade fitossanitária e genética torna-se fundamental e indispensável para reduzir os custos de produção e aumentar a competitividade do produtor brasileiro, inclusive no mercado internacional, reduzindo a dependência do mercado externo e da evasão de divisas que afetam a balança comercial, seja por diminuir o pagamento de royalties, pela variação do câmbio que

atualmente tem sido a maior limitação da importação das mudas, pois são comercializadas em dólar, ou mesmo pelos altos custos de importação das mudas.

### **3. Propagação *in vitro* e embriogênese somática**

De forma resumida, a cultura de tecidos pode ser definida como o cultivo de diferentes tipos de tecidos, órgãos ou células vegetais, denominado explante, em meio nutritivo sob condições assépticas e controladas de fotoperíodo, temperatura, umidade, densidade de fluxo de fótons, entre outros (FUZITANI; NOMURA, 2004).

A cultura de tecidos pode ser utilizada para diversas finalidades onde se destacam a propagação comercial de plantas, melhoramento genético, conservação de germoplasma (CARVALHO et al., 2013) e recuperação de plantas livres de vírus e doenças (PAIVA et al., 1993; MENEZES JUNIOR, 2011).

Mesmo sendo uma técnica em que normalmente se dispense de maiores custos com mão de obra e infraestrutura quando comparada às técnicas de propagação convencionais, na maioria dos casos apresenta relação custo-benefício melhor, uma vez que permite a produção, em escala comercial, de material selecionado e uniforme, em espaço relativamente pequeno e com bom rendimento (CID; TEIXEIRA, 2014).

Dentre os diversos grupos de plantas produzidas através das técnicas de propagação *in vitro*, as plantas ornamentais são as que tem maior destaque, provavelmente devido ao alto valor agregado do produto final (BOSA et al., 2003). Nesse sentido, as espécies da família Orchidaceae tem maior destaque, sendo responsável por cerca de 60% do total das plantas produzidas (CARVALHO; SILVA, 2012).

Apesar da técnica ser bem estabelecida e com bom rendimento para algumas espécies, um dos maiores problemas enfrentados por laboratórios no estabelecimento de protocolos de propagação *in vitro* de novas espécies está na contaminação de origem fúngica e/ou bacteriana (DONATO et al. 2005; DINIZ et al., 2008), visto que o cultivo *in vitro* proporciona ambiente favorável ao desenvolvimento destes microrganismos, que irão competir com as plantas por nutrientes, luz, umidade, entre outros e podendo ainda liberar compostos tóxicos, ocasionando a morte do material vegetal (SOUSA et al., 2007).

Devido ao material de propagação ser proveniente normalmente de plantas matrizes em condições de campo, a fase de assepsia desses materiais muitas vezes pode ser um entrave no sucesso da micropropagação, sendo necessários testes com diferentes produtos e tempos de exposição a fim de buscar a melhor condição de assepsia sem causar a morte do explante (DINIZ et al., 2008). Além do explante, o meio nutritivo, o ambiente e o operador também são fontes comuns de contaminação (SOUSA et al., 2007).

De forma geral, os compostos mais utilizados na desinfestação dos explantes são o etanol (HIRATA; MANCINI-FILHO, 2002) em concentrações entre 70% e 80% e o hipoclorito de sódio ou outras substâncias a base de cloro (GRATTAPALIA; MACHADO, 1998). Ambos possuem ação germicida, além da ação surfactante do etanol, o que facilita a ação de outros produtos usados posteriormente (SOUSA et al., 2007).

Após o estabelecimento, as fases seguintes de indução e multiplicação de brotos também são de grande importância para o sucesso do protocolo de micropropagação. Nestas etapas a escolha do meio nutritivo e dos reguladores vegetais e outros suplementos são bastante específicos de acordo com o tipo de planta que se deseja propagar, bem como o tipo de material vegetal utilizado, já que cada uma delas apresenta necessidades diferentes de nutrição, assim como no campo (SARASAN et al. 2006).

A propagação de orquídeas pode ser feita por meio de divisão de bulbos, brotações ou germinação de sementes (FRÁGUAS et al., 2003) até técnicas avançadas e eficientes com a utilização do cultivo *in vitro*, no qual é possível obter milhões de mudas ao longo de um ano de cultivo.

A produção de sementes é uma técnica eficiente para obtenção de mudas em alta quantidade, devido a capacidade de um único fruto de orquídea conter mais de um milhão de sementes viáveis, a depender da espécie. Associado a isso, a semeadura *in vitro* destas sementes para produção de mudas é possível e economicamente viável (STANCATO et al., 2001). Apesar disso, o método de semeadura traz algumas desvantagens como a desuniformidade das mudas e a segregação da cor das flores, que embora seja de interesse no melhoramento genético, é pouco desejável por produtores de flores (YOUNG et al., 2000), quando considera-se a propagação de híbridos comerciais.

Por outro lado, as técnicas de cultura de tecidos visando a produção de mudas através de clonagem apresentam outras vantagens como plantas com alta uniformidade e velocidade de crescimento, fixação de ganhos genéticos em populações clonais e produção de plantas saudáveis e livres de vírus (FRÁGUAS et al., 2003; COSTA et al., 2013).

Uma técnica de micropropagação bastante eficiente dentro a cultura de tecidos é a embriogênese somática, que já é utilizada com sucesso para orquídeas (KHODDAMZADEH et al., 2011), onde é também conhecida por indução de PLBs, do inglês *Protocorm-Like Bodies*. Essa denominação se deve ao fato da similaridade morfológica e anatômica dos embriões somáticos obtidos com a embriogênese zigótica em orquídeas (LEE et al., 2013), que envolve a formação de protocormos previamente à emissão de folhas e raízes (FANG et al., 2016).

De modo geral, a embriogênese somática pode ser definida como a formação e o desenvolvimento de embriões a partir de células não gaméticas, ou seja, tecidos somáticos, e que permite a reprodução massal de plantas (TOKUHARA; MII, 1993; CARVALHO et al., 2011), reprodução de plantas elites e de plantas transgênicas (LAMB, et al., 2002), além da produção de sementes sintéticas através do armazenamento de embriões maduros por encapsulamento em alginato (ZIMMERMANN, 2014).

O processo de embriogênese somática envolve diferentes estádios, e pode ocorrer basicamente de duas formas, a embriogênese somática direta ou a embriogênese somática indireta. Na embriogênese somática direta, ocorre no explante a diferenciação e a formação de embriões somáticos sem que haja outros processos intermediários, como por exemplo a formação de calos. Enquanto que na embriogênese somática indireta, anteriormente à formação dos embriões existem os processos de desdiferenciação celular, seguido da formação de calos e posteriormente da diferenciação de células embriogênicas (GUERRA et al., 1999). Tanto na forma direta quanto na indireta, a formação do embrião somático segue o mesmo padrão de desenvolvimento, passando pelos estádios globular, torpedo e cotiledonar, ou seja, mesmo padrão de desenvolvimento observado em embriões zigóticos (ZIMMERMANN, 1993; GUERRA et al., 1999).

A indução da embriogênese somática ocorre normalmente através da adição de reguladores vegetais da classe das auxinas como o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (FÉHER et al., 2003), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-

tricoloropicolínico) e Dicamba (ácido 2,4- diclorofenoxiacético) (TITON et al., 2007), com intuito de fazer com que as células somáticas adquiram competência para originar embriões (NAMASIVAYAM, 2007; ZIMMERMANN, 2014).

Dentre os principais fatores que afetam a embriogênese somática estão o genótipo, o tipo e origem do explante, o meio de cultura e os reguladores vegetais. Ou seja, o uso de explante em estágio correto de desenvolvimento, as formulações salinas do meio de cultura, utilização de reguladores vegetais, e as condições de desenvolvimento dos explantes, como temperatura e luminosidade, são fatores importantes que influenciam diretamente no sucesso da técnica, principalmente no estágio inicial de indução à competência embriogênica (BALZON et al., 2013).

Trabalhos como o de Chen e Chang (2006), Gow et al. (2008) e Gow et al. (2010) mostram que a embriogênese somática em *Phalaenopsis* é possível, gerando até 19 embriões somáticos por explante, e parece estar ligada, entre outros fatores, ao uso do regulador vegetal TDZ (thidiazuron), pertencente a classe das citocininas. Nos trabalhos observados, os explantes foram originados de plantas germinadas e cultivadas *in vitro*, tendo como uma das vantagens já estarem em condição asséptica. Entretanto, essa é uma desvantagem para a produção de mudas clonais pois *in vitro* não se conhece a qualidade de um genótipo germinado de sementes, devido a segregação genética e alta heterozigosidade da maioria dos genótipos disponíveis no mercado. Nesse sentido, a obtenção da embriogênese e regeneração de tecidos somáticos provenientes de plantas adultas comerciais são de extremo interesse comercial.

## LITERATURA CITADA

AOS (American Orchid Society). **Orchids A to Z – Phalaenopsis**. 2016. Disponível em: <<http://www.aos.org/orchids/orchids-a-to-z/letter-p/phalaenopsis.aspx>>.

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, n. 1, p. 41-50, 2013.

BARROS, F.; PINHEIRO, F.; LOURENÇO, R. A. Orquídeas. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 909 p.

BATISTA, J. N.; BIANCHETTI, L. B.; PELLIZZARO, K. F.; Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guará. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 221-232, 2005.

BOSA, N. et al. Crescimento de mudas de gipsofila em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 514-519, 2003.

CARDOSO, J. C.; MARTINELLI, A.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A novel approach for the selection of *Cattleya* hybrids for precocious and season-independent flowering. **Euphytica**, v. 210, n. 1, p. 143-150, 2016.

CARDOSO, J. C. Melhoramento de espécies ornamentais como estratégia para o desenvolvimento e autossuficiência do setor. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n.1, p. 171, 2013.

CARDOSO, J.C.: ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p.169-173, 2005.

CARVALHO, C. H. S.; REZENDE, J. C.; ALMEIDA, G. R. R.; TEIXEIRA, J. B.; PADILHA, L. Características agronômicas e morfológicas de cafeeiro 'Catuaí vermelho' propagado por embriogênese somática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 378-383, 2011.

CARVALHO, A. C. P. P.; TOMBOLATO, A. F. C.; RODRIGUES, A. A. J.; SANTOS, E. O.; SILVA, F. Panorama da cultura de tecidos no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 407 p.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A. **Plantas Matrizes na Propagação Vegetativa**. Campina Grande: Embrapa, 2012.

CHASE, M. W. Monocot relationships: an overview. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1645-1655, 2004.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 2, p. 169-173, 2006.

CHONE, R. M. S.; OLIVEIRA, L. H. Desenho e Análise da Cadeia Produtiva de Plantas Ornamentais: O caso das Orquídeas do gênero *Phalaenopsis*. In: INTERNATIONAL MEETING OF THE IBEROAMERICAN, 4., 2005, Lisboa. **Anais...** Lisboa: 2005. p. 8-11. Lisboa.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its anual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. 3 ed., Brasília, DF: EMBRAPA, 2014, 325 p.

CORREA, S.; RIGON L.; BELING, R. R.; REETZ, E.R; SANTOS, C.; LINDEMANN, C. **Anuário Brasileiro Das Flores 2007**. Santa Cruz do Sul, Editora Gazeta Santa Cruz, 2007. 112p.

COSTA, M. A. P. C.; BASTOS, M. J. S. M.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídeas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 407 p.

DINIZ, J. D. N. et al. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 01, p. 107-113, jan./mar. 2008.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; TAKAKI, G. M. C.; MARIANO, R. L. R.; MACIEL, G. A. Plantas de cana de açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 134-141, 2005.

DUVAL, C. M. A produção de flores e a agricultura familiar. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 241, 2014.

FANG, S.; CHEN, J.; WEI, M. Protocorms and Protocorm-like bodies are molecularly distinct from zygotic embryonic tissues in *Phalaenopsis aphrodite*. **Plant Physiology**, v. 171, p. 2682-2700, 2016.

FARIA, R. T.; COLOMBO, R. C. *Oncidium*: a orquídea em expansão no cenário florícola. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 533, 2015.

FAVA, F. L. C.; CAMILI, C. E., Produção de cultivares de *Anthurium andraeanum* nas condições de Acorizal, Acorizal – MT, **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.20, n.2, p 179-184, 2014.

FÉHER, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p. 201–228, 2003.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, v. 50, n. 292, p. 719-726, 2003.

FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 10, n. 1/2, p. 15-19, 2004.

GIACON, M. G. **Fertirrigação nitrogenada na cultura do gladiolo (*Gladiolus hortulanus*) L. cv. Amsterdam**. Dourados: UFGD, 2015.

GOW, W.; CHEN, J.; CHANG, W. Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 621-627, 2010.

GOW, W.; CHEN, J.; CHANG, W. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchid. **Acta Phisiol Plant**, v. 30, p. 507-512, 2008.

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 2, p. 533-568, 1999.

HIRATA, M. H.; MANCINI-FILHO, J. **Manual de biossegurança**. Barueri: Editora Manole, 2002. 496 p.

IBRAFLOR. **Boletim Ibraflor 06.2016**. Holambra, 2016. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=255>> Acesso em: agosto 2016.

ISHII, Y.; TAKAMURA, T.; GOI, M.; TANAKA, M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 446-450, 1998. DOI:10.1007/S002990050423

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M. S. **Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007: recorde e novos desafios para o Brasil - Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil no período de janeiro a dezembro de 2007**. São Paulo, 2008.

KHODDAMZADEH, A. A.; SINNIH, U. R.; KADIR, M. A.; KADZIMIN, S. B.; MAHMOOD, M.; SREEERAMANAN, S. In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. **Plant Growth Regulation**, v. 65, p. 381-387, 2011.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUALI, G.; BARRO, R. S. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 123-130, 2002.

LEE, Y.; HSU, S.; YEUNG, E. C. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 2121-2131, 2013.

LEE, L. L. Biofábrica de Phalaenopsis. In: LEE, T. S. G. **Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 2011, p.150-175.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no estado do Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 332-335, 2004.

MENEZES JUNIOR, F. O. G. Cultivo *in vitro* do alho visando a limpeza clonal. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n. 2, p. 158-167, 2011.

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

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 1-8, 2007.

PAIVA, L. V.; CARVALHO, S. A.; SOUZA, M. Limpeza clonal da laranjeira 'seleta folha murcha' através da microenxertia '*in vitro*'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 1341-1344, 1993.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 106 p.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. A.; RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum: Epidendroideae (part II)**. Oxford: Oxford University Press, 2009. Vol. 5, 585 p.

SARASAN, V., CROPPS, R.; RAMSAY, M.M.; ATHERTON, C.; PRENDER-GAST, G.; ROWNTREE, J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in past decades. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 42, p.206-214, 2006.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 7, n. 1, p. 25-33, 2001.

SOUSA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, V. L. R.; FARIA, S. P.; CAMPOS, M. R. C. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 405-407, 2007.

SOUSA, C. E. A., SOARES, L. A. F., GHEYI, R. H., BARROS, M. M. H., NASCIMENTO, S. C. E., ANDRADE, O. L., Salinidade da água de irrigação na aclimatização de mudas, desenvolvidas e produção de heliconias. Fortaleza – CE, **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v.5, n.4, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SUZUKI, R. M. Breve análise sobre o comércio exterior de orquídeas no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE BOTÂNICA, 21, 2014, São Paulo. Disponível em: < [http://www.raibt.net.br/21raibt/cd/Resumos/Resumo21Raibt\\_006.pdf](http://www.raibt.net.br/21raibt/cd/Resumos/Resumo21Raibt_006.pdf)>

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento Dicamba e Picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n.3, p. 417-426, 2007.

TOKUHARA, K.; MII, M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 1, p. 7-11, 1993.

WANG, Y. *Phalaenopsis* orchid light requirement during the induction of spiking. **Hortscience**, v. 30, p. 59-61, 1995.

YOUNG, P. S.; MURTHY, H. N.; YOEUP, P. K. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 67-72, 2000.

ZIMMERMANN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3 ed., Brasília, DF: EMBRAPA, 2014, 325 P.

## **CAPÍTULO 1. EFEITO DE REGULADORES VEGETAIS EM SEGMENTOS DE INFLORESCÊNCIAS DE DOIS HÍBRIDOS COMERCIAIS DE *Phalaenopsis***

### 1. Resumo

O gênero *Phalaenopsis*, recentemente, tornou-se a orquídea de maior valor econômico na floricultura mundial, devido à alta durabilidade e grande diversidade de cores de suas flores. A propagação clonal *in vitro* de híbridos de *Phalaenopsis* é aquela de maior interesse na cultura, porém é dificultada pelo hábito de crescimento monopodial. Nesse sentido, as inflorescências são uma alternativa a produção de mudas clonais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a propagação de dois híbridos comerciais de *Phalaenopsis* sob o efeito de tipos e concentrações de Benziladenina (BA) e Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) utilizando como explantes segmentos de inflorescência *in vitro*. Inflorescências jovens com 10-15 cm de comprimento foram submetidas a assepsia e na sequência os segmentos nodais contendo uma gema lateral cada foram inoculados em meio de cultura New Dogashima Medium com adição dos reguladores: T1, sem reguladores vegetais; T2, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA), 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 6-benziladenina (BA) e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>); T3, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BA e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>; T4, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA e 0,15 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Os segmentos nodais foram repicados a cada 60 dias. Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento 2, contendo 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> foi aquele que demonstrou maior porcentagem de segmentos de inflorescência vivos

(71,48%) e número de brotações (1,68 brotações/segmento inoculado). A contaminação dos segmentos de inflorescência por leveduras foi a principal dificuldade identificada para a propagação clonal de *Phalaenopsis*.

## 2. Introdução

O gênero *Phalaenopsis* (Orchidaceae) é originário do sudeste asiático e se destaca comercialmente (LEE, 2011) devido às características de suas flores. Normalmente, suas hastes florais apresentam grande quantidade de flores, diversidade de cores e alta durabilidade. Além disso, seus híbridos são conhecidos pela precocidade de floração (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007), sendo que este conjunto de características faz com que as plantas desse gênero sejam muito procuradas pelos produtores de plantas de vaso.

Dentre os principais problemas da cultura de *Phalaenopsis* no Brasil estão a necessidade de climatização das casas de vegetação visando a floração o ano todo e a grande importação de mudas, provenientes de países como a Holanda, que encarecem o cultivo da espécie.

A produção de mudas pode ser considerada como uma das principais etapas no cultivo de algumas culturas, principalmente para plantas ornamentais, onde há predomínio de plantas híbridas que servem como matrizes para clonagem *in vitro*, permitindo a uniformização de características de interesse dos produtores, como coloração, tamanho e forma das flores, época de floração, dentre outras (FUZITANI; NOMURA, 2004).

As plantas do gênero *Phalaenopsis* são atualmente as mais representativas do segmento de flores envasadas em volume de produção e comercialização na floricultura nacional (IBRAFLOR, 2016), requerendo grandes quantidades de mudas para atender o mercado.

Devido a esta constatação, os produtores nacionais atualmente são dependentes da importação de mudas principalmente de países como Holanda e Estados Unidos, o que causa um aumento nos custos de produção devido aos custos de importação e pagamento de royalties para as empresas (CARDOSO, 2013), além do fato de ficarem sujeitos às possíveis flutuações na taxa de câmbio das moedas estrangeiras.

Considerando estes fatos, é imprescindível o desenvolvimento de tecnologias de propagação nacionais juntamente com o estabelecimento de programas de melhoramento genético (CARDOSO, 2013) visando atender a floricultura brasileira e contribuir para a autossuficiência deste setor de grande importância do agronegócio.

Um número limitado de autores examinaram o efeito do meio de cultura e reguladores de crescimento para propagação clonal de *Phalaenopsis*, sendo que os principais tipos de explantes utilizados foram segmentos de folhas jovens para induzir PLBs (TOKUHARA; MII, 1993; SINHA et al. 2007), mas na maioria dos casos, as folhas foram retiradas de plântulas de *Phalaenopsis* semeadas *in vitro*, o que dificulta o interesse comercial da propagação clonal.

A produção de brotos diretos a partir de segmentos de inflorescências também foi avaliada, mas também com poucos registros na literatura e de genótipos utilizados para este procedimento (KOSIR et al., 2004). O uso deste tipo de explante de híbridos de *Phalaenopsis* permitiu a produção de brotações regeneradas diretamente de gemas adventícias, sem calos, evitando variações genéticas e permitindo a produção de folhas *in vitro* para indução e regeneração de PLBs (BALILASHAKI et al., 2014).

Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes combinações dos reguladores vegetais, sendo esses: o ácido naftalenoacético (ANA), 6-benziladenina (BA) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na indução *in vitro* de brotações a partir de segmentos de inflorescências de dois híbridos com características comerciais de *Phalaenopsis*, e observar as principais dificuldades enfrentadas por este método de propagação.

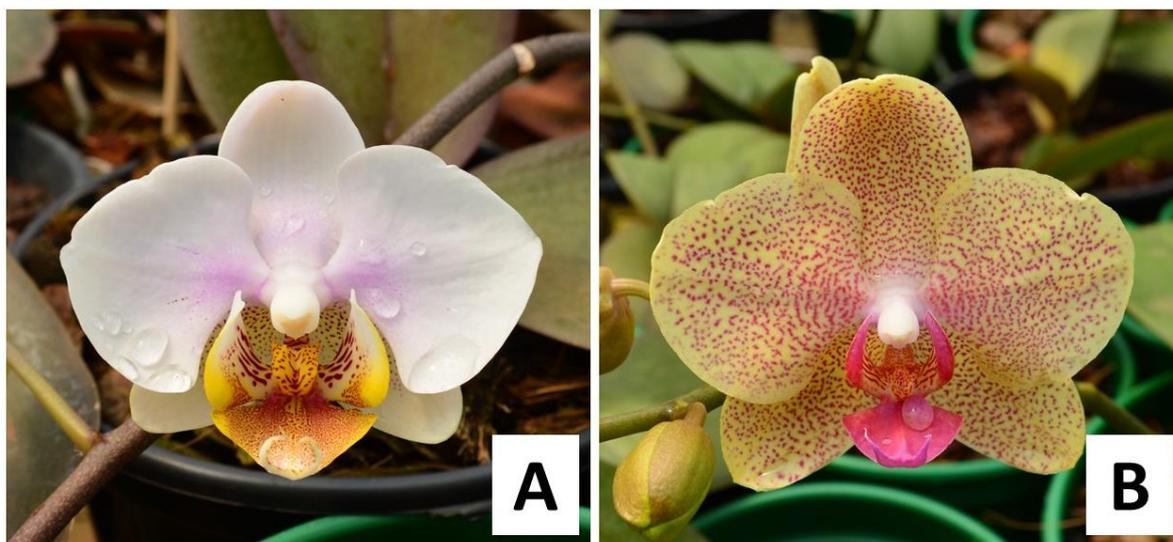
### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Genótipos utilizados e condições de cultivo

As cultivares utilizadas neste trabalho tratam-se de dois híbridos de *Phalaenopsis* que são provenientes de programa de melhoramento genético desenvolvido pelo Prof. Jean Carlos Cardoso (DBPVA/CCA-UFSCar), e foram denominados provisoriamente como 'Ph501' e 'Ph908'.

A cultivar 'Ph501' é caracterizada por apresentar flores brancas com labelo rosado. É comum nesta cultivar a ocorrência de hastes duplas que normalmente são ramificadas. Suas folhas são de cor verde escura em seu lado adaxial e em tom avermelhado na face abaxial da mesma (Figura 1A).

A cultivar 'Ph908' apresenta flores amarelas com pintas e labelo vermelhos. Normalmente há emissão de haste simples sem ramificações, porém em alguns casos é possível observar plantas com emissão de hastes duplas com 1 ou 2 ramificações. Suas folhas apresentam coloração verde escura tanto na face adaxial, como em sua face abaxial (Figura 1B).



**Figura 1:** A- cultivar 'Ph501'; B- cultivar 'Ph908'.

Todas as plantas utilizadas para coleta de material para os experimentos foram mantidas em casa de vegetação sob tela de sombreamento 65%, irrigados por aspersão (1,0 mm água/dia) e fertirrigados com fertilizante foliar Poly-Feed® (19% N, 19% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 19% K<sub>2</sub>O, 1000 ppm Fe, 500 ppm Mn) na concentração de 1 g L<sup>-1</sup> com frequência semanal, no Orquidário Monreale, localizado no município de Araras/SP.

### 3.2 Efeito de reguladores vegetais no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de segmentos de inflorescência de híbridos de *Phalaenopsis*.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Fisiologia Vegetal do Departamento de Biotecnologia, Produção Vegetal e Animal da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, SP. Foram utilizados explantes de dois genótipos de *Phalaenopsis* híbridos (Ph501 e Ph908).

Neste experimento, foram avaliados os efeitos dos reguladores vegetais ácido naftalenoacético (ANA), ácido giberélico ( $GA_3$ ) e 6-benziladenina (BA) na indução e tipo de brotações de segmentos de inflorescências de *Phalaenopsis*.

Para tanto foram coletadas hastes florais em início de desenvolvimento com 10 – 15 cm de comprimento (Figura 2A) e divididas em segmentos de aproximadamente 1,5 cm contendo uma gema lateral (Figura 2B). Estes segmentos foram submetidos à assepsia seguindo protocolo de desinfestação desenvolvido anteriormente no Laboratório de Cultura de Tecidos e Fisiologia Vegetal (DBPVA – UFSCar). Inicialmente foram imersos em álcool 70% por dois minutos, após em hipoclorito de sódio (água sanitária Candura®, 2,0 – 2,5% de cloro ativo) por 20 minutos, sendo novamente passados em álcool 70% por 1 minuto seguido de lavagem por três vezes em água deionizada autoclavada.



**Figura 2:** Coleta de hastes florais e etapas do processo de assepsia e inoculação dos explantes. A- Hastes florais em tamanho médio de 10-15 cm coletadas; B- hastes florais segmentadas em explantes de aproximadamente 1,5 cm contendo uma gema; C- retirada de partes oxidadas do explante após processo de assepsia; D- explantes inoculados em frasco contendo meio de cultura. Barra = 1 cm.

Após a assepsia foram retiradas as partes oxidadas localizadas nas extremidades dos segmentos de inflorescência utilizados e realizada a exposição da gema, pela retirada da bráctea que a reveste (Figura 2C). Posteriormente, os segmentos foram introduzidos em frascos de 250 ml (Figura 2D) contendo meio NDM (TOKUHARA; MII, 1993) suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol e os reguladores vegetais 6-benziladenina (BA), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e ácido naftalenoacético (ANA) como descrito a seguir: T1: sem reguladores de crescimento; T2: 1,0 mg L<sup>-1</sup> BA, 1,5 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> e 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA; T3: 0,1 mg L<sup>-1</sup> BA, 1,5 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> e 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA; e T4: 1,0 mg L<sup>-1</sup> BA, 0,15 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> e 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA. Essas combinações de tratamentos basearam-se em protocolos previamente estabelecidos e desenvolvidos em nossas condições laboratoriais (dados não publicados).

O pH dos meios de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,05$ , solidificado com 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e autoclavado a 120°C, 1kgf/cm<sup>2</sup>, por 20 minutos. Os segmentos de inflorescências foram repicados a cada 60 dias mantendo os mesmos tratamentos em cada um dos meios de cultura seguindo o mesmo procedimento feito inicialmente, a exceção do processo de assepsia já que os explantes já estavam em cultivo *in vitro*.

Todos os frascos foram mantidos em sala de crescimento submetidos a luz branca fria com densidade de fluxo de fótons de 35-40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 14 horas e temperatura de 25 °C  $\pm$  2 °C.

As avaliações foram divididas em: 1) fase de estabelecimento (avaliação feita 60 dias após a introdução de segmentos provenientes de hastes florais coletadas de plantas em condições de campo) e; 2) fase de multiplicação, onde foram realizados mais 3 subcultivos para fins de coleta dos dados. Para o estabelecimento foi contabilizada a porcentagem de contaminação, porcentagem de segmentos de inflorescência vivos, a taxa de multiplicação (número de brotações obtidas/segmento inoculado) e o tipo de regeneração, se através da indução de nova inflorescência ou através de brotações vegetativas.

Para as fases de multiplicação foram feitas as avaliações de porcentagem de segmentos de inflorescência vivos e a taxa de multiplicação (número de segmentos ou brotações obtidas/ segmento inoculado).

O experimento foi conduzido no esquema fatorial 2 (genótipos) x 4 (meios de cultura) com 7 repetições na fase de estabelecimento e 11 repetições nas fases de multiplicação, sendo cada repetição composta por 1 frasco contendo 4 segmentos de inflorescência.

Todos os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância ANOVA e em seguida os tratamentos foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade. Para tais análises foi utilizado o software Assistat 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006). Dados em porcentagem foram transformados pela equação  $\arcsen\sqrt{x+1}$  (SANTANA; RANAL, 2000) antes de serem analisados.

### 3.3 Enraizamento e aclimatização de plantas

As plantas obtidas no processo de estabelecimento e multiplicação (tópico 3.1) após o último subcultivo, foram submetidas ao processo de enraizamento *in vitro*. Para isso, foram introduzidas em frascos de 500 ml contendo meio MS modificado suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 25 ml L<sup>-1</sup> de água de coco, 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, solidificado com 2,4 g L<sup>-1</sup> de Gelrite e pH ajustado para  $5,7 \pm 0,05$ . Após foram mantidas em sala de crescimento submetidas a luz branca fria com densidade de fluxo de fótons de 35-40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 14 horas e temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por mais 60 dias.

Após esse período as plantas foram levadas para a fase de aclimatização. As mesmas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente, plantadas em bandejas plásticas de 50 células e transferidas para casa de vegetação sob tela de sombreamento 65%, irrigados por aspersão (1,0 mm água/dia).

Visando avaliar o substrato ideal a ser utilizado na aclimatização dessas plantas, as mesmas foram plantadas em três substratos diferentes, sendo eles: pó de coco, esfagno e vermiculita. Para isso, avaliaram-se a massa fresca, o número de folhas e de raízes nas plantas passadas da condição *in vitro* para a *ex vitro* (dia zero). Após 60 dias de cultivo, as plantas foram retiradas dos substratos e novamente realizou-se a avaliação dos mesmos parâmetros, visando observar os ganhos obtidos neste período em cada um dos substratos utilizados.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (substratos) e 10 repetições (plantas). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância ANOVA e em seguida os tratamentos foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade. Para tais análises foi utilizado o software Agroestat (BARBOSA; MALDONADO JUNIOR, 2011).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Efeito de reguladores vegetais no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de segmentos de inflorescência de híbridos de *Phalaenopsis*.

Foi possível com sucesso o estabelecimento *in vitro* dos segmentos de inflorescências jovens dos dois genótipos de *Phalaenopsis*. A principal limitação nessa fase foi a alta taxa de contaminação (32 % dos segmentos contaminados) ocasionado pelo desenvolvimento de uma levedura com colônia de coloração branco-leitosa, no qual essa mesma contaminação persistiu mesmo após alguns subcultivos dos segmentos com brotações e repicados em novo meio de cultura.

Foram observados dois tipos de órgãos gerados da brotação das gemas axilares presentes nas inflorescências, um tipo com desenvolvimento vegetativo e formação direta de brotações adventícias (Figura 3A) e outra através de indução de nova haste floral (Figura 3B). Considerando isto, foi realizada uma avaliação da forma de regeneração através da porcentagem de segmentos de inflorescência regenerados pela indução de nova inflorescência ou através de brotações vegetativas.



**Figura 3:** Tipos de brotação provenientes de segmentos de haste floral. A- desenvolvimento vegetativo com formação direta de brotações; B- indução de nova haste floral.

Na etapa de estabelecimento *in vitro* dos segmentos florais de *Phalaenopsis*, onde houve a introdução de segmentos de hastes florais após o processo de assepsia, observou-se que a cultivar ‘Ph501’ mostrou maior taxa de multiplicação (50% a mais) e porcentagem de segmentos vivos (72% a mais) que a cultivar ‘Ph908’. As diferentes cultivares também demonstraram grande variação no tipo de desenvolvimento a partir da gema axilar, sendo a porcentagem de segmentos de inflorescência com emissão de nova haste floral próxima de 75% na cultivar ‘Ph501’ comparado e apenas 14,5% na cv. ‘Ph908’ (Tabela 1).

**Tabela 1:** ANOVA e teste de médias para porcentagem de segmentos de inflorescência vivos, porcentagem de brotações em haste floral e vegetativa, e taxa de multiplicação, no estabelecimento *in vitro* de gemas provenientes de hastes florais de duas cultivares de *Phalaenopsis*.

Genótipo	Porcentagem de segmentos vivos	Porcentagem brotações		Taxa de multiplicação
		Haste floral	Vegetativa	
‘Ph501’	76,78 a	75,14 a	24,86 b	1,81 a
‘Ph908’	44,63 b	14,53 b	85,47 a	1,21 b
<b>Meio de cultura</b>				
Sem reguladores	44,64 b	42,21 a	57,79 a	0,98 b
BA 1,0; GA <sub>3</sub> 1,5; ANA 0,1	67,83 ab	55,35 a	44,65 a	2,12 a
BA 0,1; GA <sub>3</sub> 1,5; ANA 0,1	51,78 ab	37,21 a	62,79 a	1,01 b
BA 1,0; GA <sub>3</sub> 0,15; ANA 0,1	78,56 a	44,57 a	55,43 a	1,92 a
<b>F1: Genótipo</b>	20,18 **	73,96 **	74,67 **	10,75 **
<b>F2: Meio de cultura</b>	4,36 **	1,23 ns	1,23 ns	10,76 **
<b>Interação F1 x F2</b>	1,04 ns	0,35 ns	0,36 ns	1,53 ns
<b>Tratamentos</b>	5,20 **	11,24 **	11,35 **	6,80 **
<b>CV (%)</b>	37,06	47,5	39,35	45,1

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ).

Essas diferenças associadas ao tipo de brotação obtida dos segmentos de inflorescências deve-se a uma característica das diferentes cultivares de *Phalaenopsis*, sendo os mesmos classificados comercialmente de acordo com o tipo de haste, havendo cultivares com duas ou mais inflorescências por planta e cultivares

de hastes ramificadas, no qual as inflorescências emitidas apresentam ramificações no terço médio das inflorescências, o que pode ser observado na cv. 'Ph501' (Figura 4A), e cultivares de haste única simples, com uma única inflorescência por planta que não ou raramente apresenta ramificações, como em 'Ph908' (Figura 4B).

Nessa direção, e considerando os trabalhos que demonstram o efeito do ácido giberélico no florescimento de *Phalaenopsis* (Cardoso et al. 2012A,B), era esperado que a adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura pudesse aumentar o número de segmentos de inflorescências com desenvolvimento de novas hastes, porém isso não ocorreu, sendo essa uma resposta da cultivar e independente da combinação de reguladores vegetais (Tabela 1).

A produção de hastes ramificadas em *Phalaenopsis* é uma característica genética de cada cultivar, sendo o processo de desenvolvimento das inflorescências, ramificadas ou simples, pré-determinados a partir do desenvolvimento inicial das inflorescências, característica similar as observadas para arquitetura de inflorescências de petúnias (SOUER et al., 1998) e legumes (BENLLOCH et al., 2015). Dessa forma, é possível concluir que o maior efeito na diferenciação do tipo de desenvolvimento das gemas axilares contidas nos segmentos de inflorescências inoculados *in vitro* são também genótipo-dependentes em orquídeas *Phalaenopsis*.

Essa característica de desenvolvimento de nova haste floral (Tipo B), contendo novas gemas (Figura 3), permitiu também um aumento significativo no número de brotações obtidas na cv. 'Ph501' em relação a cv. 'Ph908', pois ao invés de brotação vegetativas individuais comumente observadas em 'Ph908', foi possível gerar vários outros segmentos de inflorescências a partir do primeiramente inoculado no 'Ph501'.

Outro fato interessante observado nas condições *in vitro*, é que a divisão nos tipos de desenvolvimento (A ou B) ocorreu somente na fase de estabelecimento *in vitro*, sendo que as repicagens subsequentes, somente geraram brotações tipo A, vegetativas (Tabela 2).



**Figura 4:** Diferenças fenotípicas de hastes florais entre as cultivares. A- Haste floral ramificada da cv. 'Ph501'; B- Cultivar 'Ph908' com haste floral contendo apenas uma ramificação.

Os tipos e concentrações de reguladores vegetais influenciaram o percentual de explantes vivos e a taxa de multiplicação dos segmentos de inflorescências (Tabela 1). O meio de cultura com BA a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , juntamente com o Ácido Giberélico ( $\text{GA}_3$ ) a  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ , resultou na melhor porcentagem de segmentos vivos (78,56%). Para a taxa de multiplicação, os melhores tratamentos observados foram quando manteve-se  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BA, variando de 1,9 a 2,1 segmentos obtidos/ segmento de inflorescência introduzido.

Como esperado, a ausência de reguladores vegetais resultou nos piores resultados tanto pela baixa porcentagem de segmentos vivos como pela baixa taxa de multiplicação.

A alta porcentagem de segmentos de inflorescências contaminados (32% em média) explica a principal causa da mortalidade de segmentos de inflorescência no cultivo *in vitro*, bem como a redução na taxa de multiplicação, pois seriam também explantes capazes de gerar novas brotações. A contaminação ocasiona também a perda de tempo, de recursos financeiros e genéticos, além do risco de contaminação

de outros frascos presentes na mesma sala de crescimento (THOMAS; PRAKASH, 2004; THOMAS et al., 2006).

Apesar da contaminação não ter sido capaz de causar a morte dos segmentos de inflorescência em alguns casos (Figura 5), é muito provável que a mesma tenha restringido o desenvolvimento do mesmo, visto que os microrganismos ali presentes competem com os segmentos de inflorescência por nutrientes e eventualmente podem produzir substâncias tóxicas ao tecido vegetal (SOUSA et al., 2007).



**Figura 5:** Contaminação de segmentos de inflorescências provenientes de hastes florais por leveduras.

Embora não tenha sido possível a completa descontaminação dos segmentos de inflorescência, deve-se ressaltar que a prática de desinfestação utiliza compostos que, na maioria das vezes, reduz a capacidade de resposta dos explantes (ESPOSITO-POLESI, 2011), sendo necessário obter o balanço entre o sucesso da técnica de desinfestação sem que haja grandes prejuízos ou efeito tóxicos desses produtos aos explantes.

Juntamente com a alta taxa de contaminação, outro fator que pode ter contribuído para a mortalidade dos segmentos cultivados *in vitro* é a alta taxa de oxidação fenólica,

observada pelo escurecimento do meio de cultura após cerca de 14 dias da introdução dos segmentos (Figura 6).



**Figura 6:** Escurecimento do meio de cultura devido à oxidação fenólica dos segmentos de inflorescência introduzidos em cultivo *in vitro*.

De fato, essa alta taxa de oxidação fenólica é uma característica já relatada no gênero *Phalaenopsis* que ocorre essencialmente quando há algum tipo de injúria em seus tecidos, como por exemplo durante os cortes dos segmentos. Quando liberados no meio de cultura esses compostos normalmente são tóxicos para o tecido vegetal, e podem acarretar a morte do mesmo (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007), o que sem dúvida pode ter contribuído para a morte dos segmentos de inflorescência.

Diferente do que foi observado no momento do estabelecimento dos segmentos de inflorescência (Tabela 1), nas demais repicagens para a multiplicação *in vitro* não foi observado influência do tipo de cultivar para a porcentagem de segmentos vivos e taxa de multiplicação de brotações (Tabela 2).

A manutenção das cultivares nas condições *in vitro* em meio de cultura contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> BA ;1,5 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> e 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA, homogeneizou as respostas dos segmentos de inflorescências tanto em relação a sobrevivência *in vitro*, quanto a taxa de multiplicação (Tabela 2), diminuindo as diferenças genotípicas observadas na fase de estabelecimento. No cultivo *in vitro*, essa uniformidade de respostas entre genótipos é desejável, pois permite a utilização de um único meio de cultura para diferentes genótipos.

Na fase de multiplicação o meio de cultura 2 (1,0 mg L<sup>-1</sup> BA; 1,5 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> e 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA) mostrou os melhores resultados, com média de 71,48% de segmentos de inflorescência vivos e taxa de multiplicação de 1,68 brotações/segmento introduzido, seguido pelo meio de cultura quatro com 64,7% de segmentos de inflorescência vivos e taxa de multiplicação de 1,31 brotações/ segmento introduzido. Nesses dois meios de cultura, o maior fator de influência foi a adição do BA a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, o qual foi responsável pelo aumento no número de segmentos vivos, além de induzir e acelerar a emissão de novas brotações nos segmentos de inflorescências.

**Tabela 2:** ANOVA e teste de médias para porcentagem de segmentos de inflorescência vivos (PSV) e taxa de multiplicação (TM) em três repicagens para 2 cultivares de *Phalaenopsis* híbrido.

Genótipo	1° Repicagem		2° Repicagem		3° Repicagem		Média	
	PSV	TM	PSV	TM	PSV	TM	PSV	TM
Ph 501	52,72 b	1,27 a	66,72 a	0,94 a	66,37 a	1,32 a	60,27 a	1,18 a
Ph 908	59,40 a	1,18 a	64,89 a	0,99 a	64,79 a	1,01 b	61,21 a	1,06 a
<b>Meio de cultura</b>								
Sem reguladores	48,57 b	0,80 c	53,50 c	0,50 d	53,82 b	0,55 c	50,97 c	0,61 c
0,1 ANA; 1,0 BA; 1,5 GA <sub>3</sub>	64,74 a	1,69 a	76,61 a	1,43 a	78,61 a	1,93 a	71,48 a	1,68 a
0,1 ANA; 0,1 BA; 1,5 GA <sub>3</sub>	49,11 b	1,03 c	63,37 bc	0,77 c	59,86 b	0,79 c	55,81 bc	0,86 c
0,1 ANA; 1,0 BA; 0,15 GA <sub>3</sub>	61,81 a	1,37 b	69,75 ab	1,17 b	70,04 a	1,39 b	64,70 ab	1,31 b
F1: Genótipo	4,56 *	1,19 ns	0,35 ns	0,79 ns	0,45 ns	23,54 **	0,13 ns	1,72 ns
F2: Meio de cultura	7,26 **	21,12 **	10,36 **	51,75 **	21,99 **	89,02 **	12,39 **	27,60 **
Int. F1 x F2	2,25 ns	0,92 ns	0,27 ns	1,98 ns	1,21 ns	2,66 ns	1,07 ns	0,16 ns
Tratamentos	4,73 **	9,62 **	4,61 **	23,14 **	10,01 **	42,65 **	5,79 **	12,14 **
CV (%)	26,14	32,41	21,75	27,84	16,72	26,28	10,47	19,71

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01).

As citocininas, como o BA, são caracterizadas por induzirem brotações a partir da quebra de dormência em gemas axilares (GEORGE; SHERRINGTON, 1984;

BHOJWANI; RAZDAN, 1996), além de estarem diretamente envolvidas na divisão celular *in vitro* (DELLO et al., 2007; JANA et al., 2013). A BA é a citocinina mais comumente usada na cultura de tecidos vegetais (ERIG; SCHUCH, 2006), sendo a mesma também eficiente na indução de brotações em segmentos de inflorescências em *Phalaenopsis*, produzindo novas inflorescências ou brotações vegetativas na fase de estabelecimento e brotações vegetativas na fase de multiplicação.

Além disso, outro fator observado é que a associação entre a citocinina BA e a giberelina GA<sub>3</sub> no meio de cultura se mostrou benéfica, melhorando principalmente a taxa de multiplicação, com obtenção de maior número de brotações/segmento introduzido, (1,31 brotações/SI para 1,68 brotações/SI).

As giberelinas estão diretamente ligadas ao alongamento das células e estimulam o crescimento de órgãos já formados (REIS et al., 2008), além disso também são capazes de promover o aumento no número de brotações axilares (NIKOLIĆ et al., 2010).

De fato, a combinação de BA com GA<sub>3</sub> é relatada como capaz de induzir brotações mais rápidas além de aumentar o número médio de brotações dos explantes de gemas axilares em *Guizotia abyssinica* (BAGHEL; BANSAL, 2014).

#### 4.2 Enraizamento e aclimatização de plantas

Conforme observado (Tabela 3), foi possível a aclimatização nos três substratos avaliados, sendo que a sobrevivência das plântulas foi de 100% em todos eles. Com base nos resultados obtidos, o uso de vermiculita ou esfagno para a aclimatização de plântulas de *Phalaenopsis* propagadas *in vitro* foram os que demonstraram os melhores resultados. Destaca-se principalmente o ganho de 1,9 raízes/planta quando as plântulas são cultivadas em vermiculita, superior aos demais substratos que proporcionaram o aumento de apenas 0,9 e 0,7 raízes/planta em esfagno e pó de coco, respectivamente (Figura 7).

De forma similar, o aumento no número de folhas e de massa fresca também foi superior em vermiculita e esfagno, quando comparados ao pó de coco.

**Tabela 3:** Médias referentes a diferença entre avaliação final (60 dias após o transplante) e inicial do número de folhas, de raízes e massa fresca (g) de plantas de *Phalaenopsis*.

Tratamentos	Número		Massa
	Folhas	Raízes	Fresca (g)
Vermiculita	0,50 a	1,90 a	1,75 a
Esfagno	0,3 ab	0,90 b	1,33 ab
Pó de coco	0,2 b	0,70 b	0,97 b
CV (%)	75,27	61,5	42,83
F	3,71 *	8,03 *	4,52 *

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.01$ ).

A recomendação de substratos para a aclimatização de orquídeas é resultado de bastante controvérsias, pois depende da origem do material, da granulometria, do seu armazenamento e da condição fitossanitária do produto. Dessa forma, diferentes autores relatam vantagens e desvantagens de determinados produtos em relação a outros.

Venturieri e Arbiato (2011) na aclimatização de *P. amabilis* concluem que o uso de esfagno na aclimatização é o mais indicado quando comparado à fibra de coco, xaxim ou vermiculita. Dados semelhante foram observados por Sousa et al. (2015) na aclimatização de *Brassavola tuberculata* sendo o esfagno indicado como melhor em sobrevivência e crescimento inicial das plantas quando comparado com a fibra de coco. Já para Colombo et al. (2005), o pó de coco apresentou melhores resultados comparado ao esfagno, para a massa fresca e sobrevivência de plantas na aclimatização de híbrido de *Cattleya*.

De fato, os resultados observados no presente trabalho e nos diversos autores citados apresentam grande variação, o que provavelmente se deve ao sistema de cultivo empregado em cada situação como condições ambientais de cada região de cultivo, tipo e frequência de irrigação, entre outros, além da espécie de orquídea a ser aclimatizada.



**Figura 7:** Plântulas de *Phalaenopsis* após 60 dias de aclimatização nos substratos:  
A- vermiculita; B- esfagno; C- pó de coco.

## 5. Conclusões

1. Conclui-se que, o BA a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  foi o principal regulador responsável pela indução de brotações em segmentos de inflorescência de *Phalaenopsis*, sendo que a adição de GA<sub>3</sub> associado ao BA foi benéfica.
2. A contaminação dos segmentos de inflorescência por leveduras e a oxidação fenólica foram os principais problemas encontrados no cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis* através de segmentos de inflorescências.
3. A cultivar utilizada apresenta efeito direto na taxa de multiplicação, causada principalmente pelo tipo e morfologia do florescimento, sendo que a cultivar 'Ph501' mostrou melhores resultados.
4. Considerando as condições de cultivo utilizadas neste trabalho, indica-se o uso de vermiculita ou esfagno para a aclimatização das plântulas obtidas após a fase de enraizamento *in vitro*.

## 6. Literatura citada

BAGHEL, S.; BANSAL, Y. K. Synergistic effect of BAP and GA<sub>3</sub> on *in vitro* flowering of *Guizotia abyssinica* Cass.-A multipurpose oil crop. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 20, p. 241-247, 2014.

BALILASHAKI, K.; NADERI, R.; KALANTARI, S.; SOORNI, A. Micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* cv. Cool 'Breeze' with using of flower stalk nodes and leaves os sterile obtained from node cultures. **International Journal of Farming and Allied Sciences**, v. 3, p. 823-829, 2014.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JUNIOR, W. **AgroEstat- Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**, Jaboticabal: FCAV/UNESP, 2011.

BENLLOCH, R.; BERBEL, A.; ALI, L.; GOHARI, G.; MILLÁN, T.; MADUEÑO, F. Genetic control of inflorescence architecture in legumes. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-14, 2015.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition**. Amsterdam: Elsevier, 1996. 767p.

CARDOSO, J. C.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Gibberellic acid in vegetative and reproductive development of *Phalaenopsis* orchid híbrid genus. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 71-74, 2012A.

CARDOSO, J. C.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Ácido giberélico na indução e qualidade do florescimento de orquídea *Phalaenopsis* 'White Dream'. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.18, p. 135-140, 2012B.

CARDOSO, J. C. Melhoramento de espécies ornamentais como estratégia para o desenvolvimento e autossuficiência do setor. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n.1, p. 171, 2013.

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

DELLO, I. R.; LINHARES, F. S.; SCACCHI, E.; CASAMITJANA-MARTINEZ, E.; HEIDSTRA, R.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. **Current Biology**, v.17, p. 687-682, 2007.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Ação da 6-benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cvs. Galaxy e Mastergala. **Revista Brasileira Agrociência**, v.12, n. 2, p. 151-155, 2006.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 10, n. 1/2, p. 15-19, 2004.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, N.P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics Limited, 1984. 593p.

IBRAFLO. **Boletim Ibraflor 06.2016**. Holambra, 2016. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=255>> Acesso em: agosto 2016.

JANA, S.; SIVANESAN, I.; JEONG, B. R. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of *Sophora tonkinensis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, p. 549-553, 2013.

KOSIR, P.; SKOF, S.; LUTHAR, Z. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 83, p. 233-242, 2004.

LEE, L. L. Biofábrica de *Phalaenopsis*. In: LEE, T. S. G. **Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 2011, p.150-175.

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

NIKOLIĆ, R.; MITIĆ, N.; NINKOVIĆ, S.; VINTERHALTER, B.; KORAC, S.; NESKOVIĆ, M. Gibberellic acid promotes *in vitro* regeneration and shoot multiplication in *Lotus corniculatus* L. **Plant Growth Regulation**, v. 62, p. 181-188, 2010.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C.; CARNEIRO, A. G.; FERREIRA, S. F. Indução *in vitro* de brotos em paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*). **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.4, n.1, p. 15-20, 2008.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 205-237, 2000.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. A NEW VERSION OF THE ASSISTAT-STATISTICAL ASSISTANCE SOFTWARE. In: World congress on computers in agricultura, 4., 2006, Orlando. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

SINHA, P.; HAKIM, M. L.; ALAM, M. F. Efficient micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* (L.) BL. cv. 'Cool Breeze' using inflorescence axis thin sections as explants. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 7, p. 9-15, 2007.

SOUER, E.; KROL, A.; KLOOS, D.; SPELT, C.; BLIEK, M.; MOL, J.; KOES, R. Genetic control of branching pattern and floral identity during *Petunia* inflorescence development. **Development**, v. 125, p. 733-742, 1998.

SOUSA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, V. L. R.; FARIA, S. P.; CAMPOS, M. R. C. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 405-407, 2007.

SOUSA, G. G.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SOARES, J. S. Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 208-215, 2015.

THOMAS, P.; PRAKASH, G. S. Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminar field testing of plants after 8 years *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v.40, p. 603-607, 2004.

THOMAS, P.; PRABHAKARA, B.S.; PITCHAIMUTHU, M. Cleansing the long-term micropropagated triploid watermelon cultures from covert bacteria and field testing the plants for clonal fidelity and fertility during the 7-10 years period *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 317-329, 2006.

TOKUHARA, K.; MII, M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 1, p. 7-11, 1993.

VENTURIERI, G. A.; ARBIETO, E. A. M. *Ex-vitro* establishment of *Phalaenopsis amaibilis* seedlings in diferente substrates. **Acta Scientarum**, v. 33, p. 495-501, 2011.

## CAPÍTULO 2. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE SEGMENTOS FOLIARES DE CULTIVARES HÍBRIDAS DE *PHALAEOPSIS*

### 1. Resumo

Dentre os mais de 700 gêneros pertencentes a família Orchidaceae o gênero *Phalaenopsis* é destaque na floricultura brasileira, sendo atualmente o líder em volume de produção, principalmente devido às características para o mercado consumidor, como a diversidade de cores e durabilidade de suas flores. A obtenção de mudas nacionais de boa qualidade e preço competitivo tem sido dificultada devido à ausência de protocolos eficientes de propagação clonal, necessitando a importação de mudas para suprir o mercado interno. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para indução e regeneração de PLBs em segmentos foliares de *Phalaenopsis*. Para tanto, foram avaliados os efeitos de diferentes fatores que afetam a embriogênese somática em *Phalaenopsis*, sendo os principais o genótipo, o tipo e concentração de reguladores vegetais, meios de cultura (Meio MS ½ e NDM), tipos de segmentos foliares (em condições de casa de vegetação ou em condição *in vitro*), densidade de segmentos foliares, tipo de corte e período de subcultivo dos segmentos. Os melhores resultados foram obtidos através do uso de segmentos foliares cultivados *in vitro* segmentados em 'Thin Cell Layer', coletados após 20 dias de subcultivo, em meio suplementado com os reguladores vegetais BA e TDZ na concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> cada (até 41 % de segmentos em regeneração e 5,3 PLBs/ segmento). Não foram obtidos PLBs provenientes de segmentos foliares de plantas adultas *ex vitro*. A utilização de dois passos, um com a inoculação de

segmentos de inflorescências *in vitro* (Capítulo 1), seguido de coleta de folhas de plantas obtidas *in vitro*, foi condição necessária para obtenção de PLBs. A cultivar 'Ph501' apresentou maior recalcitrância para a regeneração de PLBs quando comparado à 'Ph908', o que comprova a influência do fator genótipo na indução e regeneração de embriões. Os diferentes meios de cultura utilizados mostraram pouca influência sobre a indução de PLBs.

## 2. Introdução

As espécies da família Orchidaceae tem grande importância para a horticultura mundial, sendo comumente produzidas como flores envasadas ou de corte, fato que se dá principalmente pela grande variedade de formas e cores de suas espécies e híbridos (KHODDAMZADEH et al., 2011). Dentre os diversos gêneros desta família, os *Phalaenopsis*, conhecidos também como orquídea mariposa (AOS, 2016) tem obtido destaque devido a sua precocidade de florescimento e grande durabilidade de suas flores.

Considerando o constante crescimento da floricultura nacional e a importância das orquídeas do gênero *Phalaenopsis* neste setor, se torna fundamental o desenvolvimento de um protocolo eficiente para a produção de mudas, uma vez que este se trata de um dos principais entraves para os produtores nacionais, que são atualmente dependentes da importação de mudas de países da Europa.

Além do alto custo para os produtores devido a necessidade de importação das mudas, a técnica atual de propagação clonal de híbridos de *Phalaenopsis* através de brotações de gemas axilares presentes em segmentos de inflorescências, apresenta como principais problemas sua baixa eficiência de multiplicação, o que resulta em maior custo de produção (CHEN, 2016), além de não garantir a eliminação de possíveis doenças contidas na matriz doadora de explantes, o que é possível através da embriogênese somática (GOUSSARD et al., 1991; QUAINOO et al., 2008; GAMBINO et al., 2009; NKAA et al., 2013).

A embriogênese somática consiste numa técnica de micropropagação em que células somáticas passam por diversos estádios embriogênicos até originarem uma planta, sem que haja a fusão de gametas (GUERRA et al., 1999). Quando a embriogênese ocorre por via direta, observa-se no explante de origem a formação de

estruturas globulares inicialmente brancas e translúcidas (ULISSES et al., 2016) que ao serem cultivadas na presença de luz adquirem a coloração verde. Já quando a embriogênese ocorre de forma indireta, observa-se a formação de calos anteriormente a formação de tais estruturas globulares (GUERRA et al., 1999).

Em orquídeas, essa estrutura globular é denominada PLB (protocorm like bodies) devido a sua semelhança com os protocormos formados na germinação de sementes comum a essa família de plantas.

Protocolos como o de Khoddamzadeh et al. (2011) e Chen e Chang (2006) comprovam a possibilidade do uso da embriogênese somática com a produção de PLBs em *Phalaenopsis belina* e *P. amabilis*, utilizando como explantes segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*.

Porém, considerando a necessidade de produção de plantas de origem clonal, em especial de plantas híbridas com características hortícolas e ornamentais de grande aceitação no competitivo mercado de flores, e o efeito direto do genótipo na embriogênese somática (MOLINA et al., 2002; SLESÁK et al., 2013; NARANJO et al., 2016), são necessários estudos que comprovem que a embriogênese somática ou indução de PLBs seja uma alternativa viável visando a produção de grande quantidade de mudas pela via clonal.

A obtenção de um protocolo eficiente de propagação clonal de *Phalaenopsis* poderia ainda reduzir a importação de mudas e o pagamento de *royalties*, em especial para produtores alocados em países com pouco desenvolvimento dessa tecnologia, como no Brasil (CARDOSO, 2013).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para a produção de PLBs e regeneração em plântulas de cultivares de *Phalaenopsis*, avaliando-se os fatores: efeito da cultivar, do tipo, idade e densidade de explantes, de reguladores vegetais e solução salina de meios de cultura.

### 3. Materiais e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos do Departamento de Biotecnologia e Produção Vegetal e Animal da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, SP.

Os experimentos foram divididos em duas partes pelo tipo de explante utilizado. Em um grupo de experimentos utilizaram-se explantes foliares jovens provenientes diretamente de plantas adultas em fase vegetativa cultivadas em casa de vegetação, os quais foram inoculados *in vitro*. No outro grupo de experimentos, os segmentos foliares foram obtidos de plantas obtidas *in vitro* pela brotação de segmentos de inflorescências, de forma idêntica ao realizado no capítulo 1.

A descrição das cultivares utilizadas para coleta dos explantes encontra-se no tópico 3.1 do capítulo anterior.

Vale ressaltar que todas as plântulas resultantes dos experimentos deste capítulo foram submetidas ao processo de enraizamento *in vitro*. Para isso, foram introduzidas em frascos de 500 ml contendo meio MS modificado suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 25 ml L<sup>-1</sup> de água de coco, 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, solidificado com 2,4 g L<sup>-1</sup> de Gelrite e pH ajustado para 5,7 ± 0,05. Após foram mantidas em sala de crescimento submetidas a luz branca fria com densidade de fluxo de fótons de 35-40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 14 horas e temperatura de 25 °C ± 2 °C por mais 60 dias.

Após esse período as plantas foram levadas para a fase de aclimatização. As mesmas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente, plantadas em bandejas plásticas de 50 células e transferidas para casa de vegetação sob tela de sombreamento 65%, irrigados por aspersão (1,0 mm água/dia), seguindo as mesmas diretrizes utilizadas para as plântulas obtidas no capítulo anterior.

### 3.1 Estabelecimento *in vitro* de segmentos foliares de cultivares híbridas de *Phalaenopsis*

Foram coletadas folhas jovens medindo entre 5,0 e 8,0 cm de comprimento provenientes de plantas adultas, obtidas de clonagem *in vitro*, e mantidas em condições de casa de vegetação. Foram avaliados diferentes tipos de assepsia com álcool 70% e hipoclorito de sódio (2,0-2,5% de cloro ativo). Os tratamentos utilizados foram os seguintes: assepsia em álcool 70% por 1 minuto seguido de 20 minutos em hipoclorito nas concentrações 60% (T1), 50% (T2) e 40% (T3) do produto comercial (água sanitária Candura®, São Paulo/SP).

Após a assepsia, os tecidos foram lavados por três vezes consecutivas em água deionizada e autoclavada, seguido da retirada da nervura foliar central e as bordas laterais da folha, segmentando o limbo foliar em quadrados de aproximadamente 1,0 x 1,0 cm (1,0 cm<sup>2</sup>). Estes segmentos foram inoculados em frasco de vidro de 250 ml contendo 30 ml de meio de cultura New Dogashima Medium (NDM) (TOKUHARA; MII, 1993) suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,25 mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron (TDZ). O pH foi ajustado para 5,7 e o meio solidificado com 6,4 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento e acondicionados em câmara escura por 60 dias a fim de induzir a embriogênese somática, de acordo com metodologia descrita por Gow et al. (2009). Após, os frascos contendo os segmentos foliares foram transferidos para iluminação artificial de intensidade aproximada de 3000 lux, fotoperíodo de 14 horas e temperatura controlada em 25 °C ± 2° C por mais 60 dias e ao final desse período foram avaliadas a porcentagem de contaminação, porcentagem de segmentos foliares verdes e porcentagem de segmentos foliares com sinais de regeneração e/ou com calos embriogênicos ou embriões formados.

O experimento foi conduzido no esquema fatorial 2 (cultivares) x 3 (concentração de hipoclorito de sódio na assepsia) com cinco repetições (frascos), sendo cada repetição composta por um frasco contendo quatro segmentos foliares.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e em seguida os tratamentos foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade. Para tais análises foi utilizado o software Assistat 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006). Dados em porcentagem foram transformados pela equação  $\arcsen\sqrt{x+1}$  (SANTANA; RANAL, 2000) antes de serem analisados.

### 3.2 Solução salina e tipos e concentrações de reguladores vegetais na indução de PLBs em segmentos foliares de cultivares de *Phalaenopsis*

Para esta etapa foram utilizados dois tipos de explantes, ambos obtidos de folhas jovens de *Phalaenopsis*, das cultivares 'Ph501' e 'Ph908'. Um deles proveniente de folhas jovens medindo entre 5,0 e 8,0 cm coletadas de plantas adultas em condições de casa de vegetação. Estas folhas foram submetidas a processo de assepsia em álcool 70% por 1 minuto seguido de 20 minutos em hipoclorito de sódio (água sanitária Candura®, 2,0 - 2,5% cloro ativo) 60% e após, foram lavados por três vezes

consecutivas em água deionizada e autoclavada, seguido da retirada da nervura foliar central e as bordas laterais da folha, segmentando o limbo foliar em quadrados de aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup>.

O outro tipo de explante foi proveniente de folhas jovens de brotações de hastes florais cultivadas *in vitro* por 60 dias em meio NDM acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA, 1,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> e pH ajustado para 5,7. Estas folhas foram seccionadas em quadrados de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, sendo usados estes segmentos como explante.

Os tratamentos foram:

- Tratamento 1: Meio de cultura NDM (TOKUHARA; MII, 1993) e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilamdenina (BA);
- Tratamento 2: Meio de cultura NDM e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de Thidiazuron (TDZ);
- Tratamento 3: Meio de cultura NDM, 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BA e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ.
- Tratamento 4: Meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a concentração de macro e micronutrientes reduzidos à metade (MS ½) e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BA (GOW et al., 2008);
- Tratamento 5: Meio de cultura MS ½ e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ (CHEN; CHANG, 2006; KHODDAMZADEH, 2011);
- Tratamento 6: Meio de cultura MS ½ e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BA e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ.

Todos os tratamentos foram suplementados com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, pH ajustado para 5,6 e solidificados com 6,4 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Cada tratamento foi composto por cinco repetições (frascos), sendo que cada frasco continha quatro segmentos foliares. Os frascos foram acondicionados por 60 dias em câmara escura (GOW et al., 2009) e, após isso, foram passados para iluminação artificial de intensidade aproximada de 3000 lux, fotoperíodo de 14 horas e temperatura controlada em 25 °C ± 2° C por mais 30 dias, sendo posteriormente avaliados em porcentagem de segmentos foliares verdes, porcentagem de segmentos foliares contendo PLBs e número de embriões somáticos e plântulas obtidos por segmento foliar (multiplicação).

### 3.3 Influência da quantidade de segmentos foliares por frasco na regeneração somática de segmentos foliares *in vitro* de *Phalaenopsis*

Para esta etapa utilizou-se folhas jovens da cultivar 'Ph908' provenientes de brotações de segmentos de inflorescências cultivadas *in vitro* por 60 dias em meio NDM acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA, 1,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, solidificado com 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7, conforme resultados obtidos no capítulo 1.

As folhas foram seccionadas em aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> e então utilizadas como explantes, dispostas com a face abaxial em contato com o meio de cultura, em frascos de 250 ml contendo 30 mL de meio NDM (TOKUHARA; MII, 1993) acrescido de 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar, 3 mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron (TDZ) e pH ajustado para 5,6.

As quantidades de segmentos foliares avaliados foram 6 (Tratamento 1), 9 (Tratamento 2) e 12 segmentos foliares/frasco (Tratamento 3).

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento em condições de escuro por 60 dias e após foram passados para iluminação artificial composta por lâmpadas fluorescentes brancas com intensidade luminosa de aproximadamente 3000 lux, fotoperíodo de 14 horas e temperatura controlada em 25 °C ± 2° C por mais 30 dias. Noventa dias após o cultivo *in vitro* foram avaliados a porcentagem de segmentos foliares verdes e contendo PLBs, e o número de embriões formados por segmento foliar (taxa de multiplicação).

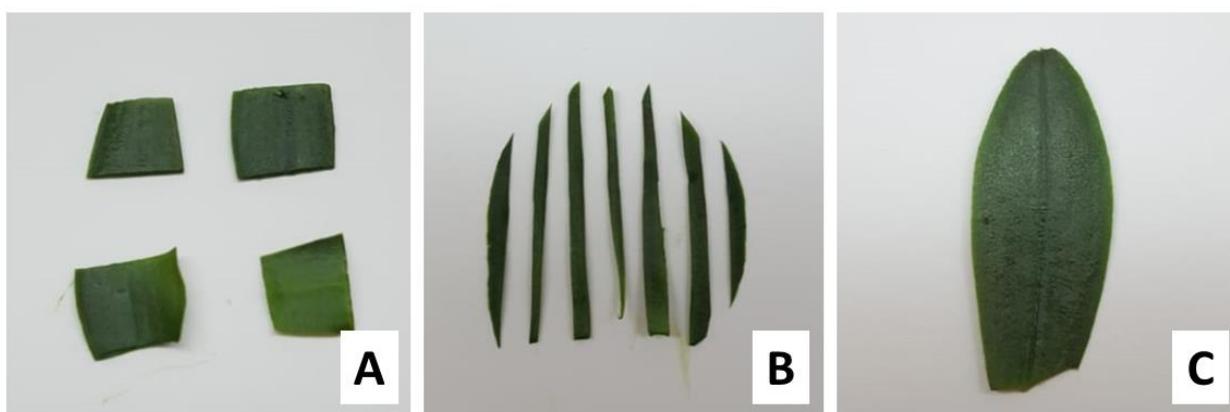
Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e em seguida os tratamentos foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade. Para as análises foi utilizado o software Assistat 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006). Dados em porcentagem foram transformados pela equação  $\arcsen\sqrt{x+1}$  (SANTANA; RANAL, 2000) antes de serem analisados.

### 3.4 Tipos de corte e combinações de reguladores vegetais na indução de PLBs em segmentos foliares de *Phalaenopsis*

Neste experimento utilizou-se folhas jovens da cultivar 'Ph501' provenientes de brotações de segmentos de inflorescências cultivadas *in vitro* em meio NDM acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA, 1,5

mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, solidificado com 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7, conforme resultados obtidos no Capítulo 1. As folhas foram coletadas das brotações obtidas, 60 dias após a inoculação.

As folhas excisadas das plantas *in vitro*, foram então segmentadas de três diferentes formas, sendo: segmentos foliares com formato quadrado (1,0 x 1,0 cm) de 1 cm<sup>2</sup> e provenientes da região central das porções proximais e distais da folha após a retirada da nervura central e das bordas (Figura 1A); folhas segmentadas pela técnica de 'Thin Cell Layer' (TCL) (segmentos de 1-3 mm de espessura excisados no sentido longitudinal da folha) (Figura 1B); ou folhas inteiras com aproximadamente 1,5 cm e com corte transversal na região proximal (Figura 1C).



**Figura 1:** Tipos de corte realizados nas folhas para indução de PLBs. A- cortes de 1 cm<sup>2</sup> ; B- folhas segmentadas pela técnica de 'Thin Cell Layer' em sentido longitudinal ; C- folha inteira com corte transversal na região proximal.

Também, nesse experimento, foram avaliadas combinações dos reguladores vegetais. Os tratamentos foram: 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,25 mg L<sup>-1</sup> de TDZ; 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BA e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e; 3,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ.

Utilizou-se o meio NDM suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, pH ajustado para 5,5 e solidificados com 6,4 g L<sup>-1</sup> de ágar para todos os tratamentos.

O experimento foi conduzido em fatorial 3 x 3 sendo, três combinações de reguladores vegetais e três tipos de cortes das folhas. Cada tratamento foi composto por três repetições (frascos), sendo que cada frasco continha duas folhas segmentadas ou inteiras, de acordo com cada tratamento.

Os frascos foram acondicionados por 60 dias em câmara escura (GOW et al., 2009) e após, passados para iluminação artificial de intensidade aproximada de 3000 lux,

fotoperíodo de 14 horas e temperatura controlada em  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por mais 30 dias, sendo posteriormente avaliadas a porcentagem de segmentos foliares com PLBs e o número de PLBs por segmento foliar.

### 3.5 Efeito do tempo de cultivo *in vitro* de brotações para excisão de segmentos foliares na obtenção de embriões somáticos de *Phalaenopsis*

Com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de cultivo *in vitro* sobre a embriogênese somática a partir de segmentos foliares com cortes tipo 'Thin Cell Layer' (TCL) (item 3.4) de *Phalaenopsis* híbrido 'Ph501', foram coletadas folhas de plantas *in vitro* com diferentes tempos de cultivo (20, 40 ou 60 dias). As mesmas foram segmentadas em cortes tipo TCL (1-3 mm de espessura) nos sentidos transversal ou longitudinal e distribuídas em frascos de 250 ml contendo 30 ml de meio NDM com  $20\text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $0,1\text{ g L}^{-1}$  de inositol,  $6,4\text{ g L}^{-1}$  Ágar e pH 5,5, acrescido dos fitorreguladores BA e TDZ ( $1,5\text{ mg L}^{-1}$  de ambos).

Os frascos foram acondicionados por 60 dias em câmara escura inicialmente (GOW et al., 2009) e, após isso, foram passados para iluminação artificial de intensidade aproximada de 3000 lux, fotoperíodo de 14 horas e temperatura controlada em  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por mais 30 dias, sendo posteriormente avaliadas a porcentagem de segmentos foliares com PLBs e o número de PLBs por segmento foliar.

O experimento foi conduzido em fatorial  $3 \times 2$ , sendo três tempos de cultivo diferentes das folhas (20, 40 ou 60 dias) e dois sentidos de corte em TCL das folhas (longitudinal ou transversal). Cada tratamento foi composto por cinco repetições (frascos com duas folhas segmentadas). Após 90 dias foram avaliadas a porcentagem de segmentos foliares com PLBs e o número de PLBs por segmento foliar.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância ANOVA e em seguida os tratamentos foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade. Para tais análises foi utilizado o software Agroestat (BARBOSA; MALDONADO JUNIOR, 2011).

3.6 Efeito do tempo de cultivo *in vitro* de brotações para excisão de segmentos foliares e suplementação do meio de cultura com água de coco na obtenção de embriões somáticos de *Phalaenopsis*.

Para esta etapa objetivou-se avaliar a suplementação do meio de cultura com água de coco em segmentos foliares com diferentes idades visando a regeneração de PLBs do híbrido 'Ph501'.

Para tal, coletou-se folhas de brotações *in vitro* com 20, 40 ou 60 dias e as mesmas foram segmentadas em cortes tipo TCL (1-3 mm de espessura) no sentido longitudinal (item 3.4) e distribuídas em frascos de 250 ml contendo 30 ml de meio NDM com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 6,4 g L<sup>-1</sup> Ágar e pH 5,5, acrescido dos fitorreguladores BA e TDZ (1,5 mg L<sup>-1</sup> de ambos). Os tratamentos foram compostos com 10% (v:v) de água de coco ou meio de cultura sem acréscimo de água de coco.

Os frascos foram acondicionados por 60 dias em câmara escura inicialmente (GOW et al., 2009) e, após isso, foram passados para iluminação artificial de intensidade aproximada de 3000 lux, fotoperíodo de 14 horas e temperatura controlada em 25 °C ± 2° C por mais 30 dias, sendo posteriormente avaliadas a porcentagem de segmentos foliares com PLBs e o número de PLBs por segmento foliar.

O experimento foi conduzido em fatorial 3 x 2, sendo três tempos de cultivo diferentes das folhas (20, 40 ou 60 dias) e suplementação do meio com 10% de água de coco ou sem essa substância complexa. Cada tratamento foi composto por cinco repetições (frascos com duas folhas segmentadas). Após 90 dias foram avaliadas a porcentagem de segmentos foliares com PLBs e o número de PLBs por segmento foliar.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância ANOVA e em seguida os tratamentos foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade. Para tais análises foi utilizado o software Agroestat (BARBOSA; MALDONADO JUNIOR, 2011).

#### 4. Resultados e Discussão

##### 4.1 Estabelecimento *in vitro* de segmentos foliares de cultivares híbridas de *Phalaenopsis*

Não foram observadas diferenças para porcentagem de contaminação e de segmentos foliares verdes entre os tratamentos (Tabela 1). Mesmo utilizando concentrações de hipoclorito de sódio relativamente altas, a média de sobrevivência de segmentos foliares esteve acima de 80%, o que demonstra a capacidade do material vegetal utilizado em sobreviver ao método de assepsia utilizado. Além disso, a porcentagem de contaminação esteve abaixo de 15%, em média, podendo ser considerada baixa em comparação aos segmentos de inflorescências utilizados no capítulo 1 (média de 32 %), demonstrando as diferenças de contaminação entre diferentes tipos de explantes cultivados nas mesmas condições de casa de vegetação e provenientes dos mesmos híbridos.

**Tabela 1:** ANOVA e teste de médias para porcentagem de contaminação e de segmentos vivos de segmentos foliares de *Phalaenopsis* submetidos ao processo de assepsia (água sanitária a 60%, 50% e 40% de diluição) para estabelecimento de protocolo de propagação *in vitro*.

Genótipo	Porcentagem	
	Contaminação	Segmentos vivos
Ph501	13,33 a	83,3 a
Ph908	11,66 a	81,6 a
<b>Assepsia</b>		
60% Hipoclorito de sódio	7,5 a	77,5 a
50% Hipoclorito de sódio	15 a	80 a
40% Hipoclorito de sódio	15 a	90 a
F1: Genótipo	0,11 ns	0,05 ns
F2: Assepsia	1,05 ns	2,45 ns
Int. F1 x F2	0,11 ns	0,05 ns
Tratamentos	0,49 ns	1,01 ns
CV (%)	72,88	17,6

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar da contaminação relativamente baixa e a boa porcentagem de sobrevivência dos segmentos foliares, não foi observado a indução de PLBs nos segmentos foliares inoculados *in vitro*.

Não há registros na literatura sobre o uso de folhas provenientes de plantas adultas de *Phalaenopsis* e inoculadas diretamente nas condições *in vitro* para obtenção de PLBs, sendo que o principal tipo de explante utilizado para a embriogênese somática nessa espécie, são segmentos foliares retirados de plântulas germinadas *in vitro* de algumas espécies de *Phalaenopsis* (CHEN; CHANG (2006); GOW et al. (2008, 2009, 2010); KHODDAMZADEH et al. (2011).

Cardoso e Habermann (2014) observaram efeitos diretos da idade da planta matriz para obtenção de gemas adventícias em segmentos foliares de *Anthurium andraeanum* cv. 'White Beauty'. O uso de explantes juvenis foi capaz de aumentar a regeneração de plantas de 0,3 para até 2,8 plântulas por segmento foliar quando comparado a explantes adultos.

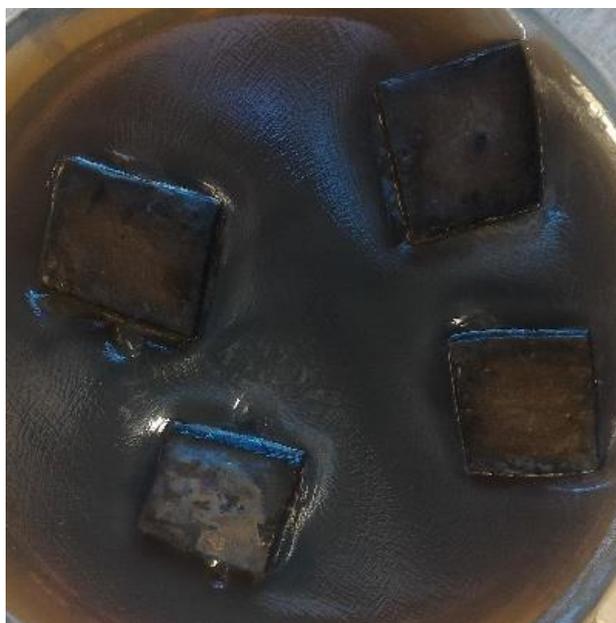
É comum observar em diversas espécies tais diferenças de regeneração quando se utiliza explantes com idades diferentes (SAVITA et al, 2011; YALCIN-MENDI, 2014) e em condições fisiológicas diferentes (BECERRA et al., 2004). Dentre as possíveis causas é citado a alta secreção de fenóis e as mudanças na relação IAA:ABA (CHAUVIN; SALESSES, 1988; BECK et al., 1998). Além disso, esta dificuldade pode estar ligada ao silenciamento de alguns genes, que podem ser revertidos com alguns tipos de estresse, utilização de fitorreguladores (PARK et al., 2010) ou transformação genética a fim de melhorar a capacidade de regeneração destas células (CERVERA et al., 2008).

Especialmente sobre o meio de cultura utilizado em nosso experimento, e em comparação a outros protocolos como o de Chen e Chang (2006), esses suplementaram o meio de cultura com TDZ na concentração de 3,0 mg L<sup>-1</sup>. Além da menor concentração de TDZ, a utilização de plântulas *in vitro* pode gerar tecidos mais responsivos aos estímulos do meio de cultura e dos reguladores vegetais para a indução e regeneração de PLBs.

Outro fator que pode ter relação direta ou indireta com a não obtenção de PLBs foi a alta quantidade de fenóis observada no meio de cultura e liberada pelos segmentos foliares de *Phalaenopsis*, de forma que o meio de cultura ficou totalmente escurecido pela liberação de fenóis pelos segmentos foliares provenientes de plantas *ex vitro* (Figura 2).

O gênero *Phalaenopsis* é caracterizado por apresentar alta produção de fenóis quando suas folhas são submetidas a cortes. Segundo Minamiguchi e Machado Neto (2007), uma forma possível de reduzir a fenolização dos explantes seria realizar o

corde dos mesmos submersos numa solução de cistina e ácido ascórbico na concentração de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de cada um dos produtos.



**Figura 2:** Segmentos foliares com alta taxa de fenolização após 90 dias de cultivo *in vitro*.

#### 4.2 Solução salina e tipos e concentrações de reguladores vegetais na indução de PLBs em segmentos foliares de cultivares de *Phalaenopsis*

Mesmo com o aumento da concentração de thidiazuron de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  usada no experimento anterior (tópico 4.1) para  $3 \text{ mg L}^{-1}$  neste trabalho, bem como o uso de outro regulador vegetal (BA) e outro meio de cultura, não foi possível obter resultados satisfatórios utilizando segmentos de folhas jovens coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação como explante para a indução de PLBs.

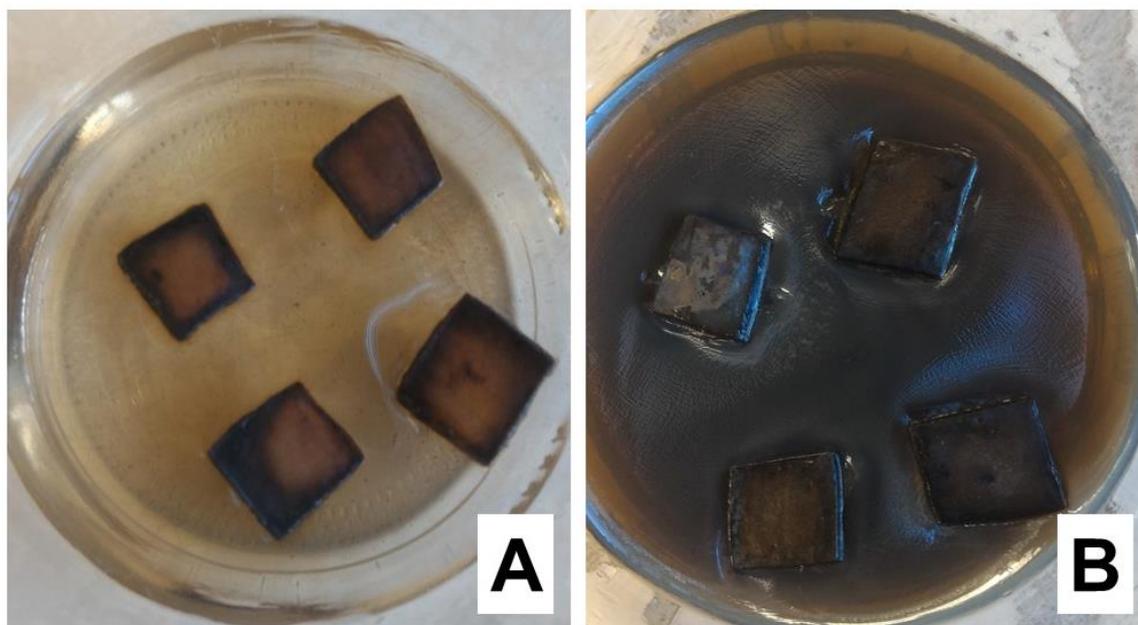
Utilizando folhas provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação, não foi possível obter nenhum segmento foliar com regeneração em ambos os genótipos. De fato, o uso desse tipo de material vegetal como explante para indução e regeneração de PLBs em *Phalaenopsis* não foi reportado, não havendo nenhum registro de uso desse tipo de explante, bem como o sucesso de sua regeneração.

Como já discutido no tópico anterior (4.1), tais resultados ajudam a confirmar o efeito direto da idade dos explantes utilizados, bem como as condições fisiológicas as quais os mesmos estão submetidos (BECERRA et al., 2004).

Considerando as condições e tratamentos a que os explantes foram submetidos o que se observou foi uma oxidação fenólica ainda mais acentuada e rápida do que em segmentos foliares cultivados *in vitro*, principalmente após a exposição dos explantes à luz (Figura 3).

Essa alta taxa de fenolização dos explantes gerou também um rápido escurecimento do meio de cultura, provavelmente pela liberação de polifenóis e outros compostos, o que confirma a hipótese do efeito negativo dos fenóis na embriogênese somática de *Phalaenopsis*, também relatada nos experimentos anteriores, resultando em posterior morte dos segmentos foliares.

Considerando isto, entende-se que novas opções devem ser testadas visando a utilização deste tipo de material como explante. A imersão dos segmentos foliares em solução de cistina e ácido ascórbico durante a etapa de segmentação das folhas (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007) bem como o uso de outros tipos de antioxidantes diretamente no meio de cultura ou em imersão dos segmentos previamente a inoculação *in vitro* podem ser possíveis formas de reduzir a oxidação fenólica e propiciar a obtenção de PLBs neste tipo de explante.



**Figura 3:** Oxidação fenólica de segmentos foliares provenientes de plantas em condições de campo, após 60 dias em câmara escura (A) e 30 dias após serem transferidos para iluminação artificial (B).

Já quando foram utilizados segmentos foliares provenientes de folhas de plantas cultivadas *in vitro*, foi possível observar que o uso em conjunto dos reguladores BA e TDZ nas concentrações de 1,5 mg L<sup>-1</sup> cada um se mostrou benéfica para alcançar as melhores taxas de porcentagem de segmentos foliares contendo PLBs, não havendo praticamente influência da solução salina utilizada para este parâmetro (Tabela 2).

Porém quando considerada a porcentagem de segmentos foliares verdes, principalmente para a cultivar 'Ph908' a solução salina afetou o desenvolvimento, sendo que o meio de cultura MS foi o responsável por aumentar a porcentagem de segmentos foliares verdes.

**Tabela 2:** Porcentagem de segmentos foliares verdes, porcentagem de segmentos foliares com PLBs e número de PLBs por segmento foliar, de explantes foliares em dois híbridos comerciais de *Phalaenopsis*.

Genótipo	Tratamento	Porcentagem de segmentos		N° PLBs
		Verdes	Com PLBs	Seg. Foliar
Ph501	1- NDM; 3,0 BA	35 ± 6,2	5 ± 3,3	1,07 ± 0,2
	2- NDM; 3,0 TDZ	40 ± 5,3	5 ± 3,3	1,07 ± 0,2
	3- NDM; 1,5 BA; 1,5 TDZ	40 ± 6,7	15 ± 4,7	3,66 ± 1,0
	4- MS ½; 3,0 BA	15 ± 4,6	0	0
	5- MS ½; 3,0 TDZ	25 ± 5,7	5 ± 3,3	1,2 ± 1,1
	6- MS ½, 1,5 BA; 1,5 TDZ	60 ± 5,8	10 ± 4,7	3,5 ± 0,7
Ph908	1- NDM; 3,0 BA	52 ± 3,3	4 ± 2,9	0,75 ± 0,5
	2- NDM; 3,0 TDZ	56 ± 5,1	20 ± 5,9	3 ± 1,2
	3- NDM; 1,5 BA; 1,5 TDZ	56 ± 4,0	24 ± 4,7	5,3 ± 1,4
	4- MS ½; 3,0 BA	60 ± 3,7	4 ± 2,9	1,3 ± 1,1
	5- MS ½; 3,0 TDZ	64 ± 4,0	20 ± 5,3	5 ± 1,7
	6- MS ½, 1,5 BA; 1,5TDZ	72 ± 4,8	24 ± 5,1	3,33 ± 1,5

Assim como para a porcentagem de segmentos foliares com PLBs, o uso conjunto de BA e TDZ também foi benéfico para o rendimento de embriões e sofreu pouca influência da solução salina dos meios de cultura utilizados, principalmente para a cv. 'Ph501'.

O TDZ tem sido utilizado com sucesso na embriogênese somática de diversas espécies (ZHANG et al., 2001; SUNANDAR et al., 2017), assim como também é reportado o uso de BA para o mesmo processo (MARTIN, 2004; SANÉ et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014). Apesar disso o uso conjunto destas duas citocininas ainda não

foi reportada e, com base nos presentes resultados demonstra potencial para melhorar o rendimento e a porcentagem de segmentos foliares com PLBs.

Considerando a diferença entre as cultivares, é possível afirmar que a 'Ph501' apresenta maior recalcitrância para a indução de PLBs (15% de segmentos foliares com PLBs) que a cv. 'Ph908' (com até 24% de segmentos foliares com PLBs). Dados como este reforçam a ideia de que o fator genótipo exerce influência direta na indução e regeneração de PLBs em *Phalaenopsis* cultivados *in vitro*.

De acordo com Khoddamzadeh et al. (2011), utilizando protocolo semelhante ao tratamento 5 (MS ½ + 3,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ) em segmentos foliares de *Phalaenopsis belina* provenientes de germinação de sementes *in vitro*, foi possível obter 71,8% de segmentos em regeneração e até 14,25 PLBs por segmento foliar. Já para segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* germinados *in vitro*, conforme Chen e Chang (2006) o mesmo protocolo é capaz de gerar até 19,4 PLBs por segmento foliar e 93,8% de segmentos em regeneração.

Apesar da superioridade de rendimento de PLBs e da porcentagem de segmentos foliares em regeneração obtidas por estes autores quando comparados aos resultados do presente trabalho, vale ressaltar que em ambos os segmentos foliares não foram provenientes de material clonal, o que é bastante indesejável considerando a produção de mudas *in vitro* em larga escala.

Utilizando segmentos foliares do híbrido Classic Spotted Pink cultivados *in vitro* em meio MS ½ acrescido de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, Ulisses et al. (2016) citam que é possível a obtenção de PLBs. Apesar disso os autores não reportam no trabalho a porcentagem de segmentos em regeneração, nem o número de PLBs formados. Já Minamiguchi e Machado Neto (2007) indicam ser possível a formação de até 8 PLBs por segmento, utilizando segmentos foliares de um híbrido de flores alba em meio NDM acrescido de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA. Neste trabalho os autores também não citam a porcentagem de segmentos foliares em regeneração.

### 4.3 Influência da quantidade de segmentos foliares por frasco na regeneração somática de segmentos foliares *in vitro* de *Phalaenopsis*

Considerando a possível influência da densidade de explantes por frasco na indução e regeneração de PLBs este trabalho foi realizado visando encontrar a densidade ideal de segmentos foliares por frasco, baseado na maior porcentagem de segmentos foliares vivos e em regeneração e no melhor rendimento de PLBs por segmento foliar.

Foi possível observar o efeito direto do aumento do número de segmentos foliares por frasco na redução da porcentagem de segmentos foliares com embriões. O aumento do número de segmentos foliares de 6 para 12 gerou uma redução de 40% para 11,7% (Tabela 3).

**Tabela 3:** Porcentagem de segmentos foliares verdes, de segmentos foliares com PLBs e número de PLBs/segmento foliar de explantes foliares de *Phalaenopsis* em diferentes densidades por frasco.

Tratamento	Porcentagem de segmentos foliares		N° PLBs/ Seg. Foliar
	Verdes	Com PLBs	
<b>6 explantes</b>	79,13 a	40,0 a	2,5 a
<b>9 explantes</b>	74,99 a	20,0 ab	2,8 a
<b>12 explantes</b>	77,05 a	11,7 b	1,1 a
<b>F</b>	0,26 ns	3,96 *	2,78 ns
<b>CV (%)</b>	20,6	45,52	20,78

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.01$ ).

Considerando a alta taxa de fenolização característica do gênero *Phalaenopsis* e normalmente observada após os danos causados aos seus tecidos, como durante o corte dos segmentos para inoculação *in vitro* (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007), a partir dos resultados obtidos, este pode ser observado como um dos principais fatores causador da redução da porcentagem de segmentos foliares com PLBs, pois o aumento da densidade de segmentos foliares por frasco levou a maior produção de fenóis e escurecimento do meio de cultura. Conforme ocorre o aumento

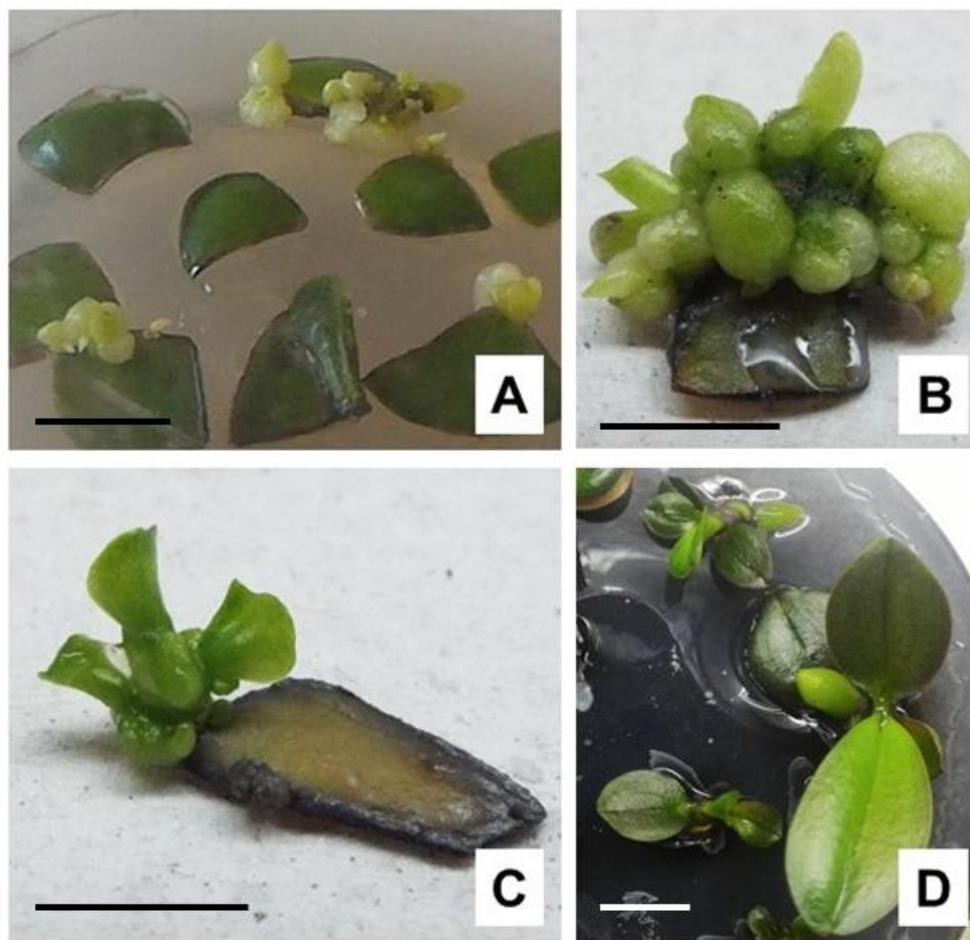
no número de segmentos foliares, com maior potencial de oxidação (densidade de tecidos/volume de meio de cultura), menor foi a regeneração.

De fato, o escurecimento dos segmentos foliares, causado pela injúria dos tecidos durante o corte tem sido um dos maiores problemas do cultivo *in vitro* (CHUANJUN et al., 2015).

A fenolização ou oxidação fenólica é um fenômeno desencadeado pela injúria dos tecidos vegetais, responsável pela cor marrom observada em explantes cultivados *in vitro* (BARRUETO CID, 2014) e que através da liberação da polifenol oxidase (PPO) (CHUANJUN et al., 2015) e outros compostos tóxicos para o tecido vegetal podem ocasionar a morte do mesmo (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007).

A respeito dos PLBs gerados durante o experimento, o período em ausência de luz foi responsável por induzir os segmentos foliares ao processo embriogênico (GOW et al., 2009), sendo que após os 60 dias no escuro foi possível observar os PLBs ainda em início de desenvolvimento, nas extremidades dos segmentos, com coloração variando de branco a verde claro (Figura 4A).

Após 15 dias da passagem dos explantes para a luz já era possível observar a mudança de cor dos PLBs para verde claro e verde escuro e em alguns casos até o aumento do número de embriões através do processo conhecido como embriogênese secundária, com a multiplicação dos embriões inicialmente regenerados dos segmentos foliares (Figura 4B). Com 90 dias de cultivo os embriões já estavam totalmente verdes e era possível observar o início da formação da primeira folha (Figura 4C). Nesta fase os mesmos foram destacados dos segmentos foliares, individualizados e passados para novo meio de cultura idêntico ao utilizado na indução, porém sem a adição de reguladores vegetais. Após 30 dias neste meio de cultura, os embriões somáticos germinaram e desenvolveram-se em plântulas e foram transferidos para o meio de enraizamento (Figura 4D), onde ficaram por mais 30 dias até serem transferidos para a fase de aclimatização, no qual completaram seu desenvolvimento, com o alongamento de suas folhas e produção de raízes.



**Figura 4:** Desenvolvimento de embriões somáticos (PLBs) a partir de segmento foliar de *Phalaenopsis* 'Ph908'. A- embriões em início de formação com coloração branco-amarelada após 60 dias em câmara escura; B- embriões com coloração verde após 15 dias em fotoperíodo de 14 horas de luz; C- desenvolvimento de embriões após 95 dias de cultivo; D- plântulas obtidas após regeneração dos embriões, em fase de enraizamento. Barra= 5 mm.

Mesmo com as dificuldades encontradas devido a fenolização dos segmentos foliares, foi possível obter uma boa quantidade de PLBs que regeneraram em plântulas através do protocolo utilizado neste experimento, sendo possível concluir que a utilização de seis segmentos foliares por frasco foi aquele com maior porcentagem de segmentos contendo PLBs, obtendo-se 40% de segmentos foliares com PLBs e 2,5 embriões por segmento foliar.

Chen e Chang (2006) obtiveram cerca de 93% de segmentos foliares contendo PLBs e até 19,4 embriões por segmento foliar utilizando protocolo semelhante, baseado no meio MS  $\frac{1}{2}$  e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ.

Porém, vale ressaltar que esses autores utilizaram como fonte de explante, folhas de plântulas germinadas *in vitro* de *Phalaenopsis amabilis* Shimadzu var. *formosa*. Essa espécie tem sido utilizada como modelo nos processos de indução de PLBs *in vitro*. Considerando o efeito direto do genótipo na embriogênese somática em orquídeas (TEIXEIRA DA SILVA; WINARTO, 2016), esse fato, associado as diferentes idades dos tecidos obtidos, explica a diferença de resultados encontrados entre o trabalho de Chen e Chang (2006) e o realizado nessa dissertação, proveniente de cultivares comerciais multiplicados *in vitro* pelo método de clonagem e a partir de plantas adultas em florescimento.

Outro ponto importante é que no atual trabalho desenvolvido, os segmentos foliares utilizados foram provenientes de processos de indução de embriogênese somática a partir de material clonal, diferentemente dos autores Chen e Chang (2006) que utilizaram de plântulas germinadas *in vitro*, provenientes de sementes e, portanto, juvenis, o que limita a técnica de propagação clonal.

Na floricultura atual existe uma alta exigência dos produtores por mudas provenientes de propagação clonal (CARDOSO, 2013), visto que nessa técnica são garantidas a uniformidade de crescimento e o padrão de floração das plantas (FRÁGUAS et al., 2003; COSTA et al., 2013), além da produção de plantas saudáveis e livres de doenças sistêmicas importantes, como aquelas de origem viral (CHIEN et al., 2015). Características altamente desejáveis para produções em larga escala e que, dificilmente são obtidas no caso de propagação via sementes (YOUNG et al., 2000).

#### 4.4 Tipos de corte e combinações de reguladores vegetais na indução de PLBs em segmentos foliares de *Phalaenopsis*

Comparando os tipos de cortes utilizados neste trabalho é possível observar que o corte tipo 'Thin Cell Layer' (TCL) demonstrou resultados mais promissores quando comparado aos demais (Cortes de 1 cm<sup>2</sup> e folha inteira) tanto na porcentagem de sementes foliares com PLBs, quanto no número de PLBs por segmento foliar. Já entre as três diferentes formulações de fitorreguladores avaliadas, não foi possível observar diferenças significativas entre os mesmos (Tabela 4).

Os resultados obtidos com os meios suplementados com 3,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ (Tabela 4) mostram que enquanto o corte em TCL pode apresentar até 33,3 ± 16,7% de

segmentos com PLBs e  $3,7 \pm 2,7$  PLBs por segmento, os demais tipos de cortes apresentam no máximo  $8,3 \pm 8,3\%$  de segmentos com PLBs e  $2 \pm 2$  PLBs por segmento, comprovando que o TCL deve ser utilizado nos segmentos foliares visando explorar ao máximo o potencial de indução e regeneração de PLBs em *Phalaenopsis*.

**Tabela 4:** Porcentagem de segmentos foliares com PLBs e número de PLBs por segmento foliar, de explantes foliares de *Phalaenopsis*.

Tratamentos	Reguladores vegetais	Tipo de corte	Porcentagem Seg. com PLBs	Nº PLBs/seg. foliar
1	1,0 ANA; 0,25 TDZ	1 cm <sup>2</sup>	0	0
2	1,0 ANA; 0,25 TDZ	TCL	$33,3 \pm 16,7$	$3,3 \pm 1,8$
3	1,0 ANA; 0,25 TDZ	Folha	$16,7 \pm 16,7$	$0,7 \pm 0,7$
4	1,5 BA; 1,5 TDZ	1 cm <sup>2</sup>	$25 \pm 14,5$	$2 \pm 1$
5	1,5 BA; 1,5 TDZ	TCL	$16,7 \pm 16,7$	$1,7 \pm 1,7$
6	1,5 BA; 1,5 TDZ	Folha	$16,6 \pm 16,7$	$0,3 \pm 0,3$
7	3,0 TDZ	1 cm <sup>2</sup>	$8,3 \pm 8,3$	$2 \pm 2$
8	3,0 TDZ	TCL	$33,3 \pm 16,7$	$3,7 \pm 2,7$
9	3,0 TDZ	Folha	0	0

O conceito do sistema de Thin Cell Layer (camada fina de células) foi definido a mais de 40 anos atrás por Tran Than Van (1973) que o descreveu como o isolamento de uma ou algumas camadas de células de qualquer órgão ou tecido que regeneram um órgão ou embrião (TEIXEIRA DA SILVA; DOBRÁNSZKI, 2015).

De acordo com Tran Than Van (2003) a capacidade de regeneração de explantes em TCL é normalmente maior do que em explantes convencionais que são mais espessos, o que de fato pode ser observado também neste experimento (Tabela 4).

Os principais motivos que explicam a maior produtividade do TCL para morfogênese (organogênese ou embriogênese somática) são os níveis mais baixos de fitorreguladores endógenos no TCL, o transporte mais eficaz dos componentes do meio de cultura diretamente para as células alvo ou uma maior proporção de células morfogênicas em comparação ao total de células do explante (TRAN THAN VAN, 2003).

De fato, a propagação clonal em massa de plantas da família Orchidaceae é considerada difícil, sendo que a tecnologia TCL tem sido capaz de facilitar a mesma,

reduzindo inclusive a necessidade de uso de tecnologias de alto custo, como os biorreatores (TEIXEIRA DA SILVA, 2013).

O uso de cortes em TCL já foi testado com sucesso em cerca de 19 espécies/híbridos da família Orchidaceae na organogênese ou embriogênese dos mesmos (TEIXEIRA DA SILVA; DOBRÁNSZKI, 2015), porém ainda não há relatos do uso em *Phalaenopsis*. A literatura atual sobre embriogênese somática *in vitro* de *Phalaenopsis* tem utilizado mais comumente como explantes, folhas segmentadas em quadrados de cerca de 1 cm<sup>2</sup> (CHEN; CHANG, 2006) ou folhas inteiras (ULISSES et al., 2016). De acordo com Teixeira da Silva (2003) a grande vantagem do sistema TCL seria a alta frequência de regeneração de órgãos com intervalo de tempo reduzido, frente ao uso de outros tipos de explantes

Protocormos de *Brasiliidium forbesii* obtidos através da germinação *in vitro*, foram segmentados através da técnica de TCL em sentido longitudinal e cultivados em meio suplementado com BA. Nestas condições, até 77% dos segmentos geraram novos protocormos somáticos (PLBs) e foi possível obter até 22,7 PLBs por segmento (GOMES et al., 2015).

Pecíolos de begônia segmentados em TCL transversal cultivadas em meio MS ½ suplementado com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e ANA apresentaram 100% de formação de parte aérea após 8 semanas de cultivo. Utilizando BA em substituição ao TDZ foi possível obter até 90% de formação de parte aérea (NHUT et al., 2005).

Em *Vanilla planifolia* a micropropagação a partir da secção longitudinal em TCL de brotações *in vitro* foi possível utilizando 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA ou TDZ produzindo em média 2,54 e 1,93 novas brotações, respectivamente (JING et al., 2014).

De acordo com Gill et al (1992) o uso do TDZ juntamente com a técnica de TCL desempenha papel de grande importância na interação entre os fitohormônios endógenos na reprogramação da organogênese para a embriogênese somática, através da liberação, síntese ou inibição das auxinas *in situ* juntamente com outras alterações metabólicas subcelulares, principalmente nas enzimas reguladoras e proteínas.

#### 4.5 Efeito do tempo de cultivo *in vitro* de brotações para excisão de segmentos foliares na obtenção de embriões somáticos de *Phalaenopsis*

Utilizando folhas com 20 dias, foi possível obter até 41,3% dos segmentos foliares com PLBs, enquanto que para folhas com 40 e 60 dias, obteve-se média de 8,8% e 5,4% respectivamente. Para folhas com 20 dias, obteve-se em média 5,3 PLBs/segmento foliar, enquanto que para folhas com 40 e 60 dias, obteve-se em média 2,2 e 0,8 PLBs/segmento foliar, respectivamente (Tabela 5). O sentido de corte dos segmentos não apresentou influência sobre a formação de PLBs.

**Tabela 5:** Porcentagem de segmentos foliares com PLBs (PSP) e Número de PLBs por segmento foliar (NPSF) em *Phalaenopsis* 'Ph501'.

Tratamentos		Porcent. Segmentos Com PLBs	N° PLBs Seg. Foliar
Sentido de corte	Dias de cultivo		
Longitudinal	20	41,3 a	5,3 a
Longitudinal	40	8,8 b	2,2 b
Longitudinal	60	5,4 b	0,8 b
Transversal	20	36,4 a	4,5 a
Transversal	40	4,8 b	1,4 b
Transversal	60	0,0 b	0,0 b
CV (%)		44,4	52,6
F1: Sentido de corte		2,0 ns	3,0 ns
F2: dias de cultivo		46,6 **	34,2 **
F Int. 1 x 2		0,02 ns	0,00 ns

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ).

De fato, as características do explante como o tipo e o seu estágio de desenvolvimento (NEHRA et al., 2005; CARNEROS et al., 2009), o estágio fisiológico e o grau de diferenciação dos tecidos estão entre os principais fatores capazes de influenciar a indução da embriogênese somática, sendo mais indicados o uso de tecidos meristemáticos e órgãos imaturos que possuem células indiferenciadas (ABIRI et al., 2017).

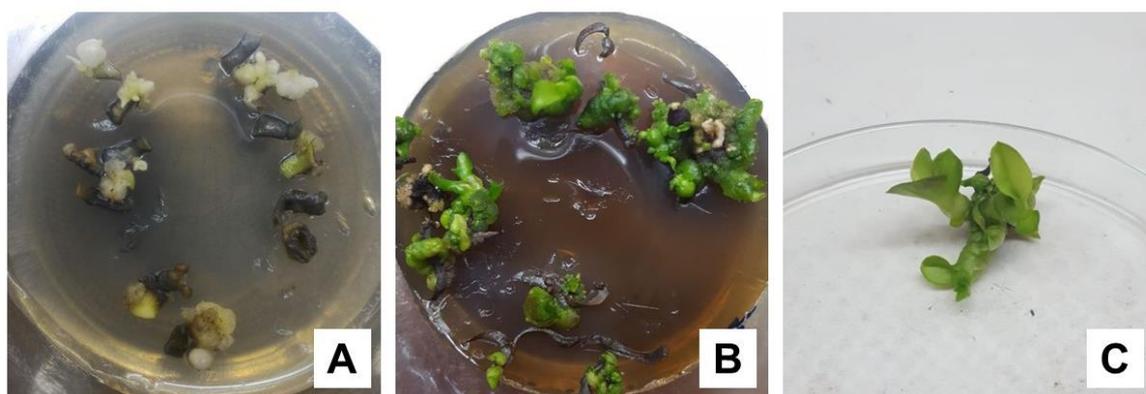
Utilizando embriões zigóticos imaturos de tritcale como explante para a embriogênese somática, Atak et al. (2008) observaram que o maior número de embriões somáticos obtidos foi conseguido utilizando explantes com 14 a 16 dias de

idade. Nesta condição foi possível obter até 9,63 embriões somáticos, já utilizando explantes com 17-19 dias o máximo de embriões somáticos obtidos foi de 3,13.

Resultado semelhante foi observado por Prakash e Gurumurthi (2010) em *Eucalyptus camaldulensis*. Utilizando explantes cotiledonares a maior porcentagem de indução de calos (66,3 ± 3,8) foi obtida em explantes com 10 dias, sendo que a cada 5 dias a redução da porcentagem de indução de calos era de em média 17,6%.

De acordo com Stasolla e Yeung (2003), tecidos diferentes de uma mesma planta, ou o mesmo tecido em estádios diferentes de desenvolvimento irão gerar respostas diferentes quando submetidos ao cultivo *in vitro*, o que é possível perceber através dos resultados obtidos neste experimento (Tabela 5). Para se obter o máximo em segmentos regenerados (41,2%) e o melhor rendimento de PLBs por segmento (5,3) em *Phalaenopsis*, o uso de folhas mais jovens é o mais indicado.

O período de 60 dias em câmara escura foi responsável por induzir os segmentos a embriogênese somática, sendo que após este período já foi possível observar os embriões em início de formação ainda em coloração branca (Figura 5A). Após 30 dias sob iluminação artificial já foi possível observar maior desenvolvimento e que os mesmos já adquiriram coloração verde (Figura 5B), e após 60 dias em regime de luz já foi possível observar a emissão de primórdios foliares (Figura 5C) onde foi feita a separação do explante e a individualização dos mesmos.



**Figura 5:** (A) Segmentos foliares após 60 dias em câmara escura com embriões em início de desenvolvimento apresentando coloração esbranquiçada; (B) Embriões em desenvolvimento após 30 dias em regime de luz, já apresentando coloração verde escura; (C) desenvolvimento de PLBs após 60 dias em iluminação artificial prontos para serem separados do segmento foliar e individualizados.

4.6 Efeito do tempo de cultivo *in vitro* de brotações para excisão de segmentos foliares e suplementação do meio de cultura com água de coco na obtenção de embriões somáticos de *Phalaenopsis*.

Conforme já observado no tópico anterior (4.5) o uso de folhas coletadas 20 dias após a repicagem dos brotos *in vitro* apresenta os melhores resultados tanto em porcentagem de segmentos com PLBs quanto no número de PLBs por segmento foliar quando comparado a folhas com 40 e 60 dias de cultivo (Tabela 6).

Já a suplementação com 10% (v:v) de água de coco não demonstrou resultados relevantes em nenhum dos parâmetros avaliados e para nenhuma das idades de coleta das folhas.

**Tabela 6:** Porcentagem de segmentos foliares com PLBs e Número de PLBs por segmento foliar em *Phalaenopsis* 'Ph501'.

Dias de cultivo	Porcent. Segmentos Com PLBs	Nº PLBs Seg. Foliar
20	29,0 a	3,6 a
40	13,3 b	1,7 b
60	5,7 b	1,2 b
<b>Água de coco</b>		
10 % (v:v)	13,8 a	2,4 a
0	18,2 a	1,9 a
CV (%)	75,61	53,59
F1: Dias de cultivo	9,61 **	11,91 **
F2: Água de coco	0,97 ns	1,03 ns
F Int. 1 x 2	1,62 ns	1,89 ns

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ).

Em *Phalaenopsis* 'Pink', similar ao relatado no presente estudo, o uso da água de coco nas concentrações de 10 e 20% em conjunto com sacarose, foi prejudicial para o crescimento e sobrevivência das plântulas, não sendo indicado na propagação deste híbrido (ZAHARA et al., 2017), o que de fato mostra que para as plantas deste gênero

a água de coco possivelmente não apresenta efeito benéfico como suplemento na micropropagação, diferente do que é visto em algumas outras espécies.

É relatado em *Dendrobium lasianthera* o efeito positivo da suplementação do meio de cultura com 15% de água de coco no aumento do número e comprimento de raízes, número de folhas e altura de plantas germinadas *in vitro* (UTAMI et al., 2017). Em *Dendrobium* 'Gradita 31', Winarto e Teixeira da Silva (2015) relatam que a suplementação com 15% de água de coco foi capaz de gerar 2,86 g de PLBs a partir de 1 g de PLBs, gerar em média 25 PLBs por subcultivo e um baixo percentual de escurecimento dos PLBs (20,7%), problema característico da espécie.

Para *Dendrobium nobile* a suplementação com 20% de água de coco foi capaz de gerar até 80% de explantes em regeneração e máximo de 10 PLBs por explante. Quando comparado ao meio sem a suplementação de água de coco foi possível obter apenas 12% de explantes em regeneração e somente 1 PLB por explante (KAUR et al., 2015). Tais resultados comprovam a eficiência da suplementação da água de coco na micropropagação de orquídeas do gênero *Dendrobium*.

Sundar e Jawahar (2010) obtiveram um protocolo eficiente para regeneração de plantas de *Datura stramonium* via embriogênese somática utilizando meio MS suplementado com os fitorreguladores 2,4-D, BA e 3% de água de coco. Resposta semelhante foi obtida na embriogênese somática em tamareiras fazendo a suplementação de água de coco em 20% (KHIERALLAH; HUSSEIN, 2013).

O uso da água de coco como suplementação para o meio de cultura tem sido relatado em diversas espécies cultivadas *in vitro*. A água de coco contém uma composição de açúcares, vitaminas, aminoácidos, fitohormônios (YONG et al., 2009), compostos orgânicos e nutrientes minerais importantes no desenvolvimento das plantas, além de apresentar efeito como tampão fisiológico e ser rica em magnésio e fosfato (VIEIRA DE SOUZA et al., 2013), e pode ser utilizada como promotor de crescimento no cultivo *in vitro*, principalmente em orquídeas (HOSSAIN et al., 2013).

De fato, conforme observado a suplementação do meio de cultura com água de coco pode apresentar efeito positivo tanto na embriogênese quanto na organogênese e no crescimento de algumas culturas micropropagadas *in vitro*. Nas condições avaliadas neste experimento a água de coco não demonstrou efeito positivo, sendo necessário avaliar concentrações diferentes a fim de avançar neste sentido.

## 5. Conclusões

1. Não foi possível obter segmentos foliares em regeneração e formação de embriões utilizando como explantes segmentos de folhas jovens coletadas de plantas cultivadas em condições de casa de vegetação.
2. O uso conjunto dos reguladores vegetais BA e TDZ na concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> cada se mostrou benéfico para a regeneração de PLBs para os dois genótipos. Já as diferentes soluções salinas (MS e NDM) utilizadas tiveram pouca influência.
3. Quando utiliza-se discos foliares o aumento no número de explantes por frasco afeta diretamente a porcentagem de segmentos foliares com embriões sendo indicado utilizar no máximo 6 segmentos por frasco.
4. Para segmentos foliares, corte tipo Thin Cell Layer é o mais indicado visando obter o máximo de indução de PLBs.
5. A cultivar 'Ph501' apresentou maior recalcitrância para a regeneração de PLBs quando comparado a 'Ph908'.
6. Folhas mais jovens resultam em maior porcentagem de segmentos foliares com PLBs e maior número de PLBs/segmento foliar, demonstrando que células mais jovens possuem maior potencial de regeneração por embriogênese somática.

## 6. Literatura citada

ABIRI, R.; MAZIAH, M.; SHAHARUDDIN, N. A.; YUSOF, Z. N. B.; ATABAKI, N.; HANAFI, M. M.; SAHEBI, M.; AZIZI, P.; KALHORI, N.; VALDIANI, A. Enhancing somatic embryogenesis of Malaysian rice cultivar MR219 using adjuvant materials in a high-efficiency protocol. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, p. 1091-1108, 2017.

AOS (American Orchid Society). **Orchids A to Z – Phalaenopsis**. 2016. Disponível em: <<http://www.aos.org/orchids/orchids-a-to-z/letter-p/phalaenopsis.aspx>>.

ALMEIDA, J. A. S.; LEAL, R. R.; CARMAZINI, V. C. B.; SALOMON, M. V.; GUERREIRO-FILHO, O. Effect of temperature and cytokinin on the capacity of direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. genotypes. **Coffee Science**, v.9, p. 394-399, 2014.

ATAK, M.; KAYA, M.; KHAWAR, K. M.; SAGLAM, S.; ÖZCAN, S.; CIFTCI, C. Y. Effect of age on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of 5 Turkish triticales genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1765-1768, 2008.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JUNIOR, W. **AgroEstat- Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**, Jaboticabal: FCAV/UNESP, 2011.

BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. Ed. Brasília: Embrapa, 2014. 325 p.

BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 87-90, 2004.

BECK, S.; DUNLOP, R.; VAN STADEN, J. Rejuvenation and micropropagation of adult *Acacia mearnsii* using coppice material. **Plant Growth Regulator**, v. 26, p. 149-153, 1998.

CARDOSO, J. C.; HABERMANN, G. Adventitious shoot induction from leaf segments in *Anthurium andreanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 55, p. 56-62, 2014.

CARDOSO, J. C. Melhoria de espécies ornamentais como estratégia para o desenvolvimento e autossuficiência do setor. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n.1, p. 171, 2013.

CARNEROS, E.; CELESTINO, C.; KLIMASZEWSKA, K.; PARK, Y. S.; TORIBIO, M.; BONGA, J. M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, p. 167-178, 2009.

CERVERA, M. A.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. **Tree Physiology**, v. 28, p. 55-66, 2008.

CHAUVIN, J. E.; SALESSES, G. Advances in chestnut micropropagation (*Castanea* sp.). **Acta Horticulturae**, v. 227, p. 340-345, 1988.

CHIEN, K. W.; AGRAWAL, D. C.; TSAY, H. S.; CHANG, C. A. Elimination of mixed 'Odontoglossum ringspot' and 'Cymbidium mosaic' viruses from *Phalaenopsis* hybrid 'V3' through shoot-tip culture and protocorm-like body selection. **Crop Protection**, v. 67, p. 1-6, 2015.

CHEN, C. Cost analysis of plant micropropagation of *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126, p. 167-175, 2016.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 2, p. 169-173, 2006.

CHUANJUN, X.; ZHIWEI, R.; LING, L.; BIYU, Z.; JUNMEI, H.; WEN, H.; OU, H. The effects of polyphenol oxidase and cycloheximide on the early stage of Browning in *Phalaenopsis* explants. **Horticultural Plant Journal**, v. 1, n. 3, p. 172-180, 2015.

COSTA, M. A. P. C.; BASTOS, M. J. S. M.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídeas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 407 p.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, v. 50, n. 292, p. 719-726, 2003.

GAMBINO, G.; DI MATTEO, D.; GRIBAUDO, I. Elimination of *Grapevine fanleaf virus* from three *Vitis vinifera* cultivars by somatic embryogenesis. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, p. 57-60, 2009.

GILL, R.; GERRATH, J.; SAXENA, P. K. High-frequency direct embryogenesis in thin cell layer cultures of hybrid seed geranium (*Pelargonium*). **Canadian Journal of Botany**, v. 71, p. 408-413, 1992.

GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, C. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum**, v. 37, p. 143-149, 2015.

GOUSSARD, P. G.; WIID, J.; KASDOR, G. G. F. The effectiveness of *in vitro* somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines. **South African Journal of Enology & Viticulture**, v. 12, p. 77-81, 1991.

GOW, W., CHEN, J.; CHANG, W. Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 621-627, 2010.

GOW, W.; CHEN, J.; CHANG, W. Effects of genotype, light regime, explant position, and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchid. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 363-369, 2009.

GOW, W.; CHEN, J.; CHANG, W. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchid. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 507-512, 2008.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 2, p. 533-568, 1999.

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

JING, G. F.; NUR, W.; RAZAK, A. W. A. B; RAHMAN, Z. A.; SUBRAMANIAM, S. The effect of thin cell layer system in *Vanilla planifolia* *in vitro* culture. **Current Botany**, v. 15, p. 22-25, 2014.

KAUR, S.; BHANDARI, P.; BHUTANI, K. K. Characterization of bioactive compounds at seedling stage and optimization of seed germination, culture multiplication of *Dendrobium nobile* Lindl. – A study *in vitro*. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, p. 1041-1052, 2015.

KHIERALLAH, H. S. M.; HUSSEIN, N. H. The role of coconut water and casein hydrolysate in somatic embryogenesis of date palm and genetic stability detection using RAPD markers. **Research in Biotechnology**, v. 4, p. 20-28, 2013.

KHODDAMZADEH, A. A.; SINNIHAH, U. R.; KADIR, M. A.; KADZIMIN, S. B.; MAHMOOD, M.; SREEERAMANAN, S. In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. **Plant Growth Regulation**, v. 65, p. 381-387, 2011.

MARTIN, K. P. Benzyladenine induced somatic embryogenesis and plant regeneration of *Leptadenia reticulata*. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 285-288, 2004.

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

MOLINA, D. M.; APONTE, M. E.; CORTINA, H.; MORENO, G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 117-123, 2002.

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

NARANJO, E. J.; FERNANDEZ BETIN, O.; URREA TRUJILLO, A. I.; CALLEJAS POSADA, R.; ATEHORTÚA GARCÉS, L. Effect of genotype on the *in vitro*

regeneration of *Stevia rebaudiana* via somatic embryogenesis. **Acta Biologica Colombiana**, v.21, p. 87-98, 2016.

NEHRA, N. S.; BECWAR, M. R.; ROTTMANN, W. H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, D.; KODRZYCKI, R. J.; ZHANG, C.; GAUSE, K. C.; PARKS, D. W.; HINCHEE, M. A. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 41, p. 701-717, 2005.

NHUT, D. T.; NGUYEN, H.; HUYEN, P. X.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Thidiazuron induces high frequency shoot bud formation from Begonia petiole transverse thin cell layer culture. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, p. 149-155, 2005.

NKAA, F. A.; ENE-OBONG, E. E.; TAYLOR, N.; FAUQUET, C.; MBANASO, E. N. A. Elimination of African Cassava Mosaic Virus (ACMV) and East African Cassava Mosaic Virus (EACMV) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cv. 'Nwugo' via somatic embryogenesis. **American Journal of Biotechnology and Molecular Sciences**, v. 3, p. 33-40, 2013.

PARK, S. Y.; KLIMASZEWSKA, K.; PARK, J. Y.; MANSFIELD, S. D. Lodgepole pine: The first evidence of seed-based somatic embryogenesis and the expression of embryogenesis marker genes in shoot bud culture of adult trees. **Tree Physiology**, v. 30, p. 1469-1478, 2010.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and médium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 13-20, 2010.

QUAINOO, A. K.; WETTEN, A. C.; ALLAINGUILLAUME, J. The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cocoa swollen shoot virus from infected cocoa trees. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 91-96, 2008.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; DIATTA, L. I. D.; GUÈYE, B.; DAHER, A.; SAGNA, M.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian cultivars. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 205-237, 2000.

SAVITA, SINGH, B.; VIRK, G. S.; NAGPAL, A. K. An efficient protocol from callus cultures of *Citrus jambhiri* Lush. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p. 161-169, 2011.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. A NEW VERSION OF THE ASSISTAT- STATISTICAL ASSISTANCE SOFTWARE. In: World congress on computers in agricultura, 4., 2006, Orlando. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

SLESÁK, H.; GÓRALSKI, G.; PAWLOWSKA, H.; SKUCINSKA, B.; POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; JOACHIMIÁK, A. J. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects. **Central European Journal of Biology**, v. 8, p. 30-37, 2013.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 15-35, 2003.

SUNANDAR, A.; DORLY.; SUPENA, E. D. J. Induction of somatic embryogenesis in Sengon (*Falcataria moluccana*) with thidiazuron and light treatments. **Hayati Journal of Biosciences**, v. 24, p. 105-108, 2017.

SUNDAR, A. N.; JAWAHAR, M. Efficient regeneration via somatic embryogenesis from anthers of *Datura stramonium* L. **Journal of Agricultural Technology**, v. 6, p. 741-745, 2010.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; WINARTO, B. Somatic embryogenesis in two orchid genera (*Cymbidium*, *Dendrobium*). **Methods in Molecular Biology**, v. 1359, p. 371-386, 2016.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J. Planth thin cell layers: update and perspectives. **Folia Horticulturae**, v. 27, p. 183-190, 2015.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 113, p. 149-161, 2013.

TOKUHARA, K.; MII, M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 1, p. 7-11, 1993.

TRAN THAN VAN, M. *In vitro* control of *de novo* flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues. **Nature**, v. 246, p. 44-45, 1973.

TRAN THAN VAN, M. Thin Cell Layer concept. In: **Thin Cell Layer culture system: regeneration and transformation applications**. NHUT, D. T. VAN LE, B.; TRAN THAN VAN, K.; THORPE, T. (eds) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands; 517 p. 2003.

ULISSES, C.; PEREIRA, J. A. F.; SILVA, S. S.; ARRUDA, E.; MORAIS, M. Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink (Orchidaceae). **Acta Biologica Colombiana**, v.21, n. 3, p. 571-580. 2016.

UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S.; MANUHARA, Y. S. W. *In vitro* propagation of the endangered medicina orchid, *Dendrobium lasianthera* J. J. Sm through mature seed culture. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, p. 406-410, 2017.

VIEIRA DE SOUZA, R. A.; BRAGA, F. T.; SETOTAW, T. A.; NETO, J. V.; AZEVEDO, P. H.; AZEVEDO, V. H.; CANÇADO, G. M. A. Effect off coconut water on growth of olive embryos cultured *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 43, p. 290-296, 2013.

WINARTO, B.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Use of coconut water and fertilizer for *in vitro* proliferation and plantlet production of *Dendrobium* 'Gradita 31', **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 51, 2015.

YALCIN-MENDI, N. Y. Effect of cotyledon age and explant location on regeneration of *Cucumis sativus*. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 17, p. 38-43, 2014.

YONG, J. W. H.; GE, L.; NQ, Y. F.; TAN, S. N. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Molecules**, v. 14, p. 5144-5164, 2009.

YOUNG, P. S.; MURTHY, H. N.; YOEU, P. K. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 67-72, 2000.

ZAHARA, M.; DATTA, A.; BOONKORKEAW, P.; MISHRA, A. The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* Hybrid 'Pink'. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, e160149, 2017.

ZHANG, C.; CHEN, D.; ELLIOT, M. C.; SLATER, A. Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, p. 305-310, 2001.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que os dois métodos de propagação *in vitro* avaliados, o primeiro através da indução de brotações em segmentos de inflorescência e o outro pela indução e regeneração de PLBs em segmentos foliares, apresentaram resultados satisfatórios.

Considerando a propagação via segmentos de inflorescência, são necessários outros estudos com foco principal na desinfestação e assepsia dos segmentos coletados das plantas em condição de casa de vegetação, a fim de reduzir as perdas por contaminação e, conseqüentemente, melhorar o rendimento da técnica. Apesar disso, a técnica se mostrou eficiente gerando até 2,12 brotações/segmento inoculado durante o estabelecimento *in vitro* e, em média 1,7 brotações/segmento inoculado a cada repicagem (60 dias).

Levando em conta esta taxa de multiplicação e considerando 3 repicagens mais o estabelecimento, partindo de um segmento de inflorescência é possível obter aproximadamente 17,7 plântulas após 240 dias (8 meses), aptas para serem transferidas para o enraizamento e posterior aclimatização. Além disso, através desta técnica de propagação é possível realizar a manutenção das cultivares na condição *in vitro*, necessário para a coleta de segmentos foliares para a propagação via embriogênese somática.

Considerando a propagação via embriogênese somática por segmentos de foliares, o uso de folhas mais jovens (coletadas após 20 dias de subcultivo) segmentadas através da técnica de 'Thin Cell Layer' foi capaz de aumentar a porcentagem de segmentos em regeneração e o número de PLBs por segmentos. O

uso conjunto de BA e TDZ ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), ainda não relatado na literatura, também apresentou resultados promissores. Para as cultivares avaliadas neste trabalho, os melhores resultados obtidos foram cerca de 41 % de segmentos foliares em regeneração e até 5,3 PLBs/ segmento foliar.

Utilizando esta técnica, foi possível regenerar até 5,3 plântulas por segmento foliar após 150 dias, aptas para serem transferidas ao meio de enraizamento por mais 60 dias, sendo submetidas ao processo de aclimatização em casa de vegetação após um total de 210 dias.

Para os dois métodos de propagação avaliados foi possível observar a influência que o genótipo exerce. Para a propagação por segmentos de inflorescência a cv. 'Ph501' obteve maior taxa de multiplicação na primeira repicagem após a introdução dos segmentos no cultivo *in vitro*. Porém, para a propagação via embriogênese somática a mesma cultivar apresentou maior recalcitrância e menor rendimento de PLBs quando comparado a 'Ph908'.