
Yohan Fritsche

**REGENERAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A
PROTOCORMOS E CITOMETRIA DE FLUXO APLICADAS AO
MELHORAMENTO GENÉTICO E AO ESTUDO DO GENOMA
NUCLEAR DE ORQUÍDEAS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais da
Universidade Federal de Santa
Catarina como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título
de Mestre em Ciências, área de
concentração em Recursos Genéticos
Vegetais.

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fritsche, Yohan

Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas [dissertação] / Yohan Fritsche ; orientador, Miguel Pedro Guerra - Florianópolis, SC, 2012.

138 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Orquídeas. 3. Micropropagação. 4. Estruturas semelhantes a protocormos. 5. Citometria de fluxo. I. Guerra, Miguel Pedro. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Yohan Fritsche

**REGENERAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A
PROTOCORMOS E CITOMETRIA DE FLUXO APLICADAS AO
MELHORAMENTO GENÉTICO E AO ESTUDO DO GENOMA
NUCLEAR DE ORQUÍDEAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 14 de setembro de 2012.

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
Coordenador do Curso

Banca examinadora:

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Rosete Pescador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Gilberto Roberto Zaffari
Universidade do Vale do Itajaí/EPAGRI-SC



**À
JANE,
STEFAN,
OLRICH,
ALICE E
HELOISA.
Dedico**



AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade que me foi dada em cursar o mestrado e desenvolver o presente trabalho;

Ao meu orientador, Miguel Pedro Guerra, pela confiança e pelos inúmeros ensinamentos;

A todos os professores do RGV pela bagagem intelectual e conhecimento que tive a oportunidade de adquirir ao cursar disciplinas, conversar e conviver durante este tempo;

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) pelo convívio amistoso, pelos momentos de descontração, pela ajuda e pelo conhecimento que adquiri ao conviver com pessoas tão competentes e inteligentes;

Aos alunos da disciplina Práticas de Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais que convivi nos três semestres em que fui tutor, pela oportunidade de poder ensinar aprendendo. Um agradecimento especial ao Fábio e a Valéria, por terem desenvolvido seus projetos integrando parte deste trabalho;

Aos amigos Dorival Almeida e Fabiano Deola pelas noites em claro ajudando na implantação e avaliação de experimentos;

Ao Deola, mais uma vez, pela enorme ajuda em todas as avaliações de citometria de fluxo e pela grande quantidade de horas que passamos ao telefone estabelecendo o protocolo. Sem a sua ajuda boa parte deste trabalho não seria possível;

Ao apoio incondicional de toda minha família que sempre esteve presente em todos os momentos em que precisei;

A minha namorada Heloisa pelo incentivo, por confiar na minha capacidade mais do que qualquer um e pelo amor incondicional. Te amo cheirosa;

A Bernardete por todo o apoio ao bom funcionamento do programa, sempre muito prestativa e com bom humor;

Agradeço também aos membros da banca por aceitarem o convite e pela contribuição com o trabalho e com minha formação;

A Universidade Federal de Santa Catarina, por disponibilizar um espaço tão importante para o enriquecimento da sociedade;

Ao CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro.



**“Não é sinal de saúde ser bem ajustado a
uma sociedade profundamente doente”**

Jiddu Krishnamurti

RESUMO

Além de grande importância ecológica, muitas espécies da família Orchidaceae, a mais numerosa entre as angiospermas, constituem-se em importantes recursos genéticos devido ao seu valor horticultural e apelo ornamental. O desenvolvimento de protocolos de micropropagação para estas espécies é importante, pois uma maneira eficaz de conservar determinado recurso genético se dá pela sua utilização. No entanto, estes protocolos são altamente específicos e muito escassos atualmente. Estudos visando o melhoramento genético de espécies através da fixação de ganho genético bem como estudos de ordem molecular são também altamente desejáveis. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo regenerativo baseado em estruturas semelhantes a protocormos (ESP) e emprego de biorreatores de imersão temporária (BIT) para *Cattleya tigrina*, espécie nativa com grande potencial ornamental e atualmente pouco encontrada *in situ*. Também objetivou-se a realização de estudos do genoma nuclear desta e de outras espécies nativas, com o emprego da citometria de fluxo, visando relacionar aspectos citogenéticos com sua implicação na cultura de tecidos destas espécies. A técnica da camada fina de células (TCL) e o uso de explantes foliares e radiculares cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de fitorreguladores foram avaliados na indução de ESP em *C. tigrina*. Diferentes concentrações de GA₃ e sacarose, além de variações físicas e de técnicas de cultivo, foram avaliadas na multiplicação e regeneração de ESP de *C. tigrina*. Também foi empregada a técnica da citometria de fluxo para a análise da estabilidade citogenética dos regenerantes de *C. tigrina* obtidos com o protocolo proposto, bem como na quantificação do conteúdo de DNA nuclear (valor C) de outras cinco espécies nativas. A indução de ESP foi nula em explantes radiculares de *C. tigrina*. Não houve diferença na taxa de indução entre explantes foliares íntegros ou seccionados em TCL. A indução de ESP foi superior nos meios com maiores concentrações de TDZ, apesar desta ter ocorrido mesmo na ausência completa de fitorreguladores. A desidratação das ESP previamente a inoculação resultou em maior taxa de multiplicação, sendo essa até duas vezes maior quando da utilização de BIT. A presença de GA₃ no meio de cultura favoreceu o aumento do número e tamanho de brotos obtidos a partir das ESP. As concentrações de sacarose testadas se comportaram de maneira diretamente proporcional ao incremento de massa fresca, não

estando esta relacionada com o número, tamanho ou diferenciação de brotos. As análises de núcleos celulares de *C. tigrina* e de outras 5 espécies de orquídeas permitiu a quantificação do valor C de DNA com boa precisão, além da observação de que o tecido foliar de todas as espécies avaliadas, com exceção de *C. purpurata*, é polissomático, existindo grupos de células com diferentes níveis de ploidia no mesmo tecido ou órgão. A análise comparativa em citometria de fluxo dos explantes utilizados na indução de ESP e dos regenerantes obtidos com o protocolo proposto mostrou que 100% dos regenerantes avaliados possuíam o dobro da ploidia do tecido dos explantes, podendo este fato estar ligado a natureza polissomática do tecido de *C. tigrina*, conforme é discutido.

Palavras-chave: Estruturas semelhantes a protocormos, orquídeas, citometria de fluxo, polissomatismo, valor C de DNA.

ABSTRACT

Besides the important ecological importance, many species of the Orchidaceae family, the biggest within the Angiosperm, are also important genetic resources due to its horticultural and ornamental value. The development of micropropagation protocols for these species is important, because one efficient way to conserve a genetic resource is by its utilization. However the protocols for micropropagation of species are highly specific and still scarce. Studies focusing the genetic improvement of species through genetic gain fixation as well as molecular studies are also highly demanded. The objective of this study was to develop a regenerative protocol based on protocorm-like bodies (PLB) and the use of temporary immersion bioreactors (TIB) to *Cattleya tigrina*, which is an endemic species with a high ornamental value, and currently rarely found *in situ*. Studies of the nuclear genome of *C. tigrina* as well as five other native orchids were also done to relate cytogenetic aspects with their implication on tissue culture. The thin cell layer technique (TCL) and the use of different hormone concentration media were evaluated on the induction of PLB from *C. tigrina* leaf and root explants. Different GA₃ and sucrose concentrations, as well as physical variations and different cultivation techniques, were evaluated in the multiplication and regeneration of PLB of *C. tigrina*. Flow cytometry was used to analyze the genetic stability of *C. tigrina* regenerates obtained through the proposed protocol, as well as in the quantification of the DNA C-value of other five native species. There was no PLB induction on root explants of *C. tigrina*. No statistical difference on the PLB induction rate between entire and TCL explants was detected. PLB induction was higher on media containing higher TDZ concentrations, although even on fitoregulator-free medium, PLB induction was observed. The previous dehydration of PLBs resulted in higher multiplication rates, and when TIB were used the multiplication rate increased 2-fold. The presence of GA₃ in the culture media favored the increase on the size and number of shoots obtained from PLBs. The sucrose concentrations tested were directly related with the fresh weight increment, but not with the shoot number or size. Through flow cytometry nuclei analysis of *C. tigrina* and other five orchid species, it was possible to estimate the DNA C-value with high precision, and it was also possible to observe polysomaty on the leaf tissue of all

analyzed species, except on *C. purpurata*. The flow cytometry analysis of tissue from the explants used on PLB induction and the regenerants obtained through the proposed protocol, showed that 100% of the analyzed regenerants doubled their ploidy levels in relation with the explants, been this fact possibly linked with the polysomaty observed on *C. tigrina* leaf tissue, as discussed.

Key-words: Protocorm-like bodies (PLB), Orchids, Flow cytometry, polysomaty, DNA C-value.

LISTA FIGURAS

- Figura 1:** Representação da distribuição da família Orchidaceae. A linha contínua representa os limites de distribuição de espécies terrestres e a linha pontilhada as espécies epífitas. Adaptado de Dressler (1990).30
- Figura 2:** A) Detalhes do funcionamento de um citômetro de fluxo. Adaptado e modificado de Ochatt (2006); B) Representação esquemática de um histograma sem dispersão. G0/G1, S e G2 representam núcleos nas respectivas fases do ciclo celular. Adaptado e modificado de Watson (1992). 41
- Figura 3:** Esquema representativo do preparo dos explantes para a indução de estruturas semelhantes à protocormos..... 66
- Figura 4:** Indução de ESP a partir de explantes foliares de *C. tigrina* oito semanas após a inoculação. A) Folha seccionada em *TCL*, com ESP induzidos em três camadas finas, duas da região basal e uma da mediana; B) Detalhe de ESP induzidas em *TCL* da região basal de explante foliar. Notar a origem direta dos ESP a partir da epiderme do explante; C e D) ESP induzidas na base de explantes foliares íntegros. Notar a indução mais acentuada na região basal em comparação com outras partes da folha em D; E e F) Detalhe da formação direta de brotos e raízes na base dos explantes foliares pela via organogênica..... 72
- Figura 5:** A) Explante radicular de *C. tigrina*, consistindo de segmento de 1 cm da porção distal da raiz, não apresentando qualquer resposta de crescimento ou indução; B) Detalhe de *TCL* da região apical (coifa) mostrando leve crescimento (seta); C-D) Detalhe da única *TCL* em que houve a formação de estrutura globular (setas) a partir de tecido interno, exposto devido ao seccionamento da raiz; 73
- Figura 6:** Sintomas de toxidez em ESP de *C. tigrina* cultivados em meio MS suplementados com sacarose ($10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e diferentes concentrações de GA_3 : A) $15\mu\text{M}$; B) $10\mu\text{M}$; C) $5\mu\text{M}$ e D) $0\mu\text{M}$. Fotos realizadas cerca de seis semanas após a inoculação. 75
- Figura 7:** Efeitos de diferentes concentrações de GA_3 no incremento de massa fresca (IMF = massa fresca final – massa fresca inicial) de ESP (150mg) de *C. tigrina*, 20 semanas após a inoculação. Dados de IMF em gramas (g)..... 76
- Figura 8:** Influência de diferentes concentrações de sacarose no IMF (g) de ESP (150mg) de *C. tigrina*, 20 semanas após a inoculação..... 76
- Figura 9:** Início da formação dos brotos de *C. tigrina* a partir de ESP em meios de cultura com diferentes concentrações de GA_3 e sacarose.

A-B) ESP cultivadas em meio isento de GA₃ e com 20 e 5g.L⁻¹ de sacarose, respectivamente; C-D) Alongamento e formação inicial de brotos na presença do GA₃ no meio de cultura; E-F) Brotos formados na presença de GA₃. Notar a necrose da maior parte do inoculo inicial (setas) e a origem dos brotos a partir de pequenas porções de ESP não afetadas pela toxidez.....77

Figura 10: Brotos *C. tigrina* obtidos a partir de ESP após 20 semanas de cultivo em meio MSB com diferentes concentrações de GA₃ e sacarose. A-B) Brotos bem formados, com presença de folhas e raízes, observados apenas na menor concentração de sacarose testada (5g.L⁻¹) e na presença de GA₃;C) Agregado de brotos formados em meio com sacarose (20g.L⁻¹) e GA₃ (15 µM). Notar que todos ramificam de único local (seta); D-E) Brotos e estruturas má formadas, as quais não foram contabilizadas; F) Exemplo geral dos brotos obtidos em meio suplementado com GA₃. ...78

Figura 11: Número médio de brotos de *C. tigrina* regenerados a partir de 150mg de ESP após 20 semanas de cultivo em diferentes concentrações de GA₃ e sacarose.....79

Figura 12: Comportamento das variáveis incremento de massa fresca (IMF) (A-B) e número de brotos (NB) (C-D) em relação a diferentes concentrações de GA₃ e sacarose avaliadas na regeneração de ESP de *C. tigrina*.....81

Figura 13: Porcentagem de sobrevivência de ESP em relação ao tempo de desidratação em sílica gel realizado antes da inoculação. Letras distintas na extremidade superior das colunas indicam diferenças significativas entre elas de acordo com comparações em tabelas de contingência e testes de χ^2 ($p \leq 0,05$). Dados coletados 20 semanas após a inoculação.82

Figura 14: Redução da massa fresca inicial das ESP de *C. tigrina* em função do período de exposição à sílica gel.....83

Figura 15: Incremento de massa fresca de ESP de *C. tigrina* submetidas a diferentes períodos de desidratação em sílica gel antes da inoculação. Dados coletados após 20 semanas de cultivo.....84

Figura 16: Incremento de massa fresca de brotos de *C. tigrina* subcultivados em sistema de imersão contínua e temporária. As letras distintas na extremidade superior das colunas indicam a existência de diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o F teste ($p=0,05$).....85

Figura 17: Subcultivo de brotos de *C. tigrina* em sistema de imersão contínua e temporária. A) Frascos de imersão contínua; B) Resultado

obtido após 24 semanas de subcultivo em BIT tipo RITA[®]; C) Visão geral da quantidade de propágulos obtidos. Notar que apenas o material presente no interior dos BIT apresentava certo grau de diferenciação, sendo selecionado para novo subcultivo e posterior avaliação da estabilidade de ploidia dos regenerantes obtidos..... 86

Figura 18: Fluxograma do protocolo regenerativo de *Cattleya tigrina* baseado na indução e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (ESP), indicando os índices obtidos, estimativas de tempo e os principais entraves ainda existentes. A) Exemplo de planta matriz portadora de valor ornamental (*C. tigrina* var. *coerulea*). Planta e cultivo de Carlos Gomes. Foto do autor; B) Broto obtido pelo cultivo de gema da planta matriz; C) Folha com indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESP); D) Frascos com ESP em multiplicação; E) Brotos regenerados a partir de ESP; F) Plantas prontas para aclimatização; G) Plantas aclimatizadas em vasos coletivos com substrato de Sphagnum.87

Figura 19: Análises preliminares em microscopia óptica das suspensões de núcleos. Núcleos corados com carmin acético (A) ou azul de toluidina (B-D). A) núcleos rompidos devido ao atrito com cristais de oxalato de cálcio (barra= 50 µm); B) suspensão com grande quantidade de oxalato de cálcio (formato de agulha) e núcleos agregados (barra= 100 µm); C) Núcleos de diferentes tamanhos (setas) (barra= 20 µm); D) Detalhe de núcleo isolado (barra= 20 µm). 111

Figura 20: Histogramas de intensidade de fluorescência de *C. purpurata*, utilizando plantas *in vitro*. A-B) *C. purpurata* e *P. sativum* com padronização interna. A) CV=4,39 para o pico G1, não permitindo a distinção entre os picos da amostra e do padrão de referência; B) CV=2,88, permitindo uma leve distinção entre as duas espécies (setas); C) histogramas de *C. purpurata* (vermelho) e *P. sativum* (azul) analisados separadamente e avaliados em sobrecamadas com o software WinMDI evidenciando a sobreposição parcial dos picos de ambos.... 113

Figura 21: Histogramas de intensidade de fluorescência de *B. tuberculata*. A) Plântula *in vitro*; B) Planta adulta; C) Sobreposição de histogramas de plântula *in vitro* (vermelho) e planta adulta (azul), analisadas juntamente com *P. sativum*. 1, 2 e 5 referem-se respectivamente aos picos 2C, 4C e 8C de *B. tuberculata* e 3 e 4 são de *P. sativum*. 4 e 7 referem-se aos picos 2C e 4C de *B. tuberculata* e *P. sativum* sobrepostos, sem possibilidade de distinção entre eles. O pico 6 refere-se a ruídos de leitura identificados como um eventos pelo software de análise. 114

Figura 22: Histogramas de intensidade de fluorescência relativa (A e C) e citogramas de dispersão lateral em escala logarítmica (SS log) pela intensidade de fluorescência (B e D) obtidos a partir de análise em citometria de fluxo de núcleos de *C. forbesii* e *P. sativum* corados com iodeto de propídio. (A-B) *C. forbesii in vitro* e *P. sativum*; (C-D) *C. forbesii* adulta e *P. sativum*. Notar a existência de 3 picos referentes a *C. forbesii* (I,II, e III) referentes a células 2C, 4C e 8C, respectivamente e outros 2 picos pertencentes às células GO/G1 e G2 do padrão de referência (P e PII, respectivamente). Notar o mesmo padrão de fluorescência em plantas *in vitro* e adultas.115

Figura 23: Histogramas de intensidade de fluorescência relativa (A, C e E) e citogramas de dispersão lateral em escala logarítmica (SS log) pela intensidade de fluorescência (B, D e F) obtidos a partir de análise em citometria de fluxo de núcleos de *C. intermedia* e *P. sativum* corados com iodeto de propídio. (A-B) *P. sativum*; (C-D) *C. intermedia in vitro* e *P. sativum*; (E-F) *C. intermedia* adulta e *P. sativum*. (I, II, e III) correspondem aos picos referentes aos núcleos com conteúdo 2C, 4C e 8C de DNA respectivamente. P e PII correspondem aos picos de *P. sativum*. Notar o mesmo padrão de fluorescência em plantas *in vitro* e adultas, porém com menor rendimento de núcleos e maior quantidade de ruído nas plantas adultas.116

Figura 24: Histogramas de intensidade de fluorescência relativa (A, C e E) e citogramas de dispersão lateral em escala logarítmica (SS log) pela intensidade de fluorescência (B, D e F) obtidos a partir de análise em citometria de fluxo de núcleos de *E. fulgens* e *P. sativum* corados com iodeto de propídio. (A-B) *E. fulgens*; (C-D) *E. fulgens in vitro* e *P. sativum*; (E-F) *E. fulgens* adulta e *P. sativum*. (I, II, III e IV) correspondem aos picos referentes aos núcleos de *E. fulgens* com conteúdo 2C, 4C, 8C e 16C de DNA, respectivamente. P e PII correspondem aos picos de *P. sativum*. Notar o mesmo padrão de fluorescência em plantas *in vitro* e adultas, porém com menor rendimento de núcleos e maior quantidade de ruído nas plantas adultas.118

Figura 25: Sobreposição de histogramas de fluorescência relativa de núcleos de *C. intermedia* (azul) e *C. forbesii* (vermelho) e *P. sativum* como padrão interno de referência. Notar a sobreposição quase total dos picos de fluorescência.119

Figura 26: Porcentagem média de núcleos com diferentes quantidades (C) de DNA em plantas adultas e *in vitro* de *C. intermedia*, *C. forbesii* e *E. fulgens*..... 120

Figura 27: Histogramas de intensidade de fluorescência relativa de regenerantes de *C. tigrina* obtidos por meio da indução e regeneração de ESP. A) *P. sativum* (padrão interno de referência); B) Tecido das plantas mãe de *C. tigrina* utilizadas na indução dos ESP; C) Tecido dos regenerantes de *C. tigrina*. Notar em C a ausência do pico 2Cx presente em B e a presença do pico 16Cx. O símbolo Cx foi utilizado como referência a ploidia relativa de *C. tigrina*. P1 e P2 representam os núcleos de *P. sativum* nos estágios G0/G1 e G2 do ciclo celular, respectivamente..... 123

LISTA TABELAS

Tabela 1: Combinações de meios de cultura e tipo de explante utilizados no experimento de indução de ESP de <i>Cattleya tigrina</i> e respectivos tamanhos amostrais.	67
Tabela 2: Porcentagem de indução de ESP de <i>C. tigrina</i> em relação à região do explante foliar e a suplementação do meio de cultura com fitoreguladores.	74
Tabela 3: Número médio de brotos e incremento de massa fresca (IMF) de ESP (150mg) de <i>C. tigrina</i> 20 semanas após a inoculação em meios de cultura com diferentes combinações de GA ₃ e sacarose.	80
Tabela 4: Número médio de brotos formados e incremento de massa fresca de ESP de <i>C. tigrina</i> após 20 semanas de cultivo em meio líquido suplementado com diferentes concentrações de GA ₃ e sacarose.	80
Tabela 5: Incremento de massa fresca (IMF) e número médio de brotos (NB) de diferentes tamanhos formados 20 semanas após a inoculação de ESP de <i>C. tigrina</i> submetidas, previamente a inoculação, a diferentes períodos de desidratação em sílica gel.	83
Tabela 6: Estimativa do valor C de DNA obtido por meio da citometria de fluxo. Núcleos corados com iodeto de propídio e extraídos de tecido foliar de plantas <i>in vitro</i> das espécies alvo do estudo, com <i>Pisum sativum</i> cv. Ctirad como padrão interno de referência.	121

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
2,4 D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
ANOVA	Análise de variâncias
C.	<i>Cattleya</i>
ca.	Cerca de
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CFL	Câmara de fluxo laminar
CV	Coefficiente de variação
CV(%)	Coefficiente de variação experimental
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
ESP	Estruturas semelhantes a protocormos
GA ₃	Ácido giberélico A ₃ - C ₁₉ H ₂₂ O ₆
GAs	Giberelinas
IMF	Incremento de massa fresca
IP	Iodeto de propídio
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LFDGV	Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
LMM	Laboratório de Moluscos Marinhos
log	logaritmo
MSB	Meio de cultura basal
NB	Número de brotos
p	Significância
pH	Potencial de hidrogênio
PVC	Policloreto de vinila
sac.	Sacarose
SNK	Teste de separação de médias Student-Newman-Keuls
TCL	Camada fina; técnica da camada fina de células
TDZ	Thidiazuron
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
χ^2	Teste de qui-quadrado

LISTA UNIDADES E SÍMBOLOS

Unidade / Símbolo	Significado
±	mais ou menos; em média
≤	menor ou igual a
®	marca registrada comercial
°C	Graus Celsius
°GL	Graus Gay Lussac (% V)
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar
µm	micrômetro
µmol	micromol
bp	pares de base ($0,978 \times 10^6$ pg)
cm	centímetro
g	grama
h	horas
L	litro
m	metro
Mbp	mega pares de base (10^6 bp)
mg	miligrama
min.	Minutos
ml	mililitros
N	Normalidade
pg	picogramas (10^{-12} g)
s	segundos



SUMÁRIO

Objetivo Geral.....	19
Objetivos Específicos.....	19

CAPÍTULO 1 – Estado da Arte e Situação do Problema21

1. A Família Orchidacea	30
1.1. Estado de Conservação	31
2. Histórico do cultivo de orquídeas <i>in vitro</i>	34
3. Clonagem de Orquídeas <i>in vitro</i> - Rotas morfogênicas e protocolos regenerativos	35
4. Biotecnologia e Melhoramento Genético	40
5. Citometria de fluxo como ferramenta auxiliar no melhoramento genético e estudo do genoma nuclear vegetal	41
5.1. Preparo das amostras para análise.....	42
5.2. Aplicações práticas	43
5.2.1. Análises de ploidia.....	44
5.2.2. Estimativas do conteúdo de DNA nuclear	44
6. Referências Bibliográficas	47

CAPÍTULO 2 – Indução e Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos em *Cattleya tigrina*58

Resumo.....	59
Abstract.....	61
1. Introdução	62
2. Material e Métodos	64
2.1. Obtenção de material de mesma origem genética.....	64
2.2. Indução de ESP em <i>Cattleya tigrina</i>	65
2.2.1. Explantes.....	65
2.2.2. Meios de cultura.....	66
2.2.3. Delineamento experimental	67
2.3. Efeitos das condições de cultivo na eficiência de regeneração de ESP de <i>cattleya tigrina</i>	68
2.3.1. Efeitos das concentrações de GA ₃ e sacarose	68
2.3.2. Efeitos da desidratação das ESP	69

2.3.3.	Efeitos do sistema de imersão no subcultivo de microbrotos	69
3.	Resultados	71
3.1.	Indução de ESP em <i>Cattleya tigrina</i>	71
3.2.	Efeitos das condições de cultivo na eficiência de regeneração de ESP de <i>Cattleya tigrina</i> A. RICH.....	74
3.2.1.	Efeitos do GA ₃ e sacarose	74
3.2.2.	Efeitos da desidratação das ESP na regeneração de brotos	82
3.2.3.	Efeitos do sistema de imersão no subcultivo de microbrotos	84
4.	Discussão	88
4.1.	Indução de ESP de <i>Cattleya tigrina</i>	88
4.2.	Regeneração de ESP de <i>Cattleya tigrina</i>	91
4.2.1.	Efeitos do GA ₃ e sacarose	91
4.2.2.	Efeitos da desidratação das ESP.....	93
4.2.3.	Efeitos do sistema de imersão no subcultivo de microbrotos	94
5.	Conclusões.....	96
6.	Referências Bibliográficas.....	97

CAPÍTULO 3	– Citometria de fluxo aplicada ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas	102
	Resumo.....	103
	Abstract.....	105
1.	Introdução	106
2.	Material e Métodos.....	108
2.1.	Análise e Quantificação do DNA nuclear de orquídeas com o uso de plantas <i>in vitro</i>	108
2.1.1.	Material vegetal.....	108
2.1.2.	Extração e análises de núcleos	109
2.1.3.	Análise dos dados.....	109
2.2.	Estabilidade de ploidia de regenerantes obtidos por meio da indução e regeneração de ESP de <i>Cattleya tigrina</i>	110
3.	Resultados	111

3.1.	Análise e Quantificação do DNA nuclear de orquídeas com o uso de plantas <i>in vitro</i>	111
3.2.	Estabilidade de ploidia de regenerantes obtidos por meio da indução e regeneração de ESP de <i>Cattleya tigrina</i>	121
4.	Discussão	124
4.1.	Análise e Quantificação do DNA nuclear de plantas de orquídeas cultivadas <i>in vitro</i>	124
4.2.	Estabilidade de ploidia de regenerantes obtidos por meio da indução e regeneração de ESP de <i>Cattleya tigrina</i>	128
5.	Conclusões	130
6.	Referências Bibliográficas	132
	Considerações Finais.....	137

OBJETIVO

Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo regenerativo *in vitro* para *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae) baseado em estruturas semelhantes a protocormos e empregar técnicas associadas à citometria de fluxo como ferramentas biotecnológicas visando estudos do genoma nuclear e o melhoramento genético de orquídeas nativas do estado de Santa Catarina.

Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de diferentes condições de cultivo, explantes e regiões do explante, bem como o emprego da técnica da *TCL*, na indução de estruturas semelhantes a protocormos em *Cattleya tigrina*;

Estudar o efeito de diferentes condições de cultivo e da desidratação dos explantes na regeneração de estruturas semelhantes a protocormos de *Cattleya tigrina*;

Empregar a técnica da citometria de fluxo na avaliação da estabilidade de ploidia de regenerantes de *Cattleya tigrina* obtidos por meio da indução e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos;

Estudar o genoma nuclear de folhas de plantas *in vitro* e adultas de *Cattleya purpurata*, *Cattleya intermedia*, *Cattleya forbesii*, *Brassavola perrinii* e *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae), e verificar a viabilidade do seu uso em estimativas do valor C de DNA por meio da citometria de fluxo.



**CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO
PROBLEMA**

1. A FAMÍLIA ORCHIDACEA

A família Orchidaceae está classificada na subdivisão Angiospermae, classe Monocotyledoneae e ordem Liliales. É a família botânica mais numerosa com mais de 26 mil espécies segundo o *World Checklist of the Monocotyledons* (2012). Apresenta distribuição cosmopolita, sendo encontradas desde o norte da Suécia e Alaska até a terra do fogo no sul da Argentina, sendo os indivíduos epifíticos restritos aos trópicos e sub-trópicos (DRESSLER, 1990). Segundo a Lista Oficial das Espécies da Flora do Brasil (2012) ocorrem no território nacional 2432 espécies distribuídas em 236 gêneros, e com taxa de endemismo de 67% em nível específico. Constantemente novas espécies são descritas (PALESTINA; SOSA, 2002; BATISTA; BIANCHETTI, 2004; SINGER et al., 2007; VEROLA; SEMIR, 2007; MOTA et al., 2009; SMIDT; BORBA, 2009) e os recentes avanços na genética molecular estão permitindo a reclassificação de espécies e gêneros baseada em análises filogenéticas (VAN DEN BERG et al., 2009)

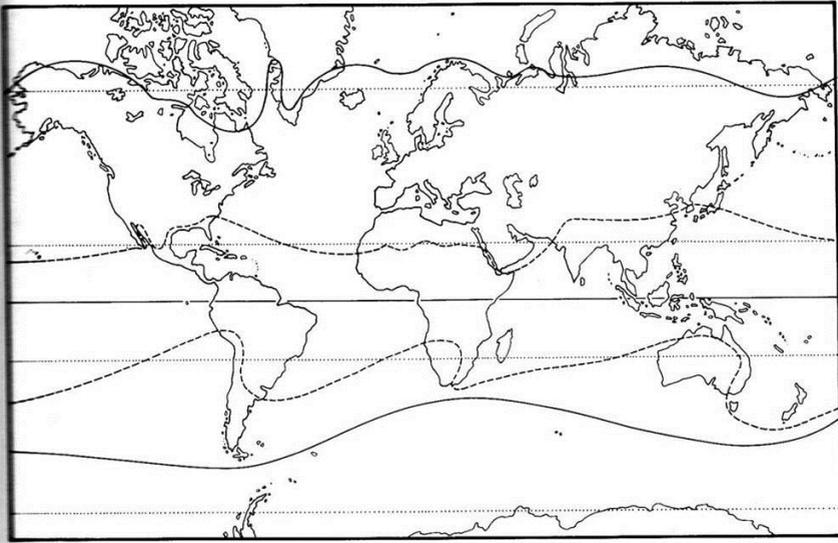


Figura 1: Representação da distribuição da família Orchidaceae. A linha contínua representa os limites de distribuição de espécies terrestres e a linha pontilhada as espécies epifitas. Adaptado de Dressler (1990).

De acordo com Dressler (1990) a família Orchidaceae é dividida em seis subfamílias: Apostasioideae, Cyrtipedioidae, Spiranthoideae, Orchidoideae, Epidendroideae e Vandoideae. As duas últimas podem ser destacadas devido ao grande número de espécies exploradas economicamente; são elas a Epidendroideae e a Vandoideae. A subfamília Epidendroideae, possui gêneros com enorme valor horticultural como *Cattleya*, *Guarianthe* e *Rhyncholaelia* entre outros (VAN DEN BERG et al., 2009), todos de ocorrência natural no Brasil, e que são muito utilizados para a produção de híbridos comerciais.

Recentemente, a descoberta de um fóssil em âmbar de políneas de orquídea presas a uma abelha permitiu a datação da família em cerca 77 milhões de anos (RAMÍREZ et al., 2007). Há muito tempo as plantas desta família despertam o interesse dos cientistas devido a enorme variabilidade morfológica, de estratégias evolutivas e pelas síndromes de polinização (FAY; CHASE, 2009), atraindo inclusive a atenção de Darwin, que utilizou exemplos de relações planta/polinizador em orquídeas para embasar parte da teoria da evolução das espécies, publicando um livro sobre o tema. Hoje em dia espécies da família continuam sendo utilizadas para embasar estudos evolutivos e o que pode ser o primeiro relato de especiação simpátrica continental foi relatado em orquídeas (VERECKEN et al., 2010).

1.1. ESTADO DE CONSERVAÇÃO

Paralelamente ao estado de conservação dos ecossistemas originais, especialmente os florestais, pode-se avaliar o grau de ameaça das orquídeas. Soma-se a isso a pressão causada pela coleta predatória para comércio e a retirada do ambiente natural para cultivo. No passado o estado de Santa Catarina foi um grande exportador de orquídeas para o continente europeu com empresas estabelecidas com o objetivo único de coletar e exportar orquídeas (RIBAS, 1986 & MENEZES, 1995) o que com certeza causou enorme erosão genética em muitas espécies.

No bioma Mata Atlântica, considerado um hotspot de biodiversidade (MYERS et al., 2000), são listadas 1421 espécies de orquídeas (Lista das Espécies da Flora do Brasil, 2012). Apesar de o bioma estar sobre grande ameaça poucas espécies de orquídeas são consideradas em risco de extinção. Na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008), apenas 70 espécies de orquídeas estão listadas,

sendo metade considerada como ameaçadas e outra metade com insuficiência de dados. Verifica-se que a maior parte delas é nativa das regiões sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil, sendo que nenhuma das espécies do gênero *Cattleya* de ocorrência em Santa Catarina é listada, apesar da atual ocorrência *in situ* ser muito restrita. Nas 204 espécies listadas na lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2012) nenhuma é de ocorrência na América do Sul, evidenciando a falta de dados do estado de conservação das espécies de orquídeas brasileiras. No apêndice II da lista da Convenção Internacional sobre Comércio Internacional de Espécies da Fauna e Flora Selvagem Ameaçadas de Extinção (CITES, 2010) todas as espécies e subespécies de orquídeas estão incluídas, significando que sua exportação legal depende de autorização do órgão competente e está restrita a políneas, sementes, frutos, flores de corte de indivíduos propagados artificialmente ou plântulas *in vitro* em condição estéril.

Apesar de a Convenção sobre Diversidade Biológica, da qual o Brasil é signatário, priorizar a conservação *in situ* no país de origem, observa-se que a adoção de outros métodos de conservação, especialmente a criação de bancos de sementes, tem se destacado em termos práticos. As sementes de orquídeas são extremamente diminutas, praticamente desprovidas de reservas nutritivas (ARDITTI; GHANI, 2000) fato que fez com que durante muito tempo se pensasse que estas fossem recalcitrantes e pouco resistentes ao armazenamento por longos períodos (SEATON; PRITCHARD, 2008). Knudson (1940) demonstrou pela primeira vez ser possível preservar sementes de orquídeas por períodos prolongados reduzindo a umidade das sementes e a temperatura de armazenamento. Na verdade descobriu-se posteriormente que as sementes da maior parte das orquídeas resistem por períodos relativamente longos ao armazenamento a baixa temperatura como vem sendo comprovado para diversas espécies (POPOVA et al., 2003; ALVAREZ-PARDO; FERREIRA, 2006; CARVALHO, 2006). Segundo Seaton e Pritchard (2008), o fator mais preponderante no armazenamento de sementes de orquídeas a baixas temperaturas é o teor de umidade destas, recomendando-se a dessecação destas em cloreto de lítio para teores de 12% de umidade.

Esforços atuais têm sido feitos para a conservação *ex situ* de sementes de orquídeas. O projeto da Iniciativa Darwin “*Orchid Seed Stores for Sustainable Use*” (OSSSU), com o objetivo de estabelecer uma rede global de bancos de sementes de orquídeas, fornece recursos a

países com alta diversidade de orquídeas, para aquisição de equipamentos para a armazenagem de sementes de orquídeas (SEATON et al., 2010). Apesar da importância desses bancos de sementes ressalta-se que a conservação *ex situ* interrompe as relações da planta com outros organismos e com o ambiente, o que é especialmente importante em plantas da família Orchidaceae, que possuem relações ecológicas muito específicas com polinizadores e fungos micorrízicos, sendo uma abordagem mais segura utilizar esses bancos em consonância com a conservação *in situ*.

2. HISTÓRICO DO CULTIVO DE ORQUÍDEAS *IN VITRO*

Os procedimentos utilizados na multiplicação de orquídeas sempre foram inovadores quando comparados aos métodos biotecnológicos utilizados para outras espécies e o histórico da micropropagação de orquídeas se confunde com o da própria cultura de tecidos vegetais (ARDITTI, 2008).

O primeiro método de cultivo de plantas *in vitro* foi a germinação simbiótica de sementes de orquídeas por Noel Bernard em 1899 e a primeira aplicação prática da cultura de tecidos foi com a germinação simbiótica de sementes desenvolvida por Knudson em 1922 (ARDITTI, 2008). Contudo a primeira utilização da técnica *in vitro* como ferramenta biotecnológica, foi em 1960 quando Morel e Martin obtiveram plantas livres de vírus através da cultura de ápices caulinares (TORRES et al., 1998), apesar de Arditti (2008) relatar que Rotor em 1949 e Thomale em 1957 já haviam clonado com sucesso orquídeas *in vitro*, antes de Morel.

O grande salto na propagação de orquídeas e na cultura de tecidos em geral foi após a descoberta de Knudson (1922) de que sementes de orquídeas podiam germinar na ausência da associação micorrízica, desde que o meio de cultura fosse suplementado com uma fonte de carbono. Após isso foi possível à obtenção de híbridos, a produção de plantas em larga escala e permitiu um grande avanço no cultivo de embriões zigóticos de outras espécies (RAGHAVAN, 2003). Segundo Arditti (1967), Knudson contribuiu mais do que qualquer outro pesquisador para o avanço no conhecimento das orquídeas.

3. CLONAGEM DE ORQUÍDEAS *IN VITRO* - ROTAS MORFOGENÉTICAS E PROTOCOLOS REGENERATIVOS

Além da germinação assimbiótica de sementes e da organogênese convencional existem, aparentemente, rotas morfogênicas específicas para a regeneração de plantas *in vitro* de orquídeas. A propagação clonal de orquídeas, em geral, é feita a partir de explantes somáticos de origem diversa como hastes florais (CHEN; CHANG, 2000), folhas (CHEN; CHANG, 2001; GOW et al., 2008), raízes (KERBAUY; ESTELITA, 1996) e ápices caulinares (ROY et al., 2007) com a obtenção de estruturas globulares similares aos embriões de origem zigótica. A maioria dos trabalhos publicados refere-se a esta rota como sendo embriogênese somática, muito provavelmente devido às peculiaridades dos embriões das orquídeas.

A germinação de sementes de orquídeas assemelha-se mais ao desenvolvimento de uma gema em dormência do que o desenvolvimento de um embrião propriamente (ARDITTI, 1967). O embrião das orquídeas apresenta um padrão de desenvolvimento muito diferente dos apresentados em outras espécies vegetais. Apesar de George e Debergh (2008) afirmarem ser possível, na fase de protocormo, a diferenciação do meristema apical e radicular, em polos opostos, a literatura no geral afirma que o padrão de desenvolvimento dos embriões de orquídeas é diferente do de outras Angiospermas. Estes embriões possuem formato globular mesmo quando completamente desenvolvidos, o que levou Raghavan (2003) a considerar o embrião maduro das orquídeas como análogo aos em estágio globular de outras angiospermas, e que durante o processo germinativo, ao ser colonizado pelo fungo micorrízico, o embrião evolui para os estágios subsequentes.

Devido a estas peculiaridades Treub em 1890 cunhou o termo protocormo para referir-se a estas estruturas (ARDITTI, 2008). O protocormo é uma estrutura que possui formato geralmente globular (variando entre táxons) composto principalmente por células parenquimáticas (BATYGINA et al., 2009). Na parte superior do protocormo são encontradas células menores que darão origem ao meristema apical e aos primórdios foliares. Na parte basal não é encontrada uma zona meristemática que dará origem ao meristema radicular como na maioria dos outros embriões, já que nas orquídeas as

raízes são de origem adventícia (BATYGINA; VINOGRADOVA, 2007; BATYGINA et al., 2009; KRAUS et al., 2006).

As estruturas somáticas obtidas *in vitro* e que lembram os protocormos de origem zigótica receberam a denominação de *protocorm-like bodies (PLB)* por Georges Morel em 1960 (ARDITTI, 2008), e que em português podemos nos referir como estruturas semelhantes a protocormos (ESP). No entanto, o termo vem sendo utilizado amplamente para quaisquer estruturas originadas a partir de explantes meristemáticos (KRAUS et al., 2006). Na literatura são encontrados diversos termos como: mericlones (KUEHNLE, 2007); brotos (CHEN et al., 2002; CHEN et al., 2004; KOŠIR et al., 2004); segmentos nodais axilares (SHIAU et al., 2005), embriões somáticos (CHEN; CHANG, 2004; GOW et al., 2008; HUAN, 2004; KUO; CHEN, 2005; TOKUHARA; MII, 2003) e estruturas semelhantes a protocormos (KERBAUY; ESTELITA, 1996; SAIPRASAD; POLISETTY, 2003; YOUNG et al., 2000). Na verdade, se considerarmos o grande número de espécies e híbridos naturais e artificiais na família Orchidaceae e o pouco conhecimento que temos em acerca da anatomia e embriologia delas, pouco se pode afirmar em relação às estruturas somáticas e as rotas morfogenéticas *in vitro*. Para isso ainda é necessário amplos estudos voltados especificamente ao tema.

Em relação às condições determinativas relacionadas a estas rotas morfogenéticas se observa nitidamente que as citocininas são sempre mais efetivas do que as auxinas. Assim, Chung et al. (2007); Nayak et al. (2002) e Park et al. (2003), entre outros autores, obtiveram bons resultados com a utilização de citocininas sintéticas na indução de ESP a partir de explantes somáticos de diversas origens em várias espécies de orquídeas. Entre os fitorreguladores testados o Thidiazuron (TDZ) parece ser o mais eficaz.

As condições permissivas parecem ser menos importantes, ou variam mais dependendo da espécie em questão. Enquanto Chung et al. (2007) e Chung et al. (2005), em estudos com *Dendrobium*, obtiveram melhores resultados em condições de luminosidade 16/8h de luz/escuro, Gow et al. (2008) concluíram que a luz tinha efeitos negativos na indução de ESP em duas espécies de *Phalaenopsis* investigadas. Kerbauy e Estelita (1996) observaram que a luz possuía efeito inibitório na formação de ESP a partir de ápices radiculares de *Clowesia warscewiczii*, independentemente da presença ou ausência de citocinina

no meio de cultura. Mas como sempre, regras possuem exceção, especialmente em uma família tão grande e variada. Em *Ansellia africana*, por exemplo, a suplementação do meio de cultura com citocininas resultou na formação de um único broto a partir de segmentos nodais (VASUDEVAN; STADEN, 2011), ao contrário do relatado para outras espécies de orquídeas, e com a própria função das citocininas.

Os estudos do controle do crescimento e desenvolvimento *in vivo* na família Orchidaceae são muito mais complexos do que em outras plantas devido as enormes relações ecológicas existentes. Já foi mostrado, por exemplo, que isolados de *Fusarium proliferatum* são capazes de sintetizar giberilinas em orquídeas de maneira similar a *Fusarium fujikuroi* em plantas de arroz (TSAVKELOVA et al., 2008) e que bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Sphingomonas* e *Mycobacterium* associadas a raízes de orquídeas produzem AIA que é utilizado pela planta (TSAVKELOVA et al., 2007). Isso torna mais complexo os estudos da fisiologia do desenvolvimento deste grupo de plantas, uma vez que a resposta delas não depende apenas do aparato interno de síntese de hormônios e tampouco dos níveis endógenos da planta, mas de relações bem mais complexas envolvendo interações com outros organismos.

Quanto à origem histológica dos ESP, a literatura relata muita variação. Existem trabalhos relatando seu surgimento a partir de células da subepiderme (PARK et al., 2002a) ou diretamente da epiderme (CHEN; CHANG, 2006; CHUNG et al., 2005; GOW et al., 2008; ROY et al., 2007).

Em relação à regeneração dos ESP em plantas, a maior parte dos trabalhos disponíveis descreve que o processo ocorre facilmente ao se transferir as culturas para um meios de cultura sem reguladores de crescimento (CHEN; CHANG, 2006; CHUNG et al., 2005; KUO et al., 2005; PARK et al., 2003). No entanto, observações próprias mostraram que ESP de *C. tigrina* obtidos a partir de explantes foliares só mostravam sinais de regeneração em plantas a partir do segundo ou terceiro subcultivo em meio isento de fitoreguladores. Além disso, nesta espécie o processo ocorre de forma assincrônica, o que impede a obtenção de mudas para aclimatização de maneira constante e escalonada.

A associação dos efeitos da sacarose suplementada ao meio de cultura com a conversão das ESP foi enfatizada por Thorpe et al. (2008),

que ressalta que estas podem perder permanentemente a capacidade de regenerativa quando cultivadas por muito tempo em altas concentrações de sacarose. No entanto, são escassos os relatos da influência das fontes de carbono em ESP de orquídeas, especialmente em relação à regeneração destas.

Protocormos de *Cymbidium*, por exemplo, mantêm altos níveis de clorofila apenas quando cultivados em meios com concentrações reduzidas de sacarose (2 a 5g.L⁻¹) (VANSÉVEREN-VAN ESPEN apud THORPE et al., 2008). Liu et al. (2006) relatam maior multiplicação de ESP de *Phalaenopsis* e *Doritaenopsis* com o uso de trealose. No entanto, apenas os efeitos sobre a multiplicação foram investigados, sem qualquer avaliação desta sobre a regeneração. Jheng et al. (2006) testaram diferentes fontes de carbono na regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de *Oncidium* “Gower Ramsey” e relatam que o uso de trealose foi significativamente superior ao da sacarose. No entanto, as comparações foram feitas em termos de massa e não de molaridade, o que pode causar erros devido à introdução de outros fatores, assim como destacado por (ARDITTI, 2008). Além disso, o uso desses açúcares pode encarecer o protocolo, tornando a sua aplicação prática questionável. Tokuhara e Mii (2001) por outro lado relatam que a simples diminuição dos níveis de sacarose de 58,4 mM do meio de multiplicação para metade disso, foi suficiente para a regeneração de plântulas a partir de suspensões celulares de *Phalaenopsis*.

Além de alterações nas concentrações de sacarose do meio de cultura, o uso de giberelinas (GAs) também pode ser uma opção para melhorar a eficiência regenerativa das ESP, uma vez que estas estão ligadas ao alongamento celular e caulinar (GUERRA; RODRIGUES, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009). Do ponto de vista prático as GAs têm sido utilizadas no cultivo de meristemas (MROGINSKI et al., 2004), e para promover o alongamento de brotos em *Malus*, *Fragaria*, *Accacia*, *Rubus* e *Ficus*, entre outras (MOSHKOV et al, 2008).

A maior vantagem da utilização de ESP na propagação massal de orquídeas, além da fixação de ganho genético, está na possibilidade da utilização de biorreatores de imersão temporária (BIT). Os BIT possuem muitas vantagens quando comparados ao cultivo convencional em imersão contínua. Primeiramente porque permitem a utilização de meio de cultura líquido, o que por si só já representa uma grande diminuição nos custos de produção. Além disso, também demandam muito menos mão de obra, aumentam a taxa de multiplicação dos

propágulos e possibilitam a produção de mudas em escala comercial em biofábricas (TAKAYAMA; AKITA, 2005).

Em orquídeas os BIT já foram utilizados com sucesso para a produção de plantas pela rota organogenética (HEMPFLING; PREIL, 2005; ZIV, 2000) e também para a multiplicação de ESP de *Phalaenopsis*, permitindo um enorme incremento na proliferação das culturas, na ordem de 18 mil ESP para cada 20g de inoculo (YOUNG et al., 2000). Outros autores relatam taxas proliferativas ainda maiores. Segundo Pieper e Zimmer apud Preil (2005) em 98 dias foi possível obter até 1,1kg de ESP de *Cymbidium* a partir de 15g de inoculo o que renderia cerca de 288 mil ESP. Em suma, a propagação massal de orquídeas utilizando BIT tem se mostrado promissora e altamente desejável.

4. BIOTECNOLOGIA E MELHORAMENTO GENÉTICO

Quando se consideram as plantas de orquídeas em comercialização na atualidade pode-se avaliar que por trás do produto final há tecnologia de ponta sendo utilizada. Considerando ainda a redução nos preços nos últimos anos em nível de consumidor percebe-se que a tecnologia tem melhorado, reduzindo os custos e permitindo a produção de produtos mais acessíveis. De fato modernas ferramentas biotecnológicas vêm sendo aplicadas no melhoramento genético de orquídeas. As ferramentas vão desde técnicas modernas de clonagem e fixação de ganho genético até a transformação genética com objetivos específicos (CHEN, F.-C.; CHEN, W.-H., 2007).

Outras ferramentas, de mais fácil aplicação, mas não menos valiosas, são as manipulações cromossômicas, especialmente referentes a alterações do nível de ploidia. Segundo Tang e Chen (2007) com a produção de variedades poliplóides de *Phalaenopsis* foi possível diminuir o tamanho da haste floral e aumentar o tamanho e a qualidade das flores, o que aumentou seu valor horticultural. O cultivo incipiente de variedades de corte e pote de *Dendrobium* no Hawaí só foi alavancado após a produção de cultivares poliplóides, que normalmente apresentam menos flores por haste, mas com maior tamanho e durabilidade (Kuehnle, 2007).

Apesar de alterações de ploidia serem indesejáveis em alguns casos, a poliploidização intencional, com o tratamento de explantes com inibidores do fuso mitótico como a colchicina, vem sendo muito utilizada. No entanto, a validação desses métodos é um problema. Vichiato et al. (2007), por exemplo, analisaram a ploidia dos regenerantes de *Dendrobium nobile* tratados com colchicina com lâminas de células em metáfase, um método extremamente laborioso. Além disso, apenas três lâminas por tratamento foram avaliadas de um total de 24 repetições, tornando os resultados incertos. Thao et al. (2002), por outro lado, utilizaram diferentes doses de orizalina e colchicina na indução de poliploidia em uma espécie ornamental do gênero *Alocasia*, nos quais os regenerantes foram discriminados com o uso da citometria de fluxo, uma ferramenta que permite estudos citogenéticos de maneira rápida e precisa.

5. CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA AUXILIAR NO MELHORAMENTO GENÉTICO E ESTUDO DO GENOMA NUCLEAR VEGETAL

Um citômetro de fluxo é um equipamento que faz a análise de partículas em suspensão e em movimento. Essas partículas são excitadas com a emissão de luz ultravioleta ou laser e emitem fluorescência em determinados comprimentos de onda. Essa fluorescência é filtrada por uma série de espelhos dicróicos e captada por sensores. Os sinais são enviados para um software específico que analisa e converte os sinais em gráficos passíveis de interpretação. Esses gráficos ou histogramas são construídos em função da intensidade da fluorescência emitida (eixo x) em contraste com o número de células ou partículas que emitiram tal comprimento de onda (eixo y) (OCHATT, 2006), podendo também outras variáveis serem analisadas, gerando gráficos com mais de dois parâmetros (MACEY, 2007).

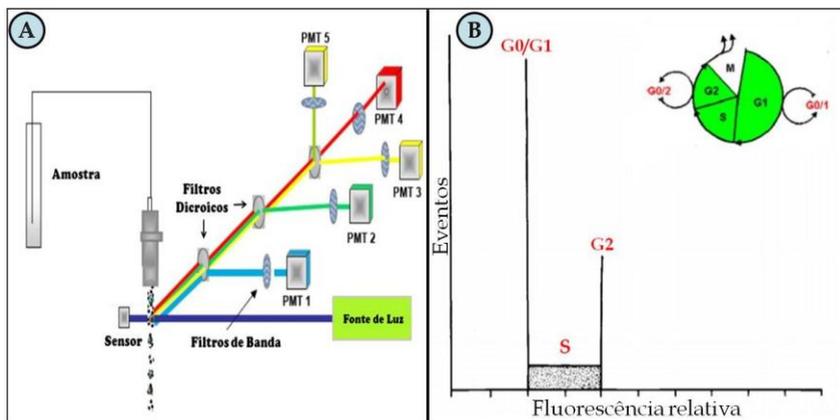


Figura 2: A) Detalhes do funcionamento de um citômetro de fluxo. Adaptado e modificado de Ochatt (2006); B) Representação esquemática de um histograma sem dispersão. G0/G1, S e G2 representam núcleos nas respectivas fases do ciclo celular. Adaptado e modificado de Watson (1992).

A técnica da citometria de fluxo teve início nos anos 50 do século passado e sua aplicação inicial era apenas para contagem e análise de células sanguíneas em humanos (LOUREIRO; SANTOS, 2004). A utilização da técnica em plantas foi retardada em muito tempo pela dificuldade de extração de núcleos intactos a partir de células

vegetais, sendo que os primeiros experimentos sugeriam que apenas núcleos extraídos de protoplastos poderiam ser analisados, o que o que limitava o uso da técnica a um grupo muito pequeno de espécies (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). No início dos anos 80 surgiu o primeiro protocolo para a extração de núcleos de tecidos vegetais para análise por citometria de fluxo. A ascensão da citometria de fluxo em plantas nas últimas décadas só foi possível devido a uma elementar mudança metodológica: o uso de uma lâmina ao invés de enzimas para isolamento de núcleos (DOLEŽEL et al., 2007). O protocolo desenvolvido por Galbraith et al. (1983) era simples, rápido, barato e aplicável a praticamente qualquer espécie ou tecido vegetal. A partir dessa publicação começaram a surgir inúmeras aplicações para a técnica da citometria de fluxo em plantas. Estimativas do tamanho do genoma nuclear, análises de ploidia, detecção de mixoplóides e estudos do ciclo celular são algumas das aplicações que a técnica possui, tanto em plantas intactas como em células e tecidos cultivados *in vitro* ou plantas deles regeneradas. Portanto não é exagero dizer que o trabalho de Galbraith et al. (1983) marca o início da citometria de fluxo em plantas (DOLEŽEL; BARTOS, 2005).

5.1. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

O procedimento para a preparação das suspensões de núcleos para análise em citômetro de fluxo consiste na extração de núcleos intactos em tampões específicos seguindo a filtração e tingimento dos núcleos com fluorocromos específicos, dependendo do alvo do estudo. Os tampões de extração devem facilitar a extração dos núcleos intactos e livres de outras partículas citoplasmáticas, mantê-los estáveis em suspensão, prevenir sua agregação, proteger o DNA nuclear e promover um ambiente adequado para sua coloração (LOUREIRO; SANTOS, 2004). Os tampões de extração de núcleos são normalmente compostos por detergentes não iônicos, tampões orgânicos para estabilização do pH, agentes quelantes e redutores, íons de magnésio ou espermina para estabilizar a cromatina nuclear e RNAses (DOLEŽEL; BARTOS, 2005).

Também fazem parte dos tampões os fluorocromos, que são substâncias capazes de se intercalar a dupla fita do DNA ou ligar-se a pares de base específicos, fazendo com que estas, quando excitadas em determinados comprimentos de onda, emitam fluorescência. A decisão

de utilizar um ou outro fluorocromo está no objetivo final da análise. Corantes como o DAPI, por exemplo, que se ligam especificamente a regiões ricas em adenina e timina, podem ser utilizados para detecções do nível de ploidias e quantificações de bases destes tipos (GREILHUBER, 2008). No entanto, fluorocromos intercalares como o iodeto de propídio (IP) e o brometo de etídio são mais recomendados para estimativas do conteúdo de DNA nuclear (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). Uma lista dos fluorocromos mais utilizados em análises com plantas podem ser encontradas na *Flower database* (<http://botany.natur.cuni.cz/flower/>) (LOUREIRO, 2012).

Compostos endógenos do metabolismo secundário, a maioria de natureza fenólica, são um grande problema para as análises por citometria de fluxo (GREILHUBER, 2008). Já foi demonstrado que antocianinas interferem com os fluorocromos inibindo sua ação sobre o DNA em até 70% (BENNETT et al., 2008) e outros compostos fenólicos como o ácido tânico também influenciam negativamente nos resultados (LOUREIRO et al., 2006), devendo ser despendida atenção extra ao tipo de tecido utilizado nas análises.

Os trabalhos com citometria de fluxo em orquídeas são ainda escassos quando comparados a outras famílias botânicas. O que se observa é que os autores não divulgam alguns dados importantes para a validação do método utilizado, como por exemplo, os coeficientes de variação (CV) e.g (CHEN et al., 2009; MEESAWAT et al., 2008).

5.2. APLICAÇÕES PRÁTICAS

Dolezel et al. (2007) destacam inúmeros usos da citometria de fluxo em plantas como: expressão gênica, detecção de metabólitos secundários, identificação de híbridos somáticos e de transferência de DNA, detecção de aneuploidia, identificação do sexo em plantas dióicas, estudo do ciclo celular e endopoliploidia, composição da cromatina, conteúdo de bases, estudo e detecção de patógenos em plantas, entre outros. No entanto, a maior aplicação desta ferramenta em plantas atualmente é para análises de ploidia e estimativas do conteúdo de DNA nuclear.

5.2.1. Análises de ploidia

As análises de ploidia por citometria de fluxo apresentam inúmeras vantagens comparativamente às técnicas microscópicas clássicas de contagem de cromossomos. A preparação das amostras é rápida, fácil, não necessita de células em divisão e é capaz de detectar mixoploidias (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

A análise da fluorescência dos núcleos isolados produz histogramas com um pico dominante, representando os núcleos das células na fase G1 do ciclo celular, e outro menor correspondendo às células em fase G2 (LOUREIRO; SANTOS, 2004). Para obter a ploidia de uma espécie em questão deve-se comparar a intensidade da fluorescência do pico G1 desta com o de outra planta da mesma espécie e com ploidia conhecida. Carvalho et al. (2007) utilizaram a citometria de fluxo para análises de ploidia de regenerantes de *Carica papaya* L. obtidos a partir de embriogênese somática de embriões zigóticos imaturos. A partir dos resultados foi possível detectar a presença de plantas diplóides, triplóides, tetraplóides e mixoplóides, mostrando a aplicabilidade da técnica no controle genético de plantas propagadas in vitro. Praça et al. (2009) utilizaram a citometria de fluxo conjuntamente com técnicas de contagem microscópica de cromossomos para análises do melhor método para indução de poliploidias em *Lycopersicon esculentum*, mostrando a aplicação da técnica como ferramenta auxiliar no melhoramento genético vegetal.

Orquídeas geralmente possuem um número relativamente elevado de cromossomos, como $2n = 56$ em *Oncidium* (MONDIN; DOCHA NETO, 2006) e $2n = 170$ em *Epistephium lucidum* (FELIX; GUERRA, 2006). Desta forma, a análise da ploidia por citometria de fluxo se mostra como uma excelente alternativa aos métodos clássicos de contagem de cromossomos, uma vez que números tão elevados dificultam ainda mais a contagem. No entanto, deve-se ressaltar que são técnicas complementares, e o uso da citometria de fluxo não justifica o desuso da contagem cromossômica.

5.2.2. Estimativas do conteúdo de DNA nuclear

O conteúdo de DNA de um núcleo haploide ou gamético de um organismo é denominado valor C de DNA (SWIFT apud BENNET et al., 2000). Portanto, um núcleo na fase G1 do ciclo celular contendo

duas cópias do genoma não replicado possui valor 2C de DNA (DOLEŽEL; BARTOS, 2005). O valor C já foi estimado por diversas metodologias distintas, como a citometria de imagem e a densitometria de Feulgen. Mais recentemente a citometria de fluxo vem sendo utilizada devido à facilidade de preparo das amostras e da eficácia comprovada do método. Diversas comparações interlaboratoriais já foram feitas para validação da técnica para esta finalidade com a obtenção de resultados estáveis e promissores (DOLEŽEL et al., 1998), sendo atualmente a metodologia mais utilizada para esta finalidade.

O conteúdo nuclear de DNA é geralmente expresso em picogramas (pg). No entanto, com o advento da biologia molecular e os avanços nos projetos de sequenciamento genético houve uma tendência em expressar tal conteúdo em termos de quantidade de pares de base (bp). Para estimar o valor C de uma espécie deve-se proceder a análise desta juntamente com uma planta de valor C conhecido (padrão de referência). O conteúdo de DNA nuclear é calculado em função da relação da fluorescência entre as duas espécies (DOLEŽEL; BARTOS, 2005):

Diversas recomendações foram estabelecidas para permitir a comparação futura entre os dados obtidos com diferentes espécies por diferentes pesquisadores ao redor do mundo. De acordo com Dolezel et al. (2007) as principais recomendações são: (i) Análise de mínima de 5000 núcleos por amostra com um mínimo de 4 indivíduos analisados e diferentes dias; (ii) Coeficientes de variação $\leq 3\%$ ou 5% para espécies com tecido recalcitrante; (iii) Uso de padrões de referência já estabelecidos, como *Pisum sativum*, e IP como fluorocromo.

As amostras dos padrões de referência devem ser requisitadas de um único local para evitar possíveis erros de estimativa. Atualmente o Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria do Instituto de Botânica Experimental na Republica Tcheca, coordenado pelo professor Jaroslav Doležel tem fornecido para todo o mundo, sem custos, amostras de diversos padrões de referência.

Atualmente já se conhece o conteúdo de DNA nuclear de um grande número de espécies. Os resultados sugerem que a família Orchidaceae é, entre as angiospermas, a que possui maior variabilidade nos conteúdos de DNA nuclear (LEITCH et al., 2009) com valores entre 0,60 e 38,83 pg de DNA, uma variação de mais de 64 vezes. A variação entre todas as angiospermas vai de 0,0065 pg em *Genlisea margaretae*

(Lentibulariaceae) a 127,4 pg em *Fritillaria assyriaca* (Liliaceae), uma variação de 2000 vezes (LEITCH; BENNET, 2007).

De acordo com o *Plant DNA C-value database* (2012) apenas 223 entre as mais de 24 mil espécies aceitas para a família Orchidaceae possuem estimativas para o valor C de DNA. Observa-se que estimativas para alguns gêneros são notavelmente ausentes como em *Brassavola*, *Catasetum*, *Encyclia* e inúmeros outros. Para outros como *Cattleya* e *Laelia*, as estimativas são mínimas. *Epidendrum*, o gênero mais numeroso da família, possui apenas uma estimativa. Acredita-se que a falta de dados para a família Orchidaceae utilizando a técnica da citometria de fluxo esteja relacionada às dificuldades em se obter estimativas precisas para esta família (LEITCH et al., 2009), possivelmente devido a natureza recalcitrante do tecido. Os procedimentos utilizados para as estimativas existentes variam muito, dificultando comparações. Em estimativas do valor C de 70 espécies de orquídeas pertencentes a 26 gêneros distintos Jones et al. (1998) utilizaram tanto padronização interna quanto externa. Além disso, foram utilizados glóbulos vermelhos de galinha como padrão de referência, procedimentos que podem levar a estimativas totalmente equivocadas (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

O conhecimento do valor C de DNA é importante para diversos ramos da biologia como a taxonomia, ecologia e a genética molecular (BENNET et al., 2000). O conteúdo de DNA nuclear, adicionalmente ao genoma, também pode influenciar muitas características de um organismo. Assim como revisto por Leitch e Bennet (2007), sabe-se que existe correlação positiva entre o valor C e o tamanho do núcleo, tamanho da célula, duração da mitose e meiose, sensibilidade à radiação e poluição, tamanho do pólen, semente e estômato, e grau de ameaça de extinção. O valor C também pode ser importante na escolha de metodologias para análise da diversidade genética, como microssatélites e AFLP e na escolha de organismos para projetos de sequenciamento genômico, uma vez que o custo e o tempo dependem da quantidade de DNA (LEITCH; BENNET, 2007).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A. G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 92-98. 2006.

ALVES, G. M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P.. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 2, p. 204-207. 2006.

ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review**, v. 33, n. 1, p. 1-97. 1967.

ARDITTI, J. **Micropropagation of orchids - Vol.1** (J. Arditti, Ed.). 2nd ed., p.1547. Blackwell Publishing, 2008.

ARDITTI, J. Plenary Presentation : History of orchid propagation. **History**, 2010.

ARDITTI, J.; GHANI, A. K. A. Tansley Review No. 110.. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v. 145, n. 3, p. 367-421. 2000.

BAROW, M.; JOVTCHEV, G. Endopolyploidy in Plants and its Analysis by Flow Cytometry. In: Jaroslav Dolezel; Johann Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. p.349-370. WILEY, 2007.

BATYGINA, T. B.; BRAGINA, E. A.; VASILYEVA, V. E. The reproductive system and germination in orchids. **ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA**, v. 45, n. 2, p. 21-34, 2009.

BATYGINA, T. B.; VINOGRADOVA, G. Y. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 38, n. 3, p. 126-151. 2007.

BENNETT, M. D.; PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S. Anthocyanin inhibits propidium iodide DNA fluorescence in *Euphorbia pulcherrima*: implications for genome size variation and flow cytometry. **Annals of botany**, v. 101, n. 6, p. 777-90. 2008.

CARVALHO, V. S. **Virginia silva carvalho criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. Universidade Federal de Viçosa, 2006.

CHEN, F-C.; CHEN, W-H. Somaclonal Variation in Orchids. In: W-H. Chen; H-H. Chen (Eds.); **Orchid Biotechnology**. 1st ed., p.65-76. World Scientific Publishing, 2007.

CHEN, J-T.; CHANG, W-C. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). **Plant science (Shannon, Ireland)**, v. 160, n. 1, p. 87-93. 2000.

CHEN, J-T; CHANG, W-C. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* “Gower Ramsey”. **Plant Growth Regulation**, p. 229-232, 2001.

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.

CHEN, J-T; CHANG, W-C.. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var . *formosa* shimadzu. **In Vitro Cell Dev. Biol.** v. 40, p. 290-293. 2004.

CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Effects of GA₃, ancymidol, cycocel and paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium* in vitro. **Plant Cell**, , n. 100, p. 105-108, 2003.

CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, n. 3, p. 315-320. 2004.

CHEN, T-Y; CHEN, J-T; CHANG, W-C. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 11-15, 2004.

CHEN, T-Y.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 38, n. 6, p. 595-597. 2002.

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

CHUNG, H-H.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. **Biologia plantarum**, v. 51, n. 2, p. 346-350, 2007.

CHUNG, H-H.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* chiengmai pink and subsequent plant regeneration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 6, p. 765-769. 2005.

DOLEZEL, J; BARTOS, J; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 51, n. 2, p. 127-8; 2003.

DOLEZEL, J; GREILHUBER, J; LUCRETTIII, S. et al. Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry : Inter-laboratory Comparison *. **Annals of Botany**, v. 82, p. 17-26, 1998.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER J.; SUDA, J. Flow Cytometry with Plants: an Overview. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. p.41-66. WILEY, 2007.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J.. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of botany**, v. 95, n. 1, p. 99-110. 2005.

EMSHWILLER, E. Ploidy Levels among Species in the “*Oxalis tuberosa* Alliance” as Inferred by Flow Cytometry. **Annals of Botany**, v. 89, n. 6, p. 741-753. 2002.

FARIA, R. T.; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. Propagação in vitro de *Oncidium baueri* Lindl . (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.

FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of Botany**, v. 104, n. 3, p. 359-364. 2009.

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

FILHO, A. R.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O. et al. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, n. 8, p. 1799-1808. 2005.

FUKAI, S.; HASEGAWA, A.; GOI, M. Polysomaty in *Cymbidium*. **Hortscience**, v. 37, n. 7, p. 1088-1091, 2002.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C.. Micropropagation: Uses and Methods. In: E. F. George; M. A.Hall; G.-J. D. Klerk (Eds.); **Plant Propagation by Tissue Culture**. p.29-64. Springer, 2008.

GOW, W-P.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 2, p. 363-369. 2008.

GREILHUBER, J.; TEMSCH, E. M.; LOUREIRO, J. Nuclear DNA Content Measurement. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow**

Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. 1st ed., p.67-99. WILEY, 2007.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: S. M. Jain; S. J. Ochatt (Eds.); **Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants.** 1st ed., v. 589, p.47-66. Totowa, NJ: Humana Press. 2010.

GUO, B.; ABBASI, B. H.; ZEB, A.; XU, L. L.; WEI, Y. H. Thidiazuron : A multi-dimensional plant growth regulator. **Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, p. 8984-9000, 2011.

HEMPFLING, T.; PREIL, W. Chapter 15 Application of a temporary immersion system in mass propagation of *Phalaenopsis*. In: A. K. HVOSLEF-EIDE; W. PREIL (Eds.); **Liquid culture systems for in vitro plant propagation.** v. 2002, p.231-242. Springer, 2005.

HEW, C. S.; CLIFFORD, P. E. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. **Plant Growth Regulation**, v. 13, n. 3, p. 231-239. 1993.

HONG, P-I.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Shoot development and plant regeneration from protocorm-like bodies of *Zygopetalum mackayi*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, n. 3, p. 306-311. 2010.

HUAN, L. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. **Plant Science**, v. 166, n. 6, p. 1443-1449. 2004.

IANTCHEVA, A.; ATANASSOV, M.; VLAHOVA, A. Somatic Embryogenesis in Genera *Medicago* : an Overview. In: A. Mujib; J. Samaj (Eds.); **Somatic Embryogenesis.** 1st ed., v. 2005, p.285-304. Springer. 2006.

JHENG, F-Y.; DO, Y-Y.; LIAUH, Y-W.; CHUNG, J-P.; HUANG, P-L.. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic

callus cultures of *Oncidium* “Gower Ramsey” by adjusting carbohydrate sources. **Plant Science**, v. 170, p. 1133-1140. 2006.

JONES, W.; KUEHNLE, A. R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA Content of 26 Orchid (Orchidaceae) Genera with Emphasis on *Dendrobium*. **Annals of Botany**, v. 82, n. 2, p. 189-194. 1998.

KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warscewiczii*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 157-159, 1996.

KOŠIR, P.; ŠKOF, S.; LUTHAR, Z. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. **Plant Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 233-242, 2004.

KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, R.. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb . f. in vitro : aspectos estruturais e conceituais. , v. 33, n. 2, p. 177-184, 2006.

KUEHNLE, A. R. ORCHIDS - *Dendrobium*. In: N. O. Anderson (Ed.); **Flower Breeding and Genetics - Issues, Challenges and Opportunities for the 21st century**. 1st ed., p.539-560. Springer, 2007.

KUO, H-L.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* “Little Steve.” **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 4, p. 453-456. 2005.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome Size and its Uses: the Impact of Flow Cytometry. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. 1st ed., p.153-174. WILEY, 2007.

LIU, T-H.; LIN, J-J.; WU, R-Y.. The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm-like-bodies. **Plant cell tissue and organ culture**, v. 86, n. 1, p. 125-129. 2006.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. **Annals of botany**, v. 98, n. 3, p. 515-27. 2006a.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, JAROSLAV; SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of botany**, v. 98, n. 3, p. 679-89. 2006b.

LU, C-Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 29, n. 2, p. 92-96. 1993.

MALABADI, R. B.; MULGUND, G. S.; NATARAJA, K. Efficient Regeneration of *Vanda coerulea*, an Endangered Orchid Using Thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 3, p. 289-293. 2004.

MEESAWAT, U.; SRISAWAT, T.; EKSOMTRAMAGE, L.; KANCHANAPOOM, K. Nuclear DNA content of the pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.) with the analysis of flow cytometry. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 277-280, 2008.

MOSHKOV, I. E.; NOVIKOVA, G. V., HALL, M. A.; et al. Plant Growth Regulators III : Gibberellins , Ethylene , Abscisic Acid , their Analogues and Inhibitors ; Miscellaneous Compounds. In: E. F. George; M. A. Hall; G.-J. D. Klerk (Eds.); **Plant Propagation by Tissue Culture**. p.227-282. Springer, 2008.

MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P.; FLASCHLAND, E. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: G. Levitus; V. Echenique; C. Rubinstein; E. Hopp; L. Mroginski (Eds.); **Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II**. p.17-25. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, 2004.

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid

micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L .) Sw . and *Dendrobium nobile*. **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 107-116, 2002.

PARK, S Y; MURTHY, H. N.; PAEK, K Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science**, v. 164, p. 919-923. 2003.

PARK, S. Y.; YEUNG, E. C.; CHAKRABARTY, D.; PAEK, K. Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 1, p. 46-51. 2002.

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

PREIL, W. Chapter 1 General introduction : a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. In: A. K. HVOSLEF-EIDE; W. PREIL (Eds.); **Liquid culture systems for in vitro plantpropagation**. p.1-18. Springer, 2005.

RAMÍREZ, S. R.; GRAVENDEEL, B.; SINGER, R. B.; MARSHALL, C. R.; PIERCE, N. E. Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. **Nature**, v. 448, n. 7157, p. 1042-5. 2007.

ROY, J.; NAHA, S.; MAJUMDAR, M.; BANERJEE, N. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 1, p. 31-39. 2007.

RUPP, B.; SAMUEL, R.; RUSSELL, A. et al. Genome size in *Polystachya* (Orchidaceae) and its. **Society**, p. 223-233, 2010.

SAIPRASAD, G. V. S.; POLISETTY, R. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 1, p. 42-48. 2003.

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

SHIAU, Y-J.; NALAWADE, S. M.; HSIA, C-N.; MULABAGAL, V.; TSAY, H-S. In vitro propagation of the Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* wall. ex lindl., from axenic nodal segments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 5, p. 666-670. 2005.

SUDA, J.; KRON, P.; HUSBAND, B. C.; TRÁVNICEK, P. Flow Cytometry and Ploidy: Applications in Plant Systematics, Ecology and Evolutionary Biology. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. 1st ed., p.103-128. WILEY, 2007.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B. Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 3, p. 359-365. 2006.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Chapter 4 Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. In: A. K. HVOSLEF-EIDE; W. Preil (Eds.); **Liquid culture systems for in vitro plant propagation**. p.61-78. Springer, 2005.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; TANAKA, M. Multiple Regeneration Pathways via Thin Cell Layers in Hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 25, n. 3, p. 203-210. 2006.

TEIXEIRA, J. A. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 2, n. December, p. 683-691, 2003.

THORPE, T; STASOLLA, E. C.; YEUNG, G-J. et al. The Components of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions , Osmotic and pH Effects , and Support Systems. In: E. F. George; M. A.Hall; G.-J. D.

Klerk (Eds.); **Plant Propagation by Tissue Culture**. p.115-174. Springer, 2008.

TOKUHARA, K. E. N.; MII, M. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (ORCHIDACEAE). **In Vitro**, n. August, p. 457-461. 2001.

TOKUHARA, K.; MII, M. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 6, p. 635-639. 2003.

TRÁVNÍČEK, P.; KUBÁTOVÁ, B.; CURN, V. et al. Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. **Annals of botany**, v. 107, n. 1, p. 77-87. 2011.

TSAVKELOVA, E. A.; BÖMKE, C.; NETRUSOV, A. I.; WEINER, J.; TUDZYNSKI, B. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 45, n. 10, p. 1393-403. 2008.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; KLIMOVA, S. Y. et al. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. **Archives of microbiology**, v. 188, n. 6, p. 655-64. 2007.

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L. et al. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of botany**, v. 104, n. 3, p. 417-30. 2009.

VASUDEVAN, R.; STADEN, J. Cytokinin and explant types influence in vitro plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, n. 1, p. 123-129. 2011.

VERECKEN, N. J.; COZZOLINO, S.; SCHIESTL, F. P. Hybrid floral scent novelty drives pollinator shift in sexually deceptive orchids. **BMC evolutionary biology**, v. 10, p. 103. 2010.

VEROLA, C. F.; SEMIR, J. *Hoffmannseggella viridiflora* (Orchidaceae, Laeliinae), a New Species from Brazilian Campos Rupestres. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 17, n. 1, p. 125-129. 2007.

YANG, M.; LOH, C. S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. **BMC cell biology**, v. 5, p. 33. 2004.

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

ZIV, M. Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. **Horticultural Reviews**, v. 24, p. 01-30. 2000.

**CAPÍTULO 2 – INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE
ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS EM
*Cattleya tigrina***

RESUMO

A indução e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (ESP) é uma técnica muito utilizada para a clonagem *in vitro* de orquídeas, apresentando inúmeras vantagens em relação aos métodos tradicionais de propagação assexuada. É um método rápido e eficiente que garante a produção de mudas com alta qualidade genética e sanitária, permitindo também a automatização do processo pelo uso de biorreatores. A eficiência desta técnica depende de altos índices de indução e multiplicação dos ESP e, posteriormente, de uma boa taxa regenerativa. Esta rota morfogênica vem sendo amplamente utilizada para diversos gêneros e híbridos comerciais de orquídeas. No entanto, em *Cattleya tigrina*, espécie nativa da mata atlântica com grande valor ornamental, a regeneração dos ESP em plantas é um processo lento e assíncrono, que dificulta a obtenção de um protocolo eficiente e adequado para a produção massal e escalonada de mudas clonadas. Neste trabalho foi avaliado o uso de diferentes condições de cultivo, tipos de explante, região do explante e uso da técnica da camada fina de células (*TCL*) na indução de ESP em *C. tigrina*. Foi avaliado também o efeito de diferentes períodos de desidratação de ESP e o uso de biorreatores de imersão temporária, no incremento de massa fresca e número de brotos formados a partir de ESP de *C. tigrina*. A região basal dos explantes foliares apresentou maiores percentuais de indução de ESP quando comparada com as outras regiões dos explantes. O maior percentual de indução (37,8%) foi verificado no meio suplementado com 9 μ M de TDZ, porém não diferenciou-se da combinação de TDZ (3 μ M) + AIB (1 μ M). Não houve diferença no percentual de indução entre explantes foliares íntegros ou seccionados em *TCL* e em explantes radiculares a indução foi nula. A adição de GA₃ ao meio de cultura promoveu a formação de brotos mais diferenciados, alongados e em maior número, independente da concentração testada. O incremento de massa fresca foi diretamente proporcional às concentrações de sacarose testadas e inversamente proporcional às de GA₃, não havendo interação entre os fatores. A desidratação das ESP previamente a inoculação resultou em maior incremento de massa fresca, apesar de não ter influenciado no número de brotos formados. O subcultivo dos brotos em biorreatores de imersão temporária resultou em maior incremento de massa fresca quando comparado com o sistema de imersão contínua, apesar de este dado não estar ligado ao número ou tamanho de plantas, mas sim a

formação de novas ESP. Em suma, foi possível estabelecer um protocolo eficiente para a indução e regeneração de ESP em *C. tigrina*, sendo que com alguns ajustes este pode ser aplicado na clonagem massal e automatizada desta espécie com a obtenção de altos índices regenerativos.

ABSTRACT

The induction and regeneration of protocorm-like bodies (PLB) is a technique widely used for *in vitro* orchid cloning, presenting several advantages when compared to traditional asexual propagation methods. It is a quick and efficient method, which produces plants with high genetic and sanitary quality, and it also allows automation by the use of bioreactors. The efficiency of these techniques depends on high PLB induction and multiplication levels, and on adequate plantlet regeneration rates. This morphogenetic pathway is been extensively applied for several orchid genera and commercial hybrids propagation. However, for *Cattleya tigrina*, a native orchid of Brazilian Atlantic Rainforest with high ornamental value, the PLB/plantlet regeneration is a low and asynchronous process, difficulting the establishment of an efficient protocol obtention for this species. In this study has been tested different culture conditions, explant types and regions, and the use of the thin cell layer technique (TCL), on *C. tigrina* PLB induction. It was also tested PLB dehydration and the use of temporary immersion bioreactors on PLB fresh weight and shoot number. Leaf basal region showed the highest PLB induction rates when compared with other explant regions. Medium supplemented with TDZ (9 μ M) presented the highest PLB induction rates (37,8%), not significantly different from the TDZ (3 μ M) + AIB (1 μ M) combination. No differences in PLBs induction rates between entire or TCL leaf explants were detected. No PLBs were found when root explants were used. PLB cultivated on GA₃ supplemented media, irrespective of the concentration, gave rise to a higher number of shoots, which were more differentiated and elongated. Fresh weight increment was directly proportional to sucrose and inversely proportional to GA₃ concentrations, with no positive interaction between both. Dehydration of the PLB previously to the inoculation, resulted in higher fresh weight increment, but no influence on shoot number was detected. The use of bioreactors on shoot subculture were found to double the fresh weight increment, besides the data were correlated with new PLB formation, and not with plantlet growth. With this research it was possible to establish an efficient PLB induction and regeneration protocol for large scale automated micropropagation of *C. tigrina*.

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é a mais numerosa das angiospermas com cerca de 26 mil espécies segundo o *world checklist of selected plant families* (2012). No Brasil, de acordo com a Lista das Espécies da Flora do Brasil (2012), são descritas pouco mais de 2,4 mil espécies de orquídeas, sendo que 67% delas são consideradas endêmicas. Além do valor ecossistêmico, grande parte das orquídeas constituem-se em importantes recursos genéticos devido ao seu valor ornamental.

O cultivo de orquídeas sempre demandou tecnologias a frente do seu tempo, e as biotecnologias aplicadas a esta família foram sempre inovadoras quando comparadas a outras plantas (ARDITTI, 2008, 2010). O cultivo de orquídeas *in vitro* teve início com a germinação simbiótica de sementes por Noël Bernard (ARDITTI, 2010), mas somente após o trabalho de Knudson (1922) com germinação assimbiótica de sementes de orquídeas *in vitro* o cultivo dessas plantas teve um grande salto, a partir do qual foi possível o desenvolvimento de híbridos e a produção de mudas em larga escala.

Desde então a necessidade de fixação de ganho genético passou a ser um dos pontos mais importantes. Desde o primeiro trabalho com cultivo de meristemas (ROTOR, 1949) e da famosa publicação de Morel em 1960, com limpeza viral em *Cymbidium* (TORRES et al., 1998), a clonagem de orquídeas *in vitro* passou a ser intensamente investigada na busca por protocolos eficientes, uma vez que a propagação assexual por divisão de rizoma é um processo lento, que leva em média dois anos (FARIA et al., 2006), não tendo, portanto, aplicação comercial.

Georges Morel utilizou o termo *protocorm-like bodies* ao se referir às estruturas somáticas de orquídeas obtidas *in vitro* devido à semelhança destas com os embriões (protocormos) de origem zigótica (ARDITTI, 2008). Desde então, este termo (estruturas semelhantes a protocormos ou ESP, em português) vem sendo amplamente utilizado, apesar de grande polêmica acerca da natureza dessas estruturas. Existe grande número de protocolos disponíveis para um grande número de espécies e híbridos comerciais, e o que se observa é que cada espécie, possui padrões específicos de resposta. Desta maneira para cada nova espécie que se deseja explorar, ou a cada novo híbrido que se deseja propagar, novos protocolos devem ser desenvolvidos ou adaptados de forma a tornar o processo eficiente e barato para que as plantas produzidas tenham preços competitivos no mercado. A principal

vantagem desta técnica, além da produção de propágulos em progressão geométrica, esta na possibilidade de automatização do protocolo.

A maior parte das publicações indica que as citocininas são mais eficientes na indução de ESP em diversas espécies Chung et al. (2007); Nayak et al. (2002) e Park et al. (2003), entre elas o Thidiazuron (TDZ), uma feniluréia, parece ser a mais eficaz. No entanto, a eficiência de um protocolo depende também de uma boa taxa regenerativa. Esta etapa é ignorada na maioria dos protocolos disponíveis, onde normalmente é sugerido que a transferência das ESP para meios livres de fitoreguladores é suficiente para a obtenção de plantas (CHEN; CHANG, 2006; CHUNG et al., 2005; KUO et al., 2005; PARK et al., 2003).

Para *Cattleya tigrina*, espécie nativa com grande valor ornamental, apesar de não existirem protocolos de clonagem disponíveis, observações preliminares tem indicado que a regeneração das ESP é um processo lento e assíncrono, que dificulta a obtenção de um protocolo eficiente e passível de automatização.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo regenerativo *in vitro* para *C. tigrina*, baseado em estruturas semelhantes a protocormos, visando a propagação clonal da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis. Em todos os experimentos envolvendo a espécie *Cattleya tigrina* foi utilizado material vegetal de mesma origem genética, proveniente de plantas jovens, mantidas *in vitro*, obtidas por meio da regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (ESP), conforme metodologia detalhada a seguir.

2.1. OBTENÇÃO DE MATERIAL DE MESMA ORIGEM GENÉTICA

ESP foram obtidas a partir de folhas (ca. 1,0cm de comprimento) de plantas jovens, com 5 a 7 folhas cada, mantidas *in vitro*, obtidas por meio da germinação assimbiótica de sementes. Essas plantas foram gentilmente cedidas por orquidófilos da Associação dos Orquidófilos de Florianópolis (ASSOF), senhores Gilmar, Ernesto e Luiz G. Cordeiro. As folhas foram inoculadas com a face abaxial em contato com meio de cultura basal (MSB) adaptado e modificado de (CHEN; CHANG, 2000).

O meio MSB é constituído pela formulação salina de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificada, contendo metade da concentração dos macro e micronutrientes e suplementado com: Vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), peptona de soja (1g.L^{-1}), NaH_2PO_4 (170mg.L^{-1}), sacarose (20g.L^{-1}) e com pH ajustado para 5,2 com HCl (0,5N) e NaOH (0,5N). Para a indução inicial das ESP este meio foi suplementado com TDZ ($20\mu\text{M}$) antes do ajuste do pH, seguido pela adição de Phytigel (2g.L^{-1}) e da Esterilização a 121°C e 1,1 atm por 15 minutos.

ESP induzidas nos explantes foliares foram selecionadas e subcultivadas sucessivamente para a obtenção de explantes de mesma constituição genética. O meio utilizado nessa fase foi o mesmo descrito anteriormente, com a concentração de TDZ reduzida para $1\mu\text{M}$. Os subcultivos foram realizados a cada 10 semanas, em frascos de vidro com 300ml de capacidade, contendo 30mL de meio de cultura.

Os brotos foram obtidos através do subcultivo sucessivo das ESP em meio de cultura sem reguladores de crescimento. Este

procedimento consistiu da seleção repetida de porções das ESP mais diferenciadas em brotos, e seu subcultivo a cada 8 semanas até a obtenção de brotos com 3 a 5 folhas, o que ocorreu após 4 a 5 subcultivos. A seleção a cada subcultivo foi necessária devido à natureza assíncrona do processo regenerativo das ESP em brotos.

O meio utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com metade da concentração dos macronutrientes e suplementado com: Vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951), carvão ativado ($1,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), e sacarose ($30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). O pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,5N) e NaOH (0,5N) antes da adição de ágar ($7,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e da esterilização a 121°C e 1,1 atm por 15 minutos. Foram utilizados frascos de vidro com 30ml de meio de cultura cada.

2.2. INDUÇÃO DE ESP EM *Cattleya tigrina*

2.2.1. Explantes

Foram utilizadas folhas e raízes (ca. de 1cm) de plantas obtidas conforme procedimento descrito no item 2.1. Para avaliar a aplicação da técnica da camada fina (*Thin Cell Layer Technique - TCL*) as folhas foram ou não seccionadas transversalmente em camadas de $\pm 1,6$ mm de espessura, e inoculadas com a face abaxial em contato com o meio de cultura. Raízes foram seccionadas da mesma maneira, do ápice (coifa) para a base, priorizando as que mostravam crescimento ativo. Com o objetivo de avaliar a indução em diferentes partes dos explantes, as secções de folhas e raízes foram inoculadas na mesma posição em que ocupavam no explante íntegro (**Figura 3**).

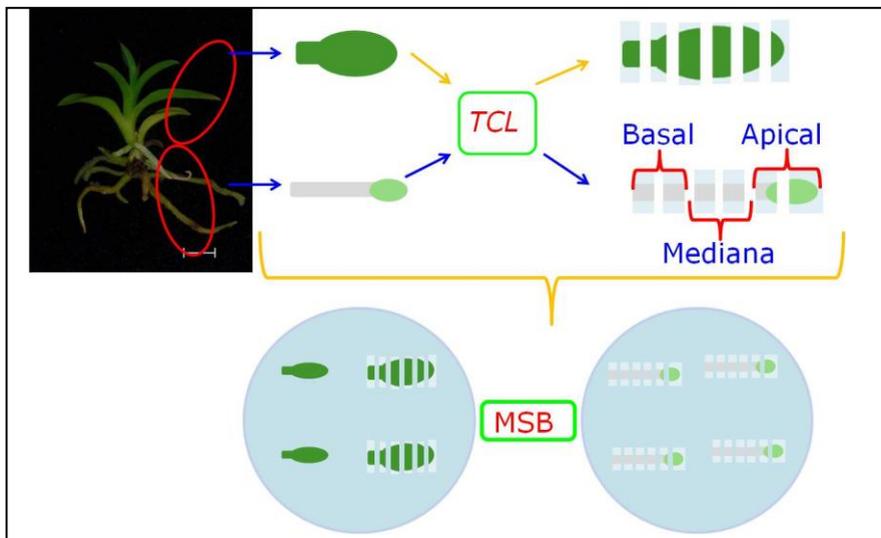


Figura 3: Esquema representativo do preparo dos explantes para a indução de estruturas semelhantes à protocormos.

2.2.2. Meios de cultura

Foi utilizado o meio de cultura basal MSB descrito anteriormente. Para a comparação da metodologia de *TCL* com o uso de explantes foliares íntegros o meio foi suplementado com diferentes concentrações de TDZ (0, 1, 3 ou 9 μ M). Para as folhas e raízes em *TCL* o meio foi suplementado com 3 μ M de TDZ combinado ou não com AIB (1 μ M), além de um tratamento controle sem reguladores de crescimento.

O pH foi ajustado para 5,2 com HCl (0,5N) e NaOH (0,5N) antes da adição de Phytigel (2g.L⁻¹) e da Esterilização a 121°C e 1,1 atm por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar os meios de cultura foram vertidos em placas de petri (15x90mm) com 20ml de meio por placa, posteriormente seladas com três camadas de filme de PVC. Após a inoculação dos explantes as placas foram mantidas em câmaras tipo B.O.D, na ausência de luz, com temperatura de 25 \pm 2°C.

2.2.3. Delineamento experimental

Foi avaliada a indução de ESP em relação à condição de cultivo (meio de cultura), tipo de explante (folhas e raízes), região do explante, e em relação ao uso de explantes foliares íntegros ou seccionados em *TCL*. Para avaliar a indução em diferentes regiões do explante, as folhas e raízes foram divididas em três regiões (basal, mediana e apical), cada uma composta por duas *TCL* nos explantes seccionados. As combinações de condição de cultivo, tipo de explante de cada comparação, e o número de repetições de cada tratamento estão resumidas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Combinações de meios de cultura e tipo de explante utilizados no experimento de indução de ESP de *Cattleya tigrina* e respectivos tamanhos amostrais.

	Controle	Meio de cultura			
		TDZ 1 μ M	TDZ 3 μ M	TDZ 9 μ M	TDZ 3 μ M + AIB 1 μ M
Folha íntegra	n=20	n=23	n=24	n=22	n=0
Folha <i>TCL</i>	n=36	n=23	n=40	n=23	n=16
Raiz <i>TCL</i>	n=16	n=0	n=16	n=0	n=16

n= número de explantes, considerando o explante como uma folha ou raiz íntegra, independente do número de *TCL*.

Para minimizar a influência de variações aleatórias o experimento foi implantado e conduzido em delineamento em blocos completos casualizados (BCC), que foram desconsiderados para a avaliação. Dados de porcentagem de indução entre os diferentes tratamentos foram coletados 8 semanas após a implantação e comparados com tabelas de contingência e testes de χ^2 ($p \leq 0,05$) com auxílio do software Statgraphics 7.0. A unidade amostral variou conforme a comparação. Para as avaliações entre as condições de cultivo, tipo de explante e quanto ao uso de explantes foliares íntegros ou seccionados em *TCL*, a unidade amostral foi constituída de um explante (folha ou raiz). Nas comparações entre as regiões dos explantes, duas *TCL* foram consideradas como uma unidade amostral.

2.3. EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA EFICIÊNCIA DE REGENERAÇÃO DE ESP DE *Cattleya tigrina*

2.3.1. Efeitos das concentrações de GA3 e sacarose

Ensaio 1: ESP de mesma origem genética, obtidas conforme descrito no item 2.1, foram inoculadas em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 10ml de meio de cultura MSB suplementado com diferentes concentrações de ácido giberélico - GA₃ (0, 5, 10 ou 15µM) combinadas com diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 15 ou 20g.L⁻¹), totalizando 16 tratamentos. O meio foi geleificado com 2g.L⁻¹ de Phytigel.

Ensaio 2: Com base nos resultados do ensaio 1, foi realizado um segundo experimento com modificações nas concentrações de GA₃ (0; 0,03; 0,3; e 3µM) combinados com sacarose (1, 10 e 20g.L⁻¹) totalizando 12 tratamentos. Diferentemente do primeiro experimento, foi utilizado meio de consistência líquida, com os explantes inoculados sobre ponte de papel filtro, e o método de esterilização do GA₃ foi modificado para a filtro-esterilização em membrana de 0,22µm, ao invés da autoclavagem juntamente com o meio de cultura.

Em ambos os experimentos o pH foi ajustado para 5,2 e o meio esterilizado a 121°C e 1,1 atm durante 15 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 25±2°C, fotoperíodo de 16h de luz e intensidade luminosa média de 50-60µmol.m⁻².s⁻¹.

Os experimentos foram implantados em delineamento em blocos completos casualizados (BCC) em esquema bifatorial 4x4 e 3x4, respectivamente, com 4 blocos e unidade amostral de 3 tubos de ensaio com 150±11,5mg de ESP cada para o primeiro experimento e 50±13mg para o segundo. As concentrações de sacarose combinadas com as doses de GA₃ constituíram os 16 tratamentos do primeiro experimento e os 12 no segundo.

Após 20 semanas de cultivo foram coletados os dados de: incremento de massa fresca (IMF), igual a diferença entre a massa fresca final e a massa fresca inicial; número de brotos ≥5mm com presença de primórdios foliares (NB), e presença de raízes adventícias. Seguindo recomendações de Compton (1994), os dados foram transformados em log x+2, a homogeneidade de variâncias verificada pelo teste de F-máximo, e foi procedida a análise de variância (ANOVA) e, quando

necessário, teste de SNK ($p=0,05$) com auxílio do software Statgraphics 7.0. Dados de porcentagem foram comparados com tabelas de contingência e testes de χ^2 ($p\leq 0,05$).

2.3.2. Efeitos da desidratação das ESP

Baseando-se na observação de que porções de ESP sob estresse hídrico apresentavam maior diferenciação, foi avaliado o efeito da desidratação prévia das ESP na eficiência regenerativa destas. Para isso as ESP ($38\pm 7,5$ mg de massa fresca) foram submetidas a um processo programado de desidratação em sílica gel estéril por períodos de (0, 30, 120, 180 e 360 min.) e inoculadas sobre pontes de papel filtro em tubos de ensaio (25x150mm), contendo 15ml de meio MSB de consistência líquida suplementado com $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e pH ajustado para 5,2. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de $25\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16h de luz, e intensidade luminosa média de $50\text{-}60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

O experimento foi implantado em BCC com 4 blocos e unidade amostral de 5 tubos de ensaio com um inoculo inicial cada. Após 20 semanas de cultivo foram coletados dados de IMF, número de brotos ≥ 2 mm e número de brotos ≥ 4 mm. Os dados foram transformados em $\log x+2$, a homogeneidade de variâncias foi verificada pelo teste de F-máximo, e foi procedida a ANOVA e, quando necessário, teste de SNK ($p=0,05$) com auxílio do software Statgraphics 7.0. Dados de porcentagem foram comparados com tabelas de contingência e testes de χ^2 ($p\leq 0,05$).

2.3.3. Efeitos do sistema de imersão no subcultivo de microbrotos

Brotos (≥ 5 mm) resultantes do primeiro experimento, mais especificamente do tratamento contendo sacarose ($10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e GA_3 ($15\mu\text{M}$), foram selecionados e foi avaliado o subcultivo nos sistemas de imersão contínua e temporária. Os brotos foram selecionados e subcultivados em frascos de vidro com 300ml de capacidade ou em biorreatores de imersão temporária modelo RITA[®]. Foram inoculados 8 brotos por frasco e 24 brotos por aparato RITA[®].

Foi utilizado meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose. O meio foi geleificado com $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Phytigel no caso do sistema de imersão contínua. O pH foi

ajustado para 5,2 antes da autoclavagem a 12°C e 1,1 atm durante 15 min. Foram utilizados 30ml de meio de cultura em cada frasco e 200ml em cada aparato RITA®.

Foi utilizado delineamento em BCC com 5 blocos e unidade amostral composta por 3 frascos para cada aparato RITA, totalizando 24 explantes por unidade amostral. Depois de 24 semanas em cultura foram coletados dados de IMF e foi avaliado o crescimento dos brotos. Os dados foram transformados em $\log x+2$, a homogeneidade de variâncias foi verificada pelo teste de F-máximo, procedida por ANOVA e, quando necessário, teste de SNK ($p=0,05$) com auxílio do software Statgraphics 7.0.

3. RESULTADOS

3.1. INDUÇÃO DE ESP EM *Cattleya tigrina*

A formação de ESP iniciou com pequenas erupções na epiderme da região basal dos explantes foliares e foram observadas cerca de quatro semanas após a inoculação. A evolução para estruturas globulares de cor branco leitosa foram observadas após 6-8 semanas da inoculação (**Figura 4B**). Essas estruturas, isoladamente, possuíam formato globular similar a um protocormo de origem zigótica nos estádios iniciais em desenvolvimento, que neste trabalho foram denominadas de estruturas semelhantes a protocormos (ESP). A partir das estruturas primárias, originadas diretamente a partir do tecido do explante, observou-se a formação de ESP secundárias, entre 8-12 semanas após a inoculação. Estas estruturas cresceram umas sobre as outras dando ao conjunto um aspecto de tecido indiferenciado, similar ao de calos, mas de estrutura firme e não friável. Em alguns explantes foi observada a formação direta de raízes ou brotos, aparentemente por organogênese (**Figura 4E-F**). A formação destes órgãos ocorreu apenas na região basal dos explantes, podendo ter origem de gemas axilares destacadas das plantas juntamente com a base das folhas.

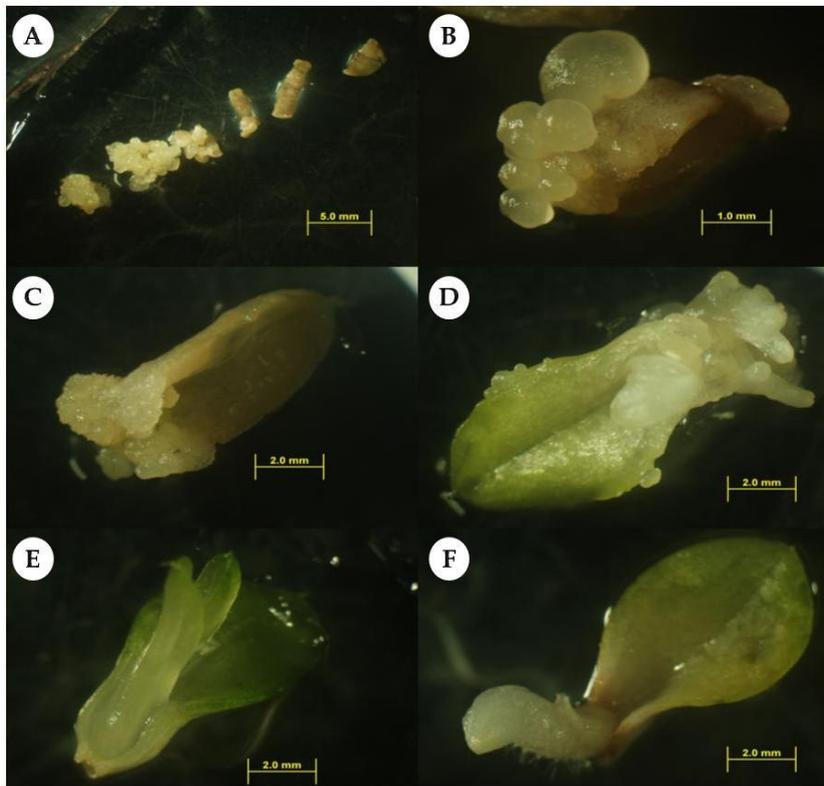


Figura 4: Indução de ESP a partir de explantes foliares de *C. tigrina* oito semanas após a inoculação. A) Folha seccionada em *TCL*, com ESP induzidos em três camadas finas, duas da região basal e uma da mediana; B) Detalhe de ESP induzidas em *TCL* da região basal de explante foliar. Notar a origem direta dos ESP a partir da epiderme do explante; C e D) ESP induzidas na base de explantes foliares íntegros. Notar a indução mais acentuada na região basal em comparação com outras partes da folha em D; E e F) Detalhe da formação direta de brotos e raízes na base dos explantes foliares pela via organogenética.

Nos explantes radiculares foi observado um leve crescimento na região apical (coifa) e na superfície ferida de *TCL* da região apical (Figura 5B-D). No entanto, este crescimento não apresentou evolução e após cerca de 30 dias nenhum explante radicular apresentava qualquer

sinal de resposta, tanto de indução de ESP como organogênética, independente do meio de cultura e da região do explante.

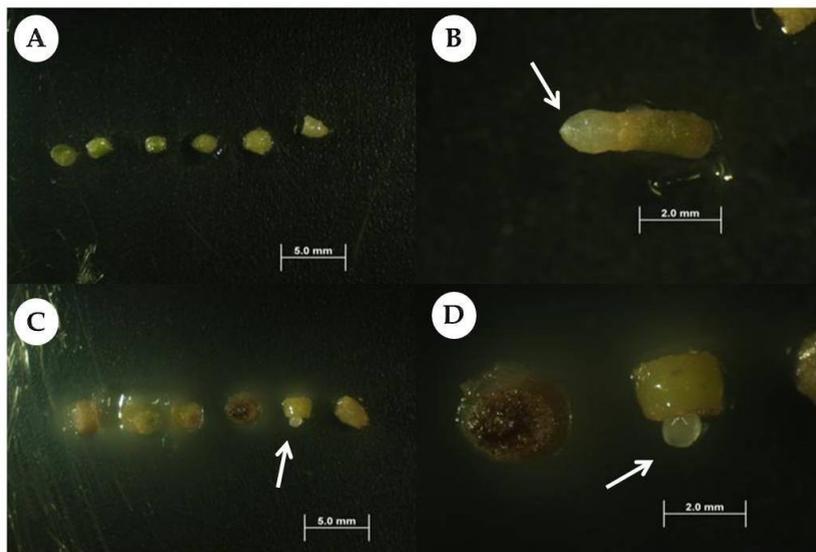


Figura 5: A) Explante radicular de *C. tigrina*, consistindo de segmento de 1 cm da porção distal da raiz, não apresentando qualquer resposta de crescimento ou indução; B) Detalhe de TCL da região apical (coifa) mostrando leve crescimento (seta); C-D) Detalhe da única TCL em que houve a formação de estrutura globular (setas) a partir de tecido interno, exposto devido ao seccionamento da raiz.

A região basal dos explantes foliares apresentou a maior e significativa ($p=9,3.10^{-8}$) porcentagem de indução quando comparada a região mediana (**Tabela 2**). Apenas alguns explantes apresentaram indução fora da região basal ou mediana, sendo que na região apical houve apenas 0,9% de indução, e esta ocorreu somente no tratamento com maior concentração de TDZ ($9\mu\text{M}$). Foi observado que todos os explantes com indução de ESP na região mediana ou apical também apresentavam indução na base, e em geral mais pronunciada. Isto mostra que a região basal da folha é a mais responsiva para a formação de ESP em *C. tigrina*. Não houve diferença de indução entre explantes foliares

íntegros ou seccionados em *TCL* ($p= 1$), mesmo quando cada *TCL* foi considerada como uma repetição.

Tabela 2: Porcentagem de indução de ESP de *C. tigrina* em relação à região do explante foliar e a suplementação do meio de cultura com fitorreguladores.

Meio de cultura	Indução de ESP (%)		
	Região do explante		
	Basal	Mediana	Geral
Controle	5,4	0,0	5,4 b
TDZ 1 μ M	15,2	0,0	15,2 b
TDZ 3 μ M	10,9	1,6	10,9 b
TDZ 9 μ M	37,8	8,9	37,8 a
TDZ 3 μ M + AIB 1 μ M	37,5	0,0	37,5 a
Média	21,4 A	2,1 B	

Valores entre colunas (letras minúsculas) ou linhas (maiúsculas) acompanhados de letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com comparações em tabelas de contingência e testes de χ^2 ($p \leq 0,05$).

As diferentes composições de meios de cultura resultaram em taxas de indução significativamente diferentes ($p=5.10^{-5}$). Em todos os tratamentos houve indução de ESP, mesmo no tratamento controle, onde 5,4% dos explantes apresentaram indução. Os meios suplementados com 1 ou 3 μ M de TDZ resultaram em valores intermediários de indução, entre os quais não houveram diferenças significativas ($p=0,26$). A suplementação do meio de cultura contendo TDZ (3 μ M) com 1 μ M de AIB aumentou a indução de ESP em 344%, frequência esta não significativamente diferente do meio suplementado com TDZ (9 μ M), para o qual a indução foi de 37,8%.

3.2. EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA EFICIÊNCIA DE REGENERAÇÃO DE ESP DE *Cattleya tigrina* A. RICH

3.2.1. Efeitos do GA₃ e sacarose

Todas as concentrações de GA₃ testadas inicialmente se mostraram tóxicas para as ESP, resultando na necrose total ou parcial do tecido. Os sintomas de toxidez foram proporcionais às concentrações de

GA₃, sendo menores na concentração de 5µM e ausentes nos meios isentos de GA₃, independente da concentração de sacarose. Na **Figura 6** é mostrado um exemplo representativo dos sintomas de toxidez observados.

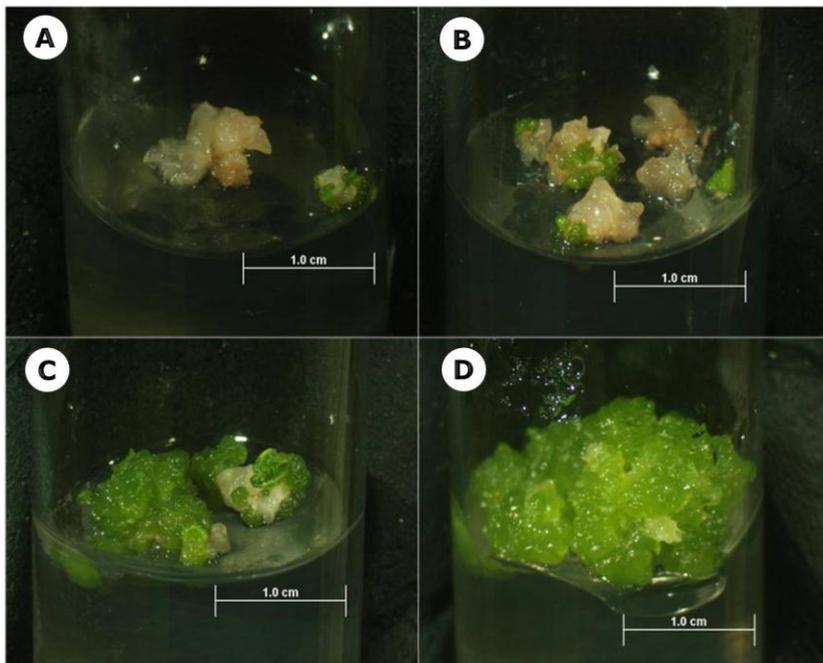


Figura 6: Sintomas de toxidez em ESP de *C. tigrina* cultivados em meio MS suplementados com sacarose (10g.L⁻¹) e diferentes concentrações de GA₃: A) 15µM; B) 10µM; C) 5µM e D) 0µM. Fotos realizadas cerca de seis semanas após a inoculação.

O incremento de massa fresca foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de GA₃ no meio de cultura (**Figura 7**). No entanto, este efeito não foi observado com o aumento da concentração de sacarose (**Figura 8**). A toxidez causada pelo GA₃ refletiu em um menor IMF nas ESP cultivadas na sua presença. Essa relação foi proporcional às doses de GA₃ utilizadas, mas também as concentrações de sacarose.

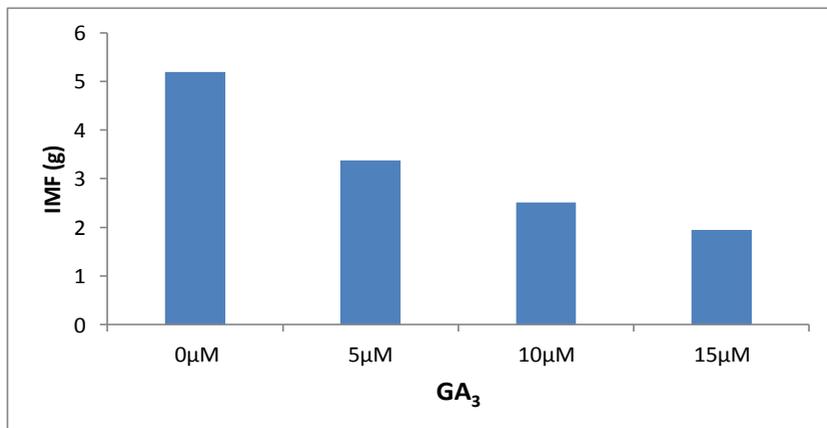


Figura 7: Efeitos de diferentes concentrações de GA₃ no incremento de massa fresca (IMF = massa fresca final – massa fresca inicial) de ESP (150mg) de *C. tigrina*, 20 semanas após a inoculação. Dados de IMF em gramas (g).

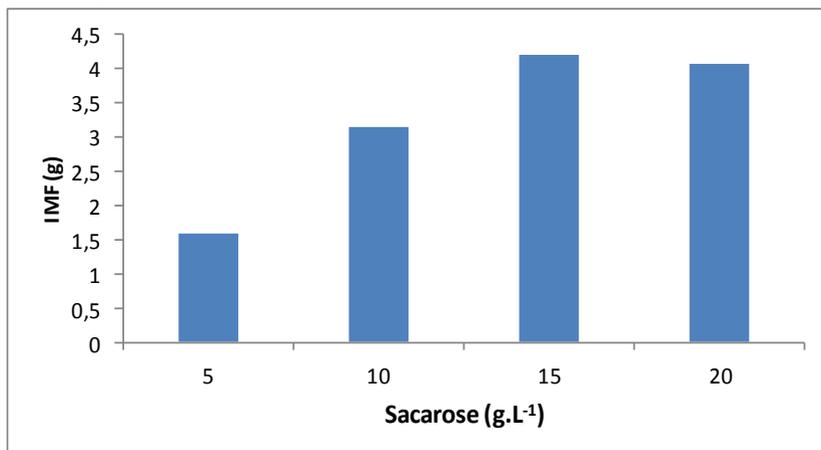


Figura 8: Influência de diferentes concentrações de sacarose no IMF (g) de ESP (150mg) de *C. tigrina*, 20 semanas após a inoculação.

Apesar da toxidez nos meios com GA₃, foi observado que após 10 semanas, as porções de ESP sobreviventes passaram a apresentar elevado alongamento. As ESP cultivadas em meio com GA₃, quando

comparadas às cultivadas na sua ausência, eram mais diferenciadas e alongadas, independente da concentração de sacarose (**Figura 9**).

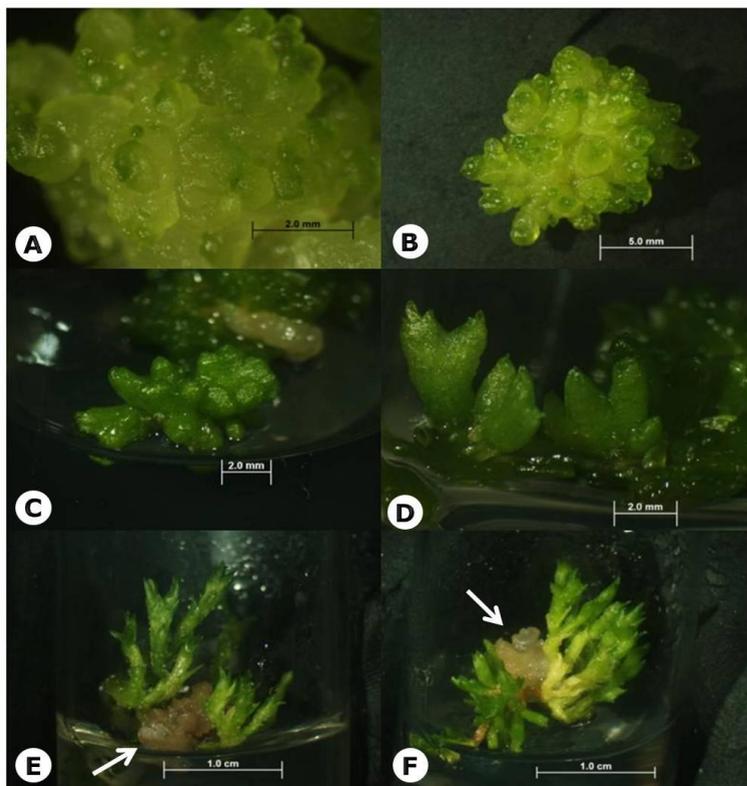


Figura 9: Início da formação dos brotos de *C. tigrina* a partir de ESP em meios de cultura com diferentes concentrações de GA_3 e sacarose. A-B) ESP cultivadas em meio isento de GA_3 e com 20 e $5g.L^{-1}$ de sacarose, respectivamente; C-D) Alongamento e formação inicial de brotos na presença do GA_3 no meio de cultura; E-F) Brotos formados na presença de GA_3 . Notar a necrose da maior parte do inoculo inicial (setas) e a origem dos brotos a partir de pequenas porções de ESP não afetadas pela toxidez.

Após 20 semanas de cultivo brotos regenerados na presença de GA_3 eram mais alongados, e com primórdios foliares mais bem formados, quando comparados aos originados na sua ausência. Também foi observado que plantas com raízes e folhas bem formadas só foram

obtidas na presença de GA_3 e na menor concentração de sacarose ($5g.L^{-1}$) (Figura 10A-B).



Figura 10: Brotos *C. tigrina* obtidos a partir de ESP após 20 semanas de cultivo em meio MSB com diferentes concentrações de GA_3 e sacarose. A-B) Brotos bem formados, com presença de folhas e raízes, observados apenas na menor concentração de sacarose testada ($5g.L^{-1}$) e na presença de GA_3 ; C) Agregado de brotos formados em meio com sacarose ($20g.L^{-1}$) e GA_3 ($15 \mu M$). Notar que todos ramificam de único local (seta); D-E) Brotos e estruturas má formadas, as quais não foram contabilizadas; F) Exemplo geral dos brotos obtidos em meio suplementado com GA_3 .

O número de brotos foi maior na presença de GA_3 , mesmo que o incremento de massa fresca tenha se comportado de forma inversa. Isso significa que o maior incremento de massa fresca dos meios sem GA_3 foi devido à formação de novas ESP e não da maior diferenciação

de brotos. Em todas as concentrações de sacarose testadas houve um aumento do número de brotos quando o GA₃ estava presente, sendo este também proporcional às concentrações de sacarose testadas (**Figura 11**).

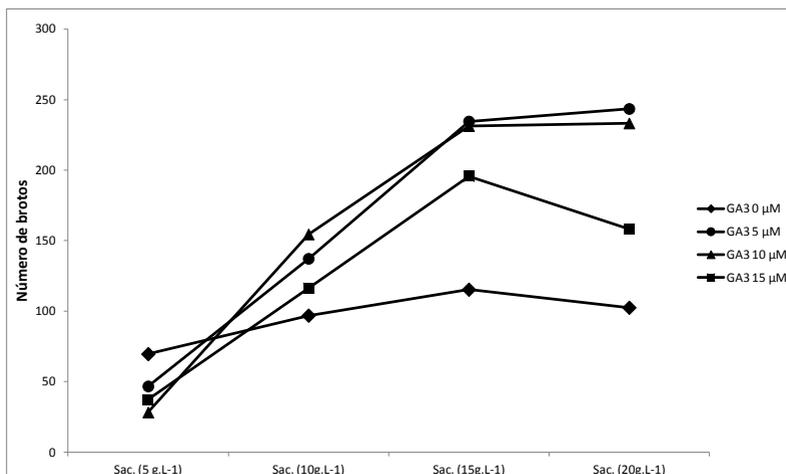


Figura 11: Número médio de brotos de *C. tigrina* regenerados a partir de 150mg de ESP após 20 semanas de cultivo em diferentes concentrações de GA₃ e sacarose.

Houve interação positiva entre as concentrações de sacarose e GA₃ testadas para a variável número de brotos, sendo que o melhor resultado ocorreu na combinação de 20g.L⁻¹ de sacarose com 5μM de GA₃, na qual foram obtidos em média 244 brotos por 150mg de ESP. Para o incremento de massa fresca não houve interação positiva entre os fatores, sendo que esta variável se comportou de forma inversamente proporcional as concentrações de GA₃ e diretamente proporcional as concentrações de sacarose, não havendo diferença significativa entre 15 e 20g.L⁻¹ (**Tabela 3**).

Tabela 3: Número médio de brotos e incremento de massa fresca (IMF) de ESP (150mg) de *C. tigrina* 20 semanas após a inoculação em meios de cultura com diferentes combinações de GA₃ e sacarose.

	Nº de brotos				Média	IMF (g)				
	Sacarose (g.L ⁻¹)					Sacarose (g.L ⁻¹)				
	5	10	15	20		5	10	15	20	Média
GA ₃ 0µM	70 (ef)	97 (de)	115 (bcde)	103 (cde)	96,25	3,2	4,9	6,1	6,6	5,2 (A)
GA ₃ 5µM	47 (fg)	137 (abcd)	235 (ab)	244 (a)	165,75	1,4	3,7	4,3	4,1	3,4 (B)
GA ₃ 10µM	28 (g)	155 (abcd)	231 (abc)	233 (ab)	161,75	1,0	2,7	3,4	2,9	2,5 (C)
GA ₃ 15µM	37 (g)	116 (bcde)	196 (abcd)	158 (abcd)	126,75	0,8	1,3	3,0	2,7	1,9 (D)
Média	45,5	126,25	194,25	184,5		1,6 (C)	3,2 (B)	4,2 (A)	4,1 (A)	
CV(%)=			6,55					13,50		

Médias acompanhadas de letras maiúsculas nas linhas e colunas, ou minúsculas na interação entre os fatores, indicam diferenças significativas de acordo com o teste de SNK (p=0,05). Dados transformados em log(x+2) para análise estatística. Os dados da tabela correspondem aos dados originais não transformados. CV(%)= coeficiente de variação experimental.

A observação de toxidez nas doses de GA₃ testadas e de maior número de brotos de ESP cultivadas na sua presença, mesmo com boa parte do inoculo inicial afetado pela toxidez, levaram a realização do segundo experimento com ajustes nas concentrações de GA₃ e no tamanho do inoculo inicial, que foi reduzido para um terço do anterior. Com a redução das concentrações de GA₃ os sintomas de toxidez não foram mais observados e o comportamento das ESP em relação ao número de brotos foi basicamente o mesmo, sendo este maior na presença do GA₃ e nas maiores concentrações de sacarose, com interação entre os dois fatores como pode ser observado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Número médio de brotos formados e incremento de massa fresca de ESP de *C. tigrina* após 20 semanas de cultivo em meio líquido suplementado com diferentes concentrações de GA₃ e sacarose.

	Nº de brotos				Média	IMF (g)			
	Sacarose (g.L ⁻¹)					Sacarose (g.L ⁻¹)			
	1	10	20	Média		1	10	20	Média
GA ₃ 0µM	10 e	93 ab	147 ab	83	0,45 cd	2,23 ab	4,59 a	2	
GA ₃ 0,03µM	35 cd	70 bc	150 ab	85	0,42 cd	2,09 ab	4,20 a	2	
GA ₃ 0,3µM	30 cd	133 ab	180 a	114	0,49 cd	1,45 ab	3,39 a	2	
GA ₃ 3µM	20 e	135 ab	66 bc	73	0,27 d	1,08 bc	1,35 bc	0,90	
Média	24	107	136		406	1713	3383		
CV(%)=		9,2				7,5			

Médias acompanhadas de letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de erro de acordo com o teste de SNK. Os dados apresentados correspondem aos dados originais, os quais foram

transformados em $\log(x+2)$ para análise estatística. CV(%)= coeficiente de variação experimental.

Para as duas variáveis houve interação positiva entre os fatores, sendo que o meio de cultura com 20g.L^{-1} de sacarose e $0,3\mu\text{M}$ de GA_3 apresentou o melhor desempenho em ambos os casos. Ambas as variáveis se comportaram de maneira diretamente proporcional as concentrações de sacarose testadas (**Figura 12A e C**). No entanto, a variável IMF foi inversamente proporcional às concentrações de GA_3 e o número médio de brotos foi maior na presença de GA_3 na concentração de $0,3\mu\text{M}$, diminuindo bruscamente na concentração mais elevada (**Figura 12B e D**).

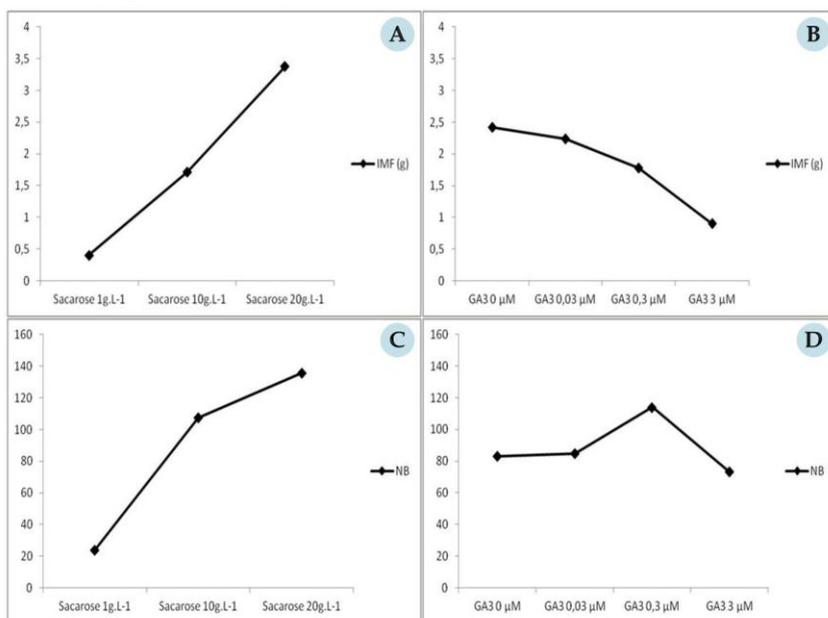


Figura 12: Comportamento das variáveis incremento de massa fresca (IMF) (A-B) e número de brotos (NB) (C-D) em relação a diferentes concentrações de GA_3 e sacarose avaliadas na regeneração de ESP de *C. tigrina*.

Com os resultados obtidos estima-se ser possível a obtenção de 3600 brotos para cada grama de ESP ao final de 20 semanas de cultivo.

3.2.2. Efeitos da desidratação das ESP na regeneração de brotos

Os diferentes períodos de desidratação tiveram influência direta na sobrevivência das ESP, a qual foi diretamente proporcional a estes (Figura 13). O tempo de 360 min. resultou na morte de mais de 90% dos explantes, o que não permitiu a avaliação das outras variáveis para este tratamento.

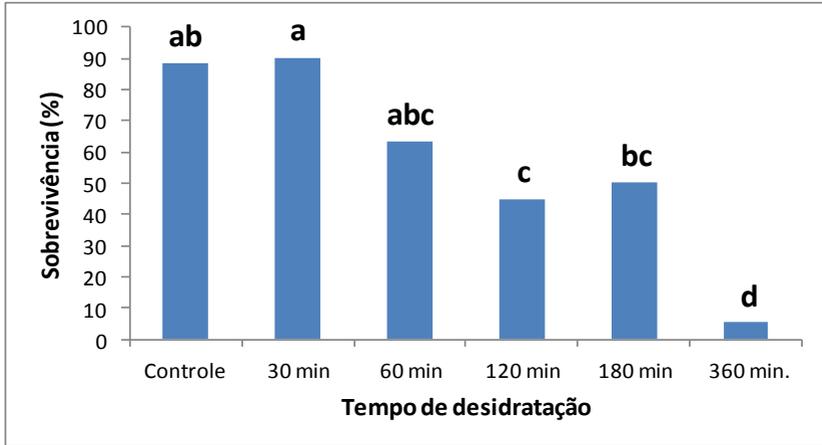


Figura 13: Porcentagem de sobrevivência de ESP em relação ao tempo de desidratação em sílica gel realizado antes da inoculação. Letras distintas na extremidade superior das colunas indicam diferenças significativas entre elas de acordo com comparações em tabelas de contingência e testes de χ^2 ($p \leq 0,05$). Dados coletados 20 semanas após a inoculação.

Com a coleta dos dados de massa fresca das ESP antes e depois do período de exposição à sílica gel, foi possível medir a desidratação delas em função dos tratamentos. A desidratação chegou a 60% da massa inicial com 120 minutos e mais de 70% com 180 minutos de exposição (Figura 14).

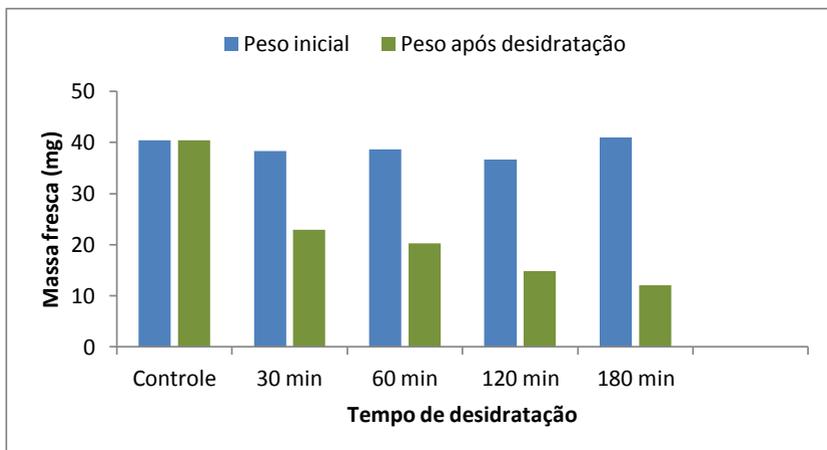


Figura 14: Redução da massa fresca inicial das ESP de *C. tigrina* em função do período de exposição à sílica gel.

Ao contrário do esperado, não houve diferenças significativas para o NB em função da desidratação das ESP, pelo menos no que diz respeito à realizada previamente a inoculação, não sendo observadas diferenças significativas em nenhuma das duas categorias de tamanho de brotos avaliadas. No entanto o IMF variou significativamente entre os diferentes tratamentos (**Tabela 5**).

Tabela 5: Incremento de massa fresca (IMF) e número médio de brotos (NB) de diferentes tamanhos formados 20 semanas após a inoculação de ESP de *C. tigrina* submetidas, previamente a inoculação, a diferentes períodos de desidratação em sílica gel.

	IMF (g)		NB \geq 2mm		NB \geq 4mm	
Controle	0,28	B	26,9		3,4	
30 min	0,33	AB	27,3		3,9	
60 min	0,34	AB	30		3,2	
120 min	0,49	A	34		5	
180 min	0,41	AB	28,6		2,9	
CV(%)	3,3		8,7		21	

Médias acompanhadas de letras distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas de acordo com o teste de SNK a 95% de confiabilidade. Os dados da tabela referem-se às médias originais, as quais

foram transformadas em $\log(x+2)$ para fins de análise estatística. CV(%)= coeficiente de variação experimental.

A desidratação prévia das ESP resultou em um aumento significativo no IMF após 20 semanas de cultivo. O melhor resultado foi obtido após duas horas de exposição, no qual o IMF foi 75% maior em relação ao tratamento controle (**Figura 15**), não sendo este significativamente diferente dos outros tratamentos (**Tabela 5**).

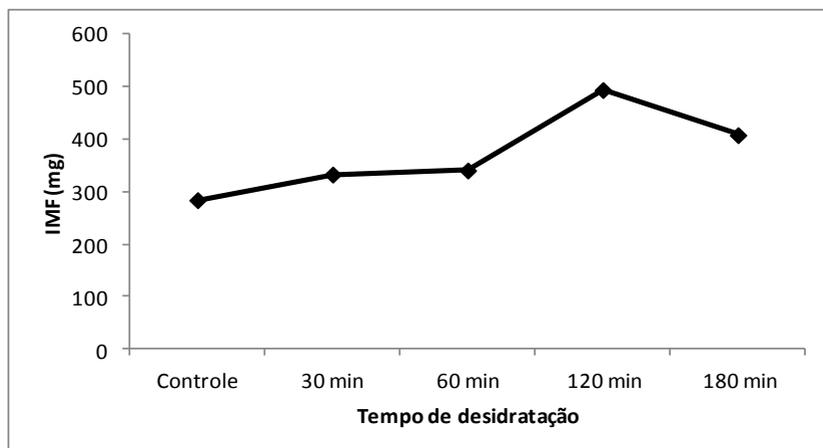


Figura 15: Incremento de massa fresca de ESP de *C. tigrina* submetidas a diferentes períodos de desidratação em sílica gel antes da inoculação. Dados coletados após 20 semanas de cultivo.

3.2.3. Efeitos do sistema de imersão no subcultivo de microbrotos

Ao contrário do esperado, quando subcultivados, os brotos isolados não deram origem a número significativo de plantas com a presença de folhas e raízes. Tanto no sistema de imersão contínua como temporária, ao invés de continuarem o desenvolvimento de folhas e raízes para a formação de plantas, houve novo surgimento e proliferação de ESP, que passaram a se multiplicar de forma contínua e gerando um número reduzido de plantas. O incremento de massa fresca obtido pode ser atribuído totalmente à multiplicação de ESP, e não ao incremento de peso devido à formação de órgãos e raízes e a obtenção de plantas. Apesar disso foi observado que esta variável foi muito superior no

sistema de imersão temporária, sendo este significativamente superior de acordo com o F teste ($p=0,05$) (Figura 16).

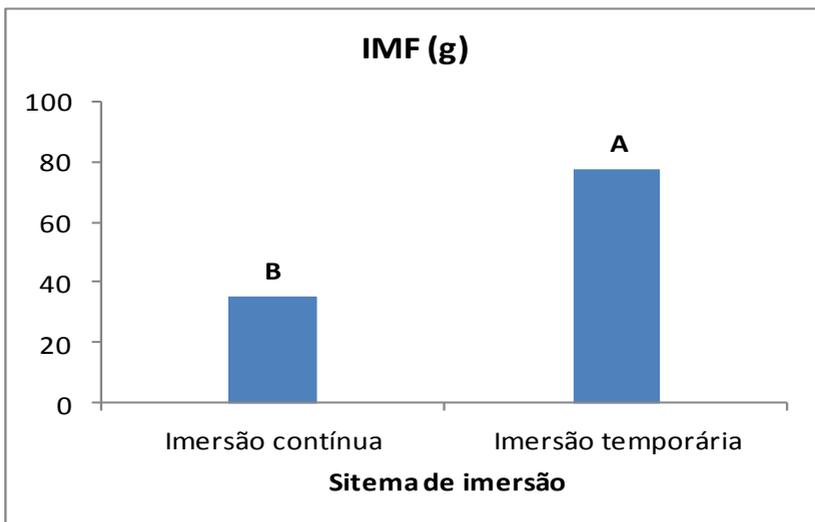


Figura 16: Incremento de massa fresca de brotos de *C. tigrina* subcultivados em sistema de imersão contínua e temporária. As letras distintas na extremidade superior das colunas indicam a existência de diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o F teste ($p=0,05$).

Os dados obtidos, apesar de não possibilitarem a produção de mudas pelo subcultivo de microbrotos, permitem avaliar a taxa de multiplicação das ESP em relação ao sistema de imersão. A mudança do sistema de imersão influencia positivamente a taxa de multiplicação das culturas, sendo esta mais do que duas vezes superior no sistema de imersão temporária. Com a inoculação de 24 brotos foram obtidos em média 77,3g de ESP com diferentes graus de diferenciação após 24 semanas de cultivo.

Apesar de não terem sido obtidas muitas plantas ao final do processo, as que foram obtidas foram subcultivadas e utilizadas para a avaliação da estabilidade, em termos de ploídia, do protocolo proposto.

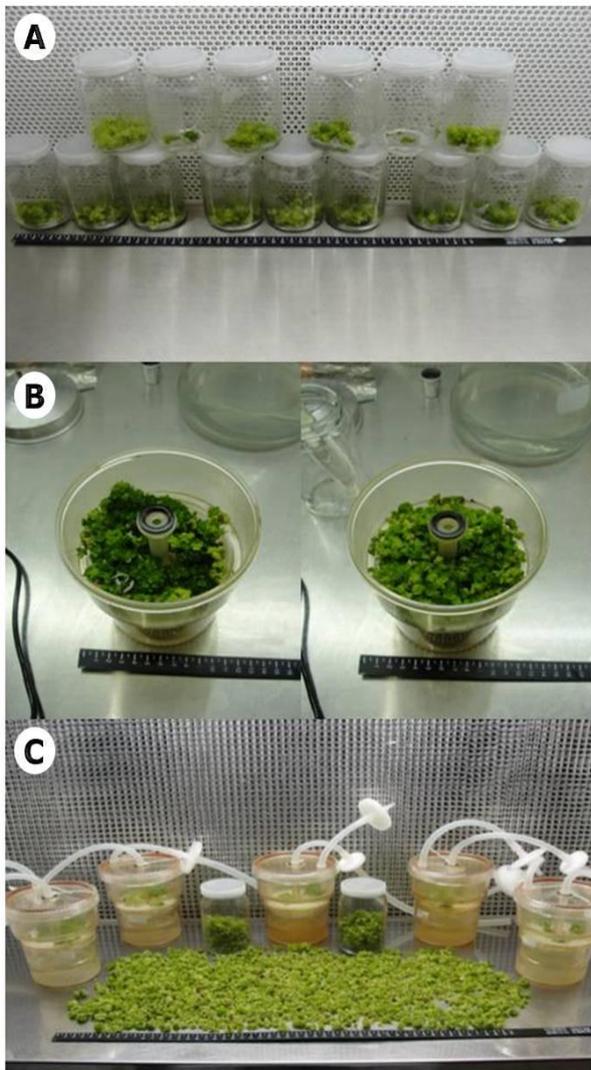


Figura 17: Subcultivo de brotos de *C. tigrina* em sistema de imersão contínua e temporária. A) Frascos de imersão contínua; B) Resultado obtido após 24 semanas de subcultivo em BIT tipo RITA[®]; C) Visão geral da quantidade de propágulos obtidos. Notar que apenas o material presente no interior dos BIT apresentava certo grau de diferenciação, sendo

selecionado para novo subcultivo e posterior avaliação da estabilidade de ploidia dos regenerantes obtidos.

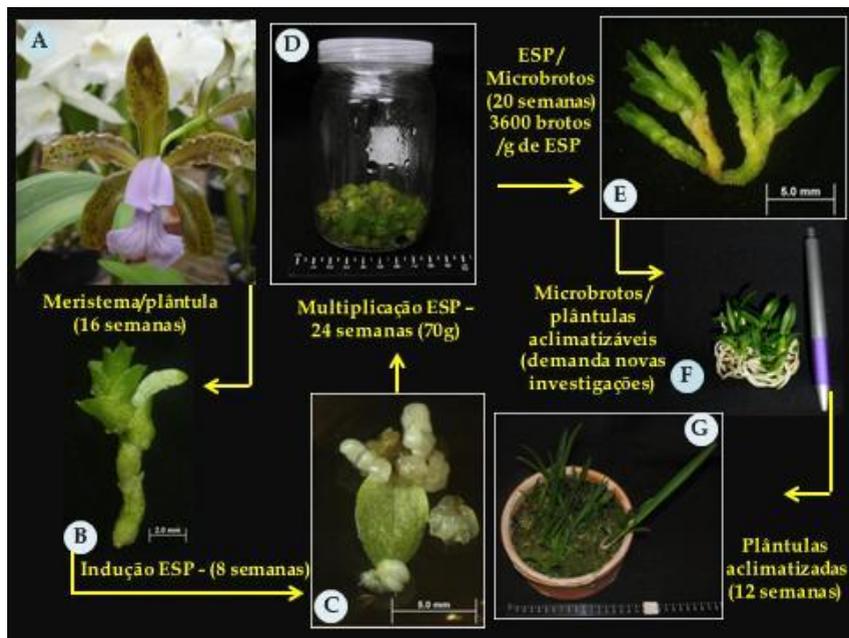


Figura 18: Fluxograma do protocolo regenerativo de *Cattleya tigrina* baseado na indução e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (ESP), indicando os índices obtidos, estimativas de tempo e os principais entraves ainda existentes. A) Exemplo de planta matriz portadora de valor ornamental (*C. tigrina* var. *coerulea*). Planta e cultivo de Carlos Gomes. Foto do autor; B) Broto obtido pelo cultivo de gema da planta matriz; C) Folha com indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESP); D) Frascos com ESP em multiplicação; E) Brotos regenerados a partir de ESP; F) Plantas prontas para aclimatização; G) Plantas aclimatizadas em vasos coletivos com substrato de Sphagnum.

4. DISCUSSÃO

4.1. INDUÇÃO DE ESP DE *Cattleya tigrina*

A indução de brotos a partir de tecidos radiculares já foi estabelecida para outras espécies de orquídeas, tais como *Clowesia warscewiczii* (KERBAUY; ESTELITA, 1996), *Catasetum fimbriatum* (PERES; KERBAUY, 1999), entre outras. No presente trabalho a adição de AIB ao meio de cultura estava ligada a relação entre os níveis endógenos de auxinas e citocininas, uma vez que raízes são as maiores responsáveis pela síntese de citocininas e os meristemas apicais pelas auxinas (TAIZ; ZEIGER, 2009). No presente trabalho não foram observadas respostas de indução nos explantes radiculares nas condições testadas. No entanto, o crescimento apresentado em alguns explantes, aliado ao reduzido número de tratamentos testados, não descarta a viabilidade da obtenção de ESP a partir de raízes de *C. tigrina*, devendo para isso estudos mais amplos serem realizados, com maior amostragem e variação das condições de cultivo.

A obtenção de protocolos adequados para a clonagem de orquídeas através de explantes radiculares é altamente desejável, especialmente quando se objetiva a introdução de material *ex vitro*. Além da quantidade de material disponível para a inoculação ser maior quando comparada as gemas da parte aérea, o dano causado à planta matriz é significativamente reduzido, o que é essencial em casos de pouca disponibilidade de material ou no caso de plantas matrizes de alto valor. Em *Doritaenopsis* (*Doritis x Phalaenopsis*), por exemplo, foi utilizado um protocolo de indução de ESP a partir de ápices radiculares (PARK, 2003), o que é particularmente interessante neste caso, uma vez que as plantas possuem hábito de crescimento monopodial, dificultando a obtenção de explantes meristemáticos sem danificar a planta mãe.

A técnica de *TCL* na clonagem de orquídeas já foi reportada para outros gêneros de orquídeas, tais como *Dendrobium* e *Cymbidium* (NAYAK et al., 2002), *Cymbidium* (SILVA; TANAKA, 2006), em híbridos como *Doritaenopsis* (PARK et al., 2002), bem como para outras plantas ornamentais (TEIXEIRA, 2003). No presente trabalho foi demonstrado que não se justifica o emprego desta técnica para a indução de ESP em *C. tigrina*, uma vez não houve diferença na taxa de indução entre explantes íntegros ou seccionados em *TCL*. Além disso, o preparo dos explantes é um processo trabalhoso, que aumenta os riscos de

contaminação pelo maior manuseio dos explantes. Isso é importante quando se considera a produção de mudas em nível comercial, onde a simplicidade dos protocolos, o tempo, e a pouca disponibilidade de mão de obra qualificada, são fatores a serem considerados. Mesmo que isto signifique o uso de protocolos menos eficientes, mas de fácil aplicação prática.

Os resultados obtidos demonstram claramente uma maior resposta da região basal dos explantes foliares para a indução de ESP. Isso já foi relatado por outros autores em orquídeas (GOW et al., 2009) e outras monocotiledôneas (ALVES et al., 2006). No entanto, a maior frequência de resposta da região basal não é uma regra para todas as espécies. Para o híbrido “Gower Ramsey” do gênero *Oncidium*, foi constatado que a região do ápice foliar apresentou a maior resposta de indução para o que os autores consideraram como embriões somáticos (CHEN; CHANG, 2001). Obviamente, devido a enorme variabilidade morfológica e anatômica entre espécies de orquídeas não se pode esperar apenas um padrão de resposta.

Uma das possibilidades para a maior resposta da região basal está relacionada à presença, ou mesmo proximidade, de gemas axilares junto da base da folha, uma vez que quanto menor a diferenciação do tecido, menor o nível de determinação e maior sua competência e resposta a estímulos (KERBAUY, 1999). Aliado a isso a constrição dos feixes vasculares na região basal e a possibilidade da ocorrência de meristemas intercalares em orquídeas podem ser fatores a considerar. Em bromélias, o maior potencial regenerativo da base das folhas foi atribuído à presença de meristemas intercalares (HOSOKI; ASAHIRA apud ALVES et al., 2006). No entanto, não existem evidências fortes da ocorrência de meristemas intercalares em orquídeas, apesar de estruturas semelhantes já terem sido identificadas (STERN et al., 1985).

Em relação às condições de cultivo, diferentemente do resultado obtido no presente trabalho, a suplementação do meio de cultura com auxinas têm demonstrado efeitos negativos na indução de ESP em outras espécies de orquídeas. Chung et al. (2005) relataram o efeito negativo de quatro auxinas (2,4-D, AIA, AIB e ANA) na embriogênese somática direta em explantes foliares de um híbrido do gênero *Dendrobium*. Em contraste, no presente trabalho, todas as citocininas testadas tiveram efeito positivo, sendo que o TDZ na concentração de 18 μM foi o mais efetivo, com 33% de indução. As mesmas quatro auxinas também

tiveram efeitos negativos em um híbrido de *Oncidium* (CHEN; CHANG, 2001). Roy et al. (2007) relataram efeitos negativos do ANA na indução de ESP de *Dendrobium chrysotoxum*, em contraste ao efeito positivo de BAP ou TDZ, sendo o último o mais eficiente.

Existem diversos relatos positivos do uso do TDZ micropropagação de orquídeas (CHEN; CHANG, 2000; CHEN et al., 2002; MALABADI et al., 2004; VASUDEVAN; VAN STADEN, 2011). Após o primeiro relato de sua ação citocínica em 1982 (LU, 1993) e uso inicial como desfolhante em plantações de algodão, têm crescido muito o número de relatos do uso do TDZ na cultura de tecidos vegetais, com efeitos positivos para um grande número de espécies de diferentes famílias botânicas (GUO et al., 2011). Os mecanismos de ação do TDZ ainda não são completamente conhecidos, mas, apesar de sua estrutura química diferente de outras auxinas e citocininas, o mesmo tem mostrado atuar como ambas, sendo que alguns estudos têm mostrado sua ligação com modificações nas membranas, absorção e assimilação de nutrientes e também à síntese e transporte de hormônios endógenos como o AIA (GUO et al., 2011), podendo, no presente trabalho, explicar o aumento da indução na presença de AIB. No entanto novos estudos se fazem necessários para compreender melhor esse processo, uma vez que apenas um tratamento contendo auxina exógena foi utilizado.

A concentração de TDZ necessária para desencadear respostas morfogênicas é, em geral, muito menor quando comparada a outros fitorreguladores, podendo chegar até 1000 vezes menos (GUO et al., 2011). Roy et al. (2007) relataram que para atingir os mesmos resultados gerados pela adição de 1 μM TDZ ao meio de cultura na indução de ESP em *Dendrobium chrysotoxum* foram necessários 8 μM de BAP. Isso é um fator positivo, pois a obtenção de protocolos seguros do ponto de vista da estabilidade genética é maior quanto menor forem os as concentrações de reguladores de crescimento utilizadas.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho são de grande valia, uma vez que foi demonstrado ser possível à obtenção de mais de 5% de indução de ESP em meio sem fitorreguladores, passando para mais de 15% com a adição de apenas 1 μM de TDZ. Deve-se levar em consideração que foi utilizado material geneticamente homogêneo e este foi selecionado de um genótipo responsivo, sendo que o uso de

genótipos diferentes nas mesmas condições propostas, pode resultar em respostas diferentes devido a uma possível interação genótipo específica.

4.2. REGENERAÇÃO DE ESP DE *Cattleya tigrina*

4.2.1. Efeitos do GA₃ e sacarose

Apesar de as giberelinas (GAs) estarem envolvidas em diversas respostas no crescimento das plantas como na indução floral, determinação de sexo, quebra de dormência de sementes e formação de frutos (GUERRA; RODRIGUES, 2008), o uso do GA₃ neste trabalho estava ligado à sua ação sobre o alongamento e a divisão celular.

O uso de GAs no cultivo *in vitro* de diversas espécies resulta na obtenção de brotos anormais, com primórdios foliares defeituosos e alongamento demasiado de entrenós (MOSHKOV et al., 2008), sintomas também observados no presente trabalho (**Figura 10D-E**). Considerando também as concentrações de GA₃ inicialmente testadas, e sua relação diretamente proporcional com os sintomas de necrose nos explantes e inversamente proporcional ao incremento de massa fresca, ficou evidente se tratar de toxidez causada por este composto.

Concentrações de GA₃ idênticas às usadas neste trabalho também foram utilizadas com sucesso no alongamento de microbrotos de *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae) sem relatos de sintomas de toxidez (FILHO et al., 2005) e dosagens similares também têm sido utilizadas em outras espécies de bromélias, resultando no alongamento mais uniforme de microbrotos (GUERRA; DAL VESCO, 2010).

Com a diminuição da concentração de GA₃ no segundo experimento os sintomas de toxidez não foram mais observados. No entanto, a introdução de novas fontes de variação, como a mudança no método de esterilização do GA₃ e a consistência do meio de cultura, impede uma conclusão mais precisa. A diferença do método de esterilização entre os dois experimentos impede comparações entre as concentrações, uma vez que o GA₃ é termolábil e a sua esterilização por autoclavagem reduz a sua atividade em mais de 90% (VAN BRAGT; PIERIK apud ARDITTI, 2008).

Na micropropagação de orquídeas GAs são raramente utilizadas (ARDITTI, 2008), sendo que nem mesmo seus efeitos sobre a germinação de sementes são bem conhecidos (ARDITTI, 1967). Apenas

recentemente o GA₃ foi utilizado para as mesmas finalidades deste trabalho. Em *Zygopetalum mackayi*, Hong et al. (2010) observaram diminuição da formação de brotos, menor peso fresco e escurecimento das ESP, concluindo não ser adequada sua utilização para tal finalidade. Chen e Chang (2003) relatam efeitos negativos do GA₃ na indução de embriões somáticos a partir de folhas de *Oncidium* e Hew e Clifford (1993) reportaram que a aplicação de GAs exógenas inibiu o crescimento de plantas *in vitro* de orquídeas, promovendo a expansão das folhas, mas diminuindo o número delas.

Os resultados obtidos mostram claramente os efeitos positivos do GA₃ no alongamento, diferenciação e número de brotos formados a partir de ESP de *C. tigrina*, sendo esse um dado novo e importante gerado por este trabalho, uma vez que o uso do GA₃ em orquídeas ainda é limitado. O maior alongamento dos brotos cultivados na presença deste fitorregulador pode ser explicado pela ação das GAs no alongamento e multiplicação celulares, estando estas envolvidas na mediação de expansinas, e na regulação da expressão de quinases dependentes de ciclina (GUERRA; RODRIGUES, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

O GA₃ inibe a formação de meristemóides, mas é necessário para o desenvolvimento de brotos após a formação destes (JARRET; HASEGAWA apud MOSHKOV et al., 2008). O sítio de ação das GAs não é o meristema apical caulinar (MAC), uma vez que as citocininas são responsáveis pela manutenção do meristema e existe uma relação antagônica entre ambos, sendo que somente células mais distantes do MAC são estimuladas pelas GAs para adquirir competência para a formação de primórdios foliares (GUERRA; RODRIGUES 2008). Com isso pode-se supor que mesmo nas ESP providas do meio de multiplicação já existem eixos caulinares pré-formados, onde o GA₃ exógeno estaria estimulando o alongamento caulinar e a formação dos primórdios foliares, dando forte indício da natureza organogenética dessas estruturas.

Como a glicosilação é uma das formas de conjugação das GAs (GUERRA; RODRIGUES, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009), a variação nas concentrações de sacarose também podem ter influenciado a inativação de parte do GA₃ exógeno, podendo este um dos motivos da observação de menor toxidez nos explantes mantidos em concentrações mais altas de sacarose. A adição de GA₃ ao meio de cultura tem normalmente efeitos negativos sobre a formação de raízes e brotos adventícios

(MOSHKOV et al., 2008). Neste caso a observação de brotos com raízes nos tratamentos com GA₃ e concentração reduzida de sacarose pode na verdade estar ligada apenas com a sacarose. No entanto, como as raízes possuem origem adventícia, o efeito do GA₃ na formação de primórdios foliares e eixos caulinares influenciou indiretamente esta observação.

Apesar de testes preliminares com concentrações mais altas de sacarose (30g.L⁻¹) terem levado aos experimentos com concentrações mais baixas justamente por não terem apresentado resultados satisfatórios, novas investigações envolvendo concentrações mais elevadas são importantes para melhor avaliar os reais efeitos desta variável sobre o desenvolvimento e a regeneração das ESP. Isso é reforçado pelo fato de nos dois experimentos terem sido observados brotos com presença de raízes apenas nos tratamentos com menor concentração de sacarose.

4.2.2. Efeitos da desidratação das ESP

Nos experimentos iniciais observou-se que brotos mais diferenciados, com presença de raízes e primórdios foliares bem formados eram mais frequentes em culturas sob estresse hídrico. Esta observação também foi feita em culturas nodulares de Bromeliaceae (DAL VESCO; SCHERER, comunicação pessoal). A hipótese levantada inicialmente era de que a condição de estresse hídrico nesses explantes favoreceria sua maior diferenciação. No entanto, com os resultados obtidos essa hipótese foi rejeitada, ao menos no que diz respeito à desidratação pré-inoculação, não havendo relação desta com o número de brotos ou a maior diferenciação destes. Possivelmente, a menor disponibilidade de nutrientes ou o estresse hídrico durante o cultivo, e não previamente a este, sejam mais importantes no processo regenerativo.

Por outro lado, os resultados sugerem claramente que a desidratação prévia das ESP está ligada a capacidade de multiplicação destas, podendo aumentar a multiplicação em até 75% se as ESP forem desidratadas para 40% do peso inicial. No entanto, se considerarmos que a sobrevivência dos explantes diminui pela metade com esse tratamento, a sua aplicação prática é questionável, mas merece mais investigações.

4.2.3. Efeitos do sistema de imersão no subcultivo de microbrotos

A importância do desenvolvimento de protocolos com o uso de BIT está atrelada a possibilidade de automatização do processo, diminuição de mão de obra e dos custos finais de produção. Apesar de resultados positivos terem sido obtidos em experimentos preliminares (dados não mostrados) no presente experimento constatou-se que mesmo com a inoculação de brotos já formados, as células voltam a multiplicar-se em estado menos diferenciado, fazendo com que um número não satisfatório de plantas seja obtido no final do processo.

A capacidade das células de mudar de um estado de dependência do suprimento exógeno de determinada substância, para um estado de autonomia parcial ou completa é denominado de habituação (MOSHKOV et al., 2008; KERBAUY, 1999). Neste caso em específico os ESP parecem ter, ao longo de sucessivos cultivos na presença de TDZ, adquirido habituação e se tornado autônomos para citocininas. O tempo de 20 semanas transcorrido entre o último cultivo com TDZ teria, em tese, diminuído este processo. No entanto, o TDZ, ao contrário de outras citocininas, é uma feniluréia, não sendo, portanto, degradado por enzimas oxidases de citocininas no interior dos tecidos (GUO et al., 2011), reforçando a hipótese de habituação.

Vasudevan e Staden (2011) também observaram comportamento similar em *Ansellia africana*, onde não era necessária a adição de citocininas exógenas para a proliferação de clusters de protocormos. Em calos de *Dendrobium chryzotoxum* induzidos com TDZ também foi observada a não necessidade de citocininas para a multiplicação (ROY et al., 2007). Em *Catasetum fimbriatum* foi reportado que a redução do alongamento de brotos estava ligada a diminuição nos níveis endógenos de citocininas devido ao aumento dos níveis de etileno (SUZUKI; KERBAUY, 2006). Com o uso de biorreatores de imersão temporária (BIT) os níveis de etileno são menores devido à troca frequente dos gases, sendo que neste caso a relação da não formação de brotos ou da maior multiplicação das ESP não parece estar ligada aos níveis de etileno ou a influência deste sobre os níveis de citocininas.

A grande diferença do incremento de massa fresca entre os sistemas de imersão é um ponto positivo a ser considerado. A multiplicação das ESP foi mais de duas vezes maior no sistema de imersão contínua. Todas as vantagens já citadas do uso de BIT na

cultura de tecidos, aliadas ao resultado obtido, fazem com que se recomende o uso da imersão temporária na fase de multiplicação de ESP de *C. tigrina*, e seu uso para a fase de alongamento de brotos deve ser melhor investigado.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos foi possível estabelecer um protocolo eficiente para a indução e regeneração de ESP em *C. tigrina*. A região basal dos explantes revelou-se mais responsiva e o uso de explante íntegros apresenta vantagens sobre outras técnicas pela facilidade de aplicação prática. As ESP podem ser induzidas na ausência de fitoreguladores, diminuindo, em teoria, as chances de ocorrência de variação somaclonal. No entanto, na presença de TDZ a taxa de indução é significativamente aumentada, podendo-se optar pelo seu uso no caso de baixa disponibilidade de explantes.

Foi demonstrado que o uso de GA₃ é necessário para a obtenção de brotos mais alongados, diferenciados e em maior número, possivelmente devido à quebra da habituação das ESP devido ao antagonismo do GA₃ com as citocininas.

A desidratação prévia das ESP para 40% do peso inicial pode aumentar a multiplicação destas em até 75%. O uso do sistema de imersão temporária duplica a multiplicação das ESP, sendo que a combinação de explantes desidratados e o uso de BIT pode ser uma alternativa eficiente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P..
Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii*
through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 2, p.
204-207. 2006.

ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. **The
Botanical Review**, v. 33, n. 1, p. 1-97. 1967.

ARDITTI, J. **Micropropagation of orchids - Vol.1** (J. Arditti, Ed.). 2nd
ed., p.1547. Blackwell Publishing, 2008.

ARDITTI, J. Plenary Presentation : History of orchid propagation.
History, 2010.

CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Efficient plant regeneration through
somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae).
Plant science (Shannon, Ireland), v. 160, n. 1, p. 87-93. 2000.

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.

CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Effects of auxins and cytokinins on direct
somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* “Gower Ramsey”.
Plant Growth Regulation, p. 229-232, 2001.

CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Effects of GA₃, ancymidol, cycocel and
paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium* in vitro.
Plant Cell, , n. 100, p. 105-108, 2003.

CHEN, T-Y.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Multiple shoot formation
and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum*
orchids. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 38, n.
6, p. 595-597. 2002.

- CHUNG, H-H.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium chiengmai* pink and subsequent plant regeneration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 6, p. 765-769. 2005.
- CHUNG, H-H.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 2, p. 346-350, 2007.
- COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.37, p.217-242, 1994.
- FARIA, R. T.; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. Propagação in vitro de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.
- FILHO, A. R.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O. et al. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, n. 8, p. 1799-1808. 2005.
- MOSHKOV, I. E.; NOVIKOVA, G. V., HALL, M. A.; et al. Plant Growth Regulators III : Gibberellins , Ethylene , Abscisic Acid , their Analogues and Inhibitors ; Miscellaneous Compounds. In: E. F. George; M. A.Hall; G.-J. D. Klerk (Eds.); **Plant Propagation by Tissue Culture**. p.227-281. Springer, 2008.
- GOW, W-P.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 2, p. 363-369. 2009.
- GUERRA, M. P.; RODRIGUES, M. A.. Giberelinas. In: KERBAUY, G. B.. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 11, p. 235-254.

GUERRA, M. P.; VESCO, L. L. DAL. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: S. M. Jain; S. J. Ochatt (Eds.); **Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants**. 1st ed., v. 589, p.47-66. Totowa, NJ: Humana Press. 2010.

GUO, B.; ABBASI, B. H.; ZEB, A.; XU, L. L.; WEI, Y. H. Thidiazuron : A multi-dimensional plant growth regulator. **Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, p. 8984-9000, 2011.

HEW, C. S.; CLIFFORD, P. E. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. **Plant Growth Regulation**, v. 13, n. 3, p. 231-239. 1993.

HONG, P-I.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Shoot development and plant regeneration from protocorm-like bodies of *Zygopetalum mackayi*. In **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, n. 3, p. 306-311. 2010.

KERBAUY, G. B.. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. in: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**: volume 2. Brasília: Embrapa, 1999. Cap. 1, p. 519-531.

KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warscewiczii*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 157-159, 1996.

KNUDSON, L.. Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. **Botanical Gazette**, p. 1-25. 1922. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/10.2307/2470045>>. Acesso em: 12 mar. 2011.

KUO, H-L.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* "Little Steve." **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 4, p. 453-456. 2005.

LU, C-Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 29, n. 2, p. 92-96. 1993.

MALABADI, R. B.; MULGUND, G. S.; NATARAJA, K. Efficient Regeneration of *Vanda coerulea*, an Endangered Orchid Using Thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 3, p. 289-293. 2004.

MOREL, G. M; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**. 38:141-143, 1951.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p.473-497. 1962.

NAYAK N. R.; SAHOO S.; PATNAIK, S. P. R.. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 94, n. 1-2, p. 107-116. 2002.

PARK, S. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science**, v. 164, n. 6, p. 919-923. 2003.

PARK, S.; YEUNG, E. C.; PAEK, D. C.. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. **Plant Cell Reports**, p. 46-51. 2002.

PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science**, v. 164, p. 919-923. 2003.

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

ROY, J.; NAHA, S.; MAJUMDAR, M.; BANERJEE, N. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of

Dendrobium chrysotoxum Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 1, p. 31-39. 2007.

ROTOR, J. G. 1949. A method for vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. **Amer. Orchid Soc. Bull.**18: 738–739.

SILVA, J. A. T.; TANAKA, M. Multiple Regeneration Pathways via Thin Cell Layers in Hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 25, n. 3, p. 203-210. 2006.

STERN, W. L.; PRIDGEON, A. M.; CARLYLE, A. L. Stem structure and its bearing on the systematics of Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 91, n. 4, p. 457-471. 1985.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B. Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 3, p. 359-365. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TEIXEIRA, J. A. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 2, n. December, p. 683-691, 2003.

VASUDEVAN, R.; VAN STADEN, J. Cytokinin and explant types influence in vitro plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n. 1, p. 123-129. 2011.

**CAPÍTULO 3 – CITOMETRIA DE FLUXO APLICADA AO
MELHORAMENTO GENÉTICO E AO ESTUDO DO GENOMA
NUCLEAR DE ORQUÍDEAS**

RESUMO

Na micropropagação de orquídeas são comumente utilizados explantes somáticos de origem variada como folhas, raízes, hastes forais, entre outros. Além de mutações e alterações epigenéticas, alterações do nível de ploidia também podem ocorrer em regenerantes da cultura de tecidos. Apesar de tecidos polissomáticos serem comuns em plantas superiores, o conhecimento da ploidia do tecido dos explantes utilizados na micropropagação de orquídeas e as consequências do seu uso são normalmente negligenciados. A citometria de fluxo é uma técnica capaz de analisar o conteúdo de DNA nuclear de núcleos isolados, permitindo inferências sobre a ploidia relativa das células e sendo, portanto, uma alternativa viável e menos onerosa para os métodos tradicionais de contagem cromossômica, especialmente em orquídeas que normalmente possuem número cromossômico elevado. No presente trabalho a citometria de fluxo foi utilizada para quantificação do DNA nuclear do tecido de folhas de plantas adultas e *in vitro* de cinco espécies de orquídeas nativas (*Cattleya intermedia*, *C. forbesii*, *C. purpurata*, *Epidendrum fulgens* e *Brassavola perrinii*) bem como na identificação da ploidia relativa de regenerantes de *C. tigrina* obtidos por meio da indução e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (ESP). Núcleos do tecido das amostras foram extraídos conjuntamente com um padrão interno de referência (*Pisum sativum* cv. Ctirad), corados com fluorocromos e analisados em citômetro de fluxo. Em cinco das seis espécies avaliadas foi constatado que o tecido foliar era polissomático, característica esta presente também em plantas adultas, e não estando, portanto, ligada ao padrão de desenvolvimento e formação do órgão. Apenas em *C. purpurata* foi observado um único nível de ploidia. No entanto esta espécie foi a única na qual não foi possível fazer uma estimativa do valor C de DNA, devido a sobreposição de histogramas da espécie e do padrão de referência. Para as outras espécies, com exceção de *B. perrinii*, na qual problemas nas amostras impediram as análises, foi possível uma estimativa segura do valor C de DNA, podendo estes dados servir como referência para estudos futuros destas espécies. Com a análise dos regenerantes de *C. tigrina* obtidos por meio da regeneração de ESP foi constatado que todos apresentavam o dobro da ploidia em relação ao tecido das plantas utilizadas como fonte de explantes. A principal hipótese levantada é de que as ESP tem origem a partir de células com valor 4C de DNA dos explantes, resultando, após um ciclo de endorredução, novamente em tecidos polissomáticos, mas com a

ploidia duplicada. Estudos complementares são sugeridos para testar a hipótese levantada. No entanto, os resultados sugerem uma instabilidade do protocolo regenerativo proposto em termos da ploidia dos regenerantes, podendo esta ser vista tanto positivamente quanto negativamente, dependendo do objetivo do trabalho.

ABSTRACT

In orchid micropropagation somatic tissues from different origins such as leaves, roots, floral stalks and others, are commonly used as explants. Besides mutations and epigenetic changes, ploidy alterations can also occur in the regenerants. Though polysomatic tissues are common in vascular plants, the knowledge of the ploidy of the explants used in orchid micropropagation and the consequences of its use are usually neglected. Flow cytometry is a technique capable of analyzing nuclear DNA content of isolated nuclei, allowing inferences of the relative cell ploidy, and being a less onerous alternative to traditional methods of chromosome counts, especially in orchids which have normally high chromosome numbers. In the present investigation flow cytometry was used for nuclear DNA quantification from leaf tissue of *in vitro* and adult plants from five native orchids species (*Cattleya intermedia*, *C. forbesii*, *C. purpurata*, *Epidendrum fulgens* e *Brassavola perrinii*) as well as in the relative ploidy identification of *C. tigrina* regenerants obtained from induction and regeneration of protocorm-like bodies (PLB). Nuclei from sample tissues were extracted simultaneously with a reference standard (*Pisum sativum* cv. Ctirad), stained with fluorochromes and analyzed in a flow cytometer. The tissue of five out of six analyzed species was observed to be polysomatic, characteristic also present in adult plants and being, though, not related with organ developmental pattern. *C. purpurata* was the only species in which just a single ploidy level was observed. However, this was the only species in which it was not possible to estimate the DNA C-value due to histograms overlay between the sample and the reference standart. For the other species, except for *B. perrinii*, in which sample problems inhibited analyzes, it was possible to securely estimate DNA C-values, generating data that can be used in future studies. The analysis of *C. tigrina* regenerants showed that all the samples used had twice the ploidy of the explants used in PLB induction. The main hypothesis highlighted to explain this observation was that the PLB originates from explant cells with 4C DNA content, resulting, after one endoreduplication cycle, again in polysomatic tissues but with doubled ploidy. Complementary investigations are suggested to support this hypothesis. However, the obtained result suggests a ploidy instability of the proposed regenerative protocol, which can be seen either as bad or good, depending on the final objective.

1. INTRODUÇÃO

Na micropropagação de plantas são utilizados tecidos somáticos de diversas origens. Geralmente se opta por tecidos menos diferenciados, como os meristemas, devido a maior competência e menor determinação das células dessas estruturas (KERBAUY, 1999). No entanto, em orquídeas, tecidos dos mais variados órgãos como hastes florais (CHEN; CHANG, 2000), folhas (CHEN; CHANG, 2001; GOW et al., 2008), raízes (KERBAUY; ESTELITA, 1996) e ápices caulinares (ROY et al., 2007) são utilizados na para a clonagem *in vitro*.

Mutações e alterações no padrão de expressão gênica (epigênese) nos regenerantes obtidos por meio da cultura de tecidos são indesejadas. Alterações no nível de ploidia também podem ocorrer na cultura de tecidos, e uma vez que a quantidade de DNA nuclear pode afetar características como tamanho do núcleo, da célula, duração do ciclo celular, tamanho do estômato, entre outras (LEITCH; BANNET, 2007), alterações de ploidia podem resultar em características completamente diferentes entre os regenerantes obtidos.

Na literatura é relatado que as orquídeas possuem números cromossômicos relativamente elevados como em *Oncidium aff. flexuosum* com cerca de 168 cromossomos (FÉLIX; GUERRA, M., 2000). Desta maneira, estudos de ploidia, que já seriam lentos e onerosos mesmo em plantas com números cromossômicos reduzidos, tornam-se ainda mais complicados em orquídeas. Além disso, a contagem cromossômica necessita de células em divisão, o que dificulta a análise da ploidia de tecidos e órgãos mais diferenciados.

A citometria de fluxo, uma técnica capaz de medir parâmetros de partículas em suspensão, tem sido muito utilizada para estudos diversos em plantas. Após a técnica de Galbraith (1983), a partir da qual ficou tornou-se possível a extração de núcleos intactos de células vegetais para análise em citometria de fluxo, os estudos desta técnica em plantas tiveram um grande avanço. Esta técnica possui inúmeras aplicações, mas estudos do genoma nuclear baseados na fluorescência relativa de núcleos corados com fluorocromos específicos, talvez sejam os mais frequentes. Com dados desta natureza é possível inferir sobre a ploidia relativa das células, o conteúdo de DNA nuclear (valor C), sobre o ciclo celular, entre outros, com a vantagem de estudar um grande número de células em um curto espaço de tempo. Outra grande vantagem é que a técnica não exige células em fases específicas do ciclo

celular, sendo que os resultados permitem a observação de características de todas as células do tecido analisado.

A análise de regenerantes da cultura de tecidos por citometria de fluxo também pode fornecer informações importantes. Alterações de ploidia, normalmente não detectadas com outras metodologias empregadas na detecção de variantes somaclonais, podem ser facilmente avaliadas com a citometria de fluxo, permitindo a detecção de mixoplóides (CLARINDO et al., 2007), aneuplóides (DAVIES; ALLEN, 2007; DOLEZEL; BARTOS, 2005), poliplóides (BESNARD et al., 2008; CHEN, W. H. et al., 2009; SUDA et al., 2007; THAO et al., 2003; YEATER et al., 2004), endoreduplicação (BAROW; MEISTER, 2003; BAROW; JOVTCHEV, 2007; TRÁVNÍČEK et al., 2011; YANG; LOH, 2004) e até mesmo a distinção do sexo em plantas dióicas (COSTICH et al., 1991; DOLEZEL; GOHDE, 1995).

A poliploidia em plantas geralmente promove o gigantismo e a intensificação de cores (MONDIN; DOCHA NETO, 2006), sendo normalmente desejada em programas de melhoramento genético e desenvolvimento de novas cultivares de orquídeas (TANG; CHEN, W-H., 2007) e outras plantas ornamentais (POMPELLI et al., 2007). No entanto, quando não desejáveis, essas alterações podem ser um entrave para o desenvolvimento de protocolos de clonagem, uma vez que se objetiva a obtenção de regenerantes idênticos à planta matriz.

Apesar de inúmeros estudos indicarem uma grande variação de ploidia nos tecidos das plantas superiores (BAROW; MEISTER, 2003; BAROW; JOVTCHEV, 2007) e de ser corriqueiro o uso de explantes somáticos de origem variada na micropropagação de orquídeas, o conhecimento da ploidia das células dos explantes é normalmente negligenciado.

O objetivo deste trabalho foi utilizar a citometria de fluxo como uma ferramenta auxiliar no melhoramento genético e no estudo do genoma nuclear de orquídeas nativas, visando dar maior subsídio aos protocolos de clonagem por meio de estruturas semelhantes a protocormos e na escolha dos explantes utilizados na micropropagação de orquídeas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DO DNA NUCLEAR DE ORQUÍDEAS COM O USO DE PLANTAS IN VITRO

2.1.1. Material vegetal

Como amostras foram utilizadas folhas de plantas jovens mantidas *in vitro* e obtidas pela germinação assimbiótica de sementes de cinco espécies de orquídeas nativas do estado de Santa Catarina. Sementes de *Cattleya intermedia*, *C. purpurata*, *C. forbesii*, *Brassavola perrinii* e *Epidendrum fulgens* foram obtidas de cruzamentos direcionados de plantas adultas e devidamente identificadas, mantidas em casa de vegetação. Cápsulas pré-deiscentes foram desinfestadas em álcool 70°GL por 10 min. e em solução de NaClO comercial (50%) mais duas gotas de Tween 20 por 15 min.

Em Câmara de fluxo laminar as cápsulas foram abertas longitudinalmente e as sementes foram inoculadas em frascos (300ml) com 30ml de meio de cultura composto por sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos macronutrientes, suplementado com: carvão ativado ($1,5\text{g.L}^{-1}$); sacarose (30g.L^{-1}); ágar ($7,5\text{g.L}^{-1}$); e pH ajustado para 5,8. Foram realizados subcultivos a cada oito semanas, no mesmo meio de cultura, até as que as plantas atingissem cerca de 5 cm de altura e com a presença de 5 a 7 folhas/planta.

Como padrão de referência foi utilizado *Pisum sativum* cv. Ctirad (Fabaceae) (2C=9,09pg de DNA), conforme recomendações de Dolezel e Greilhuber (2010). As sementes foram gentilmente cedidas pelo professor Jaroslav Doležel do Laboratório de Citogenética Molecular e Citometria, do Instituto de Botânica Experimental, da Academia de Ciências da República Tcheca em Olomouc. As plantas de *P. sativum* foram cultivadas em sala de crescimento com controle de temperatura (ca. 25°C) e fotoperíodo (18h/6h de luz/escuro), provido por duas lâmpadas de vapor de sódio (HPS) de 400W. Foram utilizados vasos de plástico de 1,5L e substrato composto de $\frac{3}{4}$ Plantmax[®] e $\frac{1}{4}$ casca de arroz carbonizada.

2.1.2. Extração e análises de núcleos

Foi utilizada padronização interna conforme recomendações de Loureiro e Santos (2002); Dolezel e Bartos (2005); Greilhuber (2008); Dolezel e Greilhuber (2010). Cerca de 150 mg de tecido de folhas jovens das amostras e de *P. sativum*, foram utilizados para a extração de núcleos utilizando a metodologia de Galbraith (1983) em 2 ml do tampão Otto I (OTTO, 1990) mantido no gelo. Para diminuir a ação de compostos fenólicos todo o procedimento foi realizado sobre o gelo e com temperatura ambiente $\leq 18^{\circ}\text{C}$. A suspensão foi filtrada em malha de nylon (40 μm) em Eppendorfs[®] (1,5 ml) e centrifugada a 150g por 5 min. com temperatura média de 5°C . O sobrenadante foi removido deixando cerca de 100 μl do tampão sobre o pellet, seguido pela ressuspensão com agitação leve após adição de mais 100 μl de tampão Otto I. Para estabelecimento inicial do protocolo, suspensões de núcleos foram coradas com azul de toluidina ou carmim acético e analisadas em microscópio óptico para verificar a presença de substâncias indesejáveis e a integridade e isolamento dos núcleos. Para análise em citômetro de fluxo as suspensões de núcleos foram mantidas em temperatura ambiente até 15 min. antes da análise, quando foi adicionado 0,5 ml de tampão Otto II (OTTO, 1990), suplementado com iodeto de propídio (Fluka[®]) e RNase, ambos a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo BD[®] modelo FACSCanto II, equipado com laser com emissão de luz no comprimento de onda de 488 a 633 nm.

2.1.3. Análise dos dados

Dados provindos do citômetro de fluxo foram analisados com o software WinMDI 2.9. Foram utilizadas no mínimo 4 amostras de cada espécie, obtidas em dias diferentes, a partir de genótipos distintos. Em cada amostra foram analisados no mínimo 5000 núcleos, considerando apenas análises com coeficientes de variação (CV) $\leq 5,0\%$ para o pico correspondente aos núcleos na fase G1 do ciclo celular, conforme recomendações de Dolezel e Bartos (2005). O valor C de DNA das amostras foi calculado conforme Dolezel e Bartos (2005), com base na relação entre as fluorescências das amostras e do padrão de referência, utilizando a equação $x = (y_1/y_2).z$, onde: “x” é o conteúdo 2C de DNA (pg) da amostra; “y1” é a fluorescência média do pico G1 da amostra; “y2” é a fluorescência média do pico G1 do padrão de referência; “z” é

o conteúdo 2C de DNA (pg) do padrão de referência. Para a conversão para pares de base (bp) considerou-se: $bp = 0,978 \times 10^9$ pg (DOLEZEL et al., 2003).

2.2. ESTABILIDADE DE PLOIDIA DE REGENERANTES OBTIDOS POR MEIO DA INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE ESP DE *Cattleya tigrina*

Foi avaliada a ploidia relativa de uma amostra de 30 plantas obtidas por meio da indução e regeneração de ESP de *C. tigrina*, resultantes do experimento descrito no item 2.3.3 (capítulo 2) em relação às plantas mães. Como padrões de referência de ploidia foram utilizadas as mesmas plantas que serviram como explantes para a indução de ESP a partir dos quais os regenerantes foram obtidos. Apesar de o nível de ploidia dessas plantas não ser conhecido, estas foram consideradas como referência para verificar a estabilidade de ploidia dos regenerantes obtidos em relação ao explante inicial.

Núcleos de células de cerca de 150 mg de tecido de folhas jovens das amostras e dos padrões diploides foram extraídos conjuntamente com *P. sativum* utilizando a metodologia de Galbraith (1983) em 2 ml do tampão Otto I (OTTO, 1990) gelado. Todo o procedimento foi realizado sobre o gelo e com temperatura ambiente $\leq 18^\circ\text{C}$ visando diminuir a ação de compostos fenólicos. A suspensão foi filtrada em malha de nylon (40 μm) e centrifugada a 150g por 5 min. com temperatura média de 5°C . O sobrenadante foi removido deixando cerca de 100 μl do tampão sobre o pellet, que foi ressuscitado com agitação leve após adição de mais 100 μl de tampão Otto I. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até 15 minutos antes da análise, quando foi adicionado 2 ml de tampão Otto II (OTTO, 1990), suplementado com DAPI (4 $\mu\text{g/ml}$) após a refiltragem da amostra em malha de 30 μm .

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec[®], pertencente ao Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da UFSC. O ganho do citômetro de fluxo foi ajustado para localizar o pico G0/G1 de *P. sativum* sobre o canal 80, permitindo assim a observação de todos os picos de fluorescência. Foi avaliada a ploidia relativa dos regenerantes em relação ao tecido das plantas utilizadas para sua obtenção.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DO DNA NUCLEAR DE ORQUÍDEAS COM O USO DE PLANTAS *IN VITRO*

Com as análises preliminares das suspensões de núcleos em microscopia óptica foi possível observar grande quantidade de cristais de oxalato de cálcio (**Figura 19**). Medindo cerca de 50 μm de comprimento esses cristais não eram completamente retirados com o processo de filtragem da suspensão devido ao seu formato de agulha. Foi constatado que durante o processo de centrifugação o atrito dos cristais com os núcleos causava o rompimento da carioteca, diminuindo o rendimento de núcleos e produzindo ruído nas leituras (**Figura 19A e C**).

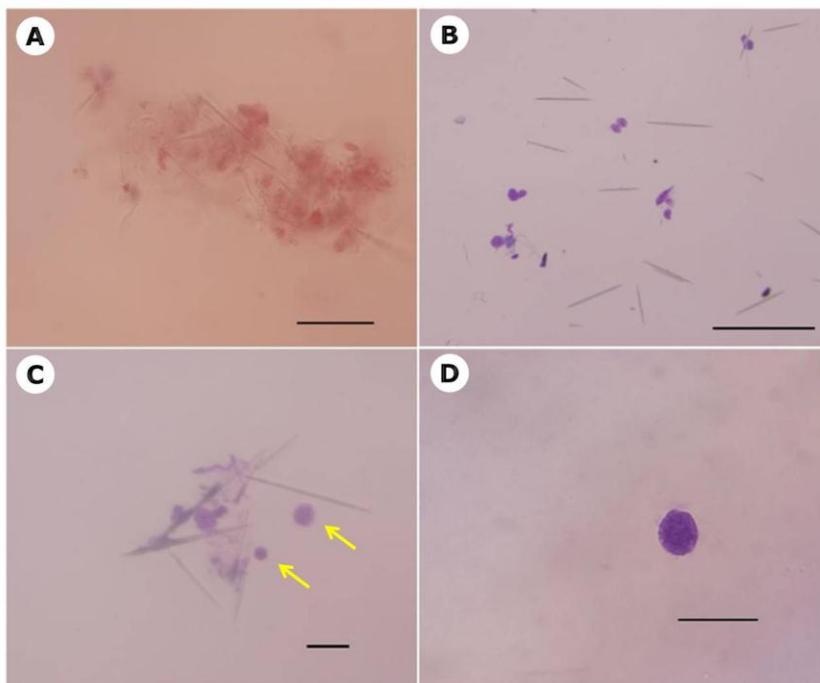


Figura 19: Análises preliminares em microscopia óptica das suspensões de núcleos. Núcleos corados com carmin acético (A) ou azul de toluidina (B-D). A) núcleos rompidos devido ao atrito com cristais de oxalato de cálcio

(barra= 50 μm); B) suspensão com grande quantidade de oxalato de cálcio (formato de agulha) e núcleos agregados (barra= 100 μm); C) Núcleos de diferentes tamanhos (setas) (barra= 20 μm); D) Detalhe de núcleo isolado (barra= 20 μm).

Devido ao baixo rendimento de núcleos a análise de 5000 núcleos chegou a levar mais de 15 minutos em algumas amostras. A metodologia da coluna de filtragem proposta por Lee e Lin (2005) foi utilizada sem a obtenção de resultados satisfatórios em termos de rendimento de núcleos e operacionalidade. Possivelmente, a quantidade reduzida de núcleos também estava ligada a natureza do tecido mucilaginoso do mesófilo foliar das amostras, composto por células de grande tamanho. Por estas razões foram utilizadas quantidades de tecido seis vezes maior que a metodologia original de Galbraith (1983), além de modificações nas quantidades de tampão e concentração de fluorocromos. Com este procedimento o rendimento de núcleos e a qualidade dos histogramas obtidos foram satisfatórios, como ficou comprovado após algumas análises preliminares em citômetro de fluxo.

Após os devidos ajustes os resultados obtidos em citometria de fluxo renderam histogramas informativos, de boa qualidade e com coeficientes de variação aceitáveis.

Foi constatado que nos histogramas de *B. perrinii* e *C. purpurata* havia uma total sobreposição dos picos, ficando impossível fazer uma distinção entre as duas espécies. Como as plantas *in vitro* de *B. perrinii* não apresentavam morfologia foliar típica da espécie, suspeitou-se de erro de identificação durante o subcultivo, ocorrendo uma mistura dessas com *C. purpurata*. Adicionalmente, os histogramas de *C. purpurata*, quando da utilização de plantas *in vitro* como amostras, apresentavam-se totalmente sobrepostos ao de *P. sativum*, não permitindo inclusive a separação de ambos (**Figura 20**). Com a análise do tecido de plantas adultas foi possível confirmar que as plantas de *B. perrinii* tratavam-se na verdade de *C. purpurata* (**Figura 21**).

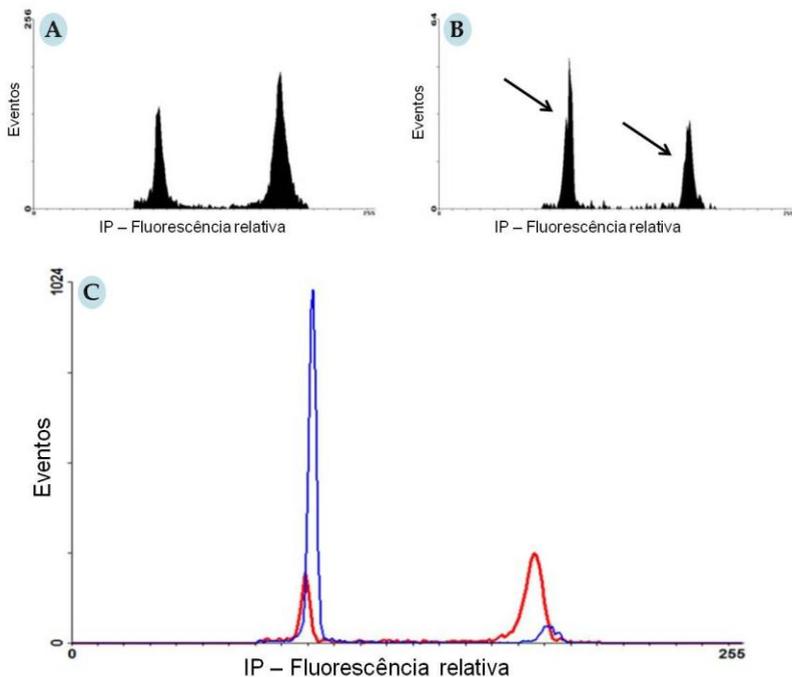


Figura 20: Histogramas de intensidade de fluorescência de *C. purpurata*, utilizando plantas *in vitro*. A-B) *C. purpurata* e *P. sativum* com padronização interna. A) $CV=4,39$ para o pico G1, não permitindo a distinção entre os picos da amostra e do padrão de referência; B) $CV=2,88$, permitindo uma leve distinção entre as duas espécies (setas); C) histogramas de *C. purpurata* (vermelho) e *P. sativum* (azul) analisados separadamente e avaliados em sobrecamadas com o software WinMDI evidenciando a sobreposição parcial dos picos de ambos.

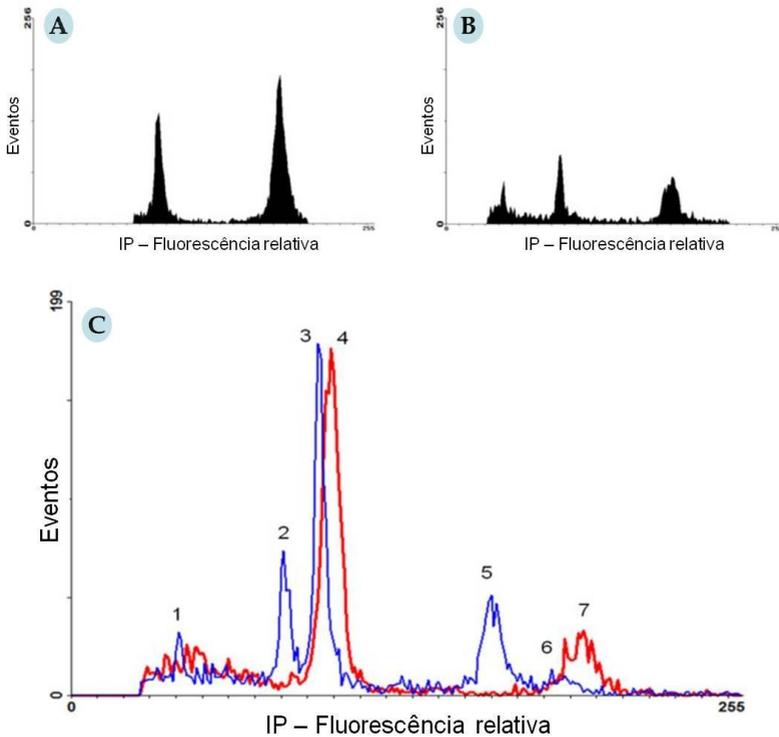


Figura 21: Histogramas de intensidade de fluorescência de *B. tuberculata*. A) Plântula *in vitro*; B) Planta adulta; C) Sobreposição de histogramas de plântula *in vitro* (vermelho) e planta adulta (azul), analisadas juntamente com *P. sativum*. 1, 2 e 5 referem-se respectivamente aos picos 2C, 4C e 8C de *B. tuberculata* e 3 e 4 são de *P. sativum*. 4 e 7 referem-se aos picos 2C e 4C de *B. tuberculata* e *P. sativum* sobrepostos, sem possibilidade de distinção entre eles. O pico 6 refere-se a ruídos de leitura identificados como um eventos pelo software de análise.

O indivíduo adulto de *B. tuberculata* apresentou picos 2C, 4C e 8C, ao passo que com o uso de plantas *in vitro* somente dois picos foram observados. Desta maneira optou-se por descartar as amostras de *B. perrini* e não proceder análises e estimativas para esta espécie. Para *C. purpurata* também se optou por não proceder às análises, uma vez que a sobreposição do pico da espécie com o padrão de referência impediria qualquer inferência para a espécie.

Nas espécies *C. intermedia*, *C. forbesii* e *E. fulgens*, tanto em plantas adultas como *in vitro*, foram observados histogramas com mais do que apenas os picos representativos de células com conteúdo 2C e 4C de DNA. Em *C. forbesii* e *C. intermedia* foram observados 3 picos de fluorescência relativa, representando núcleos com quantidades 2C, 4C e 8C de DNA (**Figura 22 e Figura 23**).

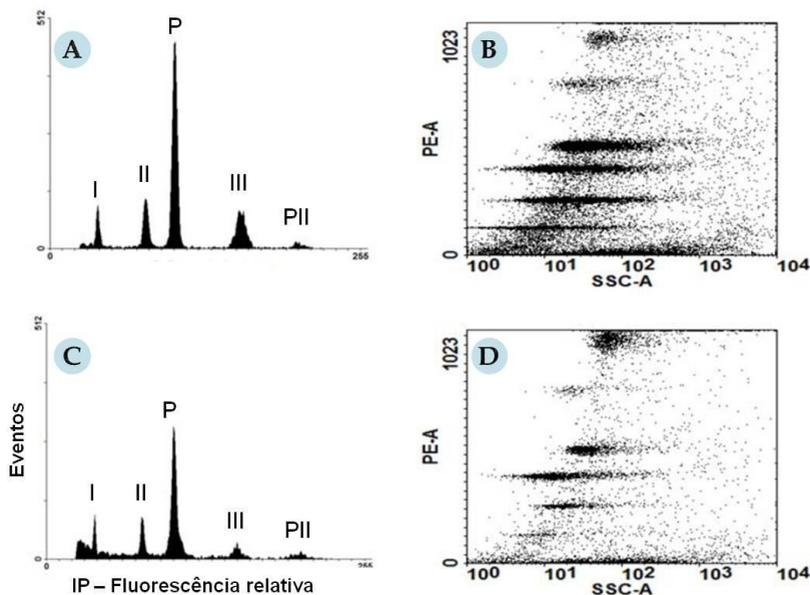


Figura 22: Histogramas de intensidade de fluorescência relativa (A e C) e citogramas de dispersão lateral em escala logarítmica (SS log) pela intensidade de fluorescência (B e D) obtidos a partir de análise em citometria de fluxo de núcleos de *C. forbesii* e *P. sativum* corados com iodeto de propídio. (A-B) *C. forbesii* *in vitro* e *P. sativum*; (C-D) *C. forbesii* adulta e *P. sativum*. Notar a existência de 3 picos referentes a *C. forbesii* (I,II, e III) referentes a células 2C, 4C e 8C, respectivamente e outros 2 picos pertencentes às células GO/G1 e G2 do padrão de referência (P e PII, respectivamente). Notar o mesmo padrão de fluorescência em plantas *in vitro* e adultas.

Em todas as espécies avaliadas o uso de tecido de plantas adultas ou *in vitro* resultou em histogramas com mesmo padrão de

fluorescência, apesar de o número de núcleos ser maior com o uso de plantas *in vitro* e a quantidade de ruído ser menor, como pode ser observado nas **Figura 22**, **Figura 23** e **Figura 24**.

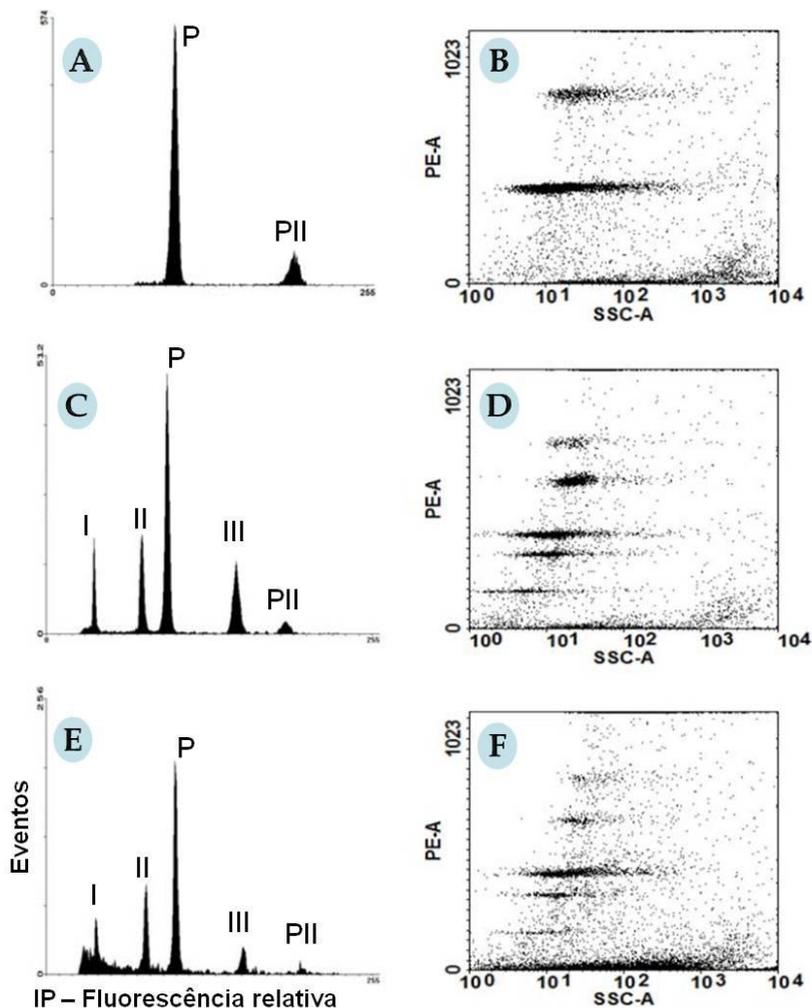


Figura 23: Histogramas de intensidade de fluorescência relativa (A, C e E) e citogramas de dispersão lateral em escala logarítmica (SS log) pela

intensidade de fluorescência (B, D e F) obtidos a partir de análise em citometria de fluxo de núcleos de *C. intermedia* e *P. sativum* corados com iodeto de propídio. (A-B) *P. sativum*; (C-D) *C. intermedia in vitro* e *P. sativum*; (E-F) *C. intermedia* adulta e *P. sativum*. (I, II, e III) correspondem aos picos referentes aos núcleos com conteúdo 2C, 4C e 8C de DNA respectivamente. P e PII correspondem aos picos de *P. sativum*. Notar o mesmo padrão de fluorescência em plantas *in vitro* e adultas, porém com menor rendimento de núcleos e maior quantidade de ruído nas plantas adultas.

Em *E. fulgens* foram observados 4 picos de fluorescência relativa, representando células com conteúdo 2C, 4C, 8C e 16C de DNA (Figura 24).

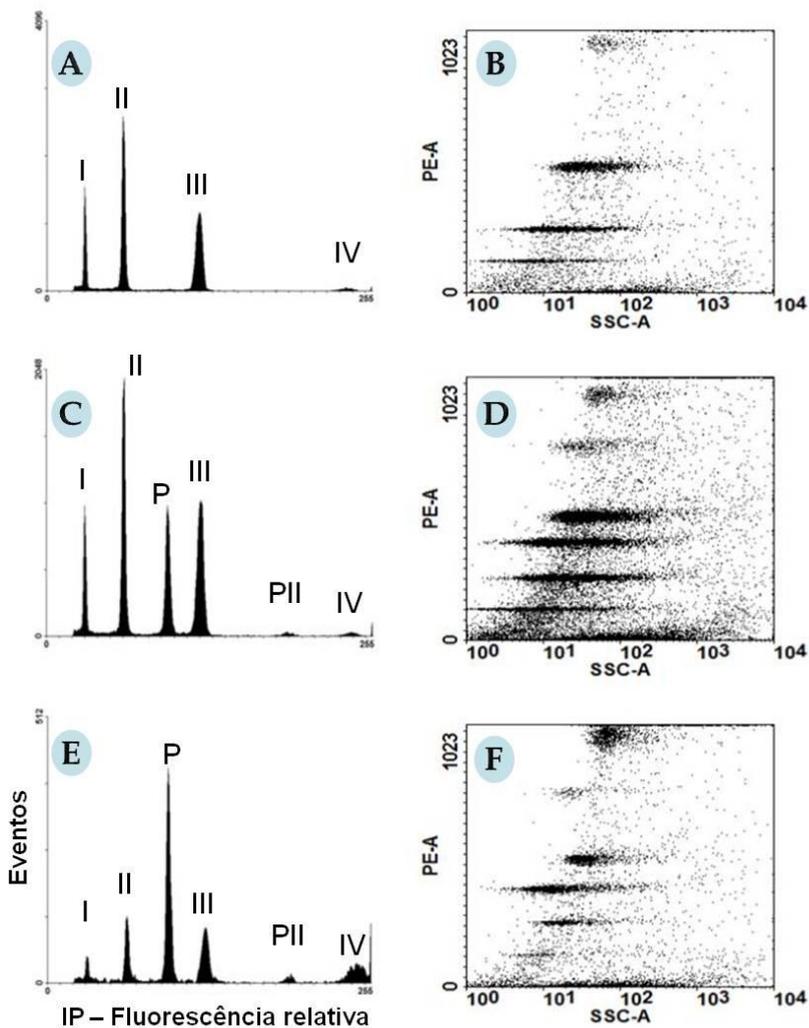


Figura 24: Histogramas de intensidade de fluorescência relativa (A, C e E) e citogramas de dispersão lateral em escala logarítmica (SS log) pela intensidade de fluorescência (B, D e F) obtidos a partir de análise em citometria de fluxo de núcleos de *E. fulgens* e *P. sativum* corados com iodeto de propídio. (A-B) *E. fulgens*; (C-D) *E. fulgens in vitro* e *P. sativum*; (E-F) *E. fulgens* adulta e *P. sativum*. (I, II, III e IV) correspondem aos picos

referentes aos núcleos de *E. fulgens* com conteúdo 2C, 4C, 8C e 16C de DNA, respectivamente. P e PII correspondem aos picos de *P. sativum*. Notar o mesmo padrão de fluorescência em plantas *in vitro* e adultas, porém com menor rendimento de núcleos e maior quantidade de ruído nas plantas adultas.

A diferença de fluorescência dos picos de *C. forbesii* e *C. intermedia* foi muito pequena (**Figura 25**) sendo muito difícil fazer a distinção de ambas, mesmo com coeficientes de variação dentro dos recomendados para estimativas de conteúdo de DNA nuclear. Essa pequena diferença de fluorescência foi observada tanto com o uso de plantas *in vitro* como adultas, sendo atribuída a real semelhança no conteúdo de DNA nuclear de ambas.

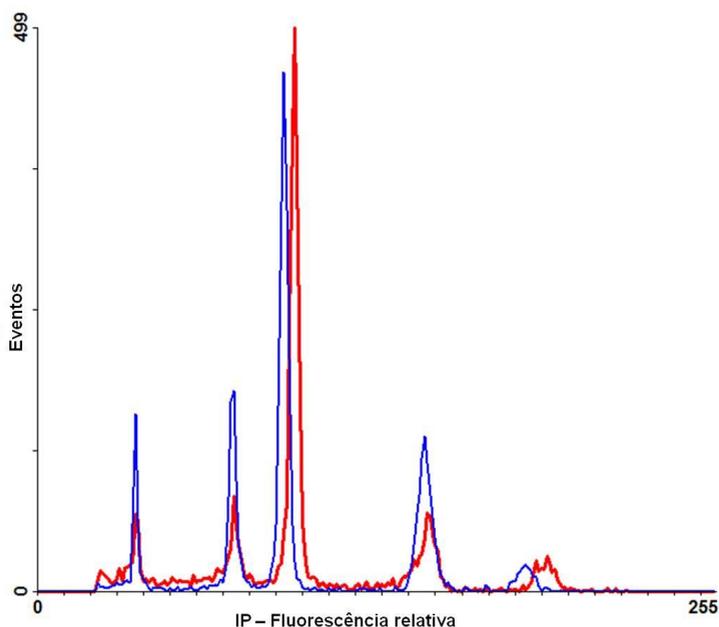


Figura 25: Sobreposição de histogramas de fluorescência relativa de núcleos de *C. intermedia* (azul) e *C. forbesii* (vermelho) e *P. sativum* como

padrão interno de referência. Notar a sobreposição quase total dos picos de fluorescência.

A relação entre a fluorescência dos diferentes picos seguiu sempre o mesmo padrão, ou seja, o segundo pico apresentava sempre o dobro da fluorescência do anterior, não se tratando, portanto, de resultados aleatórios, mas sim de uma relação intrínseca entre os picos, reflexo de núcleos com diferentes quantidades de DNA. A quantidade de eventos em cada pico de fluorescência em plantas adultas e *in vitro* foi quantificada e sumarizada na **Figura 26**.

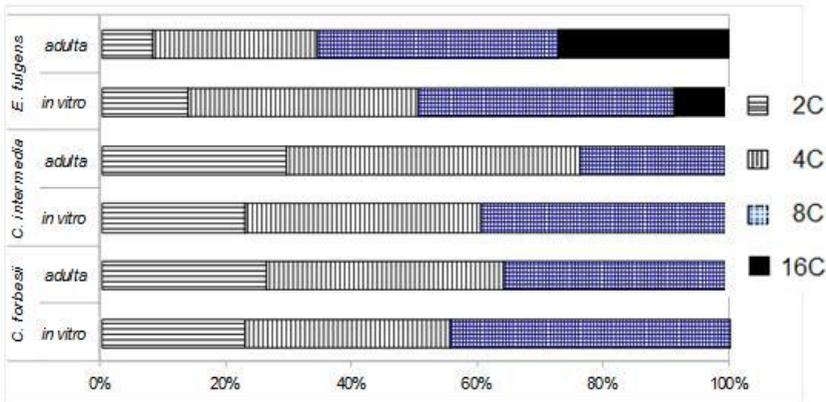


Figura 26: Porcentagem média de núcleos com diferentes quantidades (C) de DNA em plantas adultas e *in vitro* de *C. intermedia*, *C. forbesii* e *E. fulgens*.

Em *E. fulgens*, as categorias centrais (4C e 8C) correspondem tanto a núcleos na fase G0/G1 como G2 do ciclo celular, ao passo que as categorias 2C e 16C representam apenas núcleos nas fases G0/G1 e G2, respectivamente. Em *C. intermedia* e *C. forbesii* os núcleos com 4C de DNA também representam células nas fases G0/G1 e G2 do ciclo celular, e nas categorias 2C e 8C ocorre o mesmo que em *E. fulgens* em 2C e 16C. Portanto, observa-se um padrão de relação comum entre plantas adultas e *in vitro* de *C. intermedia* e *C. forbesii*, onde a quantidade de células com 8C de DNA é maior em plantas *in vitro*, enquanto as com 2C e 4C estão em maior número em plantas adultas. Já em *E. fulgens* a quantidade de células com 16C de DNA é maior em plantas adultas, ao passo que em plantas *in vitro* as células com 2C estão em menor número.

Com os resultados obtidos foi possível estimar com relativa segurança a quantidade de DNA nuclear de *C. intermedia*, *C. forbesii* e *E. fulgens* (Tabela 6)

Tabela 6: Estimativa do valor C de DNA obtido por meio da citometria de fluxo. Núcleos corados com iodeto de propídio e extraídos de tecido foliar de plantas *in vitro* das espécies alvo do estudo, com *Pisum sativum* cv. Ctirad como padrão interno de referência.

Espécie	Valor C ± desvio padrão		CV médio (pico G1)
	pg	Mpb	
<i>Cattleya intermedia</i> Grah.	1,78 ± 0,01	1740,8 ± 9,8	4,3
<i>Cattleya forbesii</i> Lindl.	1,76 ± 0,02	1721,2 ± 19,6	4,6
<i>Cattleya purpurata</i> (Lindl. & Paxton) Van den Berg	nd	nd	nd
<i>Brassavola tuberculata</i> Hook.	1,99 ± 0,01(*)	1946,2 ± 9,8	4,9
<i>Epidendrum fulgens</i> Brongn.	1,46 ± 0,03	1427,8 ± 29,3	3,6

Média ± desvio padrão de 4 repetições (genótipos) processados em dias distintos, com análise mínima de 5000 eventos. CV= coeficiente de variação; nd= não determinado; (*)= média de duas repetições de indivíduo adulto. pg= picogramas de DNA; Mpb= mega pares de base.

3.2. ESTABILIDADE DE PLOIDIA DE REGENERANTES OBTIDOS POR MEIO DA INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE ESP DE *Cattleya tigrina*

O mesmo padrão de endopoliploidia verificado em *C. intermedia* e *C. forbesii* foi observado em *C. tigrina*. Os histogramas de fluorescência relativa de núcleos apresentaram 3 picos de fluorescência relativos a células com quantidades 2C, 4C e 8C de DNA, uma vez que a relação da fluorescências entre os picos 8C/4C e 4C/2C foi sempre 2.

Com a análise comparativa da fluorescência de núcleos do tecido dos regenerantes e das plantas mãe, foi possível avaliar a estabilidade de ploidia do protocolo regenerativo. Foi observado que o tecido foliar de 100% dos regenerantes avaliados apresentou o dobro da ploidia do tecido dos explantes iniciais utilizados na indução dos ESP.

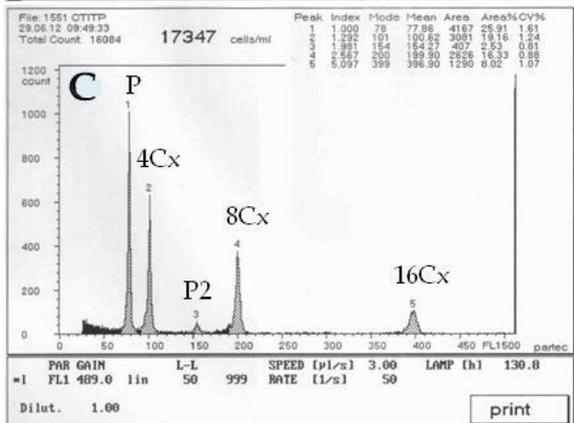
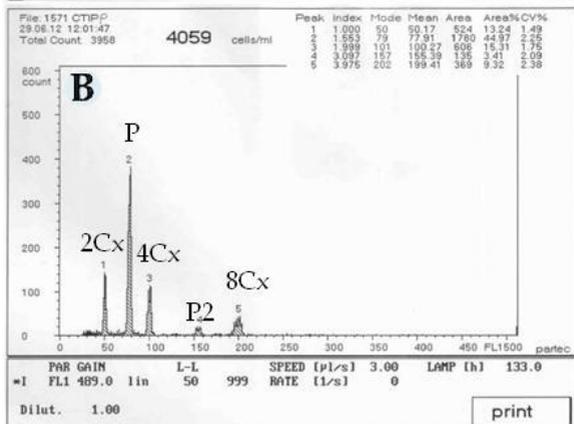
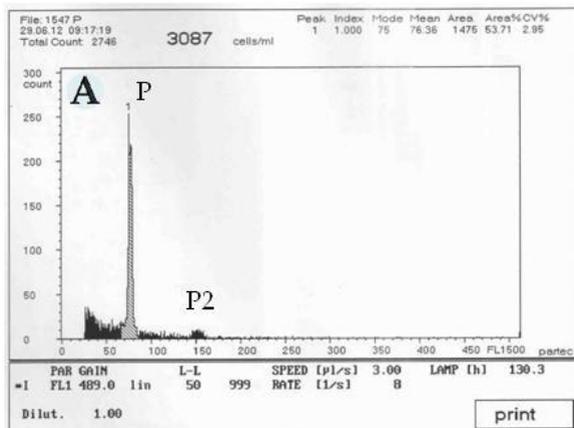


Figura 27: Histogramas de intensidade de fluorescência relativa de regenerantes de *C. tigrina* obtidos por meio da indução e regeneração de ESP. A) *P. sativum* (padrão interno de referência); B) Tecido das plantas mãe de *C. tigrina* utilizadas na indução dos ESP; C) Tecido dos regenerantes de *C. tigrina*. Notar em C a ausência do pico 2Cx presente em B e a presença do pico 16Cx. O símbolo Cx foi utilizado como referência a ploidia relativa de *C. tigrina*. P1 e P2 representam os núcleos de *P. sativum* nos estágios G0/G1 e G2 do ciclo celular, respectivamente.

Esse padrão foi verificado em todas as amostras avaliadas (N=30). A análise concomitante do tecido das amostras e de *P. sativum*, elimina qualquer possibilidade de erro de leitura ou de calibragem do aparelho.

4. DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DO DNA NUCLEAR DE PLANTAS DE ORQUÍDEAS CULTIVADAS *IN VITRO*

Lee e Lin (2005) relataram a ocorrência de grande quantidade de oxalato no tecido foliar de indivíduos adultos de *Phalaenopsis sp.*, o que levou os autores a desenvolver uma metodologia de filtragem baseados na afirmativa de que os cristais poderiam danificar o equipamento com o entupimento dos capilares. No entanto, nenhum outro relato foi encontrado na literatura indicando tais problemas. Mesmo em análises de plantas como *Oxalis tuberosa* (EMSHWILLER, 2002; LOUREIRO et al., 2006b), com altos níveis de oxalato nos tecidos, foram relatados problemas desta natureza. Existem inclusive estudos de quantificação de cristais de oxalato de cálcio na urina de humanos utilizando a citometria de fluxo (RODGERS et al., 1995). No entanto, foi verificado que o atrito dos cristais de oxalato com os núcleos resultava no rompimento da carioteca, diminuindo o rendimento e causando ruído nas leituras, fato não relatado por outros autores. Este foi o principal entrave inicial deste trabalho, a respeito da extração e isolamento de grande quantidade de núcleos intactos para análise. Por esta razão foram feitas as alterações no protocolo de extração, descritas na metodologia, que resultaram em melhoras significativas na qualidade das leituras.

Os problemas encontrados inicialmente em relação à obtenção de histogramas acurados e com número suficiente de núcleos não são exclusividade deste trabalho. Rupp et al. (2010) relataram dificuldades na extração de número suficiente de núcleos em orquídeas adultas do gênero *Polystachya*. Além de baixo rendimento de núcleos, o protocolo de extração desenvolvido pelos autores levou até duas horas para a filtragem e separação da mucilagem, tornando o procedimento lento e dispendioso. Nenhuma menção aos coeficientes de variação obtidos foi feita pelos autores, fato que se nota também em outros trabalhos de citometria de fluxo com orquídeas (JONES et al., 1998; MEESAWAT et al., 2008; RUPP et al., 2010; YANG; LOH, 2004) possivelmente devido ao valor elevado destes.

O erro de identificação das plantas *in vitro* de *B. perrinii* impediu a estimativa do valor C de DNA e maiores inferências para a espécie. No entanto, conforme destacado por Suda et al. (2007),

podemos observar a aplicação prática da citometria de fluxo como ferramenta taxonômica, através da qual foi possível distinguir espécies ainda na fase juvenil. Apesar disso, o mesmo não foi possível entre as espécies *C. intermedia* e *C. forbesii*, possivelmente devido a enorme proximidade no valor C de DNA entre ambas.

A observação de picos representativos de núcleos com valores de DNA maiores que 4C em *C. intermedia*, *C. forbesii* e *E. fulgens*, indica a existência de células com diferentes níveis de ploidia dentro do mesmo órgão (folha). Este padrão foi observado tanto no tecido de folhas de plantas *in vitro* como em plantas adultas, não sendo específico de uma determinada fase de desenvolvimento. Recentemente Trávníček et al. (2011) relataram a observação de histogramas semelhantes aos obtidos no presente trabalho em orquídeas do gênero *Gymnadenia*. No entanto, os autores verificaram que a relação da fluorescência dos picos indicava ciclos de endoreduplicação parcial, onde a fluorescência de determinado pico não correspondia a exatamente o dobro do pico anterior ou a metade do posterior. Os autores consideraram que núcleos hipertrofiados devido à infecção por micorrizas seriam uma das hipóteses para explicar tal observação. No entanto, o uso de plantas *in vitro* no presente trabalho descarta esta hipótese, uma vez que as amostras foram obtidas por cultivo assimbiótico. Além disso, a relação da fluorescência entre os picos seguiu padrão 1:2:4 em *C. intermedia* e *C. forbesii* e de 1:2:4:8 em *E. fulgens*, indicando a ocorrência de endoreduplicação completa.

A observação endopoliploidia no tecido de plantas já foi relatada por diversos autores (EMSHWILLER, 2002; LOUREIRO et al., 2006), inclusive em orquídeas (FUKAI et al., 2002; RUPP et al., 2010; YANG; LOH, 2004). Em plantas superiores a ocorrência de endopoliploidia é uma característica comum, ocorrendo na maior parte das espécies, tecidos e órgãos (D'AMATO apud BAROW; JOVTCHEV, 2007). Este fato possui implicações diretas na cultura de tecidos, como na escolha do tecido utilizado como explante inicial e sua relação com a ploidia dos regenerantes. Iantcheva et al. (2006), por exemplo, destacam a importância do conhecimento da ploidia do explante utilizado na indução de embriões somáticos devido à reconhecida frequência de ocorrência de endopoliploidia em plantas. Em cotilédones de *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, foram constatadas células com quantidade de DNA de até 256C (BAROW; JOVTCHEV, 2007).

Em alguns casos a detecção de picos com grande quantidade de DNA pode ser atribuída à formação de agregados de núcleos que acabam emitindo fluorescência em dobro, principalmente quando o número de eventos é reduzido (BAROW; JOVTCHEV, 2007). No entanto, o número de eventos observados e a presença de picos em absolutamente todas as leituras, tanto de plantas adultas como *in vitro*, contraria essa possibilidade, indicando realmente se tratar de endorreduplicação. A observação de núcleos com tamanhos distintos no estabelecimento inicial do protocolo (**Figura 19C**) dá suporte a esta hipótese, uma vez que existe correlação positiva entre o volume do núcleo e a quantidade de DNA nuclear (BAETCKE et al. apud LEITCH; BENNETT, 2007). No entanto, a confirmação dos resultados com contagem cromossômica é recomendável, devendo esta ser de preferência precedida de outras investigações buscando identificar a exata localização de cada tipo celular nos tecidos foliares.

A observação do mesmo padrão de histogramas em plantas adultas e *in vitro* indica que ambas podem ser usadas para estudos e quantificação do DNA nuclear das espécies em questão e, possivelmente, de outras espécies de orquídeas. A maior quantidade de eventos (núcleos) e a melhor qualidade de histogramas, no entanto, fazem das plantas *in vitro* a melhor fonte de material, podendo esta estratégia vir a ser adotada em estudos futuros.

A quantidade de células com diferentes conteúdos de DNA nuclear entre plantas *in vitro* e adultas seguiu um padrão esperado em *C. intermedia* e *C. forbesii*, onde a proporção de células 4C e 8C foi maior em plantas *in vitro*. Isso ocorre porque essas duas categorias também englobam células 2C e 4C na fase G2 do ciclo celular, sendo que posteriormente estas irão sofrer mitose e aumentar a quantidade de células das menores categorias. Como as folhas de plantas *in vitro* ainda estão em crescimento ativo espera-se uma maior proporção de células na fase G2 do ciclo celular, corroborando com o observado. Já em *E. fulgens* foi observado o contrário. Em plantas adultas a proporção de células 16C foi maior e em plantas *in vitro* as células 2C ocorreram em maior número. Uma das hipóteses para explicar tal observação é que as plantas *in vitro* de *E. fulgens* estavam relativamente mais desenvolvidas que as de *C. intermedia* e *C. forbesii*, tendo consumido inclusive quase a totalidade do meio de cultura, ao passo que em plantas adultas foram utilizadas folhas bem jovens para evitar a presença de antocianinas comuns em folhas mais velhas na espécie.

Com a análise concomitante das amostras de orquídeas e de *P. sativum*, seguindo todas as recomendações para atingir acurácia nas leituras, foi possível estimar o valor C de DNA de três das cinco espécies estudadas. Dentre elas apenas *C. forbesii* já possui estimativa (JONES et al. 1998), sendo que o valor obtido no presente trabalho diverge muito pouco deste. Os autores estimaram em 1,65 pg o valor C de DNA de *C. forbesii* contra 1,76 pg do presente trabalho. Esta diferença pode ser atribuída ao uso de diferentes padrões de referência, já que Jones et al. (1998) utilizaram eritrócitos de frango. Isso torna a estimativa de *C. forbesii* obtida no presente trabalho mais confiável, uma vez que o uso de eritrócitos de frango não é recomendado por razões como baixa similaridade biológica, variação de DNA entre machos e fêmeas, entre outras (GREILHUBER et al., 2007).

O valor calculado para *E. fulgens* é praticamente o mesmo do obtido para *E. steinbachii* por Jones et al. (1998), a única espécie do gênero *Epidendrum* com valor C conhecido. Os valores próximos sugerem certa acurácia na leitura, no entanto, pouco se pode afirmar em relação a este gênero, que é o mais numeroso da família e possui estimativa para uma única espécie até o momento de acordo com o *Plant DNA C-value Database* (2012).

Para *C. intermedia* não existe nenhuma estimativa publicada até o momento. O valor obtido para esta espécie é muito próximo do de *C. forbesii*, não havendo inclusive diferença estatística entre os dois pelo F-teste (dados não mostrados). Esta grande proximidade pode ser atribuída aos coeficientes de variação (CV's) obtidos, que estão dentro de valores aceitáveis (DOLEZEL; BARTOS, 2005), mas altos o suficiente para dificultar a obtenção de diferenças mais apuradas. Por outro lado, essas duas espécies não apresentam apenas conteúdos de DNA muito próximos. Van den Berg et al. (2009), através de análise de sequências de DNA de origem nuclear e de plastídios, verificaram uma enorme proximidade filogenética entre *C. intermedia* e *C. forbesii*, o que aliado aos dados obtidos com o presente trabalho indicam uma proximidade muito grande entre as duas espécies em termos moleculares.

O valor C de *B. tuberculata* foi calculado apenas para constituir um dado de referência para a espécie, por serem estes os únicos disponíveis. Este valor é apenas uma aproximação, pois é baseado em apenas duas leituras de um único genótipo, adulto. No entanto, este dado pode servir como referência para estudos futuros, como na escolha de um padrão de referência mais adequado, por exemplo.

Segundo Greilhuber et al. (2007), o padrão de referência e a amostra devem ter tamanhos de genoma diferentes, serem biologicamente similares, e os picos de ambos não devem se sobrepor, devendo a diferença entre eles ser igual ou superior o somatório de três vezes o desvio padrão de ambos. O valor C de *C. purpurata* não pôde ser estimado devido a total sobreposição dos picos desta com os de *P. sativum*. Apesar disso, com este resultado se sabe que o valor C de DNA de *C. purpurata* é muito próximo ao de *P. sativum*, sendo necessário o uso de outro padrão de referência para correta estimativa do valor C desta espécie em estudos futuros.

4.2. ESTABILIDADE DE PLOIDIA DE REGENERANTES OBTIDOS POR MEIO DA INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE ESP DE *Cattleya tigrina*

A ocorrência de endopoliploidia tem correlação positiva com a família botânica e é órgão específica (BAROW; JOVTCHEV, 2007), podendo também variar dentro do mesmo órgão, como demonstrado por Yang e Loh (2004) em folhas de *Spathoglottis plicata*, onde a endopoliploidia diminui da base para o ápice da folha. A ocorrência de autopoliploidia não intencional *in vitro* já foi relatada no cultivo de outras espécies de orquídeas. Meesawat et al. (2008), numa tentativa de estimar o valor C de DNA de *Dendrobium crumenatum*, observaram que apenas os regenerantes obtidos do primeiro cultivo mantinham a mesma ploidia da planta mãe, enquanto nos cultivos subsequentes uma grande quantidade de poliplóides e quimeras eram obtidos. Em outros casos a poliploidia induzida *in vitro* ocorreu sem a utilização de inibidores do fuso mitótico e como decorrência do seccionamento de protocormos jovens (CHEN, W. H. et al., 2009). Auxinas tais como o 2,4-D quando presentes no meio de cultura podem aumentar a regeneração de genótipos poliplóides (CHEN, F.-C.; CHEN, W.-H., 2007).

A duplicação da ploidia de 100% dos regenerantes avaliados em relação às plantas mãe, sua causa, e o momento em que ocorreu são as principais perguntas levantadas com os resultados obtidos no presente trabalho. Os ESP dos quais os regenerantes foram obtidos foram induzidos em meios de cultura com TDZ, um fitorregulador que possui ação análoga a de citocininas, uma classe de hormônios que segundo

Barow e Jovtchev (2007), ao contrário das auxinas, são antagonistas da endopoliploidização. Isso possivelmente ocorre devido à participação das citocininas na indução da expressão de genes que codificam cinases responsáveis pela transição G2 para M do ciclo celular (PERES; KERBAUY, 2008). No entanto, a reconhecida atividade auxínica do TDZ (GUO et al., 2011) e o uso de GA₃ na fase de regeneração dos ESP, um fitorregulador com reconhecida influência na endopoliploidização (BAROW; JOVTCHEV, 2007), não descarta a influência dos fitorreguladores na alteração da ploidia dos regenerantes.

Apesar disso, a observação de 100% de regenerantes com o dobro da ploidia das plantas mães indica que possibilidade da poliploidização ter ocorrido durante a multiplicação ou regeneração dos ESP é muito baixa. A ocorrência de células com dois níveis de ploidia em folhas de *C. tigrina* levanta uma hipótese mais provável: a possibilidade de que os ESP tenham sido induzidos inicialmente a partir de célula(s) do explante com 4C de DNA, dando origem já de início a ESP com o dobro da ploidia do explante. Essa possibilidade merece uma maior investigação, sendo que para isso são sugeridos estudos histológicos objetivando localizar as células 2C, 4C e 8C nas folhas e sua relação com a gênese dos ESP.

5. CONCLUSÕES

A ocorrência de polissomatismo (entendido aqui como o equivalente ao termo em inglês *Polysomaty*, indicando a ocorrência de células de diferentes ploidias no mesmo tecido), nas folhas de *C. intermedia*, *C. forbesii*, *C. tigrina* e *E. fulgens* demonstradas com o presente trabalho possui algumas aplicações práticas. Na cultura de tecidos, o uso de tecido foliar como explantes, nessas espécies, pode resultar na obtenção de regenerantes com ploidia alterada, assim como foi demonstrado em *C. tigrina*. Isso pode ser considerado negativo, uma vez que um protocolo, mesmo quando altamente eficiente, como o proposto para *C. tigrina* no segundo capítulo desta dissertação, perde o valor do ponto como uma ferramenta de clonagem, uma vez que a fidelidade genotípica dos regenerantes em relação as matrizes não é mantida. No entanto, o oposto também pode ser considerado, já que genótipos poliploides de orquídeas são altamente desejados em programas de melhoramento genético, ainda mais quando se considera a obtenção de 100% de regenerantes poliplóides, valor dificilmente alcançado em qualquer protocolo visando à obtenção intencional de poliplóides.

Estudos futuros de contagem cromossômica para validação total dos resultados obtidos quanto à ocorrência de polissomatismo são altamente desejáveis, assim como análises histológicas buscando identificar a localização dos diferentes tipos celulares nas folhas, a origem dos ESP, e a relação de ambos com as alterações de ploidia verificadas.

A demonstração da estabilidade de ploidia entre plantas adultas e plantas *in vitro* obtidas a partir de embriões zigóticos abre novas possibilidades para estudos futuros, uma vez que as leituras são mais acuradas devido a menor presença de compostos fenólicos, ausência de outros organismos e uso de grande número de genótipos. A obtenção de estimativas confiáveis do valor C de DNA de *C. intermedia*, *C. forbesii* e *E. fulgens* adiciona novos dados à pobre lista informação existente para a família Orchidaceae e pode servir como base para estudos futuros de espécies deste táxon.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAROW, M.; JOVTCHEV, G. Endopolyploidy in Plants and its Analysis by Flow Cytometry. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. p.349-370. WILEY, 2007.

BAROW, M; MEISTER, A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics , organ , life strategy and genome size. **Plant Cell and Environment**. n. 26, p. 571-584, 2003.

BESNARD, G.; GARCIA-VERDUGO, C.; CASAS, R. R. DE; et al. Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. **Annals of botany**, v. 101, n. 1, p. 25-30. 2008.

CHEN, J-T.; CHANG, W-C. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). **Plant science (Shannon, Ireland)**, v. 160, n. 1, p. 87-93. 2000.

CHEN, J-T; CHANG, W-C. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* “ Gower Ramsey .”**Plant Growth Regulation**, p. 229-232, 2001.

CHEN, F-C.; CHEN, W-H. Somaclonal Variation in Orchids. In: W-H. Chen; H-H. Chen (Eds.); **Orchid Biotechnology**. 1st ed., p.65-76. World Scientific Publishing, 2007.

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

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; ARAÚJO, F. S.; ABREU, I. S.; OTONI, WAGNER CAMPOS. Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, n. 2, p. 207-214. 2007.

COSTICH, D. E.; MEAGHER, T. R.; EDWARD, J. A Rapid Means of Sex Identification in *Silene latifolia* by use of Flow Cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 9, n. 4, p. 359-370, 1991.

DAVIES, D.; ALLEN, P. DNA Analysis by Flow Cytometry. In: M. G. Macey (Ed.); **Flow Cytometry Principles and Applications**. 1st ed., p.165-179. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 51, n. 2, p. 127-8. 2003.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J.. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of botany**, v. 95, n. 1, p. 99-110. 2005.

DOLEZEL, J.; GOHDE, W. Sex determination in dioiceous plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. **Cytometry**, v. 19, p. 103-106, 1995.

EMSHWILLER, E. Ploidy Levels among Species in the “*Oxalis tuberosa* Alliance” as Inferred by Flow Cytometry. **Annals of Botany**, v. 89, n. 6, p. 741-753. 2002.

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

FUKAI, S.; HASEGAWA, A.; GOI, M. Polysomaty in *Cymbidium*. **Hortscience**, v. 37, n. 7, p. 1088-1091, 2002.

GOW, W-P.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 2, p. 363-369. 2008.

GREILHUBER, J.; TEMSCH, E. M.; LOUREIRO, J. Nuclear DNA Content Measurement. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow**

Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. 1st ed., p.67-99. WILEY, 2007.

GUO, B.; ABBASI, B. H.; ZEB, A.; XU, L. L.; WEI, Y. H.
Thidiazuron : A multi-dimensional plant growth regulator. **Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, p. 8984-9000, 2011.

IANTCHEVA, A.; ATANASSOV, M.; VLAHOVA, A. Somatic Embryogenesis in Genera *Medicago* : an Overview. In: A. Mujib; J. Samaj (Eds.); **Somatic Embryogenesis**. 1st ed., v. 2005, p.285-304. Springer. 2006.

JONES, W.; KUEHNLE, A. R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA Content of 26 Orchid (Orchidaceae) Genera with Emphasis on *Dendrobium*. **Annals of Botany**, v. 82, n. 2, p. 189-194. 1998.

KERBAUY, G. B.. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. in: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**: volume 2. Brasília: Embrapa, 1999. Cap. 1, p. 519-531.

KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warscewiczii*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 157-159, 1996.

LEE, H. C.; LIN, T. Y.. Isolation of Plant Nuclei Suitable for Flow Cytometry From Recalcitrant Tissue by Use of a Filtration Column. **Plant Molecular Biology Reporter**, n. 23, p.53-58, mar. 2005.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome Size and its Uses: the Impact of Flow Cytometry. In: J. Dolezel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. 1st ed., p.153-174. WILEY, 2007.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of botany**, v. 98, n. 3, p. 679-89. 2006.

MEESAWAT, U.; SRISAWAT, T.; EKSOMTRAMAGE, L.; KANCHANAPOOM, K. Nuclear DNA content of the pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.) with the analysis of flow cytometry. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 277-280, 2008.

MONDIN, M.; DOCHA NETO, A. Citogenética vegetal enfatizando a família orchidaceae. **Orchidstudium**, v. 4, p. 24-54, 2006.

OCHATT, S. J.. Flow Cytometry: ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus. In: MATHESIUS, U.; JOURNET, E.p.; SUMNER, L.W.. **The Medicago truncatula handbook**. Ardmore, Okla: Isbn, 2006. p. 1-13.

OTTO, F. J.. DAPI Staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: DARZYNKIEWIEZ, Z.; CRISSMAN, H. A.; ROBINSON, J. P.. **Methods in Cell Biology**. San Diego: San Diego Academic Press, 1990. Cap. 10, p. 101-104.

POMPELLI, M. F.; BRITO, G. G. DE; OTONI, W. C.; GUERRA, M. P. Biotecnologies for ornamental plants : some insights to the Brazilian productive chain. **Journal Of Horticultural Science**, v. 13, n. 1, p. 51-59, 2007.

RODGERS, A., HIBBERT, B., PROBYN T.. Determination of Urinary Calcium Oxalate Crystallization Mechanisms and Kinetics Using Flow Cytometry. **Urologia Internationalis**, v. 55, n. 2, p. 93-100. 1995.

ROY, J.; NAHA, S.; MAJUMDAR, M.; BANERJEE, N. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 1, p. 31-39. 2007.

RUPP, B.; SAMUEL, R.; RUSSELL, A. et al. Genome size in *Polystachya* (Orchidaceae) and its. **Society**, p. 223-233, 2010.

SUDA, J.; KRON, P.; HUSBAND, B. C.; TRÁVNÍČEK, P. Flow Cytometry and Ploidy: Applications in Plant Systematics, Ecology and Evolutionary Biology. In: J. Doležel; J. Greilhuber; J. Suda (Eds.); **Flow Cytometry with Plant Cells Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. 1st ed., p.103-128. WILEY, 2007.

TANG, C.-Y.; CHEN, W.-H. Breeding and Development of New Varieties in *Phalaenopsis*. In: W.-H. Chen; H.-H. Chen (Eds.); **Orchid Biotechnology**. 1st ed., p.1-22. Toh Tuck Link: World Scientific Publishing, 2007.

THAO, N. T. P.; URESHINO, K.; MIYAJIMA, I.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 19-25, 2003.

TRÁVNÍČEK, P.; KUBÁTOVÁ, B.; CURN, V. et al. Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. **Annals of botany**, v. 107, n. 1, p. 77-87. 2011.

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L. et al. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of botany**, v. 104, n. 3, p. 417-30. 2009.

YANG, M.; LOH, C. S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. **BMC cell biology**, v. 5, p. 33. 2004.

YEATER, K. M.; BOLLERO, G. A; BULLOCK, D. G.; RAYBURN, A L. Flow cytometric analysis for ploidy level differentiation of 45 hairy vetch accessions. **Annals of Applied Biology**, v. 145, n. 1, p. 123-127. 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho foi possível desenvolver um protocolo simples, barato e eficiente para a micropropagação de *C. tigrina* por meio da indução e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (ESP). Foi demonstrado que: esta indução pode ser feita com explantes foliares íntegros; que a região da base da folha é a mais responsiva; que mesmo em meio sem reguladores de crescimento a obtenção dessas estruturas é possível.

Também foi demonstrado que a multiplicação das ESP é relativamente simples, podendo ser feita em meio sem regulador de crescimento devido a habituação das culturas e de sua autonomia temporária às citocininas. A retomada da multiplicação também pode estar relacionada à elevada disponibilidade de nitrogênio no meio de cultura devido ao uso de meio MS com a concentração original de macro e micronutrientes. Desta maneira recomenda-se que investigações futuras levem em consideração a concentração de macronutrientes, especialmente o nitrogênio.

Com a suplementação de GA₃ no meio de cultura a obtenção de brotos é mais rápida e eficiente, no entanto o subcultivo destes para a obtenção de mudas aclimatizáveis carece de mais investigações.

Com a análise em citometria de fluxo do tecido de regenerantes obtidos com o protocolo proposto, foi mostrado que o nível de ploidia dessas era o dobro em relação à dos explantes iniciais. A análise citométrica de plantas *in vitro* de outras espécies de orquídeas, obtidas através de embriões zigóticos, permitiu a observação de que o tecido foliar dessas, inclusive de *C. tigrina*, é polissomático, sendo que ciclos de endorreduplicação durante a formação do órgão dão origem a células com diferentes níveis de ploidia. A atribuição da origem dos ESP a partir de células do explante com conteúdo 4C de DNA foi levantada como a principal possível duplicação da ploidia dos regenerantes obtidos com o protocolo proposto. Requerendo, portanto, maiores investigações que comprovem ou rejeitem esta hipótese. A análise do DNA nuclear de espécimes adultos e *in vitro* de orquídeas, conjuntamente com um padrão de referência adequado, permitiu também a quantificação do conteúdo de DNA nuclear. A precisão destes dados possibilita agregar mais dados à lista de valores C já existentes e validando o uso de plantas *in vitro* para estudos futuros com este objetivo.

A obtenção de 100% de regenerantes com o dobro da ploidia dos explantes iniciais pode ser vista de forma negativa ou positiva. Sob o ponto de vista da fidelidade genotípica o protocolo pode ser visto negativamente. No entanto, se considerarmos a valorização de genótipos poliploides devido às características hortícolas impressas por estes, o protocolo pode ser visto positivamente, ainda mais quando se considera a obtenção de 100% de regenerantes poliplóides, valor dificilmente alcançado em qualquer protocolo visando à obtenção intencional de poliplóides.