

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS**

Rafaela Duarte de Liz

**ELUCIDAÇÃO DA MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DO
DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS E ESTRUTURAS
SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs) DE ESPÉCIES DE
CATTLEYA LINDL. MICROPROPAGADAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Dra. Marisa Santos

Co-orientadora: Dra. Rosete Pescador

Florianópolis
2013

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

Liz, Rafaela Duarte de

Elucidação da morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de espécies de *Cattleya* Lindl. micropropagadas / Rafaela Duarte de Liz ; orientadora, Marisa Santos ; co-orientadora, Rosete Pescador. - Florianópolis, SC, 2013. 119 p.

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. Orchidaceae. 3. Micropropagação. 4. Protocormos. I. Santos, Marisa. II. Pescador, Rosete. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.


**Elucidación da morfo-histodiferenciação
do desenvolvimento de protocormos e
estruturas semelhantes a protocormos
(ESPs) de espécies de *Cattleya* Lindl.
micropropagadas**

por

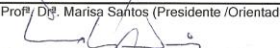
Rafaela Duarte de Liz

Dissertação julgada e aprovada em 28/02/2013, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.


Banca Examinadora:




Prof.^a Dr.^a Marisa Santos (Presidente /Orientador)




Prof. Dr. Lirio Luiz Dal Vesco (UFSC-Curitiba)



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (CCA/UFSC)



Dr.^a Gabriela Claudia C. Inocente (CCA/UFSC)



Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2013

Ao meu filho Nicolas Heraclito Liz de Lima DEDICO

*“O que está formado
transforma-se de novo imediatamente
e nós temos, se quisermos de
algum modo
chegar à intuição viva da
Natureza,
de nos mantermos tão plásticos
como o exemplo que Ela nos propõe”.*
(Goethe)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela existência.

Ao meu pai, Zauri Duarte de Liz (*in memoriam*) e minha mãe Maria Leni de Liz, pelo apoio eterno e as palavras confortantes.

Meu filho Nicolas Heraclito Liz de Lima que aprendeu ser paciente nas muitas horas em que não pude estar presente e também nas palavras de força, nas situações difíceis.

Minha família e as pessoas queridas pelo constante apoio e incentivo.

A minhas queridas orientadoras Profa. Marisa Santos e Profa. Rosete Pescador pela orientação, colaboração, amizade e confiança depositada durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela formação acadêmica, pela estrutura física e humana para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores formadores da banca examinadora, Dr^a. Gabriela Cangahuala Inocente; Prof^o Dr^o Lírio Luiz Dal Vesco; Prof^o Dr^o Miguel Pedro Guerra, pelas contribuições valiosas e pertinentes ao presente trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Gilmar Roberto Zaffari, pela disponibilidade em sugerir aspectos relevantes ao trabalho.

Aos Profs. Miguel Pedro Guerra e Rubens Onofre Nodari pelos ensinamentos e a oportunidade de fazer parte do RGV.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais que de alguma forma fizeram parte da minha formação.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas do CCB da UFSC.

As Profas Zenilda Laurita Bouzon e Luciane Cristina Ouriques, pelas sugestões e pelos ensinamentos durante a disciplina de Técnicas em Microscopia Eletrônica.

Ao querido Prof. Ademir Reis por me fazer preferir ser uma “*Metamorfose Ambulante*”.

Ao Sr. Carlos Gomes, pelos ensinamentos sobre as orquídeas e pelo material fornecido.

Ao Yohan Fritsche pela disponibilidade para me ajudar no início dos experimentos e compartilhar suas experiências no cultivo de orquídeas.

Ao Fabiano Deola por ser sempre assim “quieto, estranho e esquisito”, mas deu certo quando começamos a implantar os experimentos.

Às queridas amigas Morgana Lopes, Daniela de Conti, Pâmela Dall'Asta, Marília Shibata, pelos momentos de conversa, apoio, risadas, e o carinho que partilhamos nesse caminhar... nas viagens, congressos, pôsteres, facebook, celular, whatsapp e principalmente colaboração durante toda realização desta etapa.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV).

Uai, meu jovem Tiago Montagna, pelos churrascos “de quinta” que sempre causaram uma “boa impressão”.

Aos queridos do núcleo (NPFT), Felipe Steiner, Caroline Cristofolini, Andréa Mattos, Samantha Filippin, Ana Luiza Assis, Nicole Vicente, Natália Adan, Daniel Caetano Oller, no qual me proporcionaram momentos inesquecíveis durante a realização da disciplina Botânica de Campo.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG), do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e do Laboratório de Sementes da UFSC pelo espaço disponibilizado e os ensinamentos.

A secretária da Pós Graduação Bernadete Possebon Ribas, pela colaboração e disposição em resolver os trâmites e obrigações da pós.

Aos colegas do curso de mestrado e doutorado do PPG RGV pelas conversas e ajuda durante minha aprendizagem.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, CNPQ e FAPESC.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

A saber, esta é a conclusão de apenas uma etapa, muitas outras virão e o mais importante e legal, é o aprendizado adquirido. Posso afirmar o quanto amadureci, o quanto aprendi e sinto que preciso aprender mais e mais...

Não terminou... está apenas começando!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise da Variância
AIA	Ácido indol 3 acético
C.	<i>Cattleya</i>
ca.	cerca de
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBS	Campus de Curitiba
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESPs	Estruturas Semelhantes à Protocormo
FAPESC	Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação de Santa Catarina
GA ₃	Acido Giberélico
GAs	Giberelinas
HCl	Ácido Clorídrico
LAVEG	Laboratório de Anatomia Vegetal
LFDGV	Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MO	Microscópio Óptico
MS	Meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962)
MS/2	Meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) suplementado com metade dos macro e micronutrientes
NaOH	Hidróxido de Sódio
NPFT	Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais
pH	Potencial de Hidrogênio
PPG	Programa de Pós Graduação
PVC	Policloreto de Vinila
RGV	Recursos Genéticos Vegetais
S20G0	20 g.L ⁻¹ de sacarose
S20G5	20 g.L ⁻¹ de sacarose e 5 µM de giberelina
S5G5	5 g.L ⁻¹ de sacarose e 5 µM de giberelina
sac.	Sacarose

SC	Santa Catarina
SNK	Teste de Separação de Médias Student-Newman-Keuls
TDZ	Thidiazuron
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
±	mais ou menos
%	por cento
®	marca registrada
°C	graus Celsius
°GL	graus Gay Lussac
µg	micrograma
µm	micrômetro
µmol	micromol
µM	micromolar
µL	microlitro
cm	centímetro
g	grama
h	hora
L	litro
M	molar
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
min	minuto
nm	nanômetro
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

RESUMO	20
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO GERAL.....	25
REFERÊNCIAS.....	33
1. CAPITULO I	41
MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DAS FASES INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO DE <i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rchb. f. ex Warner A PARTIR DE SEMENTES <i>in vitro</i>	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1.1 INTRODUÇÃO.....	43
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
1.2.1 SEMENTE.....	44
1.2.2 PROCEDIMENTOS PARA O CULTIVO <i>IN VITRO</i>	45
1.2.3 PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE MORFO-HISTOLÓGICA.....	45
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
1.3.1 MORFODIFERENCIAÇÃO	46
1.3.2 HISTODIFERENCIAÇÃO	51

1.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
2.	CAPÍTULO II	61
	MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs) INDUZIDOS A PARTIR DE FOLHAS DE <i>Cattleya tigrina</i> A. Rich ex Beer	61
	RESUMO.....	61
	ABSTRACT.....	61
2.1	INTRODUÇÃO.....	62
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.2.1	INICIAÇÃO DAS CULTURAS	64
2.2.2.	ANÁLISE EM MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA (ME).....	65
2.2.3	ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA (MO).....	65
2.2.4	ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	65
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
2.4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
3.	CAPÍTULO III	81
	MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS DE <i>Cattleya tigrina</i> A. Rich	

ex Beer MICROPROPAGADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E GIBERELINA.....	81
3.1 INTRODUÇÃO	84
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	86
3.2.1 MATERIAL VEGETAL	86
3.2.2 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA (ME)	86
3.2.3 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA (MO).....	87
3.2.4 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	87
3.2.5 CARBOIDRATOS TOTAIS (CHO).....	88
3.2.6 TEOR DE AMIDO	88
3.2.7 TEOR DE CLOROFILA E CAROTENÓIDES TOTAIS	89
3.2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	89
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfodiferenciação de <i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rchb. f. ex Warner, cultivada <i>in vitro</i> , da germinação do embrião até a formação de plântula, observada em microscopia estereoscópica, do tempo zero até 21 semanas após inoculação.....	50
Figura 2 - Histodiferenciação de <i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rchb. f. ex Warner, cultivada <i>in vitro</i> , a partir de sementes, observada em microscopia óptica.....	56
Figura 3 - Estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) formadas de 7 a 20 dias após a inoculação em folhas de <i>Cattleya tigrina</i> A Rich ex Beer.....	70
Figura 4 - Estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) formadas de 25 a 60 dias após a inoculação em folhas de <i>Cattleya tigrina</i> A Rich ex Beer. A-C. ESPs formadas na base de folhas inoculadas, 25 dias após indução..	72
Figura 5 - Estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) formadas aos 70 dias após a inoculação em folhas de <i>Cattleya tigrina</i> A Rich ex Beer.	75
Figura 6 - ESPs de <i>Cattleya tigrina</i> A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico), com uma semana após inoculação..	91
Figura 7 - ESPs de <i>Cattleya tigrina</i> A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico), com duas semanas após inoculação..	94
Figura 8 - ESPs de <i>Cattleya tigrina</i> A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico), com seis semanas após inoculação..	96
Figura 9 - ESPs de <i>Cattleya tigrina</i> A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico), com 15 semanas após inoculação..	98

Figura 10 - ESPs de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 µM ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 µM ácido giberélico), com 21 semanas após inoculação..

..... 100

Figura 11 - ESPs de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 µM ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 µM ácido giberélico), com 28 semanas após inoculação..

..... 103

Figura 12 - Teores de Carboidratos Totais e Amido de ESPs de *Cattleya tigrina* A. Rich ex Beer com 28 semanas de cultivo. As letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças significativas entre as médias pelo teste SNK a 5% de probabilidade dos teores de carboidratos. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças significativas entre as médias pelo teste SNK a 5% de probabilidade do teor de amido presente nas ESPs de cada tratamento. ESPs de *Cattleya tigrina* suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5); com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5); e com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0).

..... 106

Figura 13 - Teores de Clorofila *a*, *b* e total e carotenóides (µg de Clorofila/grama de matéria fresca) em ESPs de *Cattleya tigrina* A. Rich ex Beer com 28 semanas de cultivo. As letras acima das barras indicam diferenças significativas entre as médias pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ESPs de *Cattleya tigrina* suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5); com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5); e com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0).

..... 109

RESUMO

O Bioma Mata Atlântica é um dos ecossistemas mais ricos em diversidade biológica, contudo é o mais ameaçado do planeta. O processo de devastação causado nesse bioma reduziu sua biodiversidade, afetando suas populações e comunidades como também a flora epifítica. As espécies utilizadas nessa pesquisa são epífitas pertencentes à família Orchidaceae, do gênero *Cattleya* Lindl., que estão diminuindo suas populações devido à fragmentação deste ecossistema. A conservação *ex situ* tem sido uma importante ferramenta para a conservação das espécies ameaçadas e a micropropagação permite a conservação destes recursos genéticos vegetais. No presente trabalho foram propostas três investigações relacionadas a morfo-histodiferenciação de orquídeas do gênero *Cattleya*. Com o objetivo de compreender os estádios referentes a germinação e formação de protocormo até a fase de plântula, estudou-se a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f. ex Warner *in vitro*, caracterizando a diferenciação morfológica e histológica durante os processos de germinação e desenvolvimento dos protocormos até o estágio de plântula. Sementes *C. amethystoglossa* passaram pelo processo de desinfestação e foram inoculadas em meio de cultura MS/2. As análises revelaram que o embrião após intumescimento rompe a testa, caracterizando a germinação e constitui o protocormo, o qual, no desenvolvimento, apresenta-se com primórdios foliares, no ápice, e rizóides, na base. No estágio que surge a primeira raiz passa a constituir a plântula. Nesse estágio em que o protocormo passa a ser uma plântula e esta constituído pelas primeiras folhas, pode-se induzir a formação das estruturas semelhantes a protocormos (ESPs). Utilizando este processo, no capítulo II, foi objetivado investigar através de estudos morfológicos e histológicos a etapa de obtenção das ESPs utilizando o processo de indução de explantes foliares de *Cattleya tigrina* A. Rich. ex Beer. Como explantes foram utilizados folhas jovens de *C. tigrina* cultivadas *in vitro*, inoculadas com a face abaxial em contato com o meio de cultura baseado em MS e suplementado com a metade das concentrações de macro e micronutrientes, suplementado com 20 µM de TDZ para induzir a formação das ESPs. A regeneração destas estruturas teve origem epidérmica, iniciando na face abaxial da folha inoculada. A região basal dos explantes foi a que apresentou maior quantidade de regeneração das ESPs. Estas ESPs apresentavam rizóides,

na sua base, com a função de obtenção de nutrientes. A proliferação destas ESPs aconteceu gradativamente e em estádios mais avançados foram mais numerosas e mais volumosas. Estas ESPs foram selecionadas e subcultivadas em meio de cultura isento de fitoreguladores. Com a obtenção destas ESPs, objetivou-se estudos relacionados a morfo-histodiferenciação das ESPs, sob diferentes concentrações de giberelina e sacarose, para regeneração ou desenvolvimento de *C. tigrina*. As análises revelaram que as ESPs submetidas ao tratamento suplementado com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5 µM ácido giberélico (S5G5) apresentaram uma melhor resposta morfológica e histológica de diferenciação em relação aos outros tratamentos. Estas ESPs permaneceram com a coloração verde, com alongamento caulinar e primórdios foliares. Os tratamentos submetidos com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) e 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5 µM giberelina (S20G5), não foram eficientes na regeneração de plantas, observando necrose total e ou parcial das ESPs. Para isso foi proposto realizar análises bioquímicas, verificando o teor de amido, carboidratos totais, clorofila *a* e *b*, e carotenóides totais. A partir dos resultados foi constatado que o tratamento S20G0 apresentou as concentrações mais elevadas de teores de carboidrato e amido, remetendo para alta concentração de sacarose no meio. Os teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides nos tratamentos S20G5 e S5G5 apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o tratamento S20G0. Sugere-se que a alta concentração de sacarose no meio de cultura pode ter ocasionado redução nos teores de clorofila e conseqüentemente na fotossíntese. De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que as ESPs suplementadas com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5 µM de ácido giberélico estiveram mais aptas a formar plantas, pois apresentaram parte aérea alongada, com primórdios foliares. Com estes resultados foi possível elucidar processos de desenvolvimento de *C. amethystoglossa*, a partir da germinação, e de *C. tigrina*, a partir da indução para obtenção de ESPs. Análises comparativas das ESPs submetidas a diferentes concentrações de sacarose e giberelina mostraram que elevados níveis de sacarose, para regeneração das ESPs, podem vir a ocasionar necrose das ESPs. O meio suplementado com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5 µM de ácido giberélico, através das análises morfo-histológicas e bioquímicas, revelou ser o mais eficiente para obtenção de plantas.

ABSTRACT

The Atlantic Forest biome is one of the richest ecosystems in biological diversity, yet it is the most endangered in the world. Devastation of this biome has diminished its biodiversity, affecting its populations and communities as well as the epiphytic flora. The species used in this research are epiphytic belonging to the Orchidaceae family, genus *Cattleya* Lindl., whose populations have declined due to the fragmentation of this ecosystem. *Ex situ* preservation has been an important tool for managing the preservation of endangered species, and micropropagation enables the preservation of plant genetic resources. In the present work, three investigations were proposed for the morpho and histodifferentiation of orchids of the genus *Cattleya*. Aiming to understand the stages relating to the germination and formation of protocorm until reaching the plantlet phase, nonsymbiotic *in vitro* germination of seeds of orchids *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f. ex Warner was studied, characterizing the morphological and histological differentiation during the processes of germination and development of protocorms until the seedling stage. Seeds of *C. amethystoglossa* were disinfected and inoculated in a MS/2 culture. The analyses revealed that the embryo after swelling breaks the testa cell, characterizing germination, and constitutes the protocorm, which, during development, presents leaf primordia at the apex and rhizoids at the base. At the stage when the first root emerges, it becomes a plantlet. In this stage, in which the protocorm becomes a seedling and is constituted by the first leaves, one can induce the formation of protocorm-like bodies (PLBs). Using this process, in Chapter II, the objective was to investigate via morphological and histological studies the stage of PLBs development, using the process of induction of leaf explants of *Cattleya tigrina* A. Rich. ex Beer. As explants, young leaves of *C. tigrina* cultured *in vitro* were inoculated with the abaxial surface in touch with the MS medium and supplemented with half of the concentrations of macro and micro nutrients, supplemented with 20 μM of TDZ to induce the PLBs development. The regeneration of such structures had epidermal origin, starting on the abaxial surface of the inoculated leaf. The basal region of the explants presented the greatest PLBs regeneration. Such PLBs had rhizoids at their bases, with the function of obtaining nutrients. Proliferation of the PLBs occurred gradually and in the most advanced stages they were more numerous and voluminous. Such PLBs were selected and sub-cultured in culture

medium free of plant growth regulators. Upon the development of the PLBs, the goal was to study the morpho and histodifferentiation of the PLBs under different concentrations of gibberellin and sucrose, for regeneration or development of *C. tigrina*. The analyses showed that the PLBs undergoing treatment supplemented with 5 g.L⁻¹ of sucrose and 5 µM of gibberellin acid (S5G5) presented the best morphological and histological differentiation response compared with other treatments. Such PLBs remained with a green color, with elongation of the shoots with leaf primordia. Treatments with 20 g.L⁻¹ of sucrose (S20G0) and 20 g.L⁻¹ of sucrose and 5 µM of gibberellin (S20G5) were not effective in the plants regeneration, and total or partial necrosis of the PLBs was found. As a result, it was suggested to conduct biochemical analyses to determine the concentrations of starch, total carbohydrates, chlorophyll *a*, *b*, total and carotenoids. The results showed that treatment S20G0 had the highest concentrations of carbohydrates and starch, attributable to the high concentration of sucrose in the medium. The levels of chlorophyll *a*, *b*, total and carotenoids in treatments S20G5 and S5G5 showed significant differences when compared with treatment S20G0. It is suggested that the high sucrose concentration in the culture medium might have caused the reduced amount of chlorophyll and, as a consequence, in photosynthesis. According to the results obtained, it was possible to conclude that the PLBs supplemented with 5 g.L⁻¹ of sucrose and 5 µM of gibberellin acid were more efficient in forming plants, because they showed an elongated shoot with leaf primordia. With these results, it was possible to elucidate the development processes of *C. amethystoglossa* from germination and of *C. tigrina* from induction to develop PLBs. Comparative analyses of PLBs with different concentrations of sucrose and gibberellin showed that high levels of sucrose for PLBs regeneration might cause necrosis of the same. The morphological and histological analyses showed that the medium supplemented with 5 g.L⁻¹ of sucrose and 5 µM of gibberellin acid was the most effective for the plants development.

INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Mata Atlântica é um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de diversidade biológica (*SOS Mata Atlântica, 2012*), contém alta biodiversidade e endemismo de espécies e está entre os 25 hotspots em riqueza e número de espécies do planeta, estimando-se nele a existência de 20.000 espécies de plantas, das quais 8.000 (40%) são endêmicas (Myers *et al.*, 2000).

A Mata Atlântica é um dos biomas mais ameaçados do planeta (Silva & Tabarelli, 2000; Metzger, 2009), devido ao avanço urbano e rural do Brasil, foi o mais prejudicado com a fragmentação florestal. O processo de devastação tem sido contínuo, ocasionando perdas nos seus ecossistemas, redução na biodiversidade, relacionada com a flora epífita (Coffani-Nunes, 2002).

As epífitas compõem aproximadamente 10% das plantas vasculares conhecidas (Gentry & Dodson, 1987a). Em termos de riqueza de espécies e biomassa, as epífitas contribuem com a diversidade biológica das florestas tropicais (Nadkarni, 1985; Gentry & Dodson, 1987b). As epífitas vasculares têm sido utilizadas como bioindicadoras das mudanças climáticas, poluição e danos aos ecossistemas (Lugo & Scatena, 1992). As orquídeas representam 45,8% das espécies epífitas (Kersten, 2010).

A retirada excessiva de espécies de orquídeas, por seu grande valor ornamental, teve um impacto direto na sobrevivência e colonização de espécies. (Partomihardjo 2003). Devido aos habitats fragmentados, ocasionando a ausência de polinizadores, por causa do uso indiscriminado de agrotóxicos ou outras modificações do bioma, a conservação *in situ* não é sempre uma opção viável (Chugh *et al.*, 2009).

Orchidaceae abrangem cerca de 7% das angiospermas, sendo considerada uma das maiores famílias desse grupo (Dressler, 1993). Com aproximadamente 24 mil espécies, Orchidaceae ocorre em 40% das Monocotiledôneas (Dahlgren *et al.*, 1985), encontradas em maior abundância nos ambientes tropicais e subtropicais (Dressler, 1993).

De acordo com Pabst & Dungs (1975), o Brasil apresenta cerca de 2.300 espécies distribuídas em 191 gêneros. Barros (1996), em sua pesquisa, menciona aproximadamente 2.500 espécies para o território brasileiro.

Espécies de Orchidaceae podem ser encontradas em todas as formações vegetacionais brasileiras. A grande capacidade adaptativa das

orquídeas pode ser explicada, pelas várias formas das estruturas vegetativas presentes na família, as quais podem representar diferentes estratégias relacionadas com a obtenção e reserva de água e nutrientes (Hoehne, 2010).

Na Lista de Espécies da Flora do Brasil (2013) constam no território brasileiro 2440 espécies de orquídeas, distribuídas em 240 gêneros, dos quais 67% são endêmicos em nível de espécie. De acordo com a lista das espécies da flora brasileira, publicada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008) são consideradas ameaçadas de extinção, espécies com alto risco de desaparecimento na natureza em futuro próximo, com base em documentação científica. Nesta lista, encontram 34 espécies de Orchidaceae, das quais 7 (sete) destas espécies pertencem ao gênero *Cattleya*. Segundo esta publicação consta também as espécies da flora brasileira com deficiência de dados, que são espécies cujas informações (distribuição geográfica, ameaças/impactos e usos, entre outras) não são suficientes para permitir enquadrá-las com segurança na condição de ameaçadas. Dentre estas, estão listadas 36 espécies de Orchidaceae, das quais 3 (três) pertencem ao gênero *Cattleya*.

O Brasil, de acordo com Pabst & Dungs (1975), concentra cerca de 60% das espécies de Orchidaceae do continente americano. Neste há dois principais centros de origem da família, comentam os autores, sendo um nas florestas de altitude, localizadas nos Andes, a oeste do continente, e outro na Serra do Mar, a leste do continente.

Na Ilha de Santa Catarina (Florianópolis, SC), foram registradas 199 espécies de orquídeas; nos municípios próximos (Governador Celso Ramos, Biguaçu, São José, Santo Amaro da Imperatriz, Palhoça, Garopaba, Imaruí e Paulo Lopes) foram registradas 96 espécies (Klein *et al.*, 1977).

O gênero *Cattleya* foi estabelecido originalmente por John Lindney em 1822, na obra “*Collectanea Botanica*”, ao descrever a espécie brasileira *Cattleya labiata* Lindney, importada pelo colecionador Willhen Cattley em 1818 (Braem, 1994). *Cattleya* abrange aproximadamente 120 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (Buzzato *et al.*, 2010). Arditti e Ernst (1993) consideram “*Cattleya*” como sinônimo de “orquídea” e Menezes (1987) cita *Cattleya* como rainha das orquídeas pela sua exuberância e tamanho da flor.

As plantas de *Cattleya* apresentam rizomas bastante desenvolvidos e semi-lenhosos, dos quais saem um ou dois grupos de raízes e um novo ramo a cada estação de crescimento, o ramicaule que

origina os pseudobulbos (Braem, 1984). As flores são compostas de três sépalas, duas pétalas e uma pétala especial, o labelo, que envolve a coluna ou ginostêmio (fusão dos estames e estigma); existe apenas uma antera funcional; e ainda há uma estrutura modificada, o rostelo, a qual evita a autofecundação da flor por ocasião da visita de um polinizador (hercogamia) (Withner, 1998).

O gênero *Cattleya* está representado por duas espécies no Estado de Santa Catarina, *C. leopoldii* Versh. (sinonímia de *C. tigrina* A. Rich) e *C. intermedia* Grah.; encontradas na Ilha de Santa Catarina, nos seus arredores e também em outros locais do Estado (Klein *et al.*, 1977). As espécies de *Cattleya* estão distribuídas em duas grandes regiões. A primeira é nas montanhas do Brasil, a maioria das espécies paralelamente à costa oriental do país. A segunda região compreende os Andes, estendendo-se no sentido Leste através da Venezuela até Trinidad e no sentido Norte através da América Central até o Sul do México (Withner, 1988). De acordo com Fowlie (1977), o centro de origem de *Cattleya* seria na região costeira entre o Litoral Norte Paulista e o Sul do Rio de Janeiro, e também o Vale do Paraíba e regiões montanhosas da Serra da Mantiqueira e Serra dos Órgãos.

Embora não estejam comprovados cientificamente os danos causados pelas mudanças climáticas, relacionadas com o aquecimento global, possam vir afetar as populações de orquídeas. Presume-se que a conservação *in situ* não será suficiente para evitar a extinção das espécies. Atualmente a conservação *ex situ* através de ferramentas, como o banco de sementes de orquídeas, pode ser valiosa para a manutenção da diversidade genética, com espaço mínimo e potencial para conservação de material para possível reintrodução e programas de restauração. O projeto de iniciativa de Darwin “*Orchid Seed Stores for Sustainable Use*” (OSSSU) tem o objetivo de estabelecer uma rede global de bancos de sementes de orquídeas centrado em países com alta biodiversidade de espécies (Seaton *et al.*, 2010).

A maioria das orquídeas possui sementes extremamente diminutas, com 0,005 a 6 mm de comprimento (Arditti, 1992), destituídas de endosperma (Dressler, 1993; Clements, 1999). As sementes de orquídeas geralmente apresentam um padrão bastante uniforme de germinação e desenvolvimento, iniciando-se por intumescimento da semente que rompe o tegumento seminal e libera o embrião. Este desenvolve-se numa estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada protocormo (Arditti, 1992).

O termo protocormo foi proposto em 1890 para descrever o estágio inicial do desenvolvimento de licopodíneas, que formavam uma estrutura tuberiforme a partir da germinação dos esporos (Arditti & Ernst, 1993). Para Carlson (1943), o protocormo seria a estrutura que se apresenta com a forma de um pião ou cone invertido, na porção superior da qual está diferenciado apenas o meristema do ápice caulinar. O término do estágio de protocormo, segundo Mariat (1952), se encerraria com o desenvolvimento das primeiras folhas, mas de acordo com Veyret (1974) se estende até estágios posteriores, com a formação da raiz, após o surgimento de várias folhas. Alvarez & Sagawa (1965) determinam o final do estágio de protocormo com o aparecimento da primeira raiz, evento esse acompanhado por necrose e desaparecimento da região parenquimática. Cribb (1999) define o protocormo como um tubérculo efêmero que se desenvolve após a germinação das sementes de orquídeas e se associa a um fungo micorrízico apropriado, antes do primórdio foliar e raiz da plântula. Pridgeon *et al.* (2005) mencionam o protocormo como uma estrutura efêmera resultante da germinação de sementes de orquídeas, a partir da qual se formariam os primórdios dos sistemas caulinar e radicular.

Nas orquídeas, sob condições naturais, o protocormo permanece como tal até que seja infectado por um fungo micorrízico, quando tem início a formação da gema vegetativa e seus primórdios foliares (Harrison, 1977). Segundo Arditti (1992), tanto a germinação das sementes, quanto o desenvolvimento dos protocormos *in vitro*, não diferem muito dos mesmos eventos observados naturalmente.

O primeiro método de cultivo de plantas *in vitro* foi a germinação simbiótica de sementes de orquídeas, por 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). O grande salto na propagação de orquídeas e na cultura de tecidos em geral foi após a descoberta de Knudson, em 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 (Raghavan, 2003).

As técnicas de cultura *in vitro*, baseadas no princípio da totipotência das células vegetais, ou seja, na potencialidade de uma única célula diferenciar-se e regenerar uma planta completa, tem gerado grandes avanços nas pesquisas básicas, principalmente na fisiologia, bioquímica e genética de plantas, fornecendo ferramentas de ação em áreas práticas, como no melhoramento genético vegetal, na

farmacologia, na micropropagação e na conservação de germoplasma (George, 1993; Kerbauy, 1998).

Na propagação *in vitro*, tecidos, órgãos ou células podem adquirir novas competências pela ação de determinados sinais químicos (reguladores de crescimento) que ativam seletivamente determinados genes (Reinert, 1977). A resposta final, afirma o autor, é a expressão morfogenética em dois níveis básicos: organogênese direta ou indireta e embriogênese somática direta ou indireta. Na organogênese direta se obtém eixos caulinares monoplares originados de gemas pré-existentes. Quando é indireta ocorre a desdiferenciação do explante, resultando na formação de calos, que podem ser definidos como a proliferação de células não diferenciadas, originado meristemóides (Thorpe, 1980).

Programas de conservação de germoplasma vegetal envolvem diferentes estratégias incluindo estudos genéticos e ecológicos de plantas, manejo de hábitat, e conservação *in situ* e *ex situ*. A conservação *ex situ* inclui as técnicas de cultura de tecidos vegetais, consideradas ferramentas importantes para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (Guerra & Dal Vesco, 2010), pois criam oportunidades para compreender, utilizar e conservar recursos genéticos de plantas (Withers & Williams, 1998).

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta muito utilizada na conservação de espécies ameaçadas (Sarasan *et al.*, 2006), tanto na propagação clonal por explantes (vegetativa) como na germinação de sementes (Fay, 1994; Sarasan *et al.*, 2006). A micropropagação vem sendo utilizada em inúmeras espécies vegetais, pela alta qualidade fitossanitária das plantas produzidas, em curto espaço de tempo, independente da época do ano e pela possibilidade de manutenção da identidade genética dos indivíduos (Kozay *et al.*, 1997; Guerra *et al.*, 1999a). Stancato & Faria (1996) mencionam que a micropropagação de orquídeas tem sido utilizada para aumentar a produção de mudas, reduzindo custos e contribuindo para salvar espécies da extinção.

As orquídeas apresentam um desenvolvimento vegetativo lento, assim como a multiplicação por sementes. Das milhares de sementes produzidas em uma cápsula, aproximadamente 5% germinam. O cultivo de sementes em meio de cultura permite acelerar esse processo e elevar a taxa de germinação, tornando a multiplicação de orquídeas comercialmente viável (Stancato & Faria, 1996).

A cultura assimiótica constitui uma técnica importante, não apenas comercialmente, mas também ecologicamente. As plantas produzidas são interessantes para programas de reintrodução de espécies

nativas em áreas de preservação ambiental (Martini *et al.*, 2001). A cultura de tecidos pode também ser utilizada para a propagação massal de híbridos e espécies de orquídeas, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária em curto período de tempo (Arditti & Ernst, 1993).

Diferentes protocolos foram desenvolvidos para a propagação em grande escala de orquídeas cultivadas *in vitro*, utilizando os ápices meristemáticos (Malabadi *et al.*, 2005), segmentos foliares (Martin & Madassery, 2006), protocormos (Sheelavanthmath *et al.*, 2005; Teng *et al.*, 1997), talos florais (Chen *et al.*, 2002a; Chen & Chang, 2000a;), segmentos caulinares (Luo *et al.*, 2008) e ápices de raiz (Manners *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2003). A propagação massal é vantajosa para a cultura de sementes devido à disponibilidade anual dos expantes (Chugh, 2009). Protocolos para regeneração de ESPs foram desenvolvidos utilizando ápices meristemáticos de *Anacamptis pyramidalis* Rich (Morel, 1970); *Dendrobium* Sw. (Sharon & Vasundhara, 1990); *Cymbidium atropurpureum* (Lindl.) Rolfe. (Subramaniam & Taha, 2003); explantes foliares de *Aerides crispum* Lindl. (Sheelavanthmath *et al.*, 2005); *Aerides maculosum* Lindl. (Murthy & Pyati 2001); *Phalaenopsis* Blume (Park *et al.*, 2002a,b); *Spathoglottis plicata* Blume (Teng *et al.*, 1997); talos florais de *Aranda* hort. (Goh & Wong 1990); *Cymbidium georingii* Rchb. (Chen *et al.*, 2002b); *Oncidium* Sw. (Chen & Chang 2000b); segmentos radiculares de *Clowesia warszewiczii* (Lindl.) Dodson (Kerbaui & Estelita 1996); *Cymbidium* Sw. (Yasugi *et al.*, 1994); *Doritaenopsis* Guillaumin & Lami (Park *et al.*, 2003); *Vanda coerulea* Griff. (Lang & Hang 2006); a aplicação da técnica da camada fina (*Thin Cell Layer Technique - TCL*) de diversas regiões da planta para *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. (Nayak *et al.*, 2002); *Cymbidium* (Teixeira da Silva *et al.*, 2006); *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Sw. (Kanjilal *et al.*, 1999); *Dendrobium nobile* Lindl. (Nayak *et al.* 2002); *Doritaenopsis* (Park *et al.*, 2002a,b); *Cattleya tigrina* (Fritsche, 2012).

O histórico da propagação *in vitro* de orquídeas estabelecendo os primeiros protocolos para o desenvolvimento de orquídeas através da cultura de meristemas para produção *in vitro* de *Cymbidium* foi proposto por Wimber em 1963 (Chug, 2009). Geetha & Shetty (2000) relataram o desenvolvimento *Vanilla planifolia* Andrews através de um protocolo para produção em grande escala. Para obtenção de ESPs através da indução de explantes foliares, Wimber (1965) foi pioneiro utilizando folhas de *Cymbidium*. Um grande número de plantas uniformes a partir

da inoculação de folhas de *Renanthera imschootiana* Rolfe, foi relatada por Seeni & Latha (1992).

A micropropagação tem sido utilizada no Brasil para aumentar a produção de mudas, reduzindo seu custo e contribuindo para sobrevivência das espécies de orquídeas em extinção (Stancato *et al.* 2001). A micropropagação de orquídeas torna possível o aproveitamento máximo de sementes, germinam quase 100% das sementes (Moraes *et al.* 2002). O cultivo de orquídeas do gênero *Cattleya* é de grande importância para o agronegócio florícola mundial, devido à ampla capacidade de recombinação genética, além das características de suas flores como forma e tamanho, forma e durabilidade (Zanenga-Godoy & Costa, 2003).

Orchidaceae mostra rota de desenvolvimento incomum às demais plantas com sementes. O embrião geralmente é pequeno, indiferenciado e raramente envolvido por endosperma (Cameron & Chase 1998). Leroux *et al.* (1997) adotam o termo proembrião nestes casos, o que também foi adotado por Gell (2002) ao estudar o desenvolvimento de espécies de Orchidaceae. Nos representantes desta família, é discutível definir o momento da germinação; o proembrião germina e completa a formação da estrutura embrionária externamente ao tegumento da semente, o que leva ao uso do termo protocormo, em lugar de denominar plântula (Gell 2002).

Barabé *et al.* (1993) referem que o protocormo pode ser considerado uma extensão do estágio embrionário. Informações sobre a morfogênese e histogênese de espécies desta família ainda são insuficientes para fundamentar estudos aplicados de micropropagação. A morfogênese pode ser conceituada como a integração entre os processos decorrentes da divisão e diferenciação celular (Guerra *et al.* 1999b).

Seguindo esta linha de raciocínio, optou-se por adotar os termos morfodiferenciação e histodiferenciação, no presente estudo, em lugar dos termos usados mais frequentemente, morfogênese e histogênese. Entretanto, estes termos já são também utilizados em outros estudos biológicos, assim como por alguns pesquisadores em estudos com estruturas vegetais. Histodiferenciação é a aquisição de características histológicas, por um grupo de células, com a finalidade de formar tecidos definitivos que constituirão uma nova estrutura. A formação desta nova estrutura caracteriza o que denomina-se de morfodiferenciação.

Este estudo foi realizado juntamente com outras pesquisas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV- CCA – UFSC), onde estão sendo desenvolvidas diversas investigações usando como modelo a espécie *Cattleya tigrina* A. Rich. ex Beer. (Orchidaceae).

A partir de pesquisas com a espécie *C. tigrina*, desenvolvidos por Fritsche (2012), para a regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas, foi formulada a atual proposta. Este trabalho teve como objetivo estudar a morfo-histodiferenciação de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de orquídeas do gênero *Cattleya* micropropagadas, visando elucidar os processos que possibilitam a regeneração de ESPs em plântulas.

O tema foi subdividido em três capítulos: I. Foi investigada a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas de *C. amethystoglossa*, cultivadas *in vitro*, para caracterizar a diferenciação morfológica e histológica durante os processos de germinação e desenvolvimento dos protocormos até o estágio de plântula; II. Foram realizados estudos morfológicos e histológicos referentes ao processo de indução de explantes foliares de *Cattleya tigrina* para obtenção e diferenciação das ESPs; III. Foi analisada a morfo-histodiferenciação de ESPs, sob diferentes concentrações de giberelina e sacarose, incluindo quantificação dos níveis de amido, carboidrato e clorofila. Elucidando aspectos biológicos, morfológicos e histológicos extremamente relevantes sobre os sistemas regenerativos da obtenção das ESPs.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, M. R.; SAGAWA, Y. 1965. A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). **Caryologia** 18: 251-261.
- ARDITTI, J. 2008. **Micropropagation of orchids** - Vol.1 2nd ed. Blackwell Publishing.
- ARDITTI, J. 1992. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons.
- ARDITTI, J.; ERNEST, R. 1993. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons.
- BARABÉ, D.; SAINT-ARNAUD, M.; LAUZER, D. Sur la natureza des protocormes d'Orchidées (Orchidaceae). 1993. **Comptes rendus de l'Académie des sciences** 316: 139-144.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W. 2013. Orchidaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>)
- BARROS, F. 1996. Notas taxonômicas para espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum*, *Platystele*, *Pleurothallis* e *Scaphyglottis* (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica** 10: 139-151.
- BRAEM, G. J. 1984. **Die bifoliaten Cattleyen Brasiliens**. Alemanha: Hildesheim, Brucke – Verlag kurt Schmiersow.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Instrução Normativa n° 6, de 23 de setembro de 2008. **Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, v. 145, n. 185, 24 set. 2008. Seção 1, 75-83.
- BUZATTO, C. R.; FERREIRA, P. P. A.; WELKER, C. A. D.; SEGER, G. D. S.; HERTZOG, A.; SINGER, R. B. 2010. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae: Laeliinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 8: 388-398.
- CAMERON, K.; CHASE, M. 1998. Seed morphology of *Vanilloid* Orchids (Vanilloideae: Orchidaceae). **Lindleyana** 13: 148-169.
- CARLSON, M. C. 1943. The morphology and anatomy of *Calopogon pulchellus*. **Bulletin of the Torrey of Botanical Club** 70: 349-368.
- CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2000a Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). **Plant science** 160: 87-93.

- CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2000b. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium* Sweet Sugar. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 62: 95–100.
- CHEN, T. Y.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2002a. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 38: 595-597.
- CHEN, L. R.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2002b. Efficient propagation of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 38: 441–445.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, U. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae** 122: 507–520.
- CLEMENTS, M. A. 1999. Embryology. *In*: Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W. (eds.). **Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae**. v.1 Oxford: Oxford University Press, 38-58.
- COFFANI-NUNES J. V. 2002. Bromélias. *In*: Simões, L. L.; Lino, C. F. (eds). **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: SENAC, 119-132.
- CRIBB, P. J. 1999. Morphology. *In*: Pridgeon, A. M; Cribb, P. J.; Chase, M. W. (eds.). **Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae**. v.1 Oxford: Oxford University Press, 13-23.
- DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. 1985. **The families of the monocotyledons**. Berlin: Springer-Verlag.
- DRESSLER, R. L. 1993. **Phylogeny and Classification of the orchid family**. Porland: Dioscorides Press.
- FAY, M.F. 1994. In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservation? **Biodiversity and Conservation** 3: 176-183.
- FOWLIE, J. A. 1977. **The Brazilian bifoliate *Cattleyas* and their color varieties**. California: Azul Quinta Press.
- FRITSCHÉ, Y. 2012. **Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas**. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- GEETHA, S.; SHETTY, S. A. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. **Current Science** 71: 886–889.

- GELL, J. A. 2002. **Desenvolvimento inicial de três espécies amazônicas de Orchidaceae em diferentes condições de cultivo: aspectos morfo-anatômicos**. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- GENTRY, A. H.; DODSON, C. H. 1987a. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. **Annals of Missouri Botanical Garden** 74: 205-233.
- GENTRY, A. H.; DODSON, C. H. 1987b. Contribution of non trees to species richness of a tropical rain forest. **Biotropica** 19: 149-156.
- GEORGE, E. F. 1993. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Part 1, 2 Edington: Exegetics. 574p.
- GOH, C. J.; WONG, P. F. 1990. Micropropagation of the monopodial orchid hybrid *Aranda* Deborah using inflorescence explants. **Science Horticulturae** 44: 315–321.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. 2010. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. *In.*: Jain, S. M. ; Ochatt, S.J. (eds.). **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, 47-66.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. 1999a. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34: 1557-1563.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1999b. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. *In.*: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB, 2: 533-568.
- HARRISON, C. R. 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette** 138: 41-45.
- HOEHNE, F.C. 2010. **Iconografia de orquídeas do Brasil**. São Paulo: Instituto de Botânica. 640p.
- KANJILAL, B.; DE SARKAR, D.; MITRA, J.; DATTA, K. B. 1999. Stem disc culture: development of a rapid mass propagation method for *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Swartz—an endangered orchid. **Current Science** 77: 497–300.
- KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. 1996. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warscewiczii*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 8: 157–159.

- KERBAUY, G. B. 1998. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. *In*: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. v. 2 Brasília: Embrapa, 519-531.
- KERSTEN, R. A. 2010. Epífitas vasculares - Histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. **Hoehnea** 37: 9-38.
- KLEIN, R. B.; BRESOLIN, A.; REIS, A. 1977. Distribuição de Orquídeas da Ilha de Santa Catarina e Arredores. **Insula** 9: 3-29.
- KOZAY T., KUBOTA C., JEONG B.R. 1997. Environmental control for the large scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 51: 49-56.
- LANG, N. T.; HANG, N. T. 2006. Using biotechnological approaches for *Vanda* orchid improvement. **Omonrice** 14: 140-143.
- LEROUX, G.; BARABI, D.; VIETH, J. 1997. Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution** 205: 53-72.
- LUGO, A. E.; SCATENA, F. N. 1992. Epiphytes and climate change research in the Caribbean: a proposal. **Selbyana** 13: 123-130.
- LUO, J. P.; WANG, Y.; ZHA, X. Q.; HUANG, L. 2008. Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 93: 333-340.
- MALABADI, R. B.; MULGUND, S. G.; KALLAPPA, N. 2005. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. **Journal of Plant Physiology** 162: 473-478.
- MANNERS, V.; KUMARIA, S.; TANDON, P. 2010. Micropropagation of *Vanda coerulea* Griff ex Lindl.: A study of regeneration competence of roots *in vitro*. **Proceedings of the International Conference on Environmental Engineering and Applications**, Singapore (ICEEA 2010), 100-102.
- MARIAT, M. F. 1952. Réchères sur la physiologie des embryons d'orchidées. **Revue Générale de Botanique** 59: 324-377.
- MARTIN, K. P.; MADASSARY, J. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants and protocorm like bodies. **Scientia Horticulturae** 108: 95-99.
- MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36: 1319-1324.

- MENEZES, L.C. 1987. *Cattleya labiata* Lindley. **Orquídeas Brasileiras**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura.
- METZGER, J. P. 2009. Conservation issues in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation** 142: 1138-1140.
- MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. 2002. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum** 24: 1397-1400.
- MOREL, G. M. 1970. Neues auf dem Gebiet der meristema. **Forschung Die Orchidee** 21: 435– 443.
- MURTHY, H. N.; PYATI, A. N. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 37: 223–226.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-858.
- NADKARNI, N. M. 1985. Epiphyte biomass and nutrient capital of a neotropical elfin forest. **Biotropica** 16: 249-256.
- NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. 2002. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L) SW. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Science Horticulturae** 94: 107–116.
- PABST, G. F. J.; DUNGS, F. 1975. **Orchidaceae Brasiliensis**. v. 1. Hildeshein: Kurt Schmiersow.
- PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science** 164: 919-923.
- PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. 2002a. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 38: 168–172.
- PARK, S. Y.; YEUNG, E. C.; CHAKRABARTY, D.; PAEK, K. Y. 2002b. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. **Plant Cell Reports** 21: 46–51.
- PARTOMIHARDJO, T. 2003. Colonisation of orchids on the Krakatau Islands. **Teloepa** 10: 299-310.
- PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. 2005. **Genera orchidacearum**. v 4. Epidendroideae Oxford: Oxford University Press.

- RAGHAVAN, V.; 2003. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. ***In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*** 39: 437–442.
- REINERT, J. 1977. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue, and organ culture**: Berlin: Springer-Verlag.
- SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PREDERGAST, G.; ROWNTREE, J. K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*** 42: 206-214.
- SEATON, P. T.; HU, H.; PERNER, H.; PRITCHARD, H. W. 2010. Ex Situ Conservation of Orchids in a Warming World. ***The Botanical Review*** 76: 193-203.
- SEENI, S.; LATHA, P. G. 1992. Foliar regeneration of the endangered Red *Vanda*, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). ***Plant Cell Tissue Organ Culture*** 29: 167–172.
- SHARON, M.; VASUNDHARA, G. 1990. Micropropagation of *Dendrobium* Joannie Ostenhault. ***The Journal of the Orchid Society of India*** 4: 145–148.
- SHEELAVANTHMATH, S. S.; MURTHY, H. N.; HEMA, B. P.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y.; 2005. High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. ***Scientia. Horticulturae*** 106: 395–401.
- SILVA, J. M. C., TABARELLI, M. 2000. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil. ***Nature*** 404: 72–74.
- SOS MATA ATLÂNTICA. 2012. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php>> Acesso em: 19 dezembro 2012.
- STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. ***Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*** 17: 25-33.
- STANCATO, G. C.; FARIA R. T. 1996. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae). ***Lindleyana*** 11: 41-43.
- SUBRAMANIAM, G.; TAHA, R. M. 2003. Morphogenesis of *Cymbidium atropurpureum* *in vitro*. ***Malaysian Journal of Science*** 22: 1–5.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; SINGH, N.; TANAKA, M. 2006. Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus

- induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 84: 135–144.
- TENG, W. L.; NICHOLSON, L.; TENG, M. C. 1997. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. **Plant Cell Reports** 16: 831–835.
- THORPE, T. A. 1980. Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects. *In: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*. Vasil, I. K. (ed.). New York: Academic Press, 71-111.
- VEYRET, Y. 1974. Development of the embryo and young seedling stages of orchids. *In: Withner, C. L. (ed.). The orchids: scientific studies*. New York: John Wiley & Sons, 223-265.
- WIMBER, D. E., 1965. Additional observations on clonal multiplication of cymbidiums through culture of shoot meristems. **Cymbidium Society. News** 20: 7–10.
- WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. 1998. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. *In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa, 297-330.
- WITHNER, C. L. 1988. The *Cattleyas* and their relatives. I. **The Cattleyas**. Oregon: Timber Press.
- YASUGI, S.; SAKAMOTO, K.; ONODERA, K.; TAMASHIRO, M. 1994. Plantlet regeneration in root segment culture of *Cymbidium* Kenny ‘Wine Color’. **Plant Tissue Culture Letters** 11: 150–152.
- ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C.G. 2003. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botanica Brasílica** 17: 101-118.

1. CAPITULO I

MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DAS FASES INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO DE *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f. ex Warner A PARTIR DE SEMENTES *in vitro*

RESUMO

A germinação *in vitro* de sementes é considerada uma técnica importante na conservação de orquídeas ameaçadas de extinção. O estudo e a compreensão da germinação são fundamentais para estabelecer parâmetros que contribuam para sobrevivência e regeneração natural das espécies. Objetivou-se estudar a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas de *C. amethystoglossa* e caracterizar a diferenciação morfológica e histológica durante o processo de germinação e desenvolvimento dos protocormos até o estágio de plântula. Foram coletadas sementes da cápsula de *C. amethystoglossa*, posteriormente desinfestadas e inoculadas em meio de cultura MS, com a metade das concentrações de macro e micronutrientes e isento de fitorreguladores. A semente madura apresentou ápice afilado e base obtusa, constituída por testa e um embrião elipsoidal. A análise morfológica revelou que o embrião globoso, após intumescimento, rompeu a testa com 3 semanas, após inoculação, caracterizando a germinação e constituindo o protocormo. Este apresentou, com 9 semanas, ápice pontiagudo, com primórdios foliares e rizóides na base. As primeiras folhas surgiram com 14 semanas, as raízes a partir da 21ª semana, quando o protocormo passou a constituir plântula. A análise histológica indicou que o embrião globoso é formado por túnica e corpo. Após a germinação, o protocormo mostrou bipolaridade, com ápice caulinar e região basal. No ápice formaram-se os tecidos que originaram os primórdios foliares e depois as folhas. Na base, inicialmente ligada ao suspensor, que posteriormente degenerou, surgiram os rizóides. O protocormo é preenchido por parênquima meristemático; o revestimento é proporcionado por túnica que origina a epiderme, já com estômatos nos primórdios foliares. O tecido provascular surge mais tardiamente, quando o protocormo já apresenta primórdios foliares bem desenvolvidos. A germinação *in vitro* ocorreu de forma mais rápida e com alta porcentagem de

sobrevivência. Os resultados obtidos relativos a morfo-histodiferenciação poderão auxiliar para interpretação de estudos com micropropagação e estruturas semelhantes a protocormos de orquídeas. Esta análise permitiu caracterizar e discutir os termos protocormo e plântula, em Orchidaceae.

Palavras-chave: semente, embrião, protocormo, micropropagação, plântula.

ABSTRACT

In vitro seed germination has been considered an important technique for the preservation of endangered orchids. Studying and understanding germination is key to the establishment of parameters that would contribute to the survival and natural regeneration of species. This study aimed to the nonsymbiotic germination of orchid seeds of *Cattleya amethystoglossa* and to characterize the morphological and histological differentiation during the germination process and protocorm development until seedling. Seeds from capsules of *C. amethystoglossa* were collected, disinfected and inoculated on a MS culture medium with half of the concentrations of macro and micronutrients and free from plant growth regulators. The mature seed showed an elongated apex and blunt base, consisting of the testa cell and an ellipsoidal embryo. The morphological analysis showed that the globular embryo broke the testa 3 weeks after inoculation, characterizing germination and constituting the protocorm. After 9 weeks, the protocorm showed a sharp-pointed apex with leaf primordia and rhizoids at the base. The first leaves emerged after 14 weeks, the roots at the 21st week, when protocorms were developed to plantlets. Histological analysis indicated that the globular embryo is formed by tunic and corpus. After germination, the protocorm showed bipolarity, with shoot apex and basal region. At the apex, tissues were formed from which the leaf primordia and then the shoots originated. At the base, initially connected to the suspensor, which later degenerated, emerged the rhizoids. The protocorm is filled by meristematic parenchyma; the coat is provided by tunic that gives origin to the epidermis, already with stomata in the leaf primordia. The provascular tissue appears later, when the protocorm has well-developed leaf primordia. The *in vitro* germination took place more rapidly and with high survival rate. The results related to the morpho-histodifferentiation may be of help in the interpretation of studies with micropropagation and protocorms-like bodies (PLBs) of orchids. This

analysis allowed characterizing and discussing the terms protocorm and seedling in Orchidaceae.

Keywords: seed, embryo, protocorm, micropropagation, seedling.

1.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f. ex Warner, de acordo com Pabst & Dungs (1975) é uma orquídea brasileira classificada por Lindley e Reichenbach f. que foi coletada pela primeira vez na Bahia em 1856, classificada como *Cattleya guttata* var. prinzi, em 1882 obteve o status de espécie individual e recebeu o seu atual nome. Planta epífita ou rupícola, bifoliada produzindo de 2 a 3 flores. É uma planta muito alta, podendo seus bulbos atingir mais de 1 m de altura. Encontrada no sul da Bahia, em altitude entre 900 e 1200 metros nas matas altas e claras na Serra do Mar (Van Den Berg, 1996).

As sementes da maioria das angiospermas são caracterizadas pela presença de um embrião que se diferencia em cotilédono(s), radícula, plúmula e hipocótilo (Leroux *et al.*, 1997). As sementes de orquídeas possuem dimensões microscópicas. Devido a isso, muitas teorias foram propostas para elucidar a origem das orquídeas. Quase 400 anos separaram o tempo em que as sementes de orquídeas foram observadas pela primeira vez, bem como o desenvolvimento a partir de germinação assimbiótica (Yam & Arditti, 2009). Conforme os autores, as plântulas foram primeiramente descritas e ilustradas em 1804 e a associação orquídeas-fungos foi observada em 1824, porém a exigência de micorrizas para a germinação das sementes foi estabelecida somente em 1899.

As sementes de orquídeas, como refere Arditti (1992), consistem de pequenos embriões globulares, cujas células contêm algumas reservas lipídicas. O embrião é relativamente indiferenciado, elipsoidal e destituído de endosperma e cotilédono (Nishimura, 1981). Na maioria das espécies, o embrião evidencia histodiferenciação exibindo três tecidos – epidérmico, meristemático e parenquimático (Batygina *et al.*, 2003). Leroux *et al.* (1997) também ressaltam que estas sementes não contêm um endosperma, em nenhuma fase do seu desenvolvimento. As sementes, conforme Arditti (1992) apresentam um padrão de germinação e desenvolvimento, começando com a embebição das sementes que leva ao rompimento da testa, à liberação do embrião e à

formação de uma estrutura tuberiforme, chamada protocormo. A natureza do protocormo de Orchidaceae, órgão especial diferenciado a partir do embrião, tem fascinado morfologistas há mais de um século (Leroux *et al.*, 1997).

De acordo com Veyret (1974), as características do embrião de orquídeas, relativas à morfologia, biologia e desenvolvimento são mais especializadas que nas demais plantas, sendo que a germinação e o desenvolvimento diferem de outras plantas com flores (Harrison, 1977). O protocormo é considerado como uma estrutura intermediária entre o embrião e a plântula (Leroux *et al.*, 1997). Sua formação é considerada uma peculiaridade no desenvolvimento pós-seminal em orquídeas. Este termo “protocormo” foi descrito pela primeira vez por Treub (1890) para identificar uma estrutura tuberiforme com rizóides na parte inferior, formada durante a germinação dos embriões. A forma dos protocormos de Orchidaceae é específica para cada táxon, oval, alongado, em forma de disco, ramificado ou esférico (Batygina *et al.*, 2003). Sob condições *in situ*, as sementes germinam e permanecem como um protocormo até que seja infectada por micorrizas, que fornecerão a nutrição inicial, permitindo o metabolismo adicional e a formação dos primórdios foliares. A formação de raízes esclarece o autor, ocorre depois do crescimento de várias folhas (Arditti, 1992).

O presente estudo objetivou analisar a morfo-histodiferenciação de *Cattleya amethystoglossa* (Orchidaceae), cultivada *in vitro*, a partir da fase de embrião, passando por protocormo, até a constituição de plântula.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 SEMENTE

Sementes de *Cattleya amethystoglossa* (Orchidaceae) foram gentilmente cedidas pelo orquidófilo Sr. Carlos Gomes, provenientes do Orquidário Carlos Gomes, situado no Ribeirão da Ilha, Florianópolis, SC. Foram coletadas de cápsulas maduras que estavam iniciando sua abertura. As sementes levadas ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV-UFSC) sofreram processo de desinfestação e posteriores procedimentos de cultivo que possibilitaram a germinação e as análises estruturais.

1.2.2 PROCEDIMENTOS PARA O CULTIVO *IN VITRO*

As sementes foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio comercial a 0,4 %, de acordo com Alvarez-Pardo *et al.* (2006), durante 5 minutos em placas de Petry em câmara de fluxo laminar. Após este procedimento, com o auxílio de uma seringa descartável, acoplada com um filtro, as sementes foram lavadas por três vezes com água destilada estéril. As sementes foram inoculadas em frascos de vidro de 300 ml de capacidade contendo 30 ml de meio de cultura.

O meio de cultura usado foi baseado em Murashige e Skoog (1962) modificado, apresentando metade da concentração dos macro e micronutrientes, adicionado de vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951). O meio foi acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, solidificados com 7,5g L⁻¹ de ágar (Acros®) e o pH foi ajustado para 5,8 (±0,1) utilizando HCl (0,5N) e NaOH (0,5N), antes da esterilização por 20 min a 121 °C e 1,3 atm de pressão. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em frascos de vidro, selados com plástico filme, em sala de crescimento aclimatizada, com temperatura média de 25°C (± 2°C), fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa média de 50-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após a inoculação no meio de cultura MS/2, procedeu-se com avaliações semanais, até 21 semanas, acompanhando a germinação e desenvolvimento do embrião, passando pela fase de protocormo, até o estágio de plântula.

1.2.3 PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE MORFO-HISTOLÓGICA

As amostras foram coletadas semanalmente. As imagens relativas à morfologia foram obtidas através de Microscópio Estereoscópio (ME) Olympus SZH10 (Tóquio, Japão), com sistema de captura de imagens Olympus DP71, e software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, USA), no LFDGV – UFSC.

As amostras coletadas foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, lavadas no mesmo tampão, e desidratadas em série etílica gradual, sendo conservadas em etanol 70°GL (Ruzin, 1999).

Para confecção de lâminas permanentes, as amostras foram desidratadas até etanol 96°GL, infiltradas em hidroxietilmetacrilato

(Leica® Historesin, Heidelberg, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Blocos contendo as amostras foram seccionados com 5 μ m de espessura, em micrótomo de rotação Slee Cut 4055 (Mainz, Alemanha). O material foi corado com azul de toluidina (O' Brien *et al.*, 1965).

Para visualização histológica, foi utilizado Microscópio Óptico (MO) Olympus BX40, com câmera digital DP71 acoplada, e software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, USA).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de *C. amethystoglossa* cultivadas *in vitro* foram observadas e analisadas morfológica e histologicamente, possibilitando descrever as rotas de diferenciação, desde a fase de embrião, passando pela germinação do protocormo e atingindo a fase de plântula (Figuras 1 e 2).

1.3.1 MORFODIFERENCIAÇÃO

As estruturas morfológicas durante os processos de germinação e desenvolvimento pós-seminal *in vitro* de *C. amethystoglossa*, a partir da inoculação das sementes no meio de cultura até a formação de plântula, podem ser observadas na Figura 1.

A maioria das orquídeas possui sementes extremamente diminutas com 0,005 a 6 mm de comprimento (Arditti, 1992), destituídas de endosperma (Dressler, 1993; Clements, 1999). No presente trabalho, as sementes inoculadas de *C. amethystoglossa* apresentavam um tamanho de aproximadamente 500 a 700 μ m de comprimento, sendo constituídas de embrião elipsoidal e testa, portanto destituídas de cotilédone ou endosperma. Dentro de uma cápsula madura de orquídeas, foi possível encontrar milhares de sementes, como observado neste estudo. Algumas dessas sementes podem vir destituídas do embrião, tornando-as inférteis. Na figura 1A, foi possível observar duas sementes com embrião presente e uma semente sem embrião.

Os embriões constituem-se de pequenos corpos elipsoidais formados por relativamente poucas células que acumulam reservas (Harrison, 1977; Arditti, 1992), predominantemente lipídicas. Devido ao seu tamanho diminuto e a presença de reservas de óleo, embriões de orquídea não apresentam atividade metabólica completa e requerem uma

fonte de energia adicional para a germinação. Isto é normalmente fornecida pela adição de açúcar ao meio de germinação (Arditti, 1979), para ativar o metabolismo e ocorrer desenvolvimento de mudas. Conforme Arditti (1992), como nas sementes não há reservas abundantes, *in situ*, açúcares e outros químicos orgânicos são derivados a partir de uma associação com micorrizas.

No presente trabalho, uma semana após a inoculação no meio de cultura, as sementes *C. amethystoglossa* apresentaram-se intumescidas (Figura 1B), devido ao processo de embebição. De acordo com Castro *et al.* (2004), a embebição das sementes inicia com a fase de absorção de água, seguida pela fase de preparação e ativação do metabolismo na sementes, onde são ativados os processos requeridos para o crescimento do embrião, como a respiração, síntese e duplicação de DNA, início da degradação de reservas e alongamento das células da radícula.

Em *C. amethystoglossa*, o desenvolvimento dos protocormos ocorreu através de um processo morfogênico gradual. Com 2 semanas, as sementes mostraram-se com a porção central mais globosa em decorrência do intumescimento do embrião (Figura 1C), o que tornou-se ainda mais acentuado na terceira semana após a inoculação (Figura 1D), porém ainda sem romper a testa.

O embrião de *C. amethystoglossa* rompeu a testa entre quarta e quinta semana, caracterizando a germinação e constituindo a estrutura denominada protocormo (Figuras 1E e 1F), fase em que já puderam ser observados os rizóides. Kraus *et al.* (2006), constataram o rompimento do tegumento seminal, após 10 dias da inoculação *in vitro* das sementes de *Catasetum pileatum* Rchb. f., quando puderam ser visualizados os protocormos de formato cônico e coloração verde.

As sementes de orquídeas, segundo Arditti (1992), apresentam, em geral, um padrão bastante uniforme de germinação e desenvolvimento, iniciando-se pelo intumescimento da semente, que rompe o tegumento seminal e ocorre a liberação do embrião, o qual se desenvolve numa estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada protocormo. No presente trabalho, com *C. amethystoglossa* foi observado também este padrão de germinação. De acordo com o critério fisiológico, a germinação é completa quando uma parte do embrião, em geral a radícula, penetra e transpassa os tecidos que o envolvem (Kerbaui, 2004). Foi constatada em *C. amethystoglossa* a germinação do embrião, quando rompeu a testa e iniciou a fase de protocormo.

Nesta pesquisa com *C. amethystoglossa*, o desenvolvimento dos órgãos vegetativos começou a ser evidenciado com 9 semanas, quando o protocormo exibiu uma estrutura apical pontiaguda (Figura 1G), indicando o início dos primórdios foliares e a base do protocormo apresentou-se globosa e com rizóides. Para Bernard (1903) e Veyret (1974) a forma do protocormo pode variar, sendo característica para certos táxons. Em muitas espécies, entre as quais *Cattleya* é um exemplo, o protocormo é globular (Mariat, 1952); mas em outras espécies ocorrem modificações estruturais (Veyret, 1974). O protocormo de *C. amethystoglossa* apresentou-se em formato globular, de coloração verde. Os protocormos também variam em tamanho, de 2 a 24 mm de comprimento por 2 a 10 mm de largura, excepcionalmente apresentando-se maiores em *Spiranthes australis* (R. Br.) Lindl. (Clements, 1999). Philip *et al.* (1988) descreveram o protocormo com o ápice em forma de cúpula, atingido o seu tamanho máximo, antes da formação dos primórdios foliares.

No presente trabalho, na 13^a semana, o protocormo de *C. amethystoglossa* apresentou-se com seus primórdios foliares bem evidentes e a região basal mostrou-se de forma ovalada e achatada na superfície de contato com o substrato, onde encontravam-se os rizóides (Figuras 1H, 1I e 1J). Na pesquisa de Kraus *et al.* (2006), a formação dos protocormos, em *Catasetum pileatum*, iniciou aos 30 dias, mostrando-se maiores e, as principais modificações, ocorreram na sua porção superior, quando os dois primórdios foliares estavam mais desenvolvidos.

Um estudo comparativo do desenvolvimento dos órgãos foliáceos iniciais em protocormos de *Cattleya* e *Phalaenopsis* Blume foi proposto para esclarecer a sua natureza e as relações estruturais (Nishimura, 1981). De acordo com Velenowsky (1907, *apud* Nishimura, 1981), o primeiro dos órgãos foliáceos formados deve ser considerado como um cotilédone e, somente o segundo, como a folha propriamente dita. Todavia, Carlson (1943) e Veyret (1974) postularam que a primeira estrutura formada corresponderia à folha. Batygina *et al.* (2003) consideram inadequado usar o termo cotilédone para os órgãos de natureza foliar formados durante o desenvolvimento pós-seminal, baseando-se no conceito de que o cotilédone é uma folha embrionária ou seminal, afirmam que no protocormo são formadas folhas propriamente ditas. No presente trabalho, em *C. amethystoglossa* não há presença de cotilédones, mas folhas formando-se nos protocormos.

Em *C. amethystoglossa*, a formação das raízes ocorreu com 21 semanas após a inoculação; neste período a estrutura basal já não se mostrou mais tuberiforme e as folhas também apresentaram-se mais desenvolvidas (Figuras 1K e 1L). Nesta fase foi considerada como uma plântula e deixou de ser um protocormo. Kraus *et al.* (2006), registraram anatomicamente que os sistemas caulinar e radicular em *Casuarina pileatum*, já estavam bem desenvolvidos com 15 semanas de cultivo.

O protocormo surge após a germinação de sementes de orquídeas e é considerado uma estrutura intermediária entre embrião e plântula (Leroux *et al.*, 1997). Para Alvarez & Sagawa (1965), a presença de raiz e do agregado celular em degeneração indicariam o término do estágio de protocormo. A fase de protocormo encerra quando ocorre a formação de um par de raízes, acompanhada pela necrose do tecido parenquimático na extremidade basal (Philip *et al.*, 1988). Para *C. amethystoglossa*, de acordo com estas informações, que respaldam a afirmativa de que a estrutura com raízes e folhas, já corresponde a plântula (Figuras 1K e 1L), foi constatada no presente trabalho.



Figura 1 - Morfodiferenciação de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f. ex Warner, cultivada *in vitro*, da germinação do embrião até a formação de plântula, observada em microscopia estereoscópica, do tempo zero até 21 semanas após inoculação. A. Sementes *in vivo*; na esquerda e a central apresentam-se com embrião envolvido pela testa (setas) e a da direita destituída de embrião (cabeça de seta). B. Na primeira semana, embrião com aspecto intumescido. C. Com duas semanas, embrião com formato gradualmente mais globoso na porção central, ainda sem romper testa; suspensor (su) localizado na região basal do embrião. D. Na terceira semana, embrião com formato globular ainda mais intumescido. E. Com 4 semanas, rompimento da testa (te), iniciando a fase de protocormo. F. Na quinta semana, testa (te) já rompida, expondo o protocormo com rizóides (ri). G. Com nove semanas, protocormo com ápice pontiagudo determinado pelos primórdios foliares (pf); rizóides, na base. H. Na décima semana, base do protocormo achatada com rizóides; primórdios foliares, no ápice. I. Com 14 semanas, protocormo com alongamento da parte aérea, já com presença de folha (fo), mas ainda com rizóides. J. Na décima oitava semana, protocormo, já com folha, mas ainda absorvendo nutrientes por

rizóides na base. K e L. Com 21 semanas, plântulas constituídas por folhas (fo) e raízes adventícias (ra), em vista superior e lateral, respectivamente. Barras: A-F – 100 µm; G – 200 µm; H-J – 500 µm; K-L – 250 µm.

1.3.2 HISTODIFERENCIAÇÃO

Secções longitudinais das sementes de *C. amethystoglossa*, revelaram que o embrião, no tempo zero (antes de iniciar os procedimentos de cultivo *in vitro*), apresentou uma forma ovalada no sentido longitudinal com um suspensor em uma das extremidades (Figura 2A). O suspensor apresentou-se unisseriado nos extremos, mas bisseriado na porção central (Figura 2A). De acordo com Taiz & Zeiger (2004), o suspensor é um filamento composto por seis a nove células, no qual o embrião se conecta ao sistema vascular da planta. Para a formação do embrião há contribuição de apenas uma das derivadas

Em *C. amethystoglossa*, o embrião está constituído por células meristemáticas, sendo possível evidenciar a túnica (protoderme), estrato periférico que delimita o corpo (promeristema), células que exibem evidências de divisões em diferentes planos (Figura 2B). Após iniciado o cultivo *in vitro*, observou-se o intumescimento do embrião, o qual tornou-se inicialmente mais globoso (Figura 2C). Com a expansão do embrião, morfo-histologicamente não completamente formado, a testa é rompida, caracterizando a germinação de um pró-embrião e assim, a estrutura passa a constituir um protocormo (Figura 2C). Philip *et al.* (1988) descrevem a germinação do embrião em *Vanilla planifolia* Andrews acompanhada por um aumento no tamanho das células descendentes da camada basal do embrião e, conseqüentemente, as sementes rompem o revestimento e o embrião emerge, iniciando a fase de protocormo.

Em *C. amethystoglossa*, as modificações na forma e volume foram acompanhadas por diferenciações histológicas, surgindo um ápice meristemático, no extremo oposto ao suspensor; tornando-se evidente a presença de células iniciais do ápice radicular, a hipófise e o centro quiescente, apresentando o estágio cordiforme (Figura 2C). Nesta fase (Figura 2C) foi evidenciado a bipolaridade do embrião, constatado pelo ápice caulinar e o ápice radicular, em que a hipófise é o indício do ápice oposto ao ápice caulinar, que posteriormente desaparece. Quando ocorre o início da polarização nos tecidos embrionários, o primeiro indício do polo radicular é o centro de quiescência e a hipófise (Figura 2F), que

evolui para formação da raiz, vinculada ao suspensor, que mais tarde degenerou. Assim, há início de formação de raiz primária, correspondendo a radícula do embrião, que em *C. amethystoglossa* degenera. Mais tardiamente surgem as raízes adventícias. Mayer *et al.* (2011) observaram que entre trinta a quarenta dias após a inoculação de sementes *in vitro*, os protocormos de *Oncidium flexuosum* (Kunth) Lindl. mostraram diferenciação meristemática no pólo superior. De acordo com Taiz e Zeiger (2004), a hipófise é derivada da célula basal mais próxima do embrião, que vai formar a columela, ou a parte central da coifa, e uma parte essencial do meristema apical da raiz, conhecida como centro quiescente. O centro quiescente é a região no ápice radicular, onde a divisão celular é relativamente lenta, que pode ser ocasionado pelo fato de que os carboidratos chegam em quantidades insuficientes na região central, ou que esta região é mantida em um estado oxidado.

No presente trabalho, o ápice caulinar do protocormo mostrou intensa atividade meristemática, com as células da túnica dividindo-se anticlinalmente e as células do corpo exibindo divisões em vários planos, já com indícios de expansões laterais ao ápice (Figura 2D). Os protocormos podem desenvolver diversos centros de atividade meristemática, mas normalmente desenvolve-se apenas no ápice caulinar (Batygina *et al.*, 2003).

Posteriormente, em *C. amethystoglossa*, o protocormo expandiu-se mais lateralmente, ficando com a porção basal mais achatada (Figuras 2E e 2F). Na região basal, não houve evidências de presença de ápice radicular, pois estruturas precursoras degeneraram juntamente com o suspensor (Figura 2E), porém as células da camada de revestimento apresentaram rizóides (Figura 2F). A presença de rizóides é uma característica comum nos protocormos de muitas espécies tanto *in vitro* (Harrison, 1977; Nishimura, 1981) quanto em ambiente natural (Poddubnaya-Arnoldi, 1976 *apud* Arditti, 1992). Kraus *et al.* (2006) observaram rizóides na epiderme da porção basal do protocormo de *Catasetum pileatum* com 3 semanas de cultivo.

Em *C. amethystoglossa*, o ápice caulinar desenvolve-se formando os primórdios foliares (Figuras 2H). O revestimento do protocormo é proporcionado por uma túnica ou protoderme (Figura 2G), que gradualmente vai sendo substituída pelo tecido definitivo, epiderme, com presença de estômatos nos primórdios foliares (Figura 2G - ver círculo). Internamente à túnica/epiderme, o corpo origina o tecido meristemático que, ainda passível de intensa atividade meristemática e

diferenciação, constitui o parênquima meristemático (Figuras 2H e 2I), destinando-se a formação do córtex do eixo do protocormo e do mesofilo das folhas.

Todas as células meristemáticas são células do parênquima, conforme refere Mauseth (1988) são células que absorvem açúcares, água e nutrientes inorgânicos e os usam para sintetizar células inteiras. De acordo com o autor, o protoplasma recém-criado, é dividido em novas células pelos processos de divisão nuclear e divisão citoplasmática. Acrescenta também, que uma combinação ótima de uma célula com tal função é de um tamanho pequeno, com um pequeno número de organelas, o que permite uma rápida duplicação e divisão. O autor conclui que as células meristemáticas são consideradas totipotentes, isto é, são totalmente competentes para desenvolver-se em qualquer tipo de célula durante o ciclo de vida da planta. Em *C. amethystoglossa*, o parênquima meristemático é denominado parênquima porque ele já é funcional e meristemático, pois mostra indícios de intensa atividade mitótica. Este termo, referido e conceituado por Mauseth (1988) é bastante utilizado em trabalhos com Orchidaceae.

Cribb (1999) descreve o protocormo constituído por uma região meristemática na porção superior (calazal), uma região central e uma região basal (micropilar), além da epiderme com rizóides, uni ou pluricelulares. Protocormos com células parenquimáticas de tamanho menor, na região superior, e maiores, nas demais partes, têm sido observados em várias espécies de orquídeas (Alvarez & Sagawa, 1965; Harrison, 1977; Nishimura, 1981). Em *C. amethystoglossa*, foram observadas células meristemáticas na região superior do protocormo, constituindo o ápice caulinar e também na porção central do protocormo, onde correspondem as células precursoras do sistema vascular.

Kraus *et al.* (2006) descrevem na terceira semana após a inoculação, em *Catasetum pileatum*, na porção superior do protocormo, a formação de um primórdio de gema, com estruturas foliares em início da diferenciação. No presente trabalho, em *C. amethystoglossa*, no meristema apical caulinar visualizaram células menores e com conteúdo citoplasmático denso e células meristemáticas com intensa atividade mitótica. Na base do protocormo, os rizóides proporcionam a absorção de nutrientes e água, função que mais tardiamente foi assumida por raízes adventícias. Os rizóides são células da protoderme que alongam-se perpendicularmente à superfície (Figura 2G).

Os rizóides estão relacionados à fixação inicial do protocormo, em espécies epifíticas, bem como com a absorção de nutrientes (Arditti, 1967). De acordo com o autor, na natureza, o provimento inicial de nutrientes ao protocormo é realizado por fungos simbiotes como, por exemplo, basidiomicetos, por meio da degradação de reservas acumuladas ou síntese de novas substâncias metabolicamente importantes. No entanto na condição *in vitro*, os nutrientes necessários para o desenvolvimento do protocormo são providos pelo meio de cultura e os rizóides podem representar estruturas importantes, porém não necessariamente essenciais para a absorção desses nutrientes.

No presente trabalho, tecidos provasculares do protocormo em *C. amethystoglossa* (Figura 2I) diferenciam-se originando o sistema vascular do eixo do protocormo e as nervuras nos primórdios foliares. A porção apical do protocormo segue formando maior número de estruturas foliares, enquanto a região basal ainda permanece com presença de rizóides (Figura 2J). Philip *et al.* (1988) descrevem o protocormo com o ápice em forma de cúpula, atingido o seu tamanho máximo, antes da formação dos primórdios foliares, e que somente depois da formação de um par de primórdios foliares, o procâmbio abaixo do meristema apical tornou-se diferenciado. Em *C. amethystoglossa*, também foi observado a diferenciação do tecido provascular, depois da formação dos primórdios foliares (Figura 2I).

Kraus *et al.* (2006) verificaram que o padrão de desenvolvimento do protocormo de *Catasetum pileatum*, a partir da germinação de sementes *in vitro*, é similar ao apresentado por outras espécies de orquídeas já estudadas. Postulam que o padrão de desenvolvimento dos protocormos *in vitro* deve ser similar ao dos protocormos desenvolvidos *in situ*, conforme proposto por Arditti (1992), exceto pelo crescimento mais rápido dos inoculados *in vitro*.

Da mesma forma, no presente trabalho, verifica-se que o desenvolvimento inicial de *C. amethystoglossa* segue um padrão similar, *in vitro*, como *in situ*, servindo de modelo para outras espécies de Orchidaceae, em especial para espécies de *Cattleya*, fundamentando ainda outras investigações relativas a procedimentos de micropropagação. A estrutura que germina corresponde a um proembrião, por não apresentar-se completamente formado. Nas fases iniciais de desenvolvimento o protocormo, através da morfo-histodiferenciação, gradualmente forma um ápice vegetativo e um ápice radicular. O primeiro com os primórdios foliares e o segundo,

inicialmente com uma base contendo rizóides e posteriormente, com raízes adventícias, caracterizando a fase de plântula.

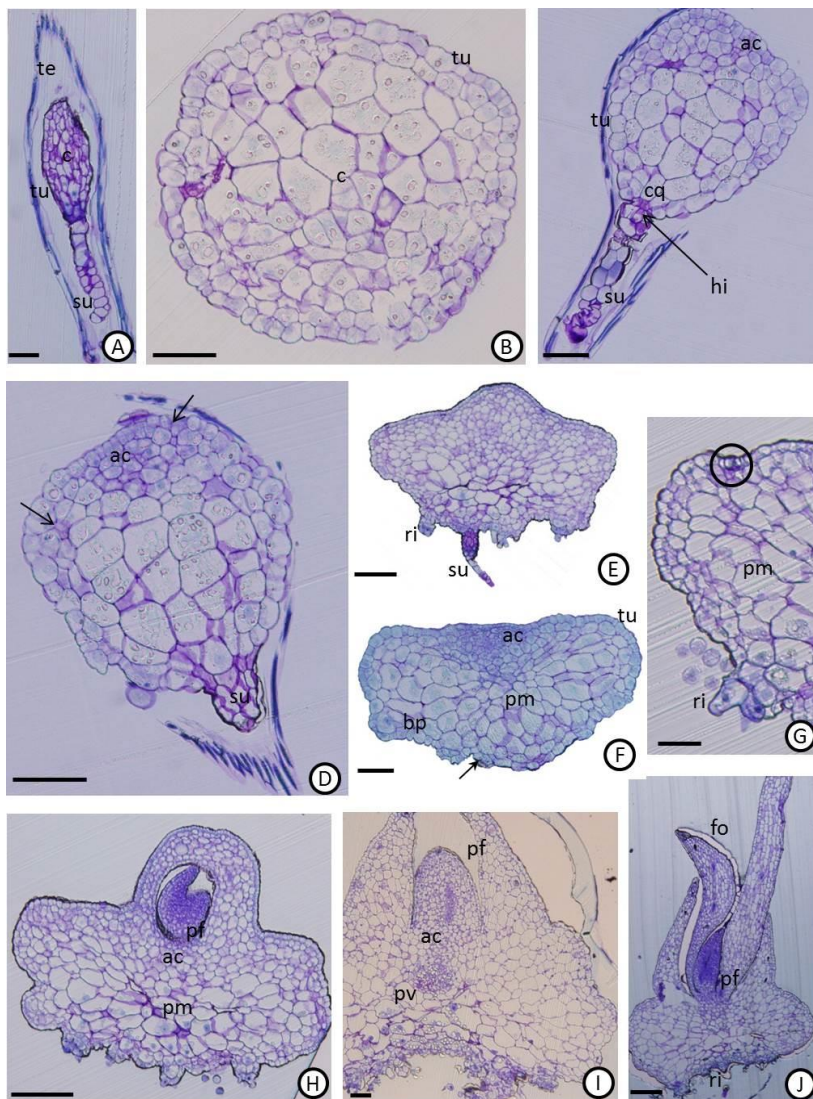


Figura 2 - Histodiferenciação de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f. ex Warner, cultivada *in vitro*, a partir de sementes, observada em microscopia óptica. A. Secção longitudinal da semente, envolvida por testa (te), contendo embrião formado por túnica (tu) e corpo (c), ligado a região basal por suspensor (su). B. Embrião em secção transversal. C. Protocormo globular, intumescido e com polaridade distinta, apresentando hipófise (hi) e centro de quiescência (cq), no polo junto ao suspensor e ápice caulinar (ac) em polo oposto. D. Secção longitudinal do protocormo com indícios de maior atividade no ápice caulinar; expansões laterais (setas) são precursoras dos primórdios foliares. E e F. Secções longitudinais de protocormos; rizóides (ri) na base do protocormo (bp); túnica delimita o parênquima meristemático (pm), que preenche a porção interna. Em E, ainda evidencia-se o suspensor, que degenera, e, em F, só há vestígios deste (seta). G. Detalhe do protocormo, com estômatos (círculo), indicando diferenciação da túnica em epiderme; na base presença de rizóides (ri). H. Aspecto geral de secção longitudinal de protocormo com primórdios foliares (pf), no ápice. I. Detalhe de protocormo, em secção longitudinal, já apresentando tecido provascular (pv). J. Protocormo com folhas (fo), no ápice, porém ainda com rizóides, na base, ainda não apresentando raízes, constituindo fase precedente à plântula. Barras: A-D, H-I – 100 µm; E, G, J – 250 µm; F – 200 µm.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, M. R.; SAGAWA, Y. 1965. A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). **Caryologia** 18: 251-261.
- ALVAREZ-PARDO, V. M.; FERREIRA, A. G.; NUNES, V. F. 2006. Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira** 24: 217-220.
- ARDITTI, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review** 33: 1-97.
- ARDITTI, J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. **Advances in Botanical Research** 7: 422-665.
- ARDITTI, J. 1992. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons.
- BATYGINA, T. B.; BRAGINA, E. A.; VASILYEVA, V. E. 2003. The reproductive system and germination in orchids. **Acta Biologica Cracoviensia** 45: 21-34.
- BERNARD, N. 1903. La germination des orchidées. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences** 137: 483-485.
- CARLSON, M.C. 1943. The morphology and anatomy of *Calopogon pulchellus*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 70: 349-368.
- CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. *In.*: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (eds.). **Germinação: do Básico ao Aplicado**. Porto Alegre: ARTMED.
- CLEMENTS, M.A. 1999. Embryology. *In.*: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. (eds.). **Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae**. Oxford: Oxford University Press, 38-58.
- CRIBB, P. J. 1999. Morphology. *In.*: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M. W. (eds.). **Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae**. Oxford: Oxford University Press, 13-23.
- DRESSLER, R. L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press.
- HARRISON, C. R. 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette** 138: 41-45.

- KERBAUY, G. B. 2004. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, W. R. 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb.f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea** 33: 177-184.
- LEROUX, G.; BARABI, D.; VIETH, J. 1997. Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution** 205: 53–72.
- MARIAT, M. F. 1952. R ch rches sur la physiologie des embryons d'orchidées. **Revue Générale de Botanique** 59: 324-377.
- MAUSETH, J.D. 1988. **Plant Anatomy**. USA: Publishing Company, Inc.
- MAYER J. L. S.; CARDOSO-GUSTAVSON P.; APPEZZATO-DAGL RIA B. 2011. Colleters in monocots: new record for Orchidaceae. **Flora** 206: 185–190.
- MOREL, G. M.; WETMORE, R. H. 1951. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany** 38: 138-140.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 495-497.
- NISHIMURA, G. 1981. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. **Botanical Gazette** 142: 306-365.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** 59: 368-373.
- PABST & DUNGS, F. 1975. **Orchidaceae Brasilienses**. Hildesheim: Kurt Schmiersow.
- PHILIP, V. J.; NAINAR, S. A. Z. 1988. Structural Changes During the *in vitro* Germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). **Annals of Botany** 61: 139-145.
- RUZIN, S.E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. New York: Oxford University Press.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2004. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed.
- TREUB, M. 1890. Études sur les Lycopodiac es VI. L'embryon et la plantule du *Lycopodium cernuum* L. **Annales du jardin botanique de Buitenzorg** 8: 1–37.
- VAN DEN BERG, C. 1996. **Estudo dos Padrões de Variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae – Laeliinae)**. Disserta o (Mestre em Ciências

Biológicas). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

VEYRET, Y. 1974. Development of the embryo and young seedling stages of orchids. *In.*: Withner, C. L. (ed.). **The orchids: scientific studies**. New York: John Wiley & Sons, 223-265.

YAM, T. W.; ARDITTI, J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reports** 3: 1-56.

2. CAPITULO II MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs) INDUZIDOS A PARTIR DE FOLHAS DE *Cattleya tigrina* A. Rich ex Beer

RESUMO

A espécie *Cattleya tigrina*, uma orchidaceae nativa da Mata Atlântica com potencial ornamental despertou interesse para que fossem utilizados métodos de micropropagação para a produção de mudas, com alta qualidade genética e sanitária, utilizando a micropropagação para indução e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos. A eficiência desta técnica depende de altos índices de indução e multiplicação das ESPs objetivando uma boa taxa regenerativa. Neste trabalho foram realizados estudos morfológicos e histológicos referentes ao processo de indução de explantes foliares para obtenção de ESPs. Para indução das ESPs, como explantes foram utilizadas folhas jovens de *C. tigrina* cultivadas *in vitro*, inoculadas com a face abaxial em contato com o meio de cultura MS suplementado com a metade dos macros e micronutrientes, acrescentado 20 µm de TDZ. A regeneração destas estruturas teve origem epidérmica, iniciando na face abaxial da folha inoculada. A região basal dos explantes foi a que apresentou maior quantidade de regeneração das ESPs. Estas ESPs apresentavam rizóides, na sua base, com a função de obtenção de nutrientes. A proliferação destas ESPs aconteceu gradativamente e em estádios mais avançados foram mais numerosas e mais volumosas. Foi possível identificar a origem histológica das ESPs a partir da inoculação de explantes foliares e fazer inferências a obtenção de ESPs de *C. tigrina in vitro*.

Palavras-chave: culturas *in vitro*, estruturas semelhantes à protocormos, origem epidérmica, orquídeas, rizóides.

ABSTRACT

The *Cattleya tigrina* species, a native orchidaceae of the Atlantic Forest with ornamental potential, has raised interest in the use of micro propagation methods for the production of seedlings with high genetic and sanitary quality, using micropropagation for the induction and regeneration of protocorm-like bodies (PLBs). The efficiency of this technique depends on high rates of induction and multiplication of PLBs

to achieve a good regenerative rate. In this work, morphological and histological studies were conducted regarding the induction process of leaf explants to obtain PLBs. For the PLBs induction, young leaves of *C. tigrina* were used as explants, cultured *in vitro* and inoculated with the abaxial surface in contact with the MS medium, supplemented with half of the macro and micro nutrients and added with 20 μm of TDZ. The regeneration of these structures had epidermal origin, beginning at the abaxial surface of the inoculated leaf. The basal region of the explants showed the highest rate of PLBs regeneration. Such PLBs showed rhizoids at the base with the function of obtaining nutrients. Proliferation of such PLBs occurred gradually, and in the more advanced stages they were greater in number and in volume. It was possible to determine the histological origin of PLBs from the inoculation of leaf explants and make inferences on the *in vitro* cultivation of PLBs of *C. tigrina*.

Keywords: *in vitro* cultures, protocorms like bodies, epidermal origin, orchids, rhizoids.

2.1 INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos sobre micropropagação de orquídeas citam Morel, que em 1960, informou que os explantes de *Cymbidium* Sw. haviam sido cultivados em meio denominado “Knudson III”, e cada broto originava várias plantas (Yan & Arditti, 1960). Porém, conforme os autores, a grande contribuição de Morel foi a introdução de nova terminologia para orquídeas, “*protocorm like body*” (PLB). Termo que, traduzido para o português, é conhecido como “Estruturas Semelhantes à Protocormos” (ESPs). De acordo com Arditti e Ernst (1993), em tecidos ou calos de orquídeas cultivadas *in vitro*, formam estruturas similares aos protocormos, sendo por esta razão denominadas ESPs. O processo de embriogênese direta ou indireta em orquídeas ocorre ao longo da formação de ESPs (Arditti & Ernst, 1993; Begum *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2008).

A propagação através da formação de ESPs é a opção preferida pelo grande número destas estruturas que podem ser obtidas dentro de um curto período de tempo. A necessidade da propagação massal tem levado ao desenvolvimento de métodos *in vitro*, sendo utilizados, para tal, os ápices meristemáticos (Malabadi *et al.*, 2005), segmentos foliares

(Martin & Madassery, 2006), protocormos (Teng *et al.*, 1997; Sheelavanthmath *et al.*, 2005), talos florais (Chen & Chang, 2000; Chen *et al.*, 2002a), segmentos caulinares (Luo *et al.*, 2008) e ápices de raiz (Manners *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2003).

De acordo com Gantait & Sinniah (2012), um sistema de regeneração com sucesso depende da indução, assim como a regeneração de órgãos para formar plântulas. As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e tem um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies (Santiago, 2001). Pesquisas com diferentes espécies de orquídeas tem utilizado citocininas como o TDZ que tem sido eficaz na indução da morfogênese *in vitro* para regeneração de ESPs de espécies de *Phalaenopsis* e *Doritaenopsis* (Ernst, 1994); *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. e *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. (Nayak *et al.*, 1997); *Oncidium* (Chen & Chang, 2000); *Paphiopedilum* Pfitzer (Chen *et al.*, 2002b); *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl. (Malabadi *et al.*, 2004); *Ansellia africana* Lindl. (Vasudevan & Van Staden, 2011); híbrido de orquídea (Gantait & Sinniah, 2012). Os mecanismos de ação do TDZ ainda não são completamente conhecidos, mesmo sua estrutura química sendo diferente de outras auxinas e citocininas têm atuado como ambas. Alguns estudos têm demonstrado sua ligação com modificações nas membranas, absorção e assimilação de nutrientes e à síntese e transporte de hormônios endógenos como o AIA (Guo *et al.*, 2011).

ESPs podem proliferar-se rapidamente e regenerar facilmente plântulas completas, por isso é o alvo para estudos de transformação genética em orquídeas (Liau *et al.*, 2003; Sreeramanan *et al.*, 2008). Além disso, ESPs são constituídos por tecidos diferenciados, que por vezes são considerados embriões de orquídeas, com estrutura bipolar distinta, apresentando meristema caulinar e radicular (Sujjaritthurakarn & kanchanapoom, 2011). Assim, as ESPs são capazes de converter-se em plântulas facilmente quando cultivados em um meio com regulador de crescimento (Ng & Saleh, 2011).

Na embriogênese de plantas superiores, comenta Clark (2001), é estabelecida uma estrutura muito simples, que contém dois agrupamentos de células tronco, meristema caulinar e o meristema radicular. O autor complementa ressaltando que o padrão do desenvolvimento pós-embriônico, nestes meristemas, é responsável pela morfologia da planta adulta, sendo o meristema caulinar responsável por todos os órgãos formados acima do solo durante o

período de vida da planta, formando continuamente novos órgãos de modo a equilibrar cuidadosamente duas atividades. A primeira é a manutenção das células-tronco indiferenciadas no centro do meristema caulinar. A segunda é a direção das células de progênie, convenientemente posicionadas para a diferenciação, de modo a serem competentes para formar os órgãos primordiais.

Este estudo teve como objetivo analisar a morfo-histodiferenciação e a origem histológica das ESPs a partir de folhas de plântulas de *Cattleya tigrina* (Orchidaceae) cultivadas *in vitro*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 INICIAÇÃO DAS CULTURAS

Para indução de ESPs foram utilizadas as primeiras e segundas folhas da base para o ápice, de *Cattleya tigrina*, cultivadas *in vitro*.

Essa espécie tem sido objeto de pesquisas com micropropagação de orquídeas no LFDGV – CCA – UFSC. Essas plantas foram gentilmente cedidas pelo Msc. Yohan Fritsche. As culturas utilizadas foram instaladas por Fritsche (2012), as plantas resultaram de sucessivos subcultivos das ESPs em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento.

O meio de cultura utilizado para indução de ESPs, no presente estudo, foi constituído pela formulação salina de MS modificado, a partir de Murashige & Skoog (1962), 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 Sigma® (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 das ESPs, este meio foi suplementado com TDZ ($20\mu\text{M}$) (Fritsche, 2012), antes do ajuste do pH, seguido pela adição de Phytigel Sigma® (2g.L^{-1}) e da esterelização a 121°C e 1,3 atm por 15 minutos.

As folhas foram inoculadas com a face abaxial em contato com o meio de cultura, em frascos de vidro, com capacidade de 300ml, com 30 ml de meio de cultura em cada frasco. Após a inoculação, as amostras foram mantidas em frascos de vidro, selados com plástico filme, em sala de crescimento aclimatizada, com temperatura média de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa média de $50\text{-}60\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

Amostras do material cultivado foram coletadas aos 7, 15, 20, 25, 30, 60 e 70 dias após a inoculação.

2.2.2. ANÁLISE EM MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA (ME)

Para análise morfológica, as imagens foram obtidas através de Microscópio Estereoscópio Olympus modelo SZH10 (Tóquio, Japão), com sistema de captura de imagens Olympus DP71, e software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, USA), no LFDGV –UFSC.

2.2.3 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

Para o estudo histológico em MO, foram preparadas lâminas permanentes. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série etílica gradual, sendo conservadas em etanol 70°GL (Ruzin, 1999). Posteriormente, as amostras foram desidratadas até etanol 96°GL, infiltradas em hidroxietilmetacrilato (Leica® Historesin, Heidelberg, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Os blocos contendo o material foram seccionados de 4 a 5 μ m de espessura, em micrótomo de rotação Slee Cut 4055 (Mainz, Alemanha). As secções foram distendidas sobre lâminas contendo água, em chapa aquecedora (42°C). Depois da secagem das lâminas, o material foi corado com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2M e pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1965).

As observações e registros foram realizados em Microscópio Olympus BX40, com sistema de captura de imagens Olympus modelo DP71, e software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, USA), no LFDGV – UFSC.

2.2.4 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Algumas amostras, após fixação e desidratação, conforme procedimentos descritos no item 2.2.3, foram secas em ponto crítico de

CO₂ modelo CPD 030 LEICA (Viena, Áustria), de acordo com Horridge & Tamm (1969). As amostras secas foram aderidas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizadora modelo EM SCD 500, LEICA (Viena, Áustria); para estudo ultraestrutural em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol® (Tóquio, Japão) modelo JSM-6390LV, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME – UFSC).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Folhas de *C. tigrina* inoculadas e cultivadas *in vitro*, aos sete dias (Figuras 3A), apresentaram evidências de desenvolvimento de ESPs, na face abaxial foliar, concentradas entre a porção média e basal (Figura 3B). Além do surgimento das ESPs, também desenvolveram-se muitos rizóides (Figura 3C), o que deve favorecer a absorção de nutrientes. A histodiferenciação das ESPs teve início a partir das células epidérmicas da folha (Figura 3J), através da divisão periclinal destas células e posteriores divisões em diversos planos.

Begun *et al.* (1994) descrevem que a divisão celular, para formação de ESPs, ocorreu a partir da superfície para os tecidos mais profundos, em uma região de protuberância, após duas semanas de cultura. Os autores acrescentaram que, os explantes foliares consistiam de células epidérmicas e subepidérmicas (parenquimáticas), grandes e vacuolizadas. Depois de uma semana de cultura, as células da epiderme romperam-se e um pequeno grupo de células sub-epidérmicas, com citoplasma denso e núcleos profundamente corados. A partir deste grupo de células foi observada a ocorrência do desenvolvimento das ESPs. No presente trabalho, a diferenciação dos tecidos foi observada na primeira semana de cultivo, mas a formação das ESPs foi mais evidente após duas semanas, quando as células epidérmicas começaram a sofrer divisões mitóticas para formação das ESPs.

Chen *et al.* (1999) constataram, em *Oncidium*, a formação das ESPs a partir de células epidérmicas ou subepidérmicas dos explantes foliares e, aparentemente, a estrutura iniciou de uma única célula. Sheelavanthmath *et al.* (2005) também registraram a formação das ESPs originadas das camadas subepidérmicas dos protocormos de *Aerides crispum* L. Mayer *et al.* (2010) descrevem ESPs originados de divisões celulares da epiderme e subepiderme apenas na face adaxial na região de ápice do explante foliar. Constata-se que dados de literatura referem a origem das ESPs a partir de células epidérmicas ou subepidérmicas,

sendo mais frequente destas últimas. Entretanto, no presente trabalho, em *C. tigrina* nenhuma evidência de origem de ESPs a partir de células subepidérmicas foi constatada, sendo a competência para tal formação esteve restrita às células epidérmicas.

No presente trabalho, em *C. tigrina*, embora na fase inicial tenham sido registradas formações de ESPs ao longo de toda metade basal da folha, aos 15 dias, estas estruturas passam a ter sua formação concentrada na região basal (Figura 3D), sendo mais raras as alterações (ESPs e rizóides) na região média da folha (Figura 3E). Nesta etapa, algumas ESPs mostraram-se mais volumosas (Figura 3F). Histologicamente, constatou-se que as ESPs são constituídas por células meristemáticas, caracterizando uma túnica e um corpo, entretanto as células do mesofilo foliar exibiram células muito amplas, bem como alguns espaços intercelulares igualmente amplos, denotando sinais de necrose celular (Figura 3K). Fritsche (2012), através de experimento de indução de explantes foliares de *C. tigrina*, verificou que a região basal apresentou a maior porcentagem de indução, quando comparada a região mediana, e também observou que todos os explantes com indução positiva na região mediana ou apical também apresentavam indução na base, e em geral mais pronunciada. Com estes resultados, verificou que a região basal da folha é a mais responsiva para a formação de ESPs em *C. tigrina*.

Em culturas com ápices de raiz para indução de ESPs, foi observado que as massas celulares meristemáticas formadas desenvolveram estruturas globulares, após 5 semanas de cultura (Park *et al.* 2003). No presente trabalho, em *C. tigrina*, nas ESPs originadas a partir de folhas, foi constatada a presença de estruturas globulares, com evidente presença de túnica e corpo, desde fases muito iniciais.

A quantidade de ESPs formados na base foliar em *C. tigrina* é ainda mais intensa aos 20 dias após inoculação, (Figuras 3G e 3H). Os rizóides, ainda presentes, mostraram-se em determinadas áreas entre as ESPs (Figura 3I). O maior volume das ESPs (Figura 3I) é determinado não apenas pela proliferação das células do corpo, mas também pela formação de novas ESPs, a partir das células da túnica da ESP inicial (Figura 3L). Nesta etapa, tornou-se ainda mais evidente o avanço da necrose celular no mesofilo (Figura 3M), que podem ser justificadas pela ampla atividade celular desenvolvida na região basal da folha. Células meristemáticas, com intensas atividades mitóticas, demandam gasto de energia e obtenção de nutrientes para esta região da planta, assim tornam as células do mesofilo foliar inativas. O conteúdo

citoplasmático destas células é preenchido por grandes vacúolos, determinando o aumento de volume destas células, que tornam-se cada vez maiores, ocasionando rompimento e a necrose celular.

Zhao *et al.* (2008) descrevem a formação de ESPs em agrupamentos globulares emergindo das partes interior ou exterior do calo, os quais são formados por células com citoplasma denso e pequenos vacúolos. Estes agrupamentos evoluem gradualmente para ESPs, desenvolvendo-se em plântulas, sob condições adequadas. Os autores relatam que a maioria destas ESPs podem proliferar-se para produzir ESPs secundárias. Sugerem, ainda, que a regeneração de plântulas de *Dendrobium candidum*, através ESPs, poderia ser considerada como uma forma de embriogênese somática e que os embriões somáticos globulares originariam-se a partir das células interiores ou exteriores do calo. Em *C. tigrina*, a formação das ESPs também começou ocorrer em agrupamentos globulares, de células meristemáticas, com conteúdo citoplasmático denso. As ESPs obtidas em *C. tigrina*, também formam novas ESPs a partir da ESP inicial, através de uma regeneração cíclica (Haccius, 1978). Em contrapartida, Zhao *et al.* (2008), afirmam que esta rota de regeneração de ESPs poderia ser considerada uma forma de embriogenese somática. No presente trabalho, não foi observado este processo no qual as células somáticas desenvolvem-se através de estágios morfológicos característicos, similares às seqüências observadas na embriogênese zigótica. Portanto, a regeneração de ESPs de *C. tigrina* não pode ser descrita como embriogênese somática.

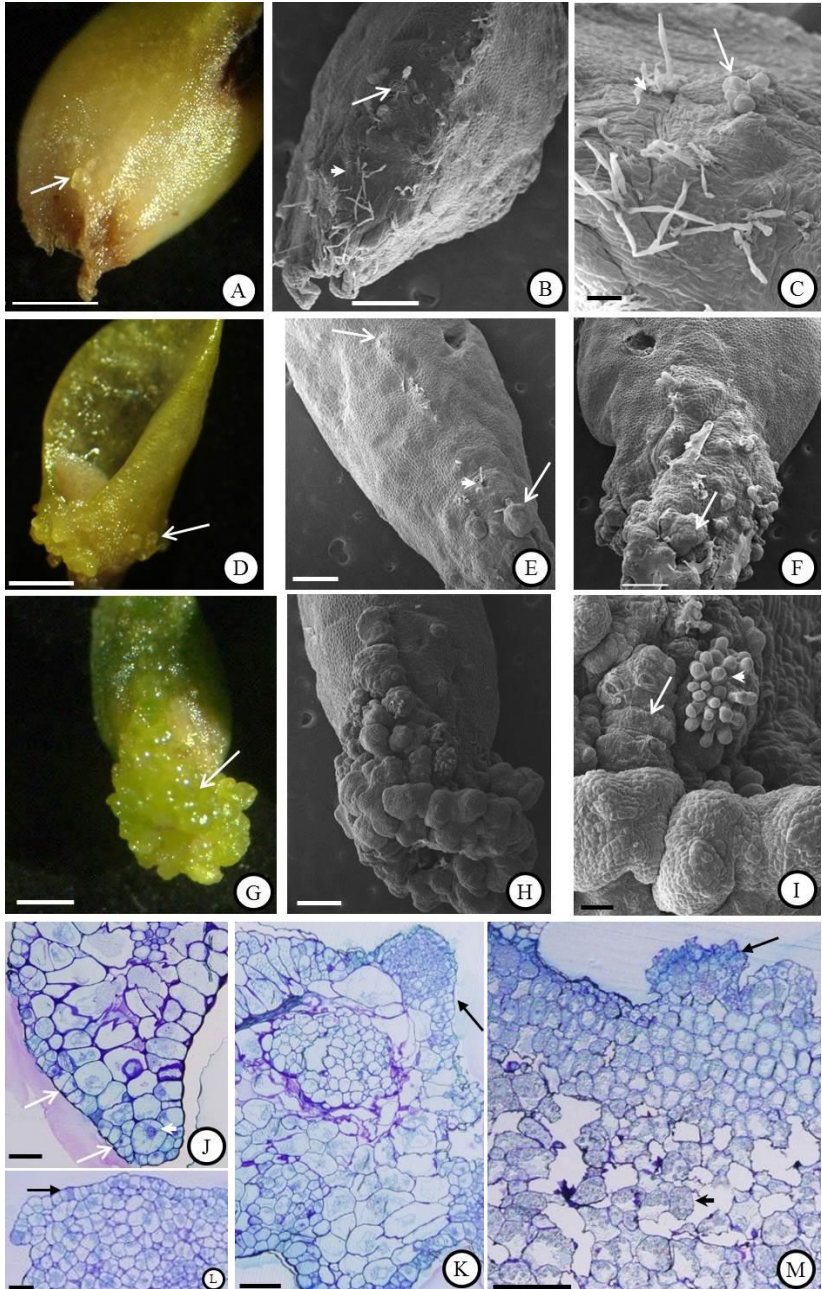


Figura 3 - Estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) formadas de 7 a 20 dias após a inoculação em folhas de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer. A-C e J. Folhas inoculadas, com 7 dias após indução. A-B. Vista geral da face abaxial da folha induzida, com início de formação de ESPs (setas) e surgimento de rizóides (cabeças de setas). C. Detalhe destas ESPs e rizóides. J. Secção transversal da folha induzida, com evidências de atividade mitótica na epiderme (setas); células do mesofilo com núcleos amplos e bastante vacuoladas (cabeça de seta). D-F e K. Com 15 dias. D-E. Formação de ESPs (setas) predominou na base da folha induzida; cabeças de seta indicam rizóides. K. Secção transversal da folha inoculada. Seta indica ESP com camada periférica de células meristemáticas (túnica) delimitando um maciço de células meristemáticas (corpo). Células do mesofilo adjacente ao ESP são amplas e também há amplos espaços intercelulares, constituindo primeiras evidências de necrose. G-I e L-M. Com 20 dias. G-I. Verificou-se um aumento no número de ESPs, na base foliar, e mais volumosos (setas); rizóides pouco alongados, mas concentrados (cabeça de seta em I). L. Secção longitudinal de ESP, com evidências de atividade mitótica na epiderme (seta), que determina a formação de novas ESPs sobre a inicial. M. Secção transversal de parte da folha induzida, destacando uma ESP (seta), sob a qual o mesofilo mostra evidências de necrose (cabeça de seta). A, D, G. Imagens em microscopia estereoscópica. B, C, E, F, H, I. Em microscopia eletrônica de varredura. J, K, L, M. Em microscopia óptica. Barras: A, D, G – 1 mm; B, E, F, H, L – 500 µm, C, I, J – 100 µm; K, M – 250 µm.

No 25º dia de cultura (Figura 4A), tornou-se visível a deterioração das folhas de *C. tigrina* inoculadas, que mostravam-se amareladas, com grande concentração de ESPs na base foliar (Figuras 4A e 4B). Begun *et al.* (1994) referem que os explantes foliares de *Cymbidium* tornaram-se castanho claro, após 7 dias de cultura, porém uma estrutura verde globular formou-se no 21º dia de cultivo.

As ESPs de *C. tigrina* mostraram-se ainda mais volumosas e, em alguns, evidenciou-se a formação de rizóides na base (Figura 4C), fato que pode denotar autosuficiência nutricional, tendo em vista a deterioração da folha inoculada. Amostras coletadas aos 30 e 60 dias (Figuras 4D a 4I) revelaram que houve apenas a formação de maior quantidade de ESPs (Figuras 4D e 4G), decorrentes da formação de novas ESPs sobre as preexistentes (Figuras 4E e 4 H), evidenciando a regeneração cíclica proposta por Haccius, em 1978, sempre com formação iniciada na túnica da ESP precedente (Figuras 4F e 4I). Batygina *et al.* (2003) também comentam sobre a formação de numerosos protocormos secundários originados a partir das células epidérmicas do protocormo inicial no cultivo *in vitro*.

A necrose dos tecidos da folha inoculada, constatada já em tempos anteriores, avançou passando, a coloração das folhas, de amarelada para tons acastanhados (Figuras 4D e 4G); destacando-se ainda que uma maior quantidade de ESPs também passou a apresentar a coloração amarelada, aos 60 dias (Figura 4G). Histologicamente, algumas ESPs apresentaram necrose nos tecidos basais (Figura 4I). Estas evidências são indicativas da necessidade da troca de meio, pois neste estágio as ESPs estão aptas a desenvolverem-se para formação de plântulas, mas requerem novos nutrientes e substrato.

Churchill *et al.* (1973) constataram que os explantes inoculados de *Laeliocattleya* Rolfe permaneciam verdes por até 45 dias, sem qualquer aparente crescimento ou mudança externa. Alguns destes explantes degeneraram; outros originaram as ESPs, as quais ao serem transferidas para outro meio, cresceram lentamente nas primeiras semanas. Mas em seguida, a taxa de crescimento aumentou, proliferando as ESPs, que permaneciam interligadas. Em *C. tigrina*, alguns explantes inoculados para regeneração de ESPs também degeneraram, outros formaram ESPs na região basal e conseqüentemente novas ESPs sobre as pré-existentes. Outros trabalhos descrevem que a regeneração das ESPs em plântulas ocorre ao se transferir as ESPs para um meio de cultura sem reguladores de crescimento (Chen & Chang, 2006; Chung *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2005, Park *et al.* 2003).

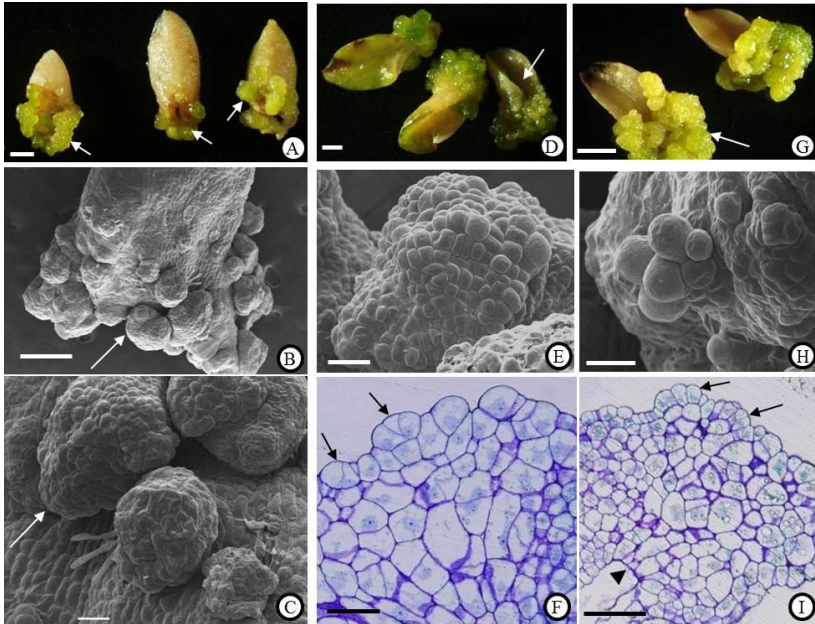


Figura 4- Estruturas semelhantes a protocormos (EPSs) formadas de 25 a 60 dias após a inoculação em folhas de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer. A-C. EPSs formadas na base de folhas inoculadas, 25 dias após indução. A. Vista da face abaxial de folhas inoculadas, com EPSs na base, mas já amareladas, indicando degeneração. B. EPSs formandos sobre outra ESP (seta). C. Rizóides na base de uma ESP (seta). D-F. EPSs, 30 dias após inoculação. D. Vista geral de folhas inoculadas, com maior número de EPSs (seta) na base foliar. E. Detalhe de ESP; superfície irregular indica formação de novas EPSs. F. Detalhe da região apical de uma ESP em seção longitudinal, com evidências de atividade mitótica na epiderme (setas), indicando formação de novas EPSs sobre a inicial. G-I. EPSs, 60 dias após a inoculação das folhas. G. Vista geral de folhas inoculadas mostrando aglomerado de EPSs na região basal (seta). H. Detalhe registrando formação de sucessivas EPSs sobre outras pré-existentes. I Seção transversal de ESP mostrando células basais em degeneração (cabeça de seta), embora novas EPSs (seta) formam-se na superfície apical. A, D, G. Imagens em microscopia estereoscópica. B, C, E, H. Em microscopia eletrônica de varredura. F, I. Em microscopia óptica. Barras: A, D – 1 mm; B – 500 μ m; C, E, F, H – 100 μ m; G – 200 μ m; I – 250 μ m.

Com 70 dias, alguns agrupamentos de ESPs apresentaram-se em fase de degeneração, mostrando-se amarelados, porém outros eram clorofilados (Figura 5A). Estes últimos denotavam evidências de avanço na morfo-diferenciação devido à presença de ápice caulinar proeminente (Figuras 5B a 5D). Entretanto, as análises histológicas (Figuras 5E e 5F) revelaram estruturas atípicas de ápice caulinar, mostrando constituição múltipla do ápice propriamente dito, fato que poderia comprometer o desenvolvimento da ESP em plântula. Mesmo assim, constatou-se que ESPs mais desenvolvidas já mostravam formação de tecido provascular (Figura 5F).

Estudos realizados por Fritsche (2012), com a mesma espécie, mostraram que os sinais de regeneração em plantas ocorriam a partir do segundo ou terceiro subcutivo, num meio isento de fitorreguladores. O autor constatou também que, em *C. tigrina*, este processo ocorreu de forma assíncrona, impedindo a obtenção de mudas para aclimação de modo constante e em escala.

Zhao *et al.* (2008) descreveram as ESPs de *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. como “embriões somáticos globulares” compostos de células com citoplasma denso, sem conexões vasculares e a medida que a diferenciação progrediu, acrescentam os autores, estes embriões somáticos desenvolveram-se em ESPs com meristema caulinar. No presente trabalho, com *C. tigrina*, as ESPs obtidas são formadas por células altamente meristemáticas, com citoplasma denso e núcleos conspícuos. Porém, não são consideradas, na formação das ESPs, como embriogênese somática, pois não seguem o mesmo padrão da embriogênese zigótica, para obtenção de estruturas bipolares.

As ESPs inicialmente não formaram raízes, como observado no trabalho de morfo-histodiferenciação de *C. amethystoglossa*, na germinação assimbiótica, nos primeiros estádios do desenvolvimento, em protocormos, não ocorreu a formação da raiz. As orquídeas são monocotiledôneas, apresentam raízes adventícias, e a raiz embrionária degenera no início da formação. O pró-embrião germina e surgem os protocormos.

Em geral, a germinação ocorre no momento em que surge a primeira raiz, surgindo a plântula. Mas, em orquídeas, a raiz não germina inicialmente, pois o embrião ainda não está pronto, é um pró-embrião que não completou seu desenvolvimento, o pró-embrião de *C. amethystoglossa* germina, mas ainda não é uma plântula, denominado protocormo, pois ainda segue o desenvolvimento, fora da semente, até

caracterizar-se estruturalmente como uma plântula. O protocormo tem características similares a um embrião, o ápice caulinar está em fase inicial de formação e não há raiz, rizóides, localizados na região basal, executam a função de fixação e absorção de nutrientes.

Deste modo, as ESPs formadas a partir da indução dos explantes foliares, não formam raízes, mas estruturas com capacidade de fixação e absorção de nutrientes, os rizóides, tal como ocorreu após a germinação das sementes de *C.amethystoglossa*, descritos no capítulo anterior.

Estes resultados obtidos através da inoculação de explantes foliares de *C. tigrina* demonstraram que estruturas estão envolvidas na formação das ESPs. Identificando que as ESPs iniciam a formação através das células epidérmicas da face abaxial da folha inoculada, predominando na região basal. As ESPs formadas buscam nutrientes através de rizóides encontrados nas próprias ESPs. Os rizóides são estruturas formadas na epiderme que tem como função a absorção de nutrientes. Neste trabalho, foi possível observar a formação destas estruturas na base das ESPs, o que corresponde a necessidade das ESPs em adquirir os nutrientes presentes no meio de cultura.

Ao longo do cultivo há formação de novas ESPs, a partir das próprias ESPs, o que representa uma regeneração cíclica. Através destas evidências pode se programar as etapas para estudos que necessitem de dados para aperfeiçoar procedimentos de inoculação e regeneração de ESPs, bem como para estudos relacionados ao padrão de metilação do DNA, servindo como modelo para identificar o estágio em que as ESPs histologicamente estão competentes para desenvolverem-se em plântulas.

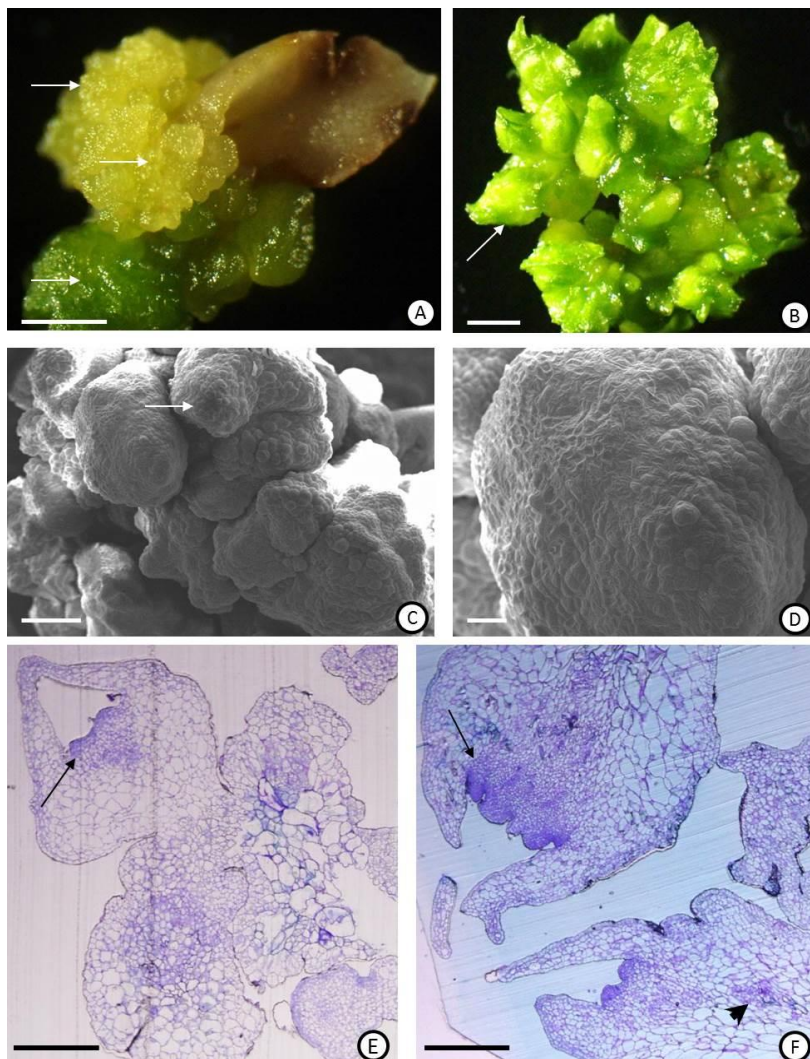


Figura 5 - Estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) formadas aos 70 dias após a inoculação em folhas de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer. A. Vista geral de folha inoculada, já amarelada evidenciando deterioração, mas grande quantidade de ESPs (setas) concentra-se na base foliar. B-C. Detalhes de agrupamentos de ESPs, algumas já apresentando evidente ápice caulinar (setas). D. ESP com ápice proeminente, mas com outras ESPs formando-se na superfície lateral. E-F. Secções longitudinais de ESPs, com ápices meristemáticos atípicos (setas), com primórdios foliares desenvolvidos; cabeças

de seta (em F) indicam tecidos provasculares. A, B. Imagens em microscopia estereoscópica. C, D. Em microscopia eletrônica de varredura. E, F. Em microscopia óptica. Barras: A – 1 mm; B – 2 mm; C, E, F – 500 μm ; D – 100 μm .

2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J.; ERNST, R. 1993. **Micropropagation of orchids**. New York: Wiley.
- BATYGINA, B. T.; BRAGINA, E. A.; VASILYEVA, V. E. 2003. The reproductive system and germination in orchids. **Acta Biologica Cracoviensia** 45: 21-34.
- BEGUM, A. A.; TAMAKI, M. ; KAKO, S. 1994. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through in vitro culture of other tissue of *Cymbidium* PLB. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science** 63: 663–673.
- CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2000. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium* ‘Sweet Sugar’. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 62: 95-100.
- CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. **Biologia Plantarum** 50: 169-173.
- CHEN, J. T.; CHANG, C.; CHANG, W. C. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Reports** 19: 43–149.
- CHEN, L. R.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2002a. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 38: 441-445.
- CHEN, T. Y.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2002b. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 38: 595-597.
- CHUNG, H. H.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2005. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* chiengmai pink and subsequent plant regeneration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 41: 765-769.
- CHURCHILL, M. E.; BALL, E. A.; ARDITTI, J. 1973. Tissue culture of orchids I. Methods for leaf tips. **New Phytologist** 72: 161–166.
- CLARK, S. E. 2001. Cell signalling at the shoot meristem. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2: 276-284.

- ERNST, R. 1994. Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 39:273–275.
- FRITSCHÉ, Y. 2012. **Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas**. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- GANTAIT, S.; SINNIH, U. R. 2012. Rapid micropropagation of monopodial orchid hybrid (*Aranda* Wan Chark Kuan ‘Blue’ 3 *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.) through direct induction of protocorm-like bodies from leaf segments **Plant Growth Regulation** 68:129–140.
- GUO, B.; ABBASI, B. H.; ZEB, A.; XU, L. L.; WEI, Y. H. 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. **African Journal of Biotechnology** 10: 8984-9000.
- HACCIUS, B., 1978, Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures, **Phytomorphology** 28: 74-81.
- HORRIDGE, G. A.; TAMM, S. L. 1969. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science** 163: 817-818.
- KUO, H. L.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* “Little Steve”. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 41: 453-456.
- LIAU, C. H.; YOU, S. J.; PRASAD, V.; HSIAO, H. H.; LU, J. C.; YANG, N. S.; CHAN, M. T. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. **Plant Cell Reports** 21: 993-998.
- LUO, J. P.; WANG, Y.; ZHA, X. Q.; HUANG, L. 2008. Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 93: 333-340.
- MALABADI, R. B.; MULGUND, G. S.; KALLAPPA, N. 2005. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. **Journal of Plant Physiology** 162: 473-478.
- MALABADI, R. B.; MULGUND, G. S.; NATARAJA, K. 2004. Efficient Regeneration of *Vanda coerulea*, an Endangered Orchid Using Thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 76: 289-293.
- MANNERS, V.; KUMARIA, S.; TANDON, P. 2010. Micropropagation of *Vanda coerulea* Griff ex Lindl.: A study of regeneration competence

- of roots *in vitro*. **Proceedings of the International Conference on Environmental Engineering and Applications**, Singapore (ICEEA 2010), 100-102.
- MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. **Scientia Horticulturae** 108: 95-99.
- MAYER, J. L. S.; STANCATO, G. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2010. Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 103: 411-416.
- MOREL, G.; WETMORE, R. M. 1951. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany** 38: 141-143.
- MURASHIGE, T. SKOOG, T. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology** 15: 473-97.
- NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; PATNAIK, S. 1997. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch- Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. **Scientia Horticulturae** 71:243-250.
- NG, C. Y.; SALEH, N. M. 2011. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 105: 193-202.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** 59: 368-373.
- PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science** 164: 919-923.
- RUZIN, S.E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. New York: Oxford University Press.
- SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F.; GOMES, G. A. C. 2001. **Multiplicação: Cultura de Tecidos**. UFLA, Lavras 5:50-57.
- SHEELAVANTHMATH, S. S.; MURTHY, H. N.; HEMA, B. P.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. 2005. High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. **Scientia Horticulturae** 106: 395-401.
- SREERAMANAN, S.; VINOD, B.; SASHI, S.; XAVIER, R. 2008. Optimization of the transient-gusa gene transfer of *Phalaenopsis*

- violacea* Orchid via *Agrobacterium tumefaciens*: an assessment of factors influencing the efficiency of gene transfer mechanisms. **Advances in Natural Applied Sciences** 2: 77-88.
- SUJJARITTHURAKARN, P.; KANCHANAPOOM, K. 2011. Efficient Direct Protocorm-Like Bodies Induction of Dwarf *Dendrobium* using Thidiazuron. **Notulae Scientia Biologicae** 3: 88-92.
- TENG, W. L.; NICHOLSON, L.; TENG, M. C. 1997. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. **Plant Cell Reports** 16: 831-835.
- VASUDEVAN, R.; VAN STADEN, J. 2011. Cytokinin and explant types influence in vitro plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 107: 123-129.
- YAM, T. W.; ARDITTI, J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reports** 3: 1-56.
- ZHAO, P.; WU, F.; FENG, F. S.; WANG, W. J. 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 44:178–185.

3. CAPÍTULO III

MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS DE *Cattleya tigrina* A. Rich ex Beer MICROPROPAGADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E GIBERELINA

RESUMO

As rotas de morfodiferenciação são utilizadas para regeneração de plantas *in vitro* de orquídeas, através da indução de vários tipos de explantes para obtenção de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs). A indução de ESPs de orquídeas, para conversão em plantas, tem sido uma técnica muito utilizada para a propagação massal de espécies com potencial econômico e ecológico. Características relacionadas a morfologia, histologia e fisiologia são estratégias fundamentais para compreensão das respostas adaptativas que possibilitem a propagação da espécie sob distintas condições ambientais. A espécie utilizada para esta pesquisa foi a *Cattleya tigrina*, uma epífita da Mata Atlântica, com alto valor econômico. O objetivo foi analisar a morfo-histodiferenciação das culturas inoculadas sob diferentes concentrações de giberelina e sacarose. As análises revelaram que as ESPs submetidas ao tratamento suplementado com 5g.L^{-1} de sacarose e $5\mu\text{M}$ ácido giberélico (S5G5) apresentaram uma melhor resposta morfológica e histológica de diferenciação em relação aos outros tratamentos. Estas ESPs permaneceram com a coloração verde, com surgimento de brotos com primórdios foliares. Na histologia, também foi observado células competentes para formação de meristema apical caulinar e tecidos provasculares. Em relação aos resultados obtidos com os tratamentos suplementado com 20g.L^{-1} de sacarose (S20G0) e com 20g.L^{-1} de sacarose e $5\mu\text{M}$ giberelina (S20G5) foi observado necrose total e ou parcial das ESPs, instigando a realização de estudos fisiológicos e bioquímicos, visando determinar a quantidade de pigmentos fotossintéticos, carboidratos solúveis totais e amido das ESPs inoculadas num estágio de 28 semanas, com 20g.L^{-1} de sacarose (S20G0), 20g.L^{-1} de sacarose e $5\mu\text{M}$ giberelina (S20G5) e 5g.L^{-1} de sacarose e $5\mu\text{M}$ de giberelina (S5G5), para elucidar os processos metabólicos envolvidos durante esta rota de regeneração das ESPs.

Foram encontradas diferenças nas análises bioquímicas realizadas entre o tratamento S20G0 e os outros tratamentos, respectivamente. Para os teores de carboidratos, não houve diferença significativa entre os tratamentos S20G5 e S5G5 e entre os tratamentos S20G5 e S20G0, mas entre os tratamentos suplementados com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) e com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5) houve diferenças significativas, apresentando valores de 2,2 µg/g⁻¹ de carboidrato para o tratamento S20G0 e de 0,95 µg/g⁻¹ de carboidrato para o tratamento S5G5. O teor de amido, presente nas ESPs apresentou diferença significativa entre os três tratamentos, no tratamento S20G0 foi determinado 0,98 mg/g, no tratamento S20G5 0,53 µg/g⁻¹ e no tratamento S5G5 0,26 µg/g⁻¹. Para os níveis de clorofilas *a*, *b*, total e carotenóides houve diferenças significativas do tratamento suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5) e com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5), comparadas com o tratamento suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0). Entre os tratamentos S20G5 e S5G5 não houve diferenças significativas. De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que as ESPs desenvolvidas no meio com 5g.L⁻¹ de sacarose e 5µM de ácido giberélico estiveram mais aptas a formar plantas.

Palavras chave: ESP, regeneração, giberelina, meristema apical caulinar, sacarose.

ABSTRACT

Morphodifferentiation routes are used in *in vitro* regeneration of orchids by means of the induction of several types of explants to obtain protocorm-like bodies (PLBs). The induction of orchids PLBs to be converted into plants has been a technique widely used in the mass propagation of species with economic and ecological potential. Morphological, histological and physiological characteristics are key strategies to understand the adaptive responses that enable the propagation of the species in different environmental conditions. The species used in this research was *Cattleya tigrina*, an epiphyte of the Atlantic Forest, with high economic value. The objective was to analyze the morpho-histodifferentiation of cultures inoculated with different concentrations of gibberellin and sucrose. The analyses showed that PLBs undergoing a treatment supplemented with 5g.L⁻¹ of sucrose and 5µM of gibberellin acid (S5G5) had a best response of morphological

and histological differentiation in relation to the other treatments. Such PLBs remained with a greenish color with elongation of the aerial part with leaf primordia. In histology, viable cells for the formation of the shoot apical meristem and provascular tissues were observed. With respect to the results obtained with the treatments supplemented with 20 g.L⁻¹ of sucrose (S20G0) and 20 g.L⁻¹ of sucrose and 5µm of gibberellin (S20G5), it was found total or partial necrosis of the PLBs, instigating further physiological and biochemical studies to determine the amount of photosynthetic pigments, total soluble carbohydrates and starch concentrations of the PLBs inoculated in a period of 28 weeks with 20 g.L⁻¹ of sucrose (S20G0), 20 g.L⁻¹ of sucrose and 5µm gibberellin (S20G5) and 5 g.L⁻¹ of sucrose and 5µm of gibberellin (S5G5), to elucidate the metabolic processes involved in such PLBs regeneration route. Differences were found in the biochemical analyses carried out between the treatment S20G0 and the other treatments, respectively. For the other carbohydrate contents, there was no significant difference between treatments S20G5 and S5G5 and between treatments S20G5 and S20G0, but between treatments supplemented with 20 g.L⁻¹ of sucrose (S20G0) and 20 g.L⁻¹ of sucrose and 5µm gibberellin (S20G5) there were significant differences, presenting values of 2.2 µg/g⁻¹ of carbohydrate for treatment S20G0 and 0.95 µg/g⁻¹ of carbohydrate for treatment S5G5. The concentration of starch present in PLBs showed a significant difference between the three treatments: in treatment S20G0 it was found 0.98 mg/g of starch; in treatment S20G5 0.53 µg/g⁻¹ and in treatment S5G5 0.26 µg/g⁻¹. For levels of chlorophylls *a*, *b*, total and carotenoids there were significant differences of the treatment supplemented with 20 g.L⁻¹ of sucrose and 5µm gibberellin (S20G5) and with 5 g.L⁻¹ of sucrose and 5µm of gibberellin (S5G5) when compared with the treatment supplemented with 20 g.L⁻¹ of sucrose (S20G0). Between treatments S20G5 and S5G5 there were no significant differences. According to the results obtained, it was possible to conclude that the PLBs developed in the medium with 5g.L⁻¹ of sucrose and 5µM of gibberellin acid showed the best ability to form plants.

Keywords: PLB, conversion, gibberellin, shoot apical meristem, sucrose.

3.1 INTRODUÇÃO

Para regeneração de plantas *in vitro* de orquídeas, são utilizadas outras rotas morfogênicas, além da germinação assimbiótica de sementes. A regeneração ou morfogênese *in vitro* é o processo de formação de órgãos a partir de outros pré-existentes, podendo ocorrer através da embriogênese somática ou organogênese (George, 1996).

O processo de micropropagação induz a um grande número de mudanças anatômicas, morfológicas e fisiológicas que muitas vezes tem limitado o cultivo *in vitro* de algumas espécies (Desjardins, 1993). A heterogeneidade de respostas às plântulas que ocorrem no cultivo *in vitro* de tecidos é promovida não só por fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), mas também por modificações do ambiente *in vitro* (Fogaça *et al.*, 2006).

Entre os fatores que condicionam a morfogênese *in vitro*, estão o genótipo, o explante e as condições físicas e químicas selecionadas para realizar o cultivo. Entre as condições físicas, estão os efeitos da temperatura, da umidade relativa e da luz. Entre os compostos químicos, a composição salina do meio, carvão ativado, ágar e reguladores de crescimento (Levitus, 2010).

Geralmente, a propagação clonal de orquídeas, é feita a partir de explantes somáticos de origem diversa, como folhas (Chen & Chang, 2001; Gow *et al.*, 2008), ápices caulinares (Roy *et al.*, 2007), raízes (Kerbauy & Estelita, 1996) e hastes florais (Chen & Chang, 2000), para obtenção de estruturas globulares usualmente conhecidas como estruturas semelhantes a protocormos (ESPs), pois se assemelham a embriões de origem zigótica. Devido às poucas investigações a respeito da origem das ESPs, a maioria dos trabalhos publicados refere-se esta rota como sendo embriogênese somática, provavelmente devido às peculiaridades das Orchidaceae.

As estruturas somáticas obtidas *in vitro*, assemelham-se aos protocormos de origem zigótica, sendo assim, receberam a denominação de *protocorm-like bodies (PLB)*, por Morel em 1960 (Arditti, 2008); em português estas estruturas são referidas como estruturas semelhantes a protocormos (ESPs). Kraus *et al.* (2006) referem que este termo vem sendo utilizado para quaisquer estruturas originadas a partir de explantes meristemáticos. Nos trabalhos publicados, referentes a micropropagação de orquídeas, são encontrados diversos termos referidos a estas estruturas, como: embriões somáticos (Chen & Chang, 2004; Gow *et al.*, 2008; Huan, 2004; Kuo *et al.*, 2005; Tokuhara & MII, 2003); brotos

(Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Kosir *et al.*, 2004); segmentos nodais axilares (Shiau *et al.*, 2005); mericlones (Kuehnle, 2007); e estruturas semelhantes a protocormos (Kerbaui & Estelita, 1996; Young *et al.*, 2000; Saiprasad & Polisetty, 2003). No presente trabalho, a obtenção destas culturas, foi designado denominar Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs), devido a semelhança destas estruturas com as obtidas através da germinação simbiótica e assimbiótica na germinação de sementes.

A preferência pela propagação por formação de ESPs é devido ao grande número destas que são obtidas dentro de um curto período de tempo (Sujjarittharakarn & Kanchanapoom, 2011). ESPs podem proliferar rapidamente e regenerar em plântulas completas, por isso são também consideradas o tecido-alvo para estudos de transformação genética em orquídeas (Liau *et al.*, 2003; Sreeramanan *et al.*, 2008). As plantas possuem capacidade de gerar órgãos e tecidos, durante todo o seu ciclo de vida, isto é devido aos meristemas, que possuem um papel essencial no estabelecimento da arquitetura da planta (Weigel & Jurgens, 2002).

A dificuldade de transição do mecanismo heterotrófico para o autotrófico, nessas plantas, em virtude das alterações epigenéticas, anatômicas e fisiológicas induzidas pela condição *in vitro* (Campostrini & Otoni, 1996), requer a realização de determinadas investigações, para evitar as perdas existentes no processo de aclimatização. Ferramentas para estudos histológicos podem programar as etapas do processo de inoculação, indução, conversão e aclimatização das culturas *in vitro*, maximizando a viabilidade da espécie.

A ontogenia nas plantas é altamente flexível, podendo estar relacionada à reversibilidade do estado diferenciado das células vegetais. Em condições extremas, estas células podem mudar seu destino: podem ser levadas à morte (apoptose) ou desdiferenciar ou dividir-se, dependendo da necessidade do organismo (Sablowski, 2004).

Fritsche (2012) utilizou diferentes concentrações de sacarose e GA₃ para conversão de ESPs em plântulas. A partir dos resultados do autor, onde foi observado que plântulas com raízes e folhas foram obtidas na presença de 5g.L⁻¹ de sacarose e na concentração de 5 µM de GA₃ foi objetivado estudar a morfo-histodiferenciação das ESPs, em diferentes estádios do desenvolvimento, cultivadas sob três diferentes tratamentos, caracterizando os tecidos constituintes ao longo do desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina*, considerando ainda

aspectos bioquímicos, de acordo com as observações visuais, durante a etapa de conversão.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL VEGETAL

Para a pesquisa foram utilizadas ESPs obtidas a partir da indução de folhas *C. tigrina*, mantidas *in vitro*, em sala de crescimento no Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento e Genética Vegetal – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Santa Catarina (LFDGV – CCA – UFSC). Amostras foram selecionadas e subcultivadas para obtenção das sucessivas ESPs de acordo com Fritsche (2012).

O meio de cultura utilizado foi o MS/2, constituído pela formulação salina de MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado, 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 Sigma[®] (170mg.L^{-1}), com pH ajustado para 5,2 com HCl (0,5N) e NaOH (0,5N).

As ESPs foram inoculadas em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura MS/2 suplementado com diferentes concentrações de sacarose 5 e 20g.L^{-1} e ácido giberélico 0 e $5\mu\text{M}$. Aos tratamentos foram adicionados 20g.L^{-1} de sacarose denominado S20G0; 20g.L^{-1} de sacarose e $5\mu\text{M}$ giberelina S20G5 e 5g.L^{-1} de sacarose e $5\mu\text{M}$ giberelina S5G5. O meio foi geleificado com 2g.L^{-1} de Phytigel (Sigma[®]) e esterelizado a 121°C e 1,3 atm durante 15 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura média de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa média de $50\text{-}60\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Estas ESPs foram utilizadas para o estudo morfo-histológico, sendo realizadas coletas semanalmente durante o tempo de crescimento e desenvolvimento das ESPs.

3.2.2 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA (ME)

Para análise morfológica, as imagens foram obtidas através de Microscópio Estereoscópio Olympus modelo SZH10 (Tóquio, Japão), com sistema de captura de imagens Olympus modelo DP71, e software

Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, USA), no LFDGV – UFSC.

3.2.3 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

Para o estudo histológico em MO, foram preparadas lâminas permanentes. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série etílica gradual, sendo conservadas em etanol 70°GL (Ruzin, 1999). Posteriormente, as amostras foram desidratadas até etanol 96°GL, infiltradas em hidroxietilmetacrilato (Leica® Historesin, Heidelberg, Alemanha), conforme instruções do fabricante.

Os blocos contendo o material foram seccionados de 4 a 5 µm de espessura, em micrótomo de rotação Slee Cut 4055 (Mainz, Alemanha). As secções foram distendidas sobre lâminas contendo água, em chapa aquecedora (42°C). Depois da secagem das lâminas, o material foi corado com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2M e pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1965).

As observações e registros foram realizados em Microscópio Olympus modelo BX40, com sistema de captura de imagens Olympus modelo DP71, e software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, USA), no LFDGV – UFSC.

3.2.4 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Algumas amostras, após fixação e desidratação, conforme procedimentos descritos no item 3.2.3, foram secas em ponto crítico de CO₂ modelo CPD 030 LEICA (Viena, Áustria), de acordo com Horridge & Tamm (1969).

As amostras secas foram aderidas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizadora modelo EM SCD 500, LEICA (Viena, Áustria), para estudo ultraestrutural em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol® (Tóquio, Japão) modelo JSM-6390LV, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME – UFSC).

3.2.5 CARBOIDRATOS TOTAIS (CHO)

O teor de carboidratos totais foi determinado usando o método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Amostras contendo 1 g de matéria fresca de cada tratamento, em triplicatas, foram maceradas em gral, com pistilo de porcelana, em nitrogênio líquido (-196°C) para obtenção de um pó fresco.

O material macerado foi transferido para tubos do tipo falcon, onde foram adicionados 2 ml de etanol 80% (gelado e preparado na hora), e em seguida a extração por fervura, durante 5 minutos. Os extratos foram centrifugados à 3.000 rpm por 10 minutos.

Este processo foi realizado 3 vezes, seguindo o método proposto por McCready *et al.*, (1950). Obteve-se o sobrenadante, correspondente à fração de açúcares solúveis, cujo volume final foi ajustado com etanol 80% (gelado e preparado na hora). O resíduo da extração alcoólica (precipitado) foi utilizado para a quantificação do amido, através do método colorimétrico de McCready *et al.*, (1950).

Utilizando-se do sobrenadante foi realizada uma quantificação de açúcares totais através de dosagem colorimétrica utilizando-se o método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Em tubos de ensaio de 10 ml, foram pipetados 50µL do extrato e adicionados 450 µL de água destilada, 0,5 ml de fenol (5%) e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado (96%). A absorbância foi medida em 490 nm. O teor de carboidratos totais foi estimado a partir de uma curva padrão pré-determinada com base em um carboidrato padrão (glucose). Todas as dosagens foram realizadas simultaneamente, em triplicata, e os resultados expressos como a média dos valores obtidos, em equivalentes de glicose.

3.2.6 TEOR DE AMIDO

Ao precipitado resultante da extração dos carboidratos solúveis, foram adicionados 2 ml de água destilada gelada (4°C) e 2,6 ml de ácido perclórico (52%), sendo mantido em agitação com bastão por 15 min. Em seguida foram adicionados 4 ml de água destilada gelada e a solução foi centrifugada à 3.000 rpm por 15 min.

O sobrenadante foi colocado em uma proveta e, ao resíduo, foram adicionados 1 ml de água destilada gelada (4°C) e 1,3 ml de ácido perclórico (52%), sendo novamente mantido em agitação com bastão, por 15 min. A solução foi centrifugada à 3.000 rpm por 15 min.

Os sobrenadantes foram juntados na proveta (100ml), para unir as frações de amido. A solução foi homogeneizada e filtrada em lã de vidro. O volume foi ajustado para 20 ml com água destilada. Deste volume, foram retirados 50 μ L do extrato e adicionados 450 μ L de água destilada, 0,5 ml de fenol (5%) e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado (96%). A partir deste extrato foram estimadas as concentrações de amido através do método de fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). O ácido perclórico rompe as ligações existentes na molécula de amido formando açúcares solúveis. A absorbância foi medida em 490 nm. O teor de carboidratos totais foi estimado a partir de uma curva padrão determinada com base em um carboidrato padrão (glucose).

3.2.7 TEOR DE CLOROFILA E CAROTENÓIDES TOTAIS

Para a extração de pigmentos fotossintéticos, foram utilizadas amostras de 100 mg dos diferentes tratamentos de ESPs. Estas amostras foram incubadas em banho-maria com 7 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), por duas horas a 65°C, sem maceração. Após filtragem, o volume total foi corrigido para 10 ml. As amostras foram lidas em espectrofotômetro, calibrados com acetona (85%). A absorbância da clorofila *a* foi lida em 665 nm, a da clorofila *b* em 649 nm e a dos carotenóides em 480 nm conforme descrito por Hiscox & Israelstam (1979). Os teores de pigmentos foram estimados a partir das equações propostas por Lichtenthaler & Welburn (1983), sendo os dados expressos em μ g/ml:

$$\text{Clorofila } a = [12,19*(A665) - 3,45*(A649)];$$

$$\text{Clorofila } b = [21,99*(A649) - 5,32*(A665)];$$

A clorofila total foi determinada a partir da soma da “Chl *a*” e “Chl *b*”.

$$\text{Carotenóides totais} = [1.000*(A480) - 2,14*(Chl\ a) - 70,16*(Chl\ b)] / 220.$$

3.2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises do teor de carboidratos totais e amido foram coletadas 1 g de matéria fresca das ESPs de cada tratamento e para as análises do teor de clorofila *a*, *b* e carotenóides totais, foram coletadas 100 mg de matéria fresca das ESPs de cada tratamento, sendo estas

análises realizadas em triplicata. As médias das mesmas foram submetidas à análise da variância (ANOVA), e quando necessário realizou-se comparação de médias pelo teste SNK a 5% de significância por meio do Programa Estatístico SISVAR 4.2 (Ferreira, 2003).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise semanal das estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de *C. tigrina* cultivadas *in vitro*, sob diferentes condições de cultivo, com 20 g.L⁻¹ de sacarose denominado S20G0; com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina S20G5 e com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina S5G5, revelaram alguns aspectos distintos. Foi observado que em todos os tratamentos testados, ocorreu a formação uma massa celular disforme, com uma base comum e um ápice formado por várias ESPs.

Morfologicamente, uma semana após a inoculação (Figuras 6A a 6F), verificou nas três condições de cultivo, o surgimento de novas ESPs. Algumas ESPs, mais desenvolvidas já evidenciavam primórdios foliares no ápice (Figuras 6B, 6D e 6F), e rizóides na base (Figuras 6E e 6F). No tratamento suplementado com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5), mesmo nas ESPs mais desenvolvidas, o ápice mostrou-se menos alongado, sendo mais proeminente naquelas dos tratamentos suplementados com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) e com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5), em decorrência do alongamento dos primórdios foliares. Os rizóides foram mais raros na base das ESPs do tratamento S20 G0.

No presente trabalho, secções transversais das ESPs (Figuras 6G e 6H) revelaram que, na base, apenas a epiderme mostrava-se com atividade de histodiferenciação, originando os rizóides, sendo que o tecido subepidérmico é constituído por parênquima meristemático. No ápice caulinar destas ESPs, a epiderme mostrou-se mais totipotente, originando as novas ESPs, com as células epidérmicas originando uma túnica e um corpo, por sucessivas divisões periclinais e anticlinais. A túnica e o corpo, posteriormente, sofreram divisões anticlinais e em vários planos, respectivamente, ampliando o número de células. No centro das ESPs (Figuras 6G e 6H), verificou-se a presença de tecido provascular. Não foram constatadas diferenças relativas na histodiferenciação entre as amostras procedentes dos três meios de cultivo.

Em observações histológicas de *Zygopetalum mackaii* Hook., Hong *et al.* (2010) observaram as ESPs evidenciando uma estrutura

clássica com um meristema apical caulinar com primórdios foliares. Os autores referem, na base da ESP, pelos absorventes distribuídos sobre a superfície da região da base, e novas ESPs surgindo, a partir da região basal, o que também foi observado no presente trabalho, nas ESPs de *C. tigrina*.

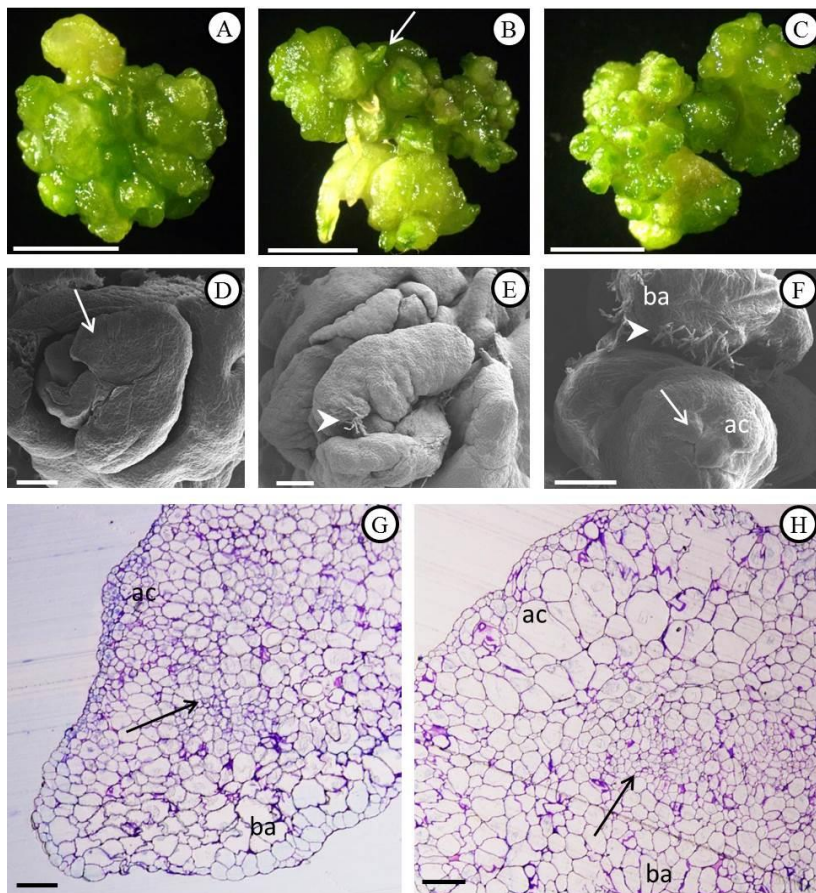


Figura 6 - ESPs de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 µm ácido giberélico), com uma semana após inoculação. A presença de um ápice caulinar e uma região oposta (basal) com tecidos diferenciados e rizóides indica a bipolaridade. A, D, S20G0. B, E, G, S20G5. C, F, H, S5G5. A-F. Aspecto geral das ESPs com primórdios foliares (setas), no ápice caulinar (ac), e muitos

rizóides (cabeças de setas), na base (ba). G-H. Células meristemáticas pequenas, no ápice (ac), denotam intensa atividade meristemática; células grandes, na base (ba), indica amplos vacúolos. Na região central setas indicam tecido provascular. A-C. Imagens em microscopia estereoscópica. D-F. Em microscopia eletrônica de varredura. G-H. Em microscopia óptica. Barras: A-C – 0,5 cm; D-F – 500 μm ; G-H – 250 μm .

Após duas semanas de cultivo, no presente trabalho, constatou-se diferenças relevantes entre os tratamentos, consistindo em maior multiplicação das ESPs no tratamento suplementado com 5 g.L^{-1} de sacarose e 5 μm giberelina (S5G5), em relação às amostras cultivadas dos tratamentos suplementados com 20 g.L^{-1} de sacarose (S20G0) e com 20 g.L^{-1} de sacarose e 5 μm giberelina (S20G5) (Figuras 7A a 7C). A coloração também mostrou-se distinta, mais verde no tratamento S5G5, em relação aos outros tratamentos, que passaram a apresentar aspecto amarelado.

A análise ultraestrutural revelou que as ESPs, nos três tratamentos, eram constituídas por epiderme uniestratificada e um parênquima meristemático (Figura 7D). A epiderme, apresentou áreas já com estômatos nos primórdios foliares (Figuras 7E e 7F). O parênquima meristemático, mostrou algumas células amplas e intercaladas por espaços intercelulares conspícuos, mas também indicou evidências de recentes divisões mitóticas (Figura 7D). A morfodiferenciação das amostras cultivadas no tratamento suplementados com 5 g.L^{-1} de sacarose e 5 μm giberelina (S5G5) ficou melhor constatada ultraestruturalmente (Figura 7G), onde percebeu-se o grande número de formações de novas ESPs, sobre as pré-existentes, embora geralmente pouco alongadas, o que pode ser decorrente de um maior investimento na multiplicação celular e diferenciação inicial, em detrimento do desenvolvimento das ESPs já existentes.

A análise histológica, realizada no presente trabalho, revelou semelhanças entre as amostras, sob as três condições de cultivo, com epiderme revestindo um parênquima meristemático (Figura 7H), embora algumas áreas mostrassem presença de corpo sob a túnica (Figura 7I e 7J), indicando o início da formação de novas ESPs. Nas muitas amostras, cultivadas sob os distintos tratamentos, confirmou-se que as novas ESPs tem origem a partir da epiderme da ESP pré-existente, embora em fases mais avançadas, quando a região já mostra maior número de células meristemáticas, como apresentado na Figura 7J,

possa induzir a interpretação equivocada de origem parcialmente subepidérmica. A única distinção entre as diferentes condições de cultivo que destacou-se foi a presença, mais frequente, de tecido provascular nas ESPs do tratamento suplementado com 5 g.L^{-1} de sacarose e $5 \mu\text{m}$ giberelina (S5G5) (Figura 7K), indicio de histodiferenciação mais consistente para resultar em continuidade do desenvolvimento e conversão em plântula.

Fritsche (2012) observou, na mesma espécie, que após 10 semanas, mesmo nos meios que apresentaram toxidez com GA_3 , as ESPs sobreviventes passaram a apresentar elevado alongamento, comprovando também que as ESPs cultivadas em meio com GA_3 , quando comparadas às cultivadas na sua ausência, eram mais diferenciadas e alongadas, independente da concentração de sacarose. Estas observações corroboram com os resultados histológicos obtidos no presente trabalho, onde foram observadas regiões meristemáticas, nos ápices destas ESPs. Os meristemas são estruturas constituídas a partir de células iniciais totipotentes, ou seja, uma população transitória de células indeterminadas, juntamente à geração do primórdio de um órgão na periferia (Doerner, 2003).

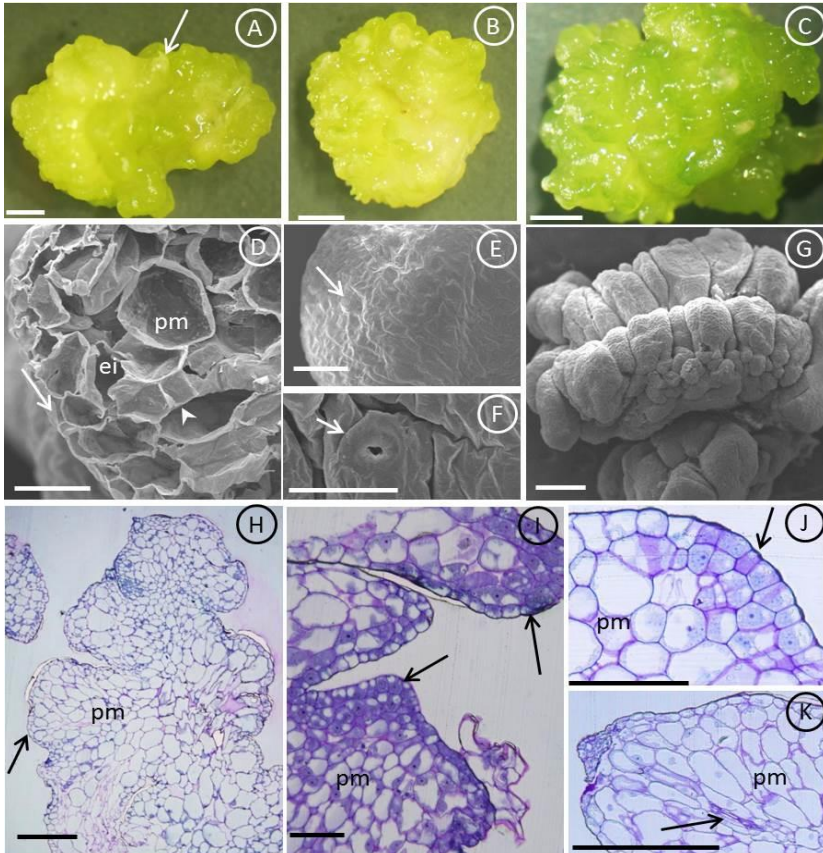


Figura 7 - ESPs de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 μ m ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 μ m ácido giberélico), com duas semanas após inoculação. A, D, E, H. S20G0. B, F, I. S20G5. C, G, J, K. S5G5. A-C, G. ESPs em grande quantidade, mais no S5G5, porém ápices mais proeminentes no S20G0, onde evidenciam-se os primórdios foliares (seta). D. Seção transversal de ESP com epiderme (seta) e parênquima meristemático (pm) apresentando espaços intercelulares (ei) e indícios de recente divisão celular (cabeça de seta). E-F. Detalhe de estômatos (setas) nos primórdios foliares. H. Seção transversal do agrupamento de ESPs; seta indica epiderme. I-J. Regiões com evidência de formação de novas ESPs, com túnica e corpo (setas). K. Na formação de ESPs, seta indica a presença de tecido provascular. A-C. Imagens em microscopia estereoscópica. D-G. Em microscopia eletrônica de varredura. H-K. Em microscopia óptica. Barras: A-C – 2 mm; D-F, I-J – 100 μ m; G-H, K – 500 μ m.

Amostras analisadas das ESPs de *Cattleya tigrina*, com seis semanas após a inoculação, mostraram que, no tratamentos suplementados com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5) e com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5), o alongamento das ESPs foi mais evidente, especialmente na resposta do tratamento S5G5, em relação ao tratamento suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) (Figuras 8A a 8F).

Secções transversais das ESPs das amostras do tratamento S20G0, mostravam epiderme revestindo a estrutura, basicamente constituída por parênquima meristemático, além de algumas células de tecido provascular (Figura 8G). Nas amostras do tratamento S20G5, destacaram-se os indícios de degeneração celular (Figura 8H), embora no ápice destas ESPs evidenciou-se a formação de novas ESPs, caracterizadas por agrupamento de células meristemáticas, as quais distinguiam-se em túnica e corpo (Figuras 8H e 8I). Estas células mostraram protoplasma denso e indícios intensas divisões celulares. No tratamento S5G5, a análise de secções longitudinais (Figura 8J) revelou que as ESPs apresentavam acentuada histodiferenciação, com primórdios foliares mais alongados, já com tecido provascular, confirmando a constatação feita nas amostras da semana anterior de que em resposta ao tratamento S5G5 as evidências apontavam para maiores possibilidades de prosseguir o desenvolvimento.

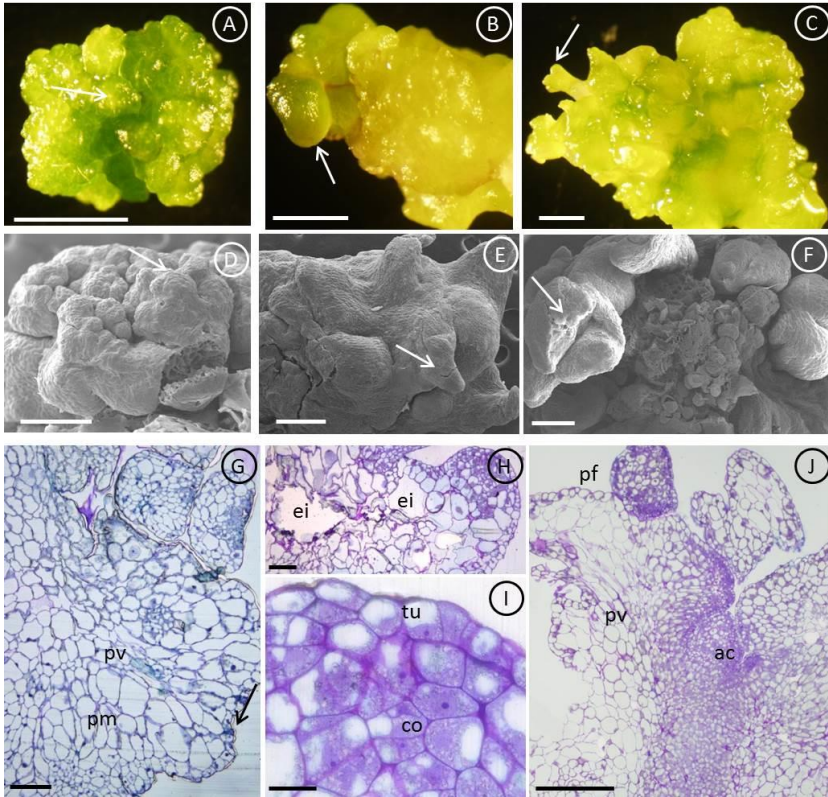


Figura 8 - ESPs de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 μ m ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 μ m ácido giberélico), com seis semanas após inoculação. A, D, G. S20G0. B, E, H, I. S20G5. C, F, J. S5G5. A-F ESPs com evidentes ápices caulinares (setas), menos proeminentes no S20G0 (A e D). G. Epiderme (seta) do S20G0 com menos indícios de mitose; parênquima meristemático (pm) com células amplas; tecido provascular (pv) evidente. H-I. Regiões periféricas das ESPs do S5G5 mostram atividade meristemática, com formação de novas ESPs (setas), sendo distintos a túnica (tu) e o corpo (co), mas parênquima meristemático com grandes espaços intercelulares (ei), evidências de degeneração. J. Secção longitudinal de ESP mostrando ápice caulinar (ac), tecido provascular (pv) e primórdio foliar (pf). A-C. Imagens em microscopia estereoscópica. D-F. Em microscopia eletrônica de varredura. G-J. Em microscopia óptica. Barras: A – 2,5 mm; B – 1 mm; C – 2 mm; D-F, H-I – 500 μ m; G – 200 μ m.

As ESPs com 15 semanas após a inoculação apresentaram-se com aspecto amarelado bastante acentuado nas amostras dos tratamentos suplementados com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) e com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5) (Figuras 9A e 9B), enquanto aquelas do tratamento S5 G5 mostravam-se esverdeadas (Figura 9C). A análise ultraestrutural revelou que nos tratamentos S20G0 (Figura 9D) e S20G5 (Figura 9E), novas ESPs ainda se formavam, mas sem denotar muito desenvolvimento, enquanto, no tratamento suplementados com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5) (Figura 9F), as ESPs exibiam primórdios foliares bem desenvolvidos, já com grande quantidade de estômatos formados.

A presença de regiões periféricas com células meristemáticas, indicando formação de novas ESPs, foi constatada nas amostras dos tratamentos S20G5 (Figura 9G) e S5G5 (Figura 9H). Acompanhando os indícios de degeneração, evidenciados pela coloração amarelada (Figuras 9A e 9B), constatou-se histologicamente a presença de amplos espaços intercelulares (Figuras 9D e 9G), decorrentes de lise celular. Estes resultados, com o decorrer do tempo, foram confirmando que amostras inoculadas com o tratamento suplementados com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5) apresentaram melhores condições para o desenvolvimento das ESPs.

Fritsche (2012) observou que, em *Cattleya tigrina*, as concentrações de GA₃ testadas mostraram-se tóxicas para as ESPs, resultando na necrose total ou parcial do tecido. Estes 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.

De acordo com Chugh *et al.* (2009), a micropropagação bem sucedida utilizando explantes foliares depende de muitos fatores, como a composição nutricional do meio a qual foi induzida, os fitoreguladores aplicados, a origem da folha (*in vitro* / *in vivo*), qual região e orientação foi inoculada e a idade da folha. O sucesso com a cultura de calos, comentam alguns autores, está restrito apenas a algumas espécies, devido à dificuldade de indução, ao crescimento limitado e a necrose severa dos calos (Chang & Chang, 1998; Lin *et al.*, 2000; Roy & Banerjee, 2001; Lu, 2004; Wu *et al.*, 2004).

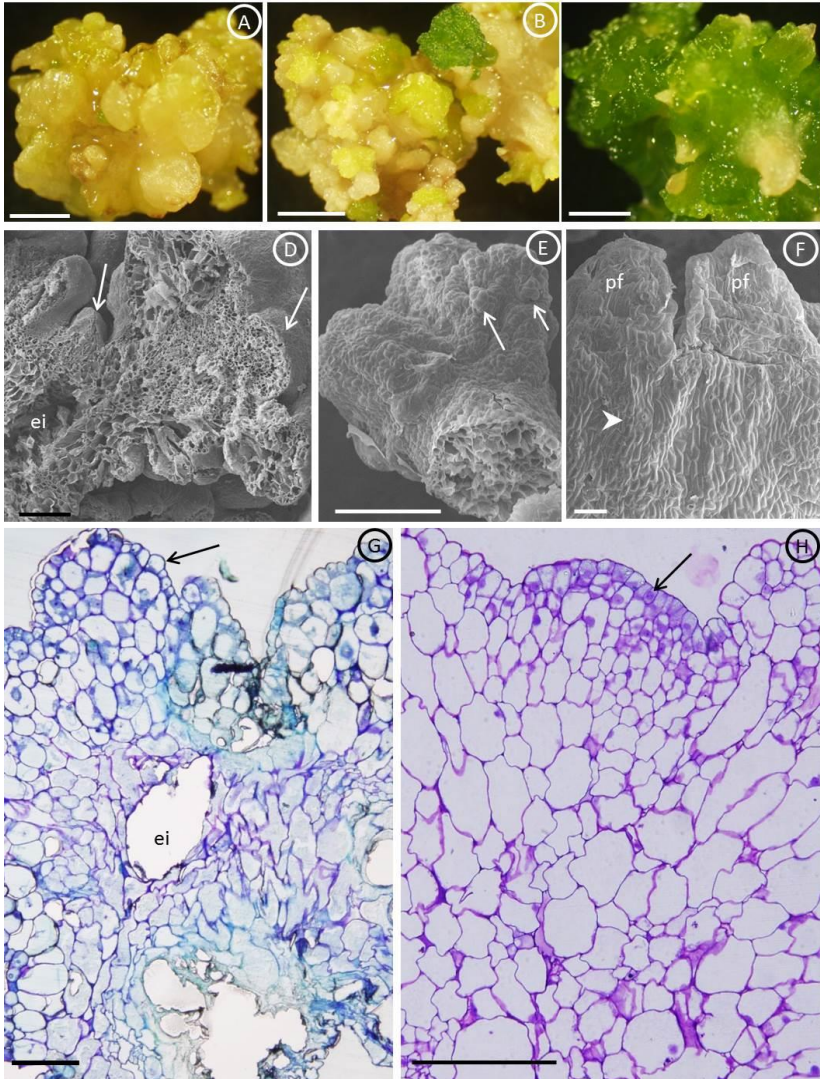


Figura 9 - ESPs de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 μ m ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 μ m ácido giberélico), com 15 semanas após inoculação. A, D. S20G0. B, E, G. S20G5. C, F, H. S5G5. A-C. Mostra a diferença de cores nas ESPs cultivadas em cada tratamento. D. ESP seccionada longitudinalmente, mostrando espaços intercelulares (ei) formados por degeneração celular; seta indica ápice caulinar.

E. ESPs com formação de novos ápices caulinares (setas). F. Detalhe dos primórdios foliares (pf) com muitos estômatos na epiderme (cabeça de seta) em ESP do S5G5. G. Secção longitudinal de ESPs do S5G5, com espaços intercelulares (ei) decorrentes da degeneração celular e epiderme desestruturada (seta). H. Secção longitudinal de ESP do S5G5, com apical caulinar indicando atividade meristemática (seta). A-C. Imagens em microscopia estereoscópica. D-F. Em microscopia eletrônica de varredura. G-H. Em microscopia óptica. Barras: A-C – 2,5 mm; D-E – 500 μm ; F – 100 μm ; G-H – 200 μm .

Com 21 semanas, as ESPs de *Cattleya tigrina* suplementadas com 20 g.L^{-1} de sacarose (S20G0) e com 20 g.L^{-1} de sacarose e 5 μm giberelina (S20G5), apresentaram-se coloração marrom, mantendo apenas algumas áreas com estruturas de coloração verde emergindo (Figuras 10A e 10B), enquanto aquelas do tratamento suplementados com 5 g.L^{-1} de sacarose e 5 μm giberelina (S5G5), mostravam-se intensamente esverdeadas (Figura 10C), indicando o vigor das ESPs em formação, as quais já exibiam primórdios foliares no ápice (Figura 10D) e rizóides na base (Figura 10E). Fritsche (2012) observa 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.

Histologicamente, constatou-se que nas ESPs dos tratamentos S20G0 (Figura 10F) e S20 G5 (Figura 10G), as células estavam degenerando, iniciando pelo aumento do volume celular, devido à formação de grandes vacúolos, com subsequente perda de protoplasto, resultando na formação de grandes espaços intercelulares. O tecido de revestimento manteve-se intacto, inclusive, muitas vezes evidenciando núcleos conspícuos (Figura 10G) e até mesmo evidências de atividade meristemática para formação de novas ESPs (Figura 10F). Fritsche (2012) chama a atenção para a necrose do inóculo inicial, mas no ápice observa a origem das ESPs a partir de pequenas porções de ESP não afetadas pela toxidez.

A necrose é um problema comumente encontrado durante a cultura de ESPs de orquídeas envolvendo a fase de calo (Chang & Chang 1998; Lin *et al.*, 2000; Lu, 2004; Wu *et al.*, 2004). Roy *et al.* (2007) referem que a necrose nas ESPs foi um fenômeno comum, observado em todos os tratamentos utilizados, em graus variáveis.

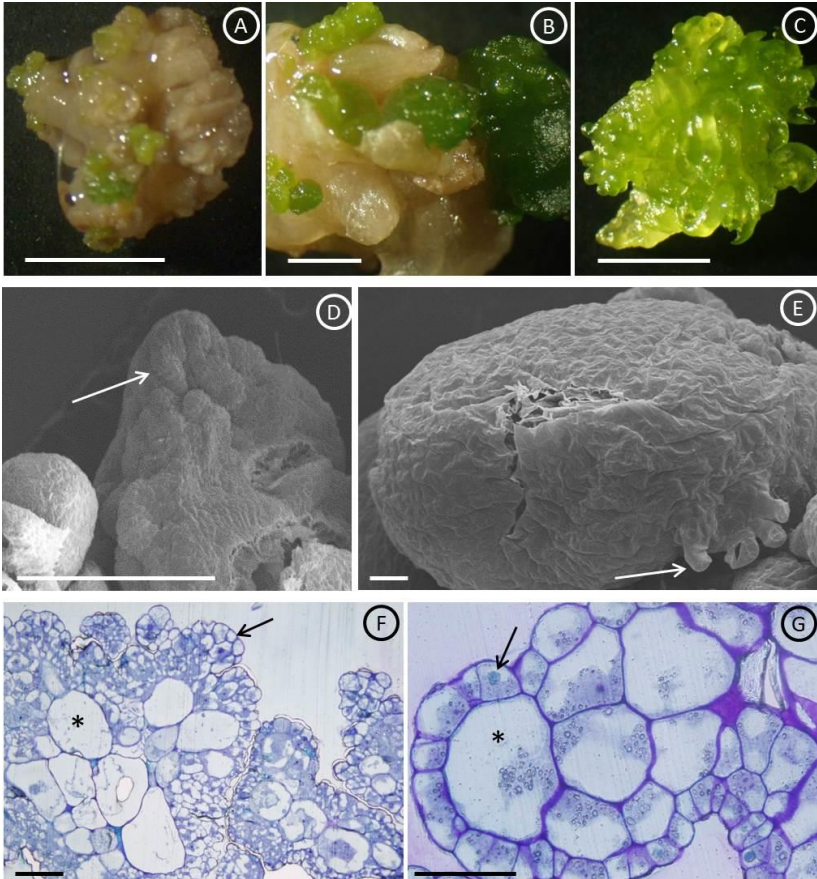


Figura 10 - ESPs de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 gL sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 gL sacarose + 5 μ M ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 gL sacarose + 5 μ M ácido giberélico), com 21 semanas após inoculação. A, F, G. S20G0. B. S20G5. C, D, E. S5G5. A-C. ESPs mostrando diferenças de coloração entre os tratamentos. D. Detalhe dos primórdios foliares (seta) no ápice de ESP. D. Detalhe dos rizóides (seta), na base da ESP. F-G. Secções longitudinais de ESPs do S20G5, com epiderme desordenada, mas com núcleos conspícuos e indícios de atividade meristemática (setas); células subepidérmicas (*) com amplo volume e grande vacúolos, estágio que precede a lise celular. A-C. Imagens em microscopia estereoscópica. D-E. Em microscopia eletrônica de varredura. F-G. Em microscopia óptica. Barras: A - 0,5 cm; B - 2,5 mm; C - 0,5 cm; D - 1 mm; E, G - 100 μ m; F - 200 μ m.

Após 28 semanas, as ESPs de *Cattleya tigrina* suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) e com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5), mostraram-se com coloração marrom escuro (Figuras 11A e 11B), denotando estado avançado de degeneração, enquanto as ESPs do tratamento suplementadas com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5), exibiam intensa coloração verde (Figura 11C). Além disto, as primeiras já não apresentavam ápices caulinares com primórdios foliares, entretanto estes estavam presentes nas amostras do tratamento S5G5, embora com aspecto atípico quanto à conformação. Internamente, alguns tecidos das ESPs do tratamento S20G5 mostravam características histológicas intactas, com presença de tecido provascular, em fase final de formação, circundado por células parenquimáticas, com grande quantidade de campos primários de pontoações (Figura 11 D), e presença de ráfides (Figura 11E), em algumas destas células. No tratamento S5G5, também a região basal exibiu estruturação atípica com relação à estruturação dos rizóides (Figura 11F), os quais projetam-se a partir de células epidérmicas proeminentes, surgindo em tufos, por vezes ramificados. Mesmo tendo constituição atípica, as ESPs do tratamento S5G5, apresentaram primórdios foliares e rizóides que devem desempenhar as funções de assimilação e absorção, respectivamente, proporcionando a continuidade do desenvolvimento.

Moshkov *et al.* (2008) afirmam que o uso de GAs, no cultivo *in vitro* de diversas espécies, resulta na obtenção de ápices anormais, com primórdios foliares defeituosos e alongamento demasiado de entrenós. Em alguns ápices caulinares, no presente trabalho, também foi observado estruturas com formação atípica. Arditti (2008) ressalta que, na micropropagação de orquídeas, GAs são raramente utilizadas e seus efeitos sobre a germinação de sementes não são conhecidos. Hong *et al.* (2010) utilizaram diferentes concentrações de GA₃, em *Zygopetalum mackayi*, e observaram a diminuição da formação de ápices caulinares, menor peso fresco e escurecimento das ESPs, concluindo não ser adequada sua utilização para tal finalidade. Chen & Chang (2003) relatam efeitos negativos do GA₃ na indução de embriões somáticos a partir de folhas de *Oncidium*. Hew & Clifford (1993) reportaram que a aplicação de GAs exógenas inibiu o crescimento de plântulas *in vitro* de orquídeas, promovendo a expansão das folhas, mas diminuindo o número delas.

O sítio de ação das GAs não é o meristema apical caulinar (MAC), as citocininas são responsáveis pela manutenção do meristema e existe uma relação antagônica entre ambos. Somente as células mais distantes do MAC são estimuladas pelas GAs para adquirir competência para a formação dos primórdios foliares (Guerra & Rodrigues 2008). No presente trabalho, pode ser evidenciado nestas culturas, a permanência dos tecidos meristemáticos apicais, que inicialmente, não foram afetados pela necrose observada nos tecidos da região central das ESPs. As observações histológicas das ESPs dos tratamentos suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) e com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5), reforçaram a constatação de degeneração estrutural, fundamentada na necrose da células dos tecidos mais internos e desestruturação das células do tecido de revestimento (Figuras 11G e 11H).

Nas ESPs do tratamento suplementadas 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5), (Figura 11I), confirmou-se a estruturação atípica do ápice caulinar, porém verificou-se a presença de epiderme, revestindo os primórdios foliares, de tecido provascular e parênquima meristemático. Sendo assim, apesar das características atípicas das ESPs do tratamento S5G5, estas mostraram-se mais aptas a prosseguir o desenvolvimento do que as dos tratamentos S20G0 e S20G5.

Segundo Fritsche (2012), além das 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). Em *Cattleya tigrina*, a regeneração das ESP em plântulas 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 (Fritsche, 2012).

Em um outro experimento, Fritsche (2012) afirma que, reduzindo as concentrações de GA₃, os sintomas de toxidez não foram mais observados, mas o comportamento das ESP em relação ao número de brotos foi o mesmo, sendo maior na presença do GA₃ e nas maiores concentrações de sacarose.

Moshkov *et al.* (2008) observam que a adição de GA₃ ao meio de cultura afetou negativamente a formação de raízes e brotos adventícios, contudo Fritsche (2012) ao trabalhar com *C. tigrina* observou brotos com raízes nos tratamentos na concentração reduzida de sacarose e GA₃. O uso de GA₃, de acordo com este autor é necessário para a obtenção de brotos mais alongados, diferenciados e em maior número.

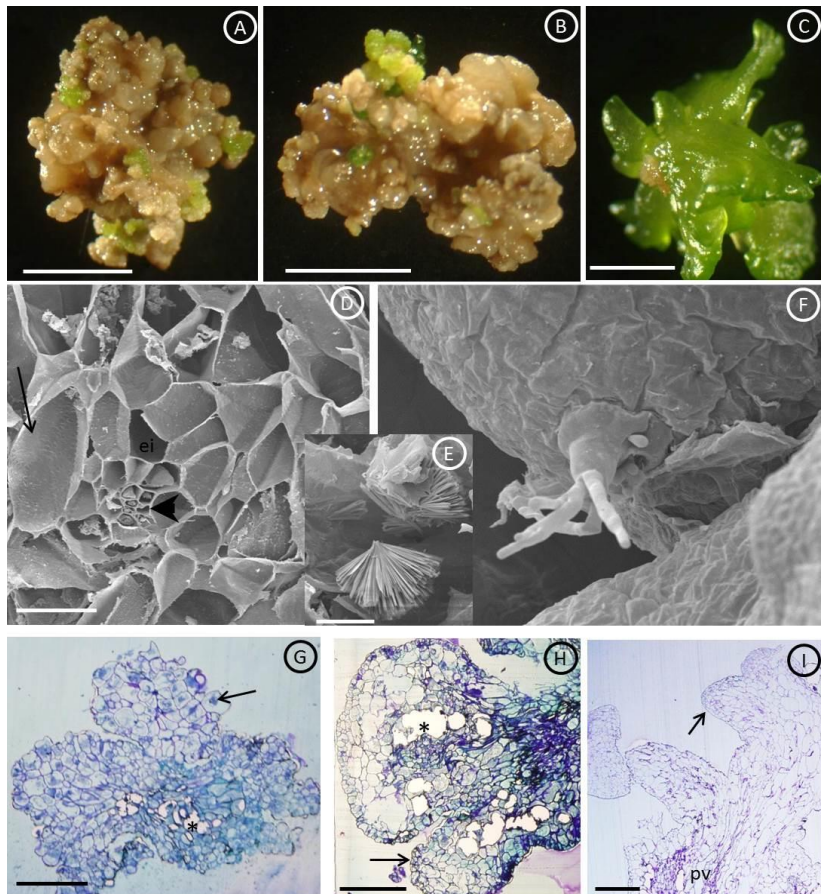


Figura 11 - ESPs de *Cattleya tigrina* A Rich ex Beer, micropropagadas sob distintos meios de cultura: S20G0 (MS/2 + 20 g/L sacarose); S20G5 (MS/2 + 20 g/L sacarose + 5 μ M ácido giberélico) e S5G5 (MS/2 + 5 g/L sacarose + 5 μ M ácido giberélico), com 28 semanas após inoculação. A, D, E. S20G0. B, H. S20G5. C, F, I. S5G5. A-C. Aspecto geral das ESPs, mostrando coloração marrom, no S20G0 e no S20G5, indicando necrose das estruturas; no S5G5, ESPs alongadas, mas com formação atípica dos primórdios celulares (seta). D. Detalhe de secção transversal de protocormo do S20G5, destacando o tecido provascular (cabeça de seta) e parênquima meristemático, com espaços intercelulares (ei) e com muitos campos primários de pontuação (seta), nas paredes celulares. E. Detalhe de ráfides nas células do parênquima meristemático. F. Rizóides com estrutura atípica, na base de ESPs de S5G5. G-H. Secções longitudinais de ESPs, do S20G0 e S20G5, mostrando epiderme desestruturada (setas) e necrose celular (*), revelando a degeneração observada

na morfologia. I. Secção longitudinal de ESP do S5G5, evidenciando parênquima meristemático (pm), tecido provascular (pv) e epiderme (seta). A-C. Imagens em microscopia estereoscópica. D-F. Em microscopia eletrônica de varredura. G-I. Em microscopia óptica. Barras: A-B – 0,5 cm; C – 2,5 mm; D, F – 100 μm ; E – 50 μm ; G-I – 500 μm .

Zhao *et al.* (2008) salientaram que a cultura de tecidos em orquídeas, raramente é focada na produção de calos, devido a menor taxa de crescimento e necrose das culturas. No momento da indução de ESPs, o sistema da síntese endógena hormonal é disparada e o aumento do nível de hormônios permite a proliferação e diferenciação de células na ausência de reguladores de crescimento exógenos (Smith & Krikorian, 1990). No presente trabalho, nas culturas de *C. tigrina*, a necrose destas ESPs tornou-se muito evidente. Nas ESPs, suplementadas com 5 g.L^{-1} de sacarose e 5 μm giberelina (S5G5), ocorreu a diferenciação no meristema caulinar, com alongamento e primórdios foliares e nas ESPs suplementadas com 20 g.L^{-1} de sacarose (S20G0) e com 20 g.L^{-1} de sacarose e 5 μm giberelina (S20G5), a necrose das culturas foi um evento comum.

Thorpe *et al.* (2008) comentam sobre a associação dos efeitos da sacarose suplementada ao meio de cultura com a conversão das ESP, observando que estas podem perder permanentemente a capacidade regenerativa, quando cultivadas por muito tempo em altas concentrações de sacarose. No presente trabalho, sobre regeneração de ESPs de *C. tigrina*, as culturas S20G0 e S20G5 foram as que visualmente tornaram seus tecidos ou parte deles, com coloração marrom, evidenciada nas imagens histológicas, indicando a perda da capacidade regenerativa das células nestas culturas. Trabalhos em relação à influência das fontes de carbono e à regeneração de ESPs de orquídeas são escassos. A partir dos resultados obtidos, em relação à morfo-histodiferenciação das culturas, foram realizadas análises bioquímicas, para complementar a pesquisa e elucidar questões envolvidas ao aspecto fisiológico das ESPs.

Os resultados obtidos, em relação ao conteúdo de carboidratos e amido, nas culturas das ESPs de *Cattleya tigrina* diferiram estatisticamente entre si (Figura12). Para os teores de carboidratos nas ESPs suplementadas com 20 g.L^{-1} de sacarose (S20G0) foi encontrado 2,2 $\mu\text{g/g}^{-1}$, nas ESPs suplementadas com 20 g.L^{-1} de sacarose e 5 μm giberelina (S20G5) foi encontrado 1,58 $\mu\text{g/g}^{-1}$ de carboidratos e nas ESPs suplementadas com 5 g.L^{-1} de sacarose e 5 μm giberelina (S5G5) foi encontrado 0,95 $\mu\text{g/g}^{-1}$ de carboidratos totais. Merchant *et al.* (2010)

comentam que elevados teores de carboidratos totais podem atuar como um mecanismo de defesa das plantas, contra a deficiência ou excesso de água, e estes teores podem ser afetados por vários fatores bióticos e abióticos. No presente trabalho, estas culturas estavam sob condições *in vitro*, o que se refere a um meio com excesso de umidade, sugere-se que a cultura S20G0, submetida à níveis elevados de sacarose, comparadas às outras culturas, necrosou como um sistema de auto-defesa.

Suzuki (2005) comenta que apesar da importância dos carboidratos solúveis na regulação do desenvolvimento e de outros eventos fisiológicos, muitas questões fundamentais relacionadas com as respostas aos açúcares são ainda alvos de muita controvérsia. O autor afirma que, possivelmente, altas concentrações de sacarose inibiriam o crescimento de *Catasetum fimbriatum* devido ao estresse osmótico provocado pela elevada concentração deste açúcar. Em *C. tigrina*, as ESPs que estavam submetidas aos tratamentos que continham elevada concentração de sacarose não desenvolveram alongamento do ápice caulinar, provavelmente como resposta ao estresse osmótico causado por altos teores de sacarose no meio de cultura.

Cao *et al.* (2003) verificaram o mesmo efeito inibitório de concentrações elevadas de sacarose na formação de brotos de *Vaccinium corymbosum*. Teo & Wong (1978) e Kerbauy (1993), observaram efeitos negativos de altas concentrações de sacarose no crescimento de protocormos de *Holttumara* e na formação de protocormóides em *Oncidium varicosum* cultivados *in vitro*. Kraus & Kerbauy (1992) verificaram um decréscimo na porcentagem de formação de protocormóides a partir de ápices radiculares de *Catasetum pileatum* cultivados *in vitro*, em altas concentrações de sacarose. Estas pesquisas de diversos autores referentes às concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultivo auxiliam nas respostas no presente trabalho com *C. tigrina*, das ESPs que vieram a necrosar e foram relacionadas com a quantidade de sacarose adicionada ao meio de cultura.

Suzuki (2005) relata que os efeitos negativos podem estar relacionados ao aumento no potencial osmótico do meio de cultura. Peres (1998) verificou, em *Catasetum fimbriatum*, que altas concentrações de sacarose promoviam a redução do crescimento longitudinal de raízes isoladas, bem como a diminuição na frequência de formação de gemas vegetativas a partir dos ápices meristemáticos radiculares. No presente trabalho, em *C. tigrina* as ESPs suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) e com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5) não desenvolveram alongamentos caulinares e não

formaram raízes, mas os ápices meristemáticos dessas culturas estavam em plena atividade mitótica. Suzuki (2005) aborda que a disponibilidade reduzida de fonte de carbono devido à baixa concentração de sacarose presente no meio de cultura não foi suficiente para o desenvolvimento normal de *Catasetum fimbriatum*. O autor também afirma que em decorrência da diminuição do potencial hídrico do meio de cultura, causado pela concentração elevada de açúcar no meio, resultou em efeito inibitório no crescimento caulinar de *Catasetum fimbriatum*.

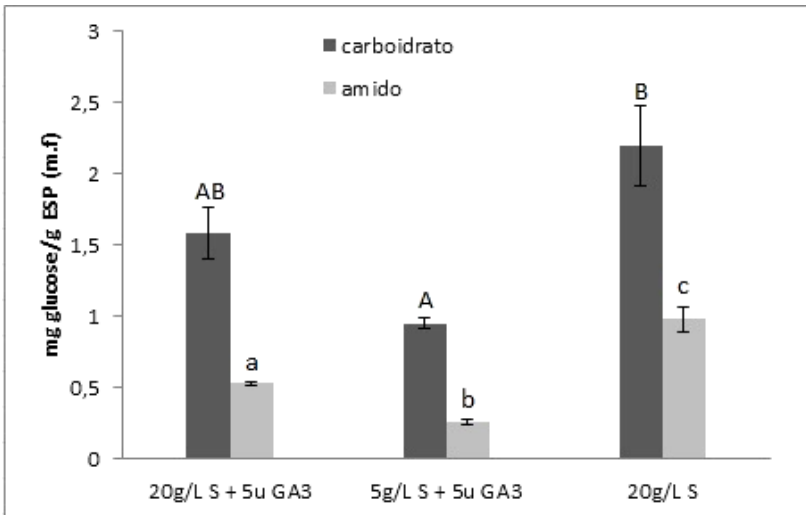


Figura 12 - Teores de Carboidratos Totais e Amido de ESPs de *Cattleya tigrina* A. Rich ex Beer com 28 semanas de cultivo. As letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças significativas entre as médias pelo teste SNK a 5% de probabilidade dos teores de carboidratos. As letras minúsculas acima das barras indicam diferenças significativas entre as médias pelo teste SNK a 5% de probabilidade do teor de amido presente nas ESPs de cada tratamento. ESPs de *Cattleya tigrina* suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5); com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5); e com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0).

A sacarose é uma das principais formas de transporte de carbono em quase todas as angiospermas e o principal produto da fotossíntese, constitui a principal forma de translocação de carbono e o principal substrato para o metabolismo e a síntese de reservas, como o amido (Farrar *et al.*, 2000, Lunn & MacRae, 2003).

O processo de divisão celular demanda energia e pela degradação do amido são formados intermediários glicolíticos que suprem os altos teores de ATP necessários para o metabolismo celular (Martin *et al.*, 2000). O amido é o principal carbono de reserva em numerosas espécies de plantas (Suzuki, 2005). Para os teores de amido presentes nas ESPs suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) foi encontrado 0,98 µg/g⁻¹, nas ESPs suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5) foi encontrado 0,53 µg/g⁻¹ de amido e nas ESPs suplementadas com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5) foi encontrado 0,26 µg/g⁻¹ amido. Esta alta concentração de amido encontrada na cultura submetida ao tratamento S20G0 pode estar relacionada também com a concentração de sacarose encontrada neste meio de cultura, o nível de amido, em relação aos tratamentos S20G5 e S5G5 pode ter sido proporcional a quantidade de sacarose adicionada em cada meio de cultivo.

A maioria das células vegetais sintetiza e degrada amido em alguma fase de seu desenvolvimento (Smith *et al.*, 2005). A degradação de amido fornece carbono diretamente para a síntese de sacarose e para o crescimento e manutenção das células. Em células adjacentes ao meristema, o amido pode atuar potencialmente como um “tampão” de carbono, balanceando a demanda por esqueletos carbônicos e energia para as células e a importação de carbonos na forma de sacarose. Aparentemente, há um controle interno refinado entre sua síntese e degradação (Smith *et al.*, 2003). Usciati *et al.*, (1972) sugeriram que o acúmulo de amido representaria um suprimento energético ao processo de divisão celular em tecidos com uma alta atividade meristemática. No presente trabalho, os altos teores de amido verificados, podem ser considerados com sendo resultante da sacarose absorvida do meio de cultura, o qual poderia ser mobilizado tanto para prover energia a partir da sua quebra em sacarose, quanto para sinalizar a retomada do ciclo celular, se estas culturas estivessem em plena atividade celular.

A giberelina é um hormônio vegetal essencial que controla aspectos do desenvolvimento vegetal, como a germinação de sementes, expansão foliar, alongamento caulinar, floração e desenvolvimento da semente (Davies, 1995). Podendo ativar a divisão celular, a hidrólise de amido e a conversão de frutanos e sacarose em moléculas de glicose e frutose, necessárias para a atividade celular (Salisbury e Ross, 1992). Nas ESPs suplementadas com GAs os níveis do teor de amido foram menores quando comparados as ESPs não submetidas ao hormônio, o que pode referir-se a giberelina presente nestas culturas ativou a

hidrólise do amido e assim, diminuiu os teores de amido presentes nas culturas.

Não são bem compreendidos os fatores que determinam os efeitos negativos ou positivos dos açúcares no crescimento e na fotossíntese (Le *et al.*, 2001). Estes efeitos controversos da adição de diferentes concentrações de sacarose poderiam depender hipoteticamente de uma quantidade limiar do conteúdo de sacarose que está presente nas plantas (Furbank, 1997), e seu “status” fisiológico associado ao desenvolvimento da mesma (Kovtun & Daeie, 1995).

Os dados relativos às análises do conteúdo de clorofilas *a* e *b* (Figura 13) revelaram que não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos suplementados com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5) e com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5), mas entre o tratamento suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0) e os tratamentos S20G5 e S5G5 verificou-se diferença significativa. Em relação à concentração de clorofila total, verificou-se maior conteúdo no S5G5 (57,81 µg de clorofila/grama de massa fresca) e no S20G5 (55,2 µg de clorofila/grama) e no S20G0, no qual apresentava uma coloração acastanhada (0,49 µg de clorofila/grama). Bjorkman (1981) descreve a relação entre o teor de clorofila e a incidência de luz incidente absorvida, pois a eficiência de absorção de luz depende do teor de clorofila por unidade de área. As clorofilas são responsáveis por absorver a energia luminosa e estão envolvidas na transferência de energia durante a fotossíntese (Reinbothe *et al.*, 2010). O excesso de sacarose pode inibir a fotossíntese, dependendo das condições em que a planta se encontra (Farrar *et al.*, 2000). Portanto, nas ESPs do tratamento S20G0, a alta concentração de sacarose no meio de cultura provocou necrose celular de tal forma que os níveis de clorofila foram quase nulos.

Parte dos carboidratos gerados na fotossíntese é utilizada para satisfazer as necessidades biossintéticas das células foliares, sendo que a parcela excedente de carboidratos pode ser exportada das células fotossintéticas na forma de sacarose, ou ser armazenada no cloroplasto na forma de amido (Peng *et al.*, 2011). Os carboidratos são necessários para manutenção das células como uma fonte de esqueleto de carbono e energia para o crescimento e os processos biossintéticos (Ferreira *et al.*, 2011) Com base nestas análises bioquímicas realizadas no estágio de 28 semanas de desenvolvimento das ESPs, observa-se que esta elevada concentração de sacarose ao que o tratamento foi submetido pode estar relacionada aos resultados elevados nos teores de carboidratos e amidos,

presentes na cultura S20G0 submetida a este tratamento. Os carboidratos podem ser armazenados como amido nos amiloplastos e sintetizados a partir da fotossíntese.

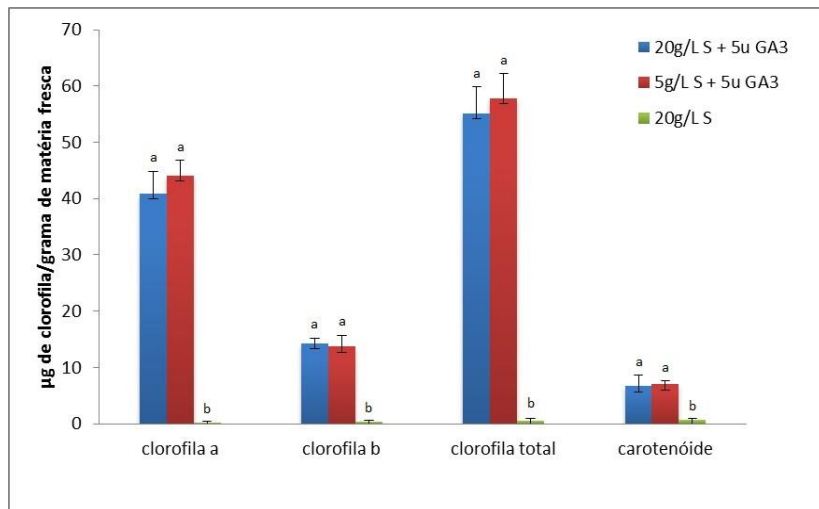


Figura 13 - Teores de Clorofila *a*, *b* e total e carotenóides (μg de Clorofila/grama de matéria fresca) em ESPs de *Cattleya tigrina* A. Rich ex Beer com 28 semanas de cultivo. As letras acima das barras indicam diferenças significativas entre as médias pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ESPs de *Cattleya tigrina* suplementadas com 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e 5 μm giberelina (S20G5); com 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e 5 μm giberelina (S5G5); e com 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose (S20G0).

O principal produto da fotossíntese exportada das folhas para fornecer às demais partes da planta o carbono necessário para o crescimento e a síntese de reserva como o amido, é a sacarose (Lunn & MacRae, 2003). Em protocormos de *Cymbidium*, observam-se altos níveis de clorofila apenas quando cultivados em meios com concentrações de 2 a 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose (Vanséveren-Van Espen, *apud* Thorpe *et al.*, 2008).

Em relação ao conteúdo de carotenóides totais observou que entre os tratamentos S20 G5 e S5 G5 não houve diferença estatística significativa, mas entre o S20 G0 e o tratamento S20 G5 e S5 G5 foi possível perceber diferença estatística significativa (Figura 2). Os carotenóides são potentes antioxidantes, em condições de excesso de luz são produzidos para evitar o estresse oxidativo, desempenham um papel

chave na proteção dos fotossistemas, pois dissipam o excesso de energia, impedindo a foto-oxidação. Sua quantificação é relevante para estimar a eficiência fotossintética (Takahashi & Badger, 2011).

Através destas análises bioquímicas realizadas foi possível evidenciar que as culturas suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose (S20G0), comparadas às culturas suplementadas com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S20G5) e com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5), obtiveram níveis elevados de carboidratos e amidos, levando a necrose destas culturas. Como consequências, os teores de clorofila e carotenóides apresentaram-se em níveis muito baixos. As ESPs do tratamento S5G5 foram as que obtiveram melhores resultados quando comparadas as outras culturas, em termos de alongamento caulinar com primórdios foliares, formação de ápices meristemáticos. As ESPs do tratamento S20G5 comportaram-se de forma intermediária, quando comparadas às do tratamento S20G0 e S5G5, pois estas culturas estavam submetidas com a mesma concentração de sacarose que as ESPs do tratamento S20G0 e também com a mesma concentração de giberelina do tratamento S5G5. A necrose observada nesta cultura foi menos evidente que as do tratamento S20G0, assim como nas análises bioquímicas, não diferiu estatisticamente no teor de amido da ESP inoculada com o tratamento S5G5, pois a presença da giberelina, fez com que este hormônio ativasse a hidrólise do amido presente nas culturas e também nas análises referentes aos teores de clorofila *a*, *b*, e carotenoides totais.

As ESPs do tratamento suplementadas com 5 g.L⁻¹ de sacarose e 5µm giberelina (S5G5), referentes às investigações observadas, estiveram mais aptas para formar plantas, com alongamento caulinar e primórdios foliares.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J. 2008. **Micropropagation of orchids**. Blackwell Publishing.
- BJORKMAN, O. 1981. Responses to different quantum flux densities. *In.*: Lange, O. L.; Nobel, P. S.; Osmond, C. B.; Ziegler, H. (eds). **Encyclopedia of Plant Physiology: Physiological Plant Ecology I**. New York: Springer-Verlag, 57-107.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. 1996. **Aclimatização de plantas: abordagens recentes**. Brasília: Embrapa.
- CAO, X.; FORDHAM, I.; DOUGLASS, L.; HAMMERSCHLAG, F. 2003. Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from in vitro propagated highbush blueberry shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 75: 255-259.
- CHANG, C.; CHANG, W. C. 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. **Plant Cell Reports** 17: 251-255.
- CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). **Plant Science** 160: 87-93.
- CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* "Gower Ramsey". **Plant Growth Regulation** 34: 229-232.
- CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2003. Effects of GA₃, ancymidol, cycocel and paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium* in vitro. **Plant Cell** 100: 105-108,
- CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2004. TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 79: 315-320.
- CHEN, T. Y.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2002. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 38: 595-597.
- CHEN, T. Y.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 76: 11-15.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae** 122: 507-520.

- DESJARDINS, Y. 1993. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plants and their effect on acclimatization. *In*: Carre, F.; Chagvardieff, P. (eds.). **Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures**. France: CEA, 145-160.
- DAVIES, P. J. 1995. **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Dodrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- DOERNER, P. 2003. Plant meristems: a merry-go-round of signals. **Current Biology** 13: 368-374.
- DUBOIS, M., K. A.; GILLES, J. K.; HAMILTON, P.A.; REBES; SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28: 350-356.
- FARRAR, J.; POLLOCK, C.; GALLAGHER, J. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science** 154: 1-11.
- FERREIRA, D.F. 2003. **Sisvar: versão 4.2**. Lavras: UFLA.
- FERREIRA, W.; SUZUKI, R. M.; PESCADOR, R.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. L.; KERBAUY, G. B. 2011. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 47: 420-427.
- FRITSCHÉ, Y. 2012. **Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas**. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- FOGAÇA, L. A.; DORTZBCH, D.; ALVES, A. C.; PEDROTTI, E. L. 2006. Características morfofisiológicas de brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária. **Plant Cell Culture & Micropropagation** 2: 80-87.
- FURBANK, R. T.; PRITCHARD, J.; JENKINS C. L. D. 1997. Effects of exogenous sucrose feeding on photosynthesis in the C3 plant tobacco and the C4 plant *Flaveria bidentis*. **Journal of Plant Physiology** 24: 291-299.
- GEORGE, E. F. 1996. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd. Edington, Exegetics Limited.
- GOW, W. P.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2008. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Physiologiae Plantarum** 31: 363-369.

- GUERRA, M. P.; RODRIGUES, M. A. 2008. Giberelinas. *In.*: Kerbauy, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 235-254.
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. 1979. A Method for the Extraction of Chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany** 57: 1332-1334.
- HEW, C. S.; CLIFFORD, P. E. 1993. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. **Plant Growth Regulation** 13: 231-239.
- HONG, P. I.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2010. Shoot development and plant regeneration from protocorm-like bodies of *Zygopetalum mackayi*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 46: 306-311.
- HORRIDGE, G.A.; TAMM, S.L. 1969. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science** 163: 817-818.
- HUAN, L. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. **Plant Science** 166: 1443-1449.
- KERBAUY, G. B. 1993. Indução in vitro de protocormóides em raízes de *Oncidium varicosum*. Efeitos de fontes nitrogenadas, auxinas e citocininas. **Revista Brasileira de Botânica** 16: 1-8.
- KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. 1996. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warszewiczii* S5 G5. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 8: 157-159.
- KOŠIR, P.; ŠKOF, S.; LUTHAR, Z. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. **Plant Biotechnology** 83: 233-242.
- KOVTUN, Y.; DAIE, J. 1995. End-product control of carbon metabolism in culture-grown sugar beet plants. **Plant Physiology** 108: 1647-1656.
- KRAUS, E. J.; KERBAUY, G. B. 1992. Formation of protocorm-like bodies from root apices of *Catasetum pileatum* (Orchidaceae) cultivated in vitro. S5 G5. Some non-hormonal requirements involved in the regeneration. **Boletim de Botânica da USP** 13: 31-40.
- KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, R. 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea** 33: 177-184.
- KUEHNLE, A. R. 2007. Orchids - *Dendrobium*. *In.*: Anderson, N. O. (ed.). **Flower Breeding and Genetics - Issues, Challenges and Opportunities for the 21st century**. Springer.

- KUO, H. L.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* "Little Steve". **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 41: 453-456.
- LE, V. Q.; SAMSON, G.; DESJARDINS, Y. 2001. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of in vitro plantlets of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO₂ concentration. **Journal of Plant Physiology** 158: 599-605.
- LIAU, C. H.; YOU, S.J.; PRASAD, V. HSIAO, H. H.; LU, J. C.; YANG, N. S.; CHAN, M. T. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. **Plant Cell Reports** 21: 993-998.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions** 603: 591-592.
- LIN, Y. H.; CHANG, C.; CHANG, W. C. 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 62: 21–25.
- LU, M. C. 2004. High frequency plant regeneration from callus culture of *Pleione formosana* Hayata. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 78: 93–96.
- LUNN, J.E. e MACRAE, E. 2003. New complexities in the synthesis of sucrose. **Current Opinion in Plant Biology** 6: 208-214.
- MARTIN, A. B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGO, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. 2000. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science** 154: 143 – 151.
- MCCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVIERA, V.; OWENS, H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. **Analytical Chemistry** 22: 1156-1158.
- MERCHANT, A.; PEUKE, A.D.; KEITEL, C.; MACFARIANE, C.; WARREN, C.R.; ADAMS, M.A. 2010. Phloem sap and 13C, carbohydrates, and amino acid concentrations in *Eucalyptus globules* change systematically according to flooding and water deficit treatment. **Journal of Experimental Botany** 61: 1785-1793.
- MOREL, G.; WETMORE, R. M. 1951. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany** 38: 141-143.

- MOSHKOV, I. E.; NOVIKOVA, G. V.; HALL, M. A.; 2008. Plant Growth Regulators S5 G5I: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. *In*: George, E. F.; Hall, M. A.; Klerk, G. J. D. (eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Springer, 227-282.
- MURASHIGE, T. SKOOG, T. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology** 15: 473-97.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** 59: 368-373.
- PENG, C. C.; XU, Y. H.; XI, R. C.; ZHAO, X. L. 2011. Expression, subcellular localization and phytohormone stimulation of a functional sucrose transporter (MdSUT1) in apple fruit. **Scientia Horticulture** 128: 206-212.
- PERES, L.E.P. 1998. **Relações hormonais endógenas envolvidas na conversão direta de ápices radiculares isolados de *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) em protocormóides**. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- REINBOTHE, C.; EL BAKKOURI, M.; BUHR, F.; MURAKI, N.; NOMATA, J.; KURISU, G.; FUGITA, Y.; REINBOTHE, S. 2010. Chlorophyll biosynthesis: Spotlight on protochlorophyllide reduction. **Trends in Plant Science** 15: 614-622.
- ROY, J.; BANERJEE, N. 2001. Cultural requirements for in vitro seed germination, protocorm growth and seedling development of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. **Indian Journal of Experimental Biology** 39:1041-1047.
- ROY, J.; NAHA, S.; MAJUMDAR, M.; BANERJEE, N. 2007. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 90: 31-39.
- RUZIN, S.E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. New York: Oxford University Press.
- SABLOWSKI, R. 2004. Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? **Trends in Cell Biology** 14: 605-611.
- SAIPRASAD, G. V. S.; POLISETTY, R. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 39: 42-48.

- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. 1992. Plant development. *In.*: Salisbury, S.B.; Ross, C.W. (eds.) **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company. 329-357.
- SHIAU, Y. J.; NALAWADE, S. M.; HSIA, C. N.; MULABAGAL, V.; TSAY, H. S. 2005. *In vitro* propagation of the Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* wall. ex lindl., from axenic nodal segments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 41: 666-670.
- SMITH, D.L.; KRIKORIAN, A.D. 1990. Low external pH replaces 2,4-D in maintaining and multiplying 2,4-D initiated embryogenic cells of carrot. **Plant Physiology** 72: 329-336.
- SMITH, A. M.; ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M. 2005. Starch degradation. **Annual Review of Plant Biology** 56: 73-97.
- SMITH, A.M.; ZEEMAN, S.C.; THORNEYCROFT, D.; SMITH, S.M. 2003. Starch mobilization in leaves. **Journal of Experimental Botany** 54: 577-583.
- SREERAMANAN, S.; VINOD, B.; SASHI, S.; XAVIER, R. 2008. Optimization of the transient-gusa gene transfer of *Phalaenopsis violacea* Orchid via *Agrobacterium tumefaciens*: an assessment of factors influencing the efficiency of gene transfer mechanisms. **Advances in Natural and Applied Sciences** 2: 77-88.
- SUJJARITTHURAKARN, P.; KANCHANAPOOM, K. 2011. Efficient Direct Protocorm-Like Bodies Induction of Dwarf *Dendrobium* using Thidiazuron. **Notulae Scientia Biologicae** 3: 88-92.
- SUZUKI, R. M. 2005. **Efeitos da luz, fitormônios e alguns nutrientes Sobre o comportamento do meristema caulinar de *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl (Orchidaceae)**. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Depto. de Botânica, São Paulo.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 2009. Porto Alegre: Artmed.
- TEO, C. K.; WONG, C. H. 1978. Effects of sucrose on the growth of protocorms of *Holttumara* Loke Tuck Yip. **Orchid Review** 86: 285-289.
- THORPE, T; STASOLLA, E. C.; YEUNG, G. J. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions , Osmotic and pH Effects , and Support Systems. *In.*: George, E. F.; Hall ,M. A.; Klerk , G. J. D. (eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Springer, 115-174.
- TAKAHASHI, S.; BADGER, M. R. 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem S5 G5 damage. **Trends in Plant Science** 16: 53–60.

- TOKUHARA, K.; MII, M. 2003. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 39: 635-639.
- USCIATI, M.; CODACCIONI, M.; GUERN, J. 1972. Early cytological and biochemical events induced by 6-benzylaminopurine application on axillary buds of *Cicer arietinum* plants. **Journal of Experimental Botany** 23: 1009-1020.
- YOUNG, P. S.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 67-72.
- WEIGEL, D.; JUNGHERNS, 2002. Stem cells that make stems. **Nature** 415: 751-754.
- WU, I. F.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 2004. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 77: 107-109.
- ZHAO, P.; WU, F.; FENG, F. S.; WANG, W. J. 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 44: 178-185.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com os resultados obtidos neste trabalho, surgem novas perspectivas para estudos posteriores com base no que foi evidenciado através das observações histológicas e morfológicas relacionadas com as espécies *C. amethystoglossa* e *C. tigrina*.

Os dados obtidos no 1º capítulo referentes a histodiferenciação de *C. amethystoglossa* elucidam processos de germinação do embrião e desenvolvimento de protocormos e ampliam os conhecimentos a respeito da germinação assimbiótica de orquídeas. As análises morfo histológicas, por meio da ferramenta ME, MEV e MO, fundamentaram as investigações sobre a estruturação e organização celular constituintes dos protocormos nos estádios de desenvolvimento. Os resultados obtidos esclarecem dúvidas ora antes pertinentes em relação a nomenclatura de termos envolvidos no desenvolvimento embrionário de *Cattleya amethystoglossa*, referentes ao pró-embrião, ao protocormo e à plântula. Como sequência, sugerem estudos que envolvam estes estádios de desenvolvimento e formação, análises bioquímicas e indução de explantes para obtenção de ESPs, a fim de aperfeiçoar processos de micropropagação para obtenção de mudas com alta qualidade fitossanitária.

Com os resultados descritos no capítulo II, sobre a origem das ESPs, pode se programar as etapas da indução e selecionar explantes para que sejam realizadas as análises relacionadas a diferenciação das culturas, aperfeiçoando pesquisas referentes a obtenção das ESPs de *C. tigrina*. As análises morfo histológicas revelaram alguns padrões de morfo histodiferenciação, em que as ESPs começam a se desenvolver na região epidérmica abaxial das folhas e em maiores concentrações na região basal. Evidenciam inúmeras regiões com intensa atividade meristemática, com divisões celulares e núcleos conspícuos. As ESPs apresentam como um aglomerado globular, formado por células meristemáticas. Dúvidas referentes a origem histológica destas ESPs de *C. tigrina* a partir da inoculação com explantes foliares puderam ser evidenciadas a partir desses estudos. Sugerem pesquisas a nível citológico, a partir das primeiras horas após a inoculação dos explantes, para determinar processos de diferenciação que estão ocorrendo celularmente no momento da indução.

Para a conversão destas ESPs em plântulas, no capítulo III, foram testadas diferentes concentrações de sacarose e giberelina. O tratamento que apresentou melhor resposta para formação de brotos, com primórdios foliares, foi o meio de cultura suplementado com 5g.L^{-1} de sacarose e $5\mu\text{m}$ de giberelina (S5 G5) sugerindo estudos posteriores que envolvam concentrações menores de sacarose, combinadas com a presença e ausência de giberelina.

Estas sugestões indicam a necessidade das pesquisas relacionadas a morfologia, histologia, embriologia e citologia de orquídeas, ressaltando para as espécies ameaçadas de extinção, nativas e com alto valor econômico, promovendo a valoração do Patrimônio Genético. Importante ressaltar que pesquisas científicas nos remetem cada vez mais para novas investigações, através da criatividade e inovação promovem o aprendizado e o compartilhamento de informações.