

MONIQUE CRISTINE RODRIGUES ABRÃO

Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya xanthina* Lindley (Orchidaceae) em diferentes meios de cultura, com base em nutrição nitrogenada

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2014

MONIQUE CRISTINE RODRIGUES ABRÃO

Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya xanthina* Lindley (Orchidaceae) em diferentes meios de cultura, com base em nutrição nitrogenada

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. ROGÉRIO MAMORU SUZUKI

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Abrão, Monique Cristine Rodrigues

A158g Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya xanthina* Lindley (Orchidaceae) em diferentes meios de cultura, com base em nutrição nitrogenada / Monique Cristine Rodrigues Abrão -- São Paulo, 2014.
57 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014
Bibliografia.

1. Orchidaceae. 2. Fitormônio. 3. Nitrogênio. I. Título

CDU: 582.594.2

*“OS GRANDES SÓ NOS PARECEM GRANDES PORQUE
ESTAMOS DE JOELHOS.
LEVANTEMO-NOS”.*

Pierre Joseph Proudhon

Agradecimentos

A Pós-graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente do Instituto de Botânica por todo suporte concedido durante todo o processo.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo (IBT) pela oportunidade de aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio concedido.

Ao Prof. Dr. Rogério Mamoru Suzuki, o meu sincero agradecimento pela orientação neste trabalho e em todos os outros já realizados. Muito obrigada pelo profissionalismo, pela sincera amizade e total disponibilidade que sempre destinou a mim.

Às Profa. Dra. Vívian Tamaki e Ma. Flávia Maria Kazue Kurita do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, pela disponibilidade de tempo no acompanhamento deste trabalho, por ceder estrutura laboratorial e de equipamentos para a realização de grande parte do trabalho.

Ao Prof. Eduardo Pereira Cabral Gomes por diminuir minhas dúvidas e auxiliar no trabalho estatístico, que tanto admiro.

A todos os integrantes que compõe o Núcleo de Pesquisas – Orquidário do Estado, desde estagiários a pesquisadores. Em especial a minha colega de laboratório Jackeline Jorge pelo incentivo, parceria e risadas durante nosso dia a dia.

A todos os integrantes da Secretaria do Meio Ambiente de Guarulhos (SEMA). Em especial aos meus colegas de trabalho Luciano Zandoná, Everton Nigro e Marcus Vinícius pelo incentivo, companheirismo e por aumentar meu amor pelas orquídeas.

Ao meu namorado Renato Duarte por todo amor, amizade e por estar ao meu lado durante todos os momentos.

Aos meus amigos de todas as horas: Aline Diniz, Martim Juras e Felipe Oliveira; pelo apoio e por todos os momentos de “crazy party”...

A minha família por todo o estímulo e compreensão.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Resumo..... | 3 |
| 2. Abstract | 4 |
| 3. Introdução e Justificativa | 5 |
| 4. Hipótese e Objetivo | 8 |
| 5. Material e Métodos..... | 9 |
| 5.1. Teste de viabilidade | 9 |
| 5.2. Desinfestação..... | 10 |
| 5.3. Meios de cultura | 10 |
| 5.4. Análise da germinação e desenvolvimento inicial | 12 |
| 5.5. Efeitos dos meios de cultura sobre o desenvolvimento de plântulas..... | 14 |
| 5.6. Análise do crescimento <i>in vitro</i> de plantas de <i>C. xanthina</i> submetidas a diferentes balanços de ácido naftalenoacético e benziladenina. | 15 |
| 5.7. Status de Nitrogênio | 15 |
| 5.7.1. Quantificação de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-)..... | 15 |
| 5.7.2. Quantificação de clorofilas e carotenoide | 16 |
| 5.7.3. Quantificação de Proteína Total | 17 |
| 5.8. Análise Estatística..... | 18 |
| 6. Resultados e Discussão | 18 |
| 6.1. Teste de Viabilidade | 18 |
| 6.2. Germinação..... | 19 |
| 6.3. Desenvolvimento Inicial..... | 22 |
| 6.4. Efeitos dos meios de cultura sobre o desenvolvimento de plântulas..... | 29 |
| 6.4.1. Status de Nitrogênio..... | 32 |
| 6.4.1.1. Quantificação de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-)..... | 32 |
| 6.4.1.2. Quantificação de clorofilas e carotenoide | 34 |
| 6.4.1.3. Quantificação de Proteína Total | 35 |
| 6.5. Análise do crescimento de plantas de <i>C. xanthina</i> submetidas a diferentes balanços de ácido naftalenoacético e benziladenina. | 37 |
| 6.5.1. Status de Nitrogênio..... | 44 |
| 6.5.1.1. Quantificação de clorofila e carotenoide | 44 |
| 6.5.1.2. Quantificação de Proteína Total | 45 |
| 7. Considerações Finais..... | 47 |
| 8. Referências Bibliográficas | 48 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Aspecto geral de <i>Cattleya xanthina</i> . A) Morfologia floral; B) Fruto; C) Conservação <i>ex-situ</i> na coleção científica “Frederico Carlos Hoehne”, do Núcleo de Pesquisas – Orquidário do Estado do Instituto de Botânica | 06 |
| Figura 2. Sementes germinadas e diferentes estágios de desenvolvimento inicial de plântulas | 14 |
| Figura 3. Viabilidade de sementes ao longo do tempo de maturação das sementes obtida pelo teste de tetrazólio | 20 |
| Figura 4. Efeitos de diferentes meios de cultura: Knudson C (KC), Murashige & Skoog (MS), e Vacin & Went (VW), adicionado ou não de 1 µM de benziladenina (BA) no desenvolvimento inicial, de <i>C. xanthina</i> utilizando sementes de 4, 5, 6, 7 e 8 meses, após 120 dias de cultivo | 25 |
| Figura 5. Efeitos de diferentes meios de cultura no desenvolvimento inicial após 180 dias de cultivo | 28 |
| Figura 6. Percentagem de plantas viáveis, nos meios: Knudson C (KC), Murashige & Skoog (MS), e Vacin & Went (VW), após 180 dias de cultivo | 29 |
| Figura 7. Aspectos das plantas de <i>Cattleya xanthina</i> após 360 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em diferentes meios de cultura | 31 |
| Figura 8. Efeitos de diferentes meios de cultura no comprimento caulinar e da raiz maior (Fig. 8A) e no número de folhas e raízes (Fig. 8B) de <i>Cattleya xanthina</i> após 360 dias de cultivo <i>in vitro</i> | 32 |
| Figura 9. Efeitos de diferentes meios de cultura sobre o acúmulo de massa de matéria fresca (Fig. 9A) e de massa de matéria seca (Fig. 9B) de caules e raízes de <i>Cattleya xanthina</i> após 360 dias de cultivo <i>in vitro</i> | 33 |
| Figura 10. Efeitos de diferentes meios de cultura no acúmulo de amônio (Fig. 10A) e nitrato (Fig. 10B) nas plantas de <i>Cattleya xanthina</i> após 360 dias de cultivo <i>in vitro</i> | 34 |

| | |
|---|----|
| Figura 11. Efeitos de diferentes meios de cultura na síntese de pigmentos fotossintéticos nas plantas de <i>Cattleya xanthina</i> após 360 dias de cultivo <i>in vitro</i> | 36 |
| Figura 12. Efeitos de diferentes meios de cultura na concentração de proteína total nas plantas de <i>Cattleya xanthina</i> após 360 dias de cultivo <i>in vitro</i> | 37 |
| Figura 13. Aspectos das plantas de <i>Cattleya xanthina</i> após 540 dias de cultivo <i>in vitro</i> , cultivadas no meio MS com adição de diferentes concentrações de auxina (ANA) e citocinina (BA) | 40 |
| Figura 14. Efeito da adição de diferentes balanços de benziladenina e ácido naftalenoacético hormônios vegetais ao meio MS, no comprimento de caules e da raiz maior (Fig. 14A) e no número de folhas e raízes (Fig. 14B) de <i>Cattleya xanthina</i> após 540 dias de cultivo <i>in vitro</i> | 41 |
| Figura 15. Efeito da adição de diferentes balanços de benziladenina e ácido naftalenoacético ao meio MS, sobre o acúmulo de massa de matéria fresca (Fig. 13A) e de massa de matéria seca (Fig. 13B) de caules e raízes de <i>Cattleya xanthina</i> após 540 dias de cultivo <i>in vitro</i> | 44 |
| Figura 16. Efeito da adição de diferentes balanços de benziladenina (BA) e ácido naftalenoacético (ANA) ao meio MS, na síntese de pigmentos fotossintéticos nas plantas de <i>Cattleya xanthina</i> após 540 dias de cultivo <i>in vitro</i> | 46 |
| Figura 17. Efeito da adição de diferentes balanços de benziladenina (BA) e ácido naftalenoacético (ANA) ao meio MS, no conteúdo de proteína total nas plantas de <i>Cattleya xanthina</i> após 360 dias de cultivo <i>in vitro</i> | 47 |

Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya xanthina* Lindley (Orchidaceae) em diferentes meios de cultura, com base em nutrição nitrogenada

1. Resumo

Cattleya xanthina Lindl. é uma orquídea neotropical endêmica do Brasil, com alto risco de desaparecimento da natureza em um futuro próximo. O presente estudo analisou a influência de diferentes concentrações e formas de nitrogênio fornecido por diferentes meios de cultura no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya xanthina*. Foi analisado o desenvolvimento das plântulas, desde a germinação até plantas com 540 dias de cultivo. Para a germinação e o desenvolvimento de plântulas foram utilizados os meios Knudson C (KC), Vacin & Went (VW), Murashige & Skoog (MS), e o meio MS com metade da concentração de nutrientes (MS/2) com ou sem a adição de citocinina. Após 360 dias de cultivo as plantas foram transferidas ao meio MS com diferentes balanços de auxina e citocinina. Após 180 dias em cada tratamento, foram avaliados os parâmetros biométricos, quantificados os pigmentos fotossintéticos, Proteína total, nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Os meios de cultura KC e VW, que possuem em sua composição a maior relação $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ mostraram ser os mais eficazes para o desenvolvimento de *Cattleya xanthina*, pois apresentaram plântulas com desenvolvimento inicial mais rápido, além de maior produção de pigmentos fotossintéticos e Proteína total. Tais resultados poderiam ser decorrentes do fato de o amônio ser absorvido primeiramente, sendo o nitrato utilizado posteriormente no cultivo *in vitro*, promovendo o desenvolvimento precoce das plantas.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, fitormônios, nitrogênio, orquídea.

2. Abstract

(Seed germination and *in vitro* development of *Cattleya xanthina* Lindley (Orchidaceae) in different media culture, based on nitrogen nutrition) *Cattleya xanthina* Lindl. is a neotropical orchid endemic to Brazil, with high risk of disappearance of nature in the near future. The present study examined the influence of different forms and concentrations of nitrogen supplied by different culture media on *in vitro* development of *Cattleya xanthina*. Seedling development, from germination to plant with 540 days of culture was analyzed. For germination and seedling development, we used the Knudson C (KC), Vacin & Went (VW), Murashige and Skoog (MS) culture media and MS medium with half the concentration of nutrients (MS/2) with or without exogenous cytokinin. After 360 days of culture, the plants were transferred to MS medium with different auxin and cytokinin balances. After 180 days for each treatment, the biometric parameters, pigments content, total protein, nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) were evaluate. The media with higher concentrations of nitrogen as NH_4^+ , KC and VW proved to be the most effective for *Cattleya xanthina* growth, presenting plants with faster early seedling development and greater production of photosynthetic pigments and total proteins. Such results could be due to the ammonium being absorbed first, and nitrate used later on *in vitro* culture, promoting early seedling development.

Keywords: *In vitro* culture, phytohormones, nitrogen, orchid.

3. Introdução e Justificativa

Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificadas famílias de plantas representando cerca de 10% das angiospermas (Dressler 1981). Esta família é constituída de aproximadamente 25.000 espécies distribuídas em 800 gêneros (Atwood 1986; Chase et al. 2003). No Brasil, segundo último levantamento, há 235 gêneros e 2.428 espécies nativas; sendo 66 gêneros e 1.632 espécies endêmicas do país (Barros *et al.* 2012). *Cattleya xanthina* (Lindl.) Van den Berg é uma espécie epífita, com alto risco de desaparecimento na natureza em futuro próximo, assim reconhecida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA 2008), entretanto, nessa instrução normativa tratada ainda como *Sophronitis xanthina*.

Cattleya xanthina apresenta folhas elípticas, inflorescências portando de quatro a sete flores de porte médio (cerca de 8 cm de diâmetro), de coloração vistosa, variando de amarelo-limão ao ocre, contrastando com o labelo esbranquiçado (Decker 1956). Um detalhe desta espécie não descrita por Decker (1956) são as venações no labelo de coloração que variam do rosa ao púrpura. Na figura 1, observa-se uma flor, como descrita por Decker (1956) e as venações. Segundo Hoehne (1953) esta espécie é principalmente encontrada na região central do Espírito Santo, ocorrendo desde o sul da Bahia até o estado do Rio de Janeiro.



Figura 1. Aspecto geral de *Cattleya xanthina*. A) Morfologia floral; B) Fruto; C) Conservação *ex-situ* na coleção científica “Frederico Carlos Hoehne”, do Núcleo de Pesquisas – Orquidário do Estado do Instituto de Botânica. Barra de escala 1cm.

Atualmente, a ação humana causa a destruição de habitats desta espécie e de várias outras orquídeas gerando declínio populacional. Além disso, as orquídeas têm uma longa fase vegetativa até atingir, em aproximadamente sete anos, a fase reprodutiva e um complexo ciclo de vida que aumentam o risco de extinção. A necessidade da associação com fungos micorrízicos para a germinação natural, a baixa percentagem de germinação na natureza (menor do que 0,1% atingindo no máximo 5%) são outros fatores de complexidade no ciclo de vida das orquídeas (Ferreira & Suzuki 2008). Sendo assim, o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa extremamente eficaz para prevenir a extinção, uma vez que promove o aumento da percentagem de germinação, por exemplo, atingindo mais de 90% de sementes germinadas de *Hoffmannseggella cinnabarina* (Bateman ex Lindl.) H. G. Jones (Suzuki et al. 2009b), permite a produção maciça de plântulas em curtos períodos e estimula o crescimento vegetal e, desta forma, contribui para a conservação das espécies. Os estudos já realizados

com outras espécies de orquídeas demonstram que a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas variam de espécie para espécie, em diferentes meios de cultura (Dutra et al. 2008; Suzuki et al. 2010; Suzuki et al. 2009a). Portanto análises que possam indicar importância dos nutrientes, especialmente o nitrogênio são extremamente relevantes para comprovação da eficácia do meio de cultura.

Os meios de cultura são compostos por macro e micronutrientes em diferentes concentrações, e o nitrogênio é o composto de maior importância entre os macronutrientes, participando na constituição dos aminoácidos, proteínas, nucleosídeos, ácidos nucléicos, pigmentos fotossintéticos e coenzimas das plantas. O principal sintoma de deficiência de nitrogênio é a clorose generalizada (Albert *et al.* 2012). O nitrogênio pode ser assimilado pelas plantas nas formas de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+). Geralmente, a forma do nitrogênio mais absorvida pelas plantas é o nitrato, embora isto possa variar entre espécies e de acordo com fatores ambientais (Mengel & Kirkby 1978).

Segundo Malavolta *et al.* (1997), o teor de clorofila presente na planta indica o nível de nitrogênio absorvido. Como o nitrogênio participa na composição da molécula de clorofila, a deficiência deste afeta diretamente a absorção de luz durante o processo de fotossíntese, influenciando o desenvolvimento da planta (Cheng 2003). Neto *et al.* (2002) enfocam que o monitoramento de níveis de clorofila pode sinalizar antecipadamente uma deficiência da concentração de nitrogênio disponibilizada ou metabolizada, podendo ser previamente corrigida com novo fornecimento de nitrogênio, evitando-se, desta maneira, a redução do desenvolvimento vegetal.

A dificuldade apresentada pelo cultivo *in vitro* está nas diferentes necessidades nutricionais de cada espécie de orquídea, sendo necessários estudos para se determinar os meios de cultura adequados, que forneçam ao embrião os nutrientes nas concentrações corretas (Ruíz & Laguna 2008).

Os reguladores de crescimento têm sido utilizados na tentativa de promover a germinação e o desenvolvimento de orquídeas, substituindo algumas funções de fungos micorrízicos (Hadley & Harvais 1968). Com base em Kuiper *et al.* (1988) a disponibilidade de nutrientes pode influenciar na síntese e na ação de fitormônios endógenos, sendo que o nitrogênio pode afetar o nível de citocinina da planta.

Segundo Ulrich (1960) algumas espécies de fungos, assim como as plantas, sintetizam auxinas. Alguns fungos também são capazes de produzir citocininas; estas foram identificadas em cultivo de fungos realizadas por Crafts & Miller (1974). Pesquisas de Skoog & Miller (1957) evidenciaram a importância da relação entre auxinas e citocininas na organogênese *in vitro*, na dominância apical, na formação e no crescimento de raízes e brotos caulinares. A produção de plantas mais vigorosas facilita o processo de aclimatização.

O declínio populacional e a conseqüente ameaça de extinção de *Cattleya xanthina* em um futuro próximo (MMA 2008), além da inexistência de estudos referentes à sua reprodução, ratificam a importância da realização de pesquisas para otimizar a germinação e o desenvolvimento *in vitro*, permitindo a conservação desta espécie, e possibilitando estudos futuros quanto à reintrodução na natureza.

4. Hipótese e Objetivo

O nitrogênio em concentração adequada promove o desenvolvimento de plantas influenciando a ação de fitormônios, no entanto em níveis elevados pode gerar toxicidade e morte, assim sendo, a análise das concentrações de clorofila, nitrato e amônio correlacionando-as com os parâmetros biométricos de crescimento, poderia indicar a promoção ou inibição do desenvolvimento de *C. xanthina* utilizando as diferentes formas e concentrações de nitrogênio presentes em cada meio de cultura.

O presente estudo visa analisar essa relação entre o nitrogênio e o desenvolvimento vegetal, analisando a influência de diferentes meios de cultura, com base em concentrações e formas de nitrogênio desde a germinação de sementes até a formação de plantas de *Cattleya xanthina* cultivadas *in vitro*.

5. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de cultivo *in vitro*, no Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, do Instituto de Botânica, em São Paulo-SP, Brasil. As análises bioquímicas foram realizadas no Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais, sob a supervisão da Dra. Vivian Tamaki e da Msa. Flávia Maria Kazue Kurita. Neste trabalho vinte plantas de *C. xanthina* selecionadas previamente, pertencentes à coleção científica “Frederico Carlos Hoehne” do Núcleo de Pesquisas Orquidário do Estado, foram utilizadas para polinização artificial cruzada, para a produção de frutos e coleta das sementes. As sementes para a germinação *in vitro* foram retiradas de frutos imaturos a partir de quatro meses até sete meses após a polinização, e de frutos maduros (com cerca de oito meses) de *C. xanthina*, utilizando-se dois frutos para cada tempo de maturação.

5.1. Teste de viabilidade

A determinação da percentagem de viabilidade das sementes foi feita por meio do teste de tetrazólio, no qual sementes são imersas em solução aquosa de 1% de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio durante 24 horas, em estufa, no escuro à temperatura de 30 °C. Após este período, foram preparadas três lâminas a serem analisadas em estereomicroscópio, para a obtenção da percentagem de sementes viáveis, sendo que foram consideradas viáveis aquelas sementes que apresentaram seu embrião corado de vermelho intenso.

5.2. Desinfestação

Em frutos imaturos foi realizada a desinfestação apenas externa dos frutos; nos frutos maduros foi realizada a desinfestação das sementes. Os frutos foram desinfestados como se segue: cada fruto foi embebido em solução aquosa de 20% de hipoclorito de sódio comercial [v/v] (com no mínimo 2% de cloro) durante dez minutos, em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, com o auxílio de pinça e bisturi estéreis, o fruto foi cortado longitudinalmente, retirando-se as sementes, e estas semeadas diretamente nos meios de cultura, sem passagem pelo procedimento abaixo descrito.

Para a desinfestação das sementes, depois de retiradas dos frutos, estas foram embebidas durante 30 minutos em água deionizada esterilizada em autoclave, em sequência transferidas para uma solução aquosa a 15% de hipoclorito de sódio comercial [v/v] (com no mínimo 2% de cloro) durante dez minutos. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, a solução de hipoclorito foi retirada e as sementes lavadas três vezes com água deionizada esterilizada, antes de realizar a semeadura nos meios de cultura.

Foram considerados maduros apenas os frutos que apresentaram deiscência natural, conseqüentemente, houve a necessidade da desinfestação das sementes, diferentemente do adotado para os frutos imaturos (ainda indeiscentes). A esterilização de todos os materiais utilizados foi realizada em autoclave durante 30 minutos, a 120 °C e 1,3 atm, excetuando-se os meios de cultura, que foram tratados da forma descrita a seguir.

5.3. Meios de cultura

A semeadura foi realizada nos seguintes meios de cultura: o meio VW (Vacin & Went 1949), modificado pela substituição do citrato de ferro pelo Fe-EDTA, o meio MS

(Murashige & Skoog 1962), o meio MS com metade da concentração de macronutrientes (MS/2) e o meio KC (Knudson 1946). Ao meio KC foi acrescentado sulfato de manganês à parte, devido à menor concentração deste micronutriente em relação aos micronutrientes que compõe o meio de cultura MS. Todos os meios foram suplementados com 2% de sacarose e micronutrientes do meio MS (com exceção do meio KC, para o qual, foi preparada outra solução de micronutrientes que diferiu apenas em relação à concentração de manganês do meio MS), e geleificados com 0,4% de ágar bacteriológico. Composição dos meios de cultura indicada na tabela 1.

Durante o período de germinação foi acrescentada citocinina 6-benziladenina e durante o experimento de desenvolvimento das plântulas, foi realizado o acréscimo da citocinina 6-benziladenina e/ou da auxina ácido naftaleno acético

O pH dos meios foi ajustado para $5,8 \pm 0,05$, anteriormente à adição de ágar. Após homogeneização em temperatura de ebulição (cerca de 100 °C) foram distribuídos 40 ml dos meios, em frascos de 200 ml de capacidade. A esterilização dos meios foi realizada em autoclave durante 15 minutos, a 120 °C e 1,3 atm.

Foram realizadas duas sementeiras para cada fruto em cada um dos oito diferentes meios de cultura, os quais foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25 °C \pm 2 °C e fotoperíodo de 12h, proporcionado por lâmpadas fluorescentes que fornecem 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa.

Tabela 1. Composição dos nutrientes dos meios de cultura utilizados para a germinação e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya xanthina*.

| Nutrientes | Knudson C (1946) (KC) mmol L ⁻¹ | Murashige & Skoog (1962) (MS) mmol L ⁻¹ | Vacin & Went (1949) (VW) mmol L ⁻¹ |
|--|---|---|--|
| Amônia (NH ₄ ⁺) | 7,57 | 20,62 | 7,57 |
| Nitrato (NO ₃ ⁻) | 8,47 | 39,43 | 5,20 |
| Fosfato (PO ₄ ³⁻) | 1,84 | 1,25 | 3,13 |
| Potássio (K) | 1,84 | 20,06 | 6,97 |
| Sulfato (SO ₄ ²⁻) | 4,84 | 1,50 | 4,90 |
| Cálcio (Ca ⁺⁺) | 4,24 | 3,01 | 1,93 |
| Magnésio (Mg ⁺⁺) | 1,02 | 1,50 | 1,02 |
| Cloro (Cl ⁻) | - | 6,03 | - |
| Nitrogênio total | 16,04 | 60,06 | 12,77 |
| Relação NH ₄ ⁺ :NO ₃ ⁻ | 0,89 | 0,52 | 1,46 |

5.4. Análise da germinação e desenvolvimento inicial

A análise de germinação das sementes foi realizada dez dias após constatada a presença de protocormos de coloração verde (clorofilados), cerca de quarenta e cinco dias depois da semeadura. Para tanto, foram retiradas duas amostras de cada frasco, depositadas em lâminas quadriculadas para a análise da germinação, realizada em estereomicroscópio, obtendo a percentagem de sementes germinadas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam rompimento da proteção da testa e embrião intumescido e clorofilado.

A análise do desenvolvimento inicial teve início cento e vinte dias após a semeadura. Foram retiradas duas porções aleatórias dos frascos, totalizando quatro amostras analisadas para cada meio de cultura e identificadas as diferentes fases de desenvolvimento inicial, de acordo com Suzuki *et al.* (2010), conforme pode ser observado na figura 2.

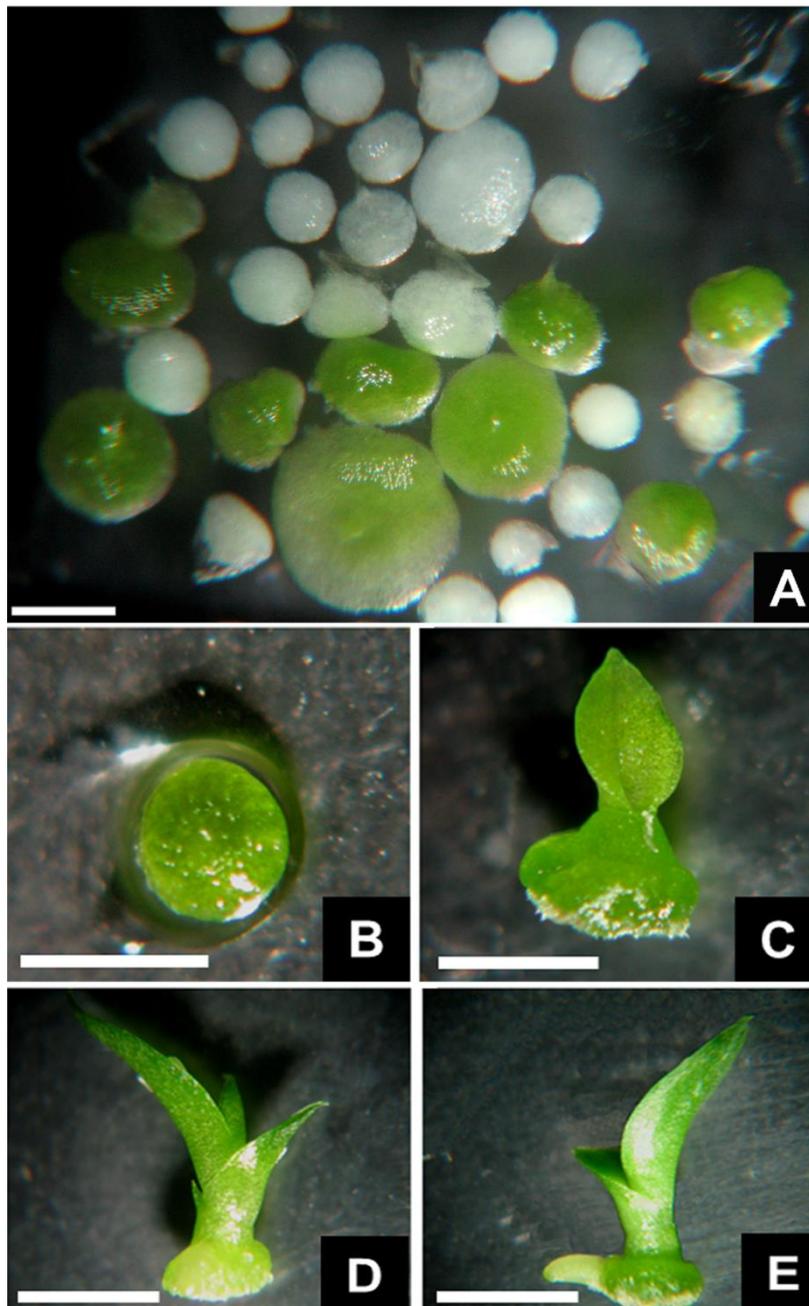


Figura 2. Sementes germinadas e diferentes estágios de desenvolvimento inicial de plântulas. A: Germinação de sementes 45 dias após a semeadura, sementes germinadas apresentam-se clorofiladas, sementes que não germinaram apresentam coloração branca ou eventualmente marrom. 2B-E Diferentes estágios de desenvolvimento inicial 180 dias após a semeadura. 2B: Protocormo (Estágio I); 2C: Protocormo com a formação da primeira folha (Estágio II); 2D.: Protocormo apresentando duas ou mais folhas (Estágio III); 2E.: Plântula com folha e presença de raiz (Estágio IV). Barra de escala 0,1cm.

Esta avaliação do desenvolvimento inicial foi realizada também aos 180 dias de cultivo, após a semeadura. Em seguida, foram retiradas quinze plantas aleatoriamente de cada tratamento, avaliando-se os seguintes parâmetros biométricos: comprimento do caule (medido da base do caulículo até a extremidade da folha maior), número de folhas e raízes, assim como as massas de matéria fresca e seca de caules e raízes; estes dados constituirão o tempo zero (T0) do experimento seguinte.

5.5. Efeitos dos meios de cultura sobre o desenvolvimento de plântulas

Para avaliar o desenvolvimento pós-germinativo, logo após a formação da plântula, 15 plântulas de cerca de 180 dias, foram transferidas para frascos de 400 ml de capacidade, contendo 80 ml dos seguintes meios de cultivo: KC, VW, MS e MS/2; totalizando 28 frascos, sendo 7 de cada meio de cultura. Foram selecionadas plântulas similares às obtidas para o tempo zero (T0) (comprimento e morfologia semelhantes), as raízes foram retiradas cuidadosamente, em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de placas de Petri, pinça e bisturi esterilizados. Aos 180 e 360 dias de cultivo na sala de cultura, com temperatura constante de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h a $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa, seis plântulas de cada frasco de cada meio de cultura foram retiradas aleatoriamente para avaliar os seguintes parâmetros biométricos: o comprimento caulinar (medido da base do caulículo até a extremidade da folha maior), comprimento da raiz maior, número de folhas e raízes vivas, bem como as massas de matéria fresca e seca de caules (incluindo folhas vivas) e raízes.

5.6. Análise do crescimento *in vitro* de plantas de *C. xanthina* submetidas a diferentes balanços de ácido naftalenoacético e benziladenina.

Plantas de 360 dias de cultivo *in vitro* de *Cattleya xanthina* foram transferidas para frascos de cultivo de 400 ml de capacidade, contendo 80 ml de meio MS cada, e mantidas na presença de luz branca proveniente de lâmpadas fluorescentes que fornecem $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa, sob fotoperíodo de 12 horas, temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, na ausência e na presença dos hormônios auxina (ácido naftaleno acético) e citocinina (6-benziladenina). As concentrações utilizadas de ácido- α -naftalenoacético (ANA) foram: 0,57 e 2,28 μM ; de 6-benziladenina (BA): 0,57 e 2,28 μM e os balanços ANA 0,57 μM +BA 0,57 μM ou BA 2,28 μM e ANA 2,28 μM +BA 0,57 μM ou 2,28 μM . Totalizando nove tratamentos, incluindo o controle (meio MS sem hormônios). Cada tratamento consistiu de sete frascos contendo 15 plantas cada. Aos 180 e 360 dias de cultivo, seis plantas de cada frasco de cada meio de cultura foram retiradas aleatoriamente para avaliar o comprimento caulinar (medido da base do caulículo até a extremidade da folha maior), comprimento da raiz maior, número de folhas e raízes vivas, massas de matéria fresca e seca de caules (incluindo folhas vivas) e raízes.

5.7. Status de Nitrogênio

5.7.1. Quantificação de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-)

Foram realizadas análises de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) 360 dias após semeadura. Para a quantificação foram utilizadas três replicatas, cada uma de 500 mg de matéria fresca (incluindo caule e raízes), macerados em água ultrapurificada (MilliQ) e centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos, utilizando-se o sobrenadante para a determinação de NH_4^+ e NO_3^- .

A quantificação de NH_4^+ foi realizada de acordo com o método utilizado por Weatherburn (1967), e modificado por Magalhães *et al.* (1992). Frações de 10 μl de extrato aquoso dos tecidos vegetais foram distribuídas em tubos de ensaio, sendo acrescentados 2,5 ml do reagente I (constituído de 10g de fenol e 50mg de nitroprusside em 1 L de água ultrapurificada). Em seguida adicionou-se 2,5 ml do reagente II (contendo 5 g de NaOH, 4,34 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20ml de NaOCl (4-6%) a cada 1 L de água ultrapurificada); os tubos de ensaio foram brandidos em agitador de tubos e analisados em espectrofotômetro na absorvância do comprimento de onda de 625 nm. O NH_4Cl foi utilizado para o estabelecimento da curva padrão.

Para a determinação de NO_3^- foi utilizado o método empregado por Cataldo *et al.* (1975), utilizando-se frações de 0,1 ml de extrato aquoso distribuídas em frascos Erlenmeyer de 50 ml, adicionando-se 0,4 ml de uma solução de 5% de ácido salicílico em ácido sulfúrico concentrado (5g/100ml). Após 20 minutos em temperatura ambiente foram acrescentados 9,5ml de NaOH 2N. A absorvância foi lida em seguida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. O KNO_3^- foi utilizado como padrão.

5.7.2. Quantificação de clorofilas e carotenoide

As quantificações de clorofila e carotenoides foram realizadas no início e término dos experimentos de crescimento e desenvolvimento de plântulas (item 5.5 e 5.6); aos 360 dias após as avaliações de desenvolvimento das plântulas em diferentes meios de cultura (item 5.5) e aos 540 dias após as análises utilizando-se reguladores de crescimento (item 5.6), no Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica.

O método de quantificação utilizado foi adaptado de Lichtenthaler (1987). Foram utilizadas três replicatas, cada uma com 300 mg de massa fresca (incluindo caule e raízes) que foi homogeneizada em 3 ml de acetona (100%) gelada; com o auxílio de almofariz e

pistilo. O material macerado foi filtrado, utilizando funil com papel filtro pré-umedecido com acetona. O líquido filtrado foi coletado em balão volumétrico de 25 ml. O papel filtro foi lavado com acetona até que os pigmentos tivessem sido completamente extraídos; ao final do procedimento, o volume do balão (25 ml) foi completado com acetona. Em seguida, o conteúdo do balão foi transferido para um tubo de ensaio identificando cada amostra, cada tubo foi envolto com papel alumínio (para evitar degradação pela luz) e filme de PVC (para evitar a perda por evaporação) e analisados em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância nos comprimentos de onda de 662 nm, 645 nm, 470 nm, e calculando-se, posteriormente, a concentração das clorofilas e carotenoides, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$Ca=11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8}$$

$$Cb= 20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6}$$

$$C=(1000 A_{470} - 1,90 Ca - 63,14 Cb)/214$$

**Ca* (quantidade de clorofila *a*); *Cb* (quantidade de clorofila *b*); *C* (quantidade de carotenoides)

5.7.3. Quantificação de Proteína total

Para a quantificação de Proteína total foi utilizado o método de Bradford (1976). As coletas foram realizadas nos mesmos tempos das coletas para a quantificação de clorofila, em triplicata, utilizando cada uma cerca de 350 mg de matéria fresca (incluindo caule e raízes), maceradas em 2 ml de tampão fosfato, em suporte de gelo com o auxílio de almofariz e pistilo. O material macerado foi inserido em tubos para centrífuga (Falcon®) e centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos. Foram utilizados 100 µL do sobrenadante da amostra, adicionado de 5 ml do corante Comassie Brilliant Blue G-250 para a realização das análises.

A curva padrão de proteínas foi obtida com o corante Comassie Brilliant Blue G-250 e albumina de soro bovino. A solução controle (branco) utilizada foi 0,1ml de Imidazol 0,1 M

com 5 ml de Comassie Brilliant Blue G-250. Foi analisado em espectrofotômetro, medindo-se a absorvância no comprimento de onda de 595 nm.

5.8. Análise Estatística

Cada parâmetro biométrico avaliado foi submetido à análise de variância (ANOVA/MANOVA) e ao teste de separação de médias utilizando-se o teste Tukey em nível de 5% de significância, com o Software SPSS 11.5.

6. Resultados e Discussão

6.1. Teste de Viabilidade

A análise de viabilidade das sementes, obtido pelo teste de tetrazólio, demonstrou que sementes de quatro, sete e oito meses de maturação apresentaram as maiores percentagens de viabilidade. As sementes de sete meses apresentaram 76,8% de viabilidade, a maior entre os meses de maturação, apesar de não diferir significativamente das sementes de quatro meses (65,7 %). Não se verificou nenhuma correlação entre o tempo de maturação das sementes e a quantidade de sementes viáveis (figura 3).

As sementes de *C. xanthina* não apresentaram alta percentagem de viabilidade, quando comparadas com sementes de plantas do mesmo gênero, como *Cattleya intermedia* Lindl. (99%) e *Cattleya bicolor* Lindl. (100%), mas semelhante à viabilidade de sementes de *Cattleya labiata* Lindl. (63%) (Alvarez-Pardo & Ferreira 2006).

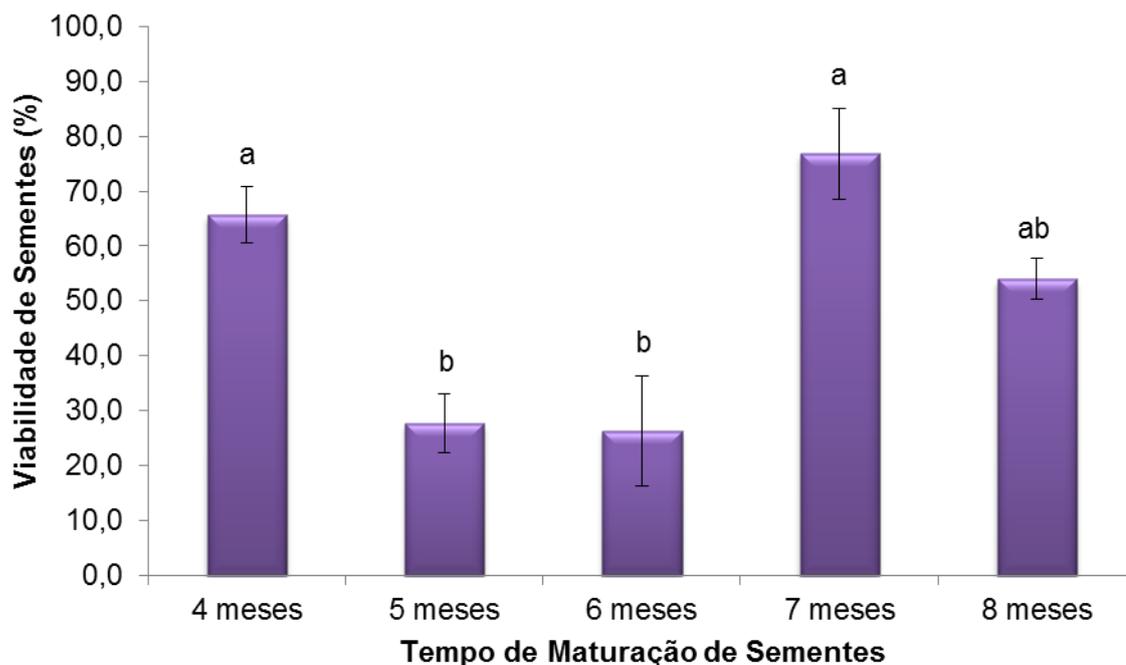


Figura 3. Viabilidade de sementes ao longo do tempo de maturação das sementes obtida pelo teste de tetrazólio. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os meses, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=6$).

6.2. Germinação

Como era previsto, a germinação das sementes (tabela 2) apresentou resultados proporcionais aos verificados na percentagem de sementes viáveis, ou seja, maior germinabilidade nas sementes de sete e quatro meses de maturação. As maiores percentagens de sementes germinadas foram verificadas em sementes de sete meses nos meios MS e MS+BA (85,4 e 83,3%, respectivamente).

Para as sementes de quatro meses, os meios KC e VW proporcionaram a obtenção da maior percentagem de germinação, no entanto não apresentaram diferença significativa (tabela 2). No presente estudo, verificou-se que as sementes de quatro meses de maturação possuem, estatisticamente, a mesma germinação de sementes com sete e oito meses de maturação, ou seja, não se verificou diferenças entre sementes imaturas e maduras, ambas

apresentaram a mesma probabilidade de germinar. As sementes imaturas possuem a vantagem de não precisarem do tratamento de desinfestação, etapa que pode afetar a viabilidade de sementes segundo Arditti (1967). Os resultados, acima descritos, podem ser decorrentes do fato de as sementes imaturas não possuírem uma cutícula protetora, o que facilitaria a entrada de nutrientes para os embriões germinarem (Lee *et al.* 2006). Semelhantemente aos resultados de germinação de sementes de diferentes maturações obtidos por Long *et al.* (2010) no gênero *Paphiopedilum*, também se observou em *C. xanthina* maior porcentagem de germinação no último mês em que as sementes eram consideradas imaturas, decaindo em porcentagem ao atingir a maturação.

Diferentemente da baixa porcentagem de germinação nas sementes maduras de *C. xanthina* no meio KC (23,4%), a germinação de sementes maduras de *Cattleya intermedia* atingiu cerca de 99% neste mesmo meio de cultura (Alvarez-Pardo *et al.* 2006).

De modo geral a adição da citocinina não aumentou significativamente a germinação de sementes; entretanto, verificou-se uma ação estimulatória pontual (tabela 2). Por exemplo, no quinto mês de maturação os meios KC e MS/2 adicionados de benziladenina (BA) aumentaram significativamente a germinação, efeito este verificado também em KC no sétimo e oitavo meses e VW no oitavo mês de maturação.

Tabela 2. Percentagem de germinação, com análise de variância em pares, entre cada meio de cultura na ausência (Aus) e na presença (Pres) de benziladenina (BA) exógena, demonstrando variação significativa entre os meios de cada um dos meses, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=6$).

| Germinação de Sementes (% - média) | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------|------|---------|-------|---------|------|---------|-------|---------|-------|------|
| Tempo de Maturação das sementes | 4 meses | | 5 meses | | 6 meses | | 7 meses | | 8 meses | | |
| | Fitormônio (BA) | | Meio | | Aus | | Pres | | Aus | | Pres |
| KC | 71,9 | 54,2 | 35,2* | 43,9* | 21,8 | 20,8 | 42,8* | 62,9* | 23,4* | 45,6* | |
| VW | 71,7 | 62,7 | 50,4* | 21,5* | 29,6 | 41,7 | 56,9 | 76,2 | 31,1 | 38,3 | |
| MS | 47,9 | 44,7 | 52,3* | 38,7* | 32,5 | 31,1 | 85,4 | 83,3 | 48,3* | 62,3* | |
| MS/2 | 61,6 | 43,5 | 43,0* | 77,9* | 20,2 | 14,6 | 71,1 | 53,3 | 40,7 | 52,1 | |

(*) diferença significativa entre o meio com fitormônio e o sem fitormônio

A teoria de que as citocininas possuem a capacidade de promover a germinação em algumas espécies, realizando a movimentação de reservas lipídicas nas sementes (Van Staden et al. 1982), foi observado em *C. xanthina* principalmente no quinto mês de maturação nos meios KC e MS/2. A adição de citocinina, na maioria dos meios de cultura não apresentou diferença significativa quando comparada ao meio sem a citocinina, nos outros meses (tabela 2).

Segundo Mercier & Kerbaux (1991) algumas espécies de orquídeas não necessitam da adição de citocinina para realizar a germinação, por possuírem um elevado nível endógeno deste regulador de crescimento, mas que normalmente é fornecido pelos fungos micorrízicos. Este nível endógeno de citocinina possui participação principalmente na mobilização de lipídios, responsáveis pela germinação (Manning & Van Staden 1987).

Entretanto, em *Cypripedium candidum* **Muhl. ex Willd** (De Pauw et al. 1995) a citocinina (BA) influenciou positivamente a germinação de sementes bastante imaturas (dois meses), indicando a falta da produção de citocinina endógena neste período de maturação das sementes desta espécie. Estudos com outras espécies, como *Habenaria macroceratitis* Willd. (Stewart & Kane 2006), *Orchis mascula* Lindl. (Valletta et al. 2008) e *Hoffmannseggella cinnabarina* (Suzuki et al. 2012) em geral também demonstraram influência positiva de BA na germinação.

6.3. Desenvolvimento Inicial

Com relação ao desenvolvimento inicial, aos 120 dias (figura 4) as sementes com quatro meses de maturação mantiveram-se em estágio de protocormo nos meios MS (100%), MS/2 (93,8%), MS+BA (96,6%) e MS/2+BA (100%). Os meios KC e VW apresentaram protocormos nos três primeiros estágios de desenvolvimento; embora a maior parte tenha sido de protocormos no estágio 1 em KC (47,0%). Nas sementeiras realizadas nos meios KC e VW com adição de BA os protocormos não sobreviveram.

Para as sementeiras de cinco meses de maturação os meios MS, KC+BA e MS+BA as sementes mantiveram-se no estágio 1 (100%). Os meios VW e KC apresentaram protocormos nos três primeiros estágios de desenvolvimento; a maioria manteve-se no estágio 2 (67,7% e 59,6%, respectivamente). Sementes com cinco meses de maturação não sobreviveram no meio MS/2, VW+BA e MS/2+BA (figura 4).

Em seis meses de maturação, não se verificou diferença significativa para o desenvolvimento das plantas entre os meios utilizados. No entanto, assim como para as sementes de quatro e cinco meses, observou-se a existência de protocormos no estágio 3 nos meios KC e VW. A partir desse tempo de maturação os protocormos sobreviveram em todos os meios de cultura em que foram sementeiras (figura 4).

Aos sete meses de maturação os meios KC, VW e MS/2 atingiram o estágio 3 de desenvolvimento (32,1%; 37,3% e 2,1% respectivamente), e uma pequena percentagem de plântulas do meio KC (1,0%) atingiram o estágio 4. Todos os meios com adição de citocinina mantiveram-se em forma de protocormo (figura 4).

Em sementes maduras (oito meses) os meios com a adição de citocinina permaneceram, em sua maioria, no estágio 1, sendo 100% em KC+BA e VW+BA, 96,6% em MS/2+BA e 93,6% em MS+BA. A percentagem de protocormos que atingiram o estágio 3 de desenvolvimento aumentou nos meios KC, VW e MS/2 (66,0%; 43,1% e 13,3%, respectivamente). Algumas plântulas cultivadas no meio MS (2,0%) também se desenvolveram até o estágio 4 (figura 4).

Durante a produção de plântulas, os meios KC e VW em geral apresentaram o mais rápido crescimento, gerando na maioria dos casos protocormos em estágios 3. Semelhantemente ao ocorrido em *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro, as plântulas cultivadas nos meios VW e KC mantiveram-se, em sua maioria, nos estágios 3 e 4. Diferentemente de *Hoffmannseggella cinnabarina* (Suzuki *et al.* 2012), em que as plântulas atingiram estágio 3 de desenvolvimento em todos os meios sem adição de BA.

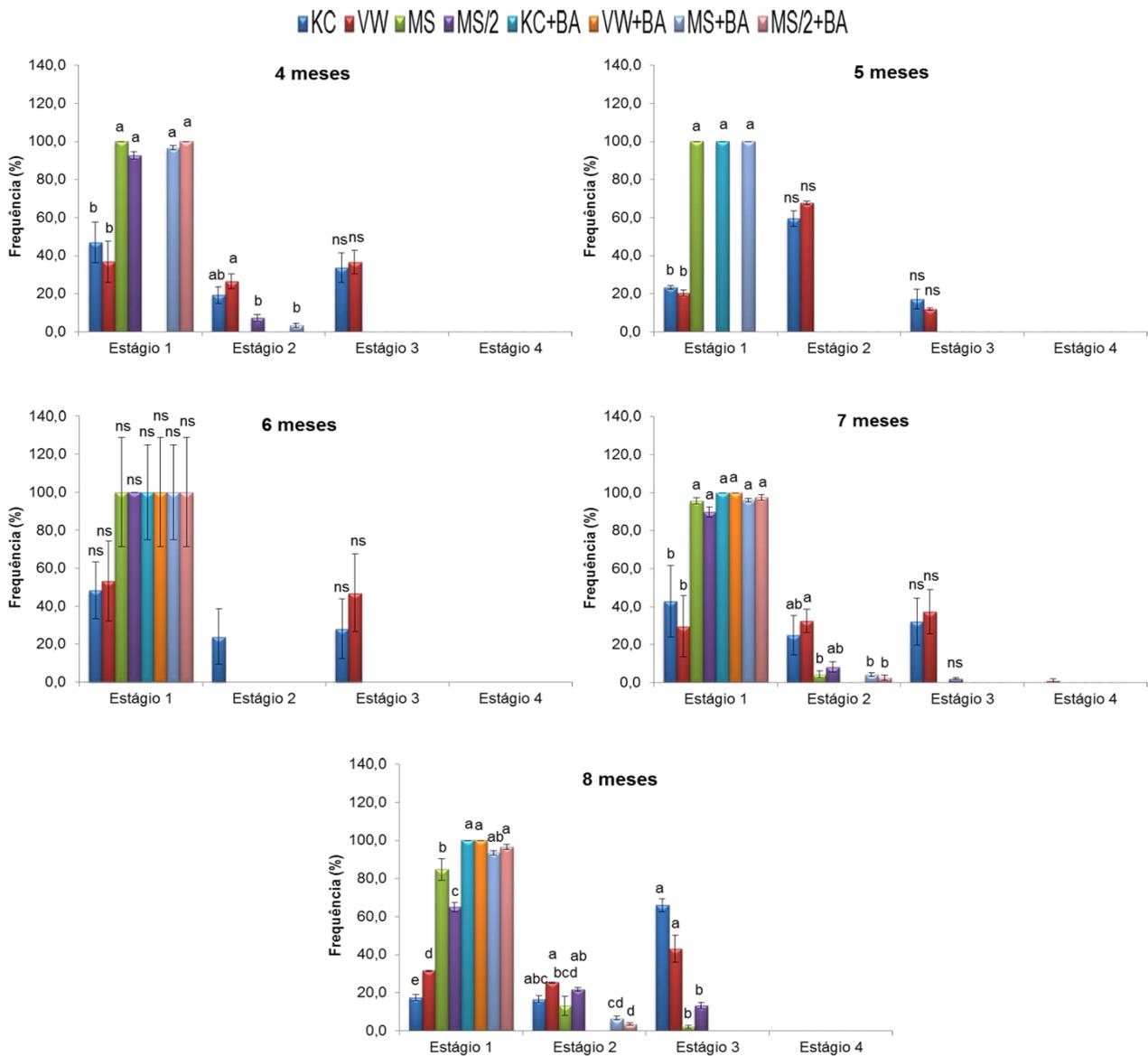


Figura 4. Efeitos de diferentes meios de cultura: Knudson C (KC), Murashige & Skoog (MS), e Vacin & Went (VW), adicionado ou não de 1 μ M de benziladenina (BA), no desenvolvimento inicial de *C. xanthina*, utilizando sementes de 4, 5, 6, 7 e 8 meses, após 120 dias de cultivo. Colunas com barras representam erro padrão e letras diferentes demonstram variação significativa entre os diferentes tratamentos, segundo o teste de Tukey (P<0,05). (n=4)

Após 180 dias de cultivo (figura 5), a semente utilizando sementes de quatro meses de maturação apresentou plântulas em sua maioria no estágio 4 quando cultivadas nos meios

KC; já as plântulas em VW apresentaram desenvolvimento até o estágio 4, no entanto, ainda se mantiveram em sua maioria no estágio 3. Durante este período a citocinina não favoreceu o crescimento de plântulas, mantendo as sementes em estágio de protocormo. Todas as plântulas no MS/2 não sobreviveram.

Em sementes com cinco meses de maturação, embora não apresentem diferença estatística, as plântulas mantiveram-se em sua maioria no estágio 1. Um pequeno percentual das plântulas atingiu o estágio 4 de desenvolvimento, nos meios KC e VW (17,1% e 2,9%, respectivamente). As sementes cultivadas em meios com adição de citocinina e as cultivadas em MS/2 sem a adição de citocinina não sobreviveram ao tratamento (figura 5).

Com 6 meses de maturação, as plântulas cultivadas nos meios VW e KC atingiram o estágio 4 (18,3% e 11,1%, respectivamente), no entanto a maioria manteve-se em estágio 3 (53,3% e 38,8%, respectivamente). Cerca de 34,8% das plântulas em MS atingiram estágio 3, a maior percentagem se manteve no estágio 1 (65,6%); no meio MS/2 cerca de 14,4% das plântulas atingiram o estágio 3. O meio MS+BA proporcionou um pequeno acréscimo no desenvolvimento de plântulas, comparativamente aos meios adicionados de BA, atingindo 3,8% no estágio 3 (figura5).

Nas sementes com sete meses de maturação foi iniciado o desenvolvimento do estágio 3, nas plântulas cultivadas em MS e MS/2 todos com adição de BA. Em todos os meios, sem a adição de citocinina, as plântulas atingiram estágio 3, sendo 52,4% em KC, 38,8% em VW, 24,9% em MS e 24,6% em MS/2. Os meios KC e VW também apresentaram plântulas no estágio 4 (31,9% e 4,6%; respectivamente) (figura 5).

Em sementes maduras (oito meses), a maioria das plântulas cultivadas em KC, VW e MS/2 sem a citocinina atingiram o estágio 3 de desenvolvimento (90,2%; 84,0% e 66,1%, respectivamente). As plântulas cultivadas nos meios KC e VW não apresentaram mais estágio 1 e 2 de desenvolvimento, diferentemente do ocorrido em sementes imaturas. Nos meios com adição de citocinina, as plântulas não apresentaram o mesmo desenvolvimento daquelas em

que o fitormônio estava ausente, mantendo-se em sua maioria, no estágio 1. O desenvolvimento mais rápido apresentado pelas plantas de *C. xanthina* cultivadas em KC e VW foi semelhante ao ocorrido, após 180 dias de cultivo em *Hadrolaelia tenebrosa* (Suzuki *et al.* 2009) e *Cattleya bicolor* (Suzuki *et al.* 2010), embora nestes trabalhos o meio MS/2 não tenha sido utilizado.

Durante o desenvolvimento inicial, as plântulas de *C. xanthina* não tiveram o crescimento influenciado pela adição de citocinina, semelhante ao ocorrido em *Hoffmannseggella cinnabarina*, em que a adição de citocinina não estimulou estágios avançados de desenvolvimento das plântulas. No entanto, o oposto ocorreu em *Habenaria macroceratitis* (Stewart & Kane 2006), sendo avaliada a ação de diversas citocininas (BA, Zea, Kin, 2-iP) e todas proporcionaram maior desenvolvimento inicial quando comparadas ao controle.

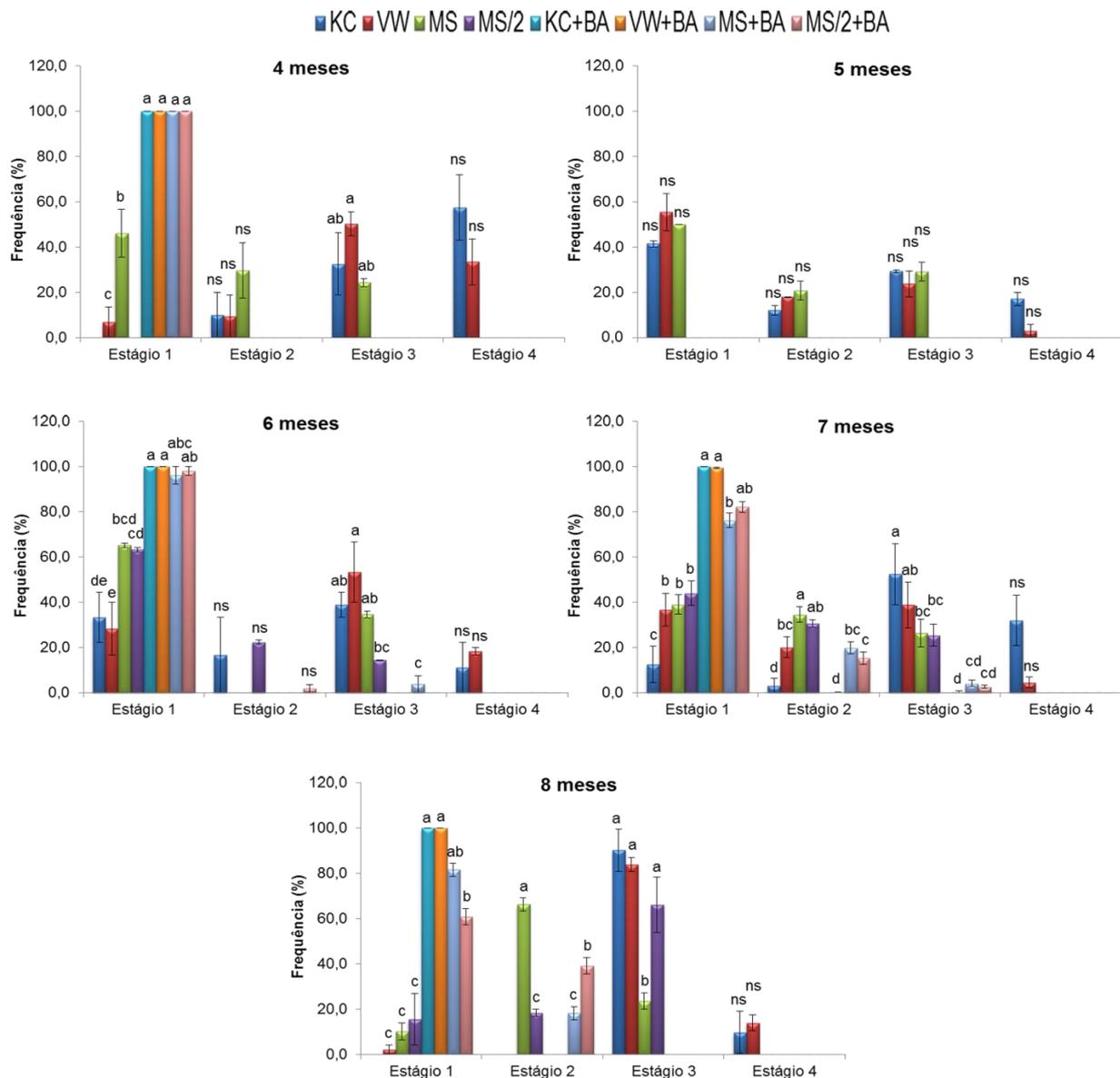


Figura 5. Efeitos de diferentes meios de cultura: Knudson C (KC), Murashige & Skoog (MS), e Vacin & Went (VW), adicionado ou não de 1 μ M de benziladenina (BA) no desenvolvimento inicial de *C. xanthina*, utilizando sementes de 4, 5, 6, 7 e 8 meses, após 180 dias de cultivo. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os diferentes tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=4$).

A eficiência no desenvolvimento das plântulas proporcionado pelos meios KC e VW, tanto aos 120 quanto aos 180 dias de cultivo, pode ser decorrente da presença de relação mais

alta de amônio/nitrato, quando comparado aos meios MS e MS/2, que possuem maior proporção de nitrato. O nitrogênio sob a forma de amônio, no cultivo *in vitro*, geralmente é absorvido primeiramente devido ao pH proporcionado pelo meio; na medida em que ocorre a absorção, o pH torna-se mais ácido, induzindo à absorção de nitrato (George *et al.* 2008); por este motivo, o amônio teria promovido o desenvolvimento inicial mais rápido das plântulas.

No entanto, os meios VW e KC apresentaram a menor quantidade de plântulas vivas (53,2% e 14,8%, respectivamente), quando comparados com os meios MS e MS/2 (99,8% e 99,2%, respectivamente), que possuem maior concentração de nitrato (figura 6). Tais resultados podem ter sido gerados pelo excesso de amônio, tendo em vista o balanço de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ dos meios KC e VW. É possível que após os 180 dias de cultivo possa ter sido atingido um limite saudável da absorção de amônio, gerando então toxicidade para as plantas de *C. xanthina*.

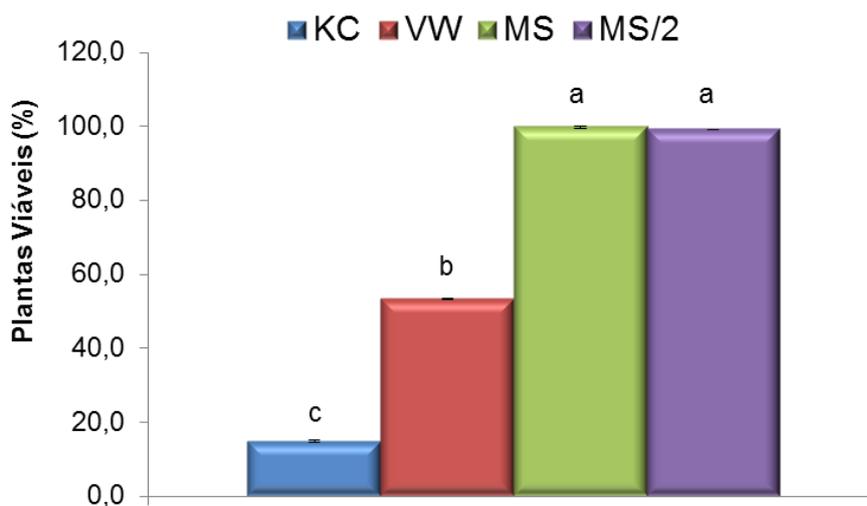


Figura 6. Percentagem de plantas viáveis nos meios: Knudson C (KC), Murashige & Skoog (MS), e Vacin & Went (VW), após 180 dias de cultivo. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os meios, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$). (n=8)

6.4. Efeitos dos meios de cultura sobre o desenvolvimento de plântulas

Após 360 dias de cultivo, o maior comprimento caulinar foi apresentado pelas plantas cultivadas nos meios KC e MS/2 (em média 1,4 e 1,2 cm; respectivamente) (figura 7), no entanto não houve diferença significativa entre os meios (figura 8A).

Quanto ao tamanho de raiz (figura 8A), as plantas dos meios MS/2 e VW apresentaram maior desenvolvimento radicular (em média 1,9 e 1,8 cm, respectivamente) (figura 7), provavelmente devido à menor quantidade de nutrientes presentes em tais meios, fazendo com que as raízes se alonguem em busca de aumentar a absorção de nutrientes. A eficiência do meio MS/2 na promoção do comprimento radicular foi demonstrada também nas plantas de *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Rego-Oliveira & Faria 2005), no entanto, as plantas cultivadas no meio VW não apresentaram o mesmo efeito promotor do comprimento radicular, diferentemente de *C. xanthina*.

O número de raízes das plântulas de *C. xanthina* não foi influenciado pelos meios de cultura estudados, não apresentando diferença estatística entre os mesmos (Figura 8B). As plântulas cultivadas no meio MS apresentaram o menor número de raízes (em média 2 raízes por planta) quando comparado aos outros meios (em média 3 raízes por planta), além de menor comprimento de raízes em relação aos outros meios (em média 0,2 cm). Tais resultados podem ser explicados devido às altas concentrações de macronutrientes presentes no meio MS, principalmente a grande proporção de nitrogênio, que possui como função sinalizar a falta de nutrientes, ativando a síntese e a mobilização de auxina e citocinina endógenas (Krouk *et al.* 2011). Em altas concentrações de nitrogênio, não ocorre a mobilização de auxina para as raízes, mantendo-as menos desenvolvidas que o sistema radicular das plantas cultivadas com escassez de nitrogênio. Estudos realizados com *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Pedroso-de-Moraes 2012), em que foram avaliados a concentração

de nitrogênio e o efeito de escarificação, as plantas também apresentaram maior desenvolvimento radicular nas menores concentrações de nitrogênio fornecidas, atingindo maior crescimento das raízes quando cultivadas em $\frac{1}{4}$ dos macronutrientes do meio MS.

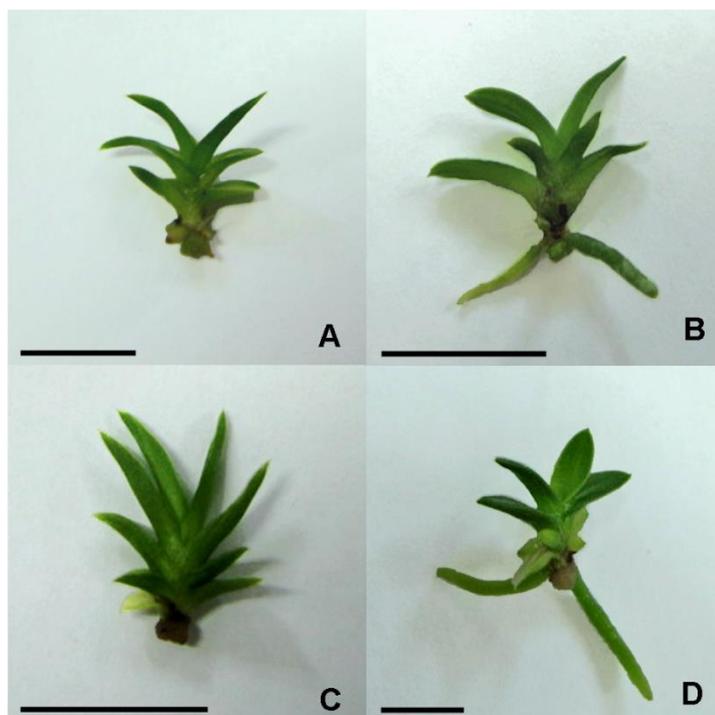


Figura 7. Aspectos das plantas de *Cattleya xanthina* após 360 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes meios de cultura. A) Plantas cultivadas no meio KC; B) Plantas cultivadas no meio VW; C) Plantas cultivadas no meio MS; D) Plantas cultivadas no meio MS/2. Barra de escala 1 cm

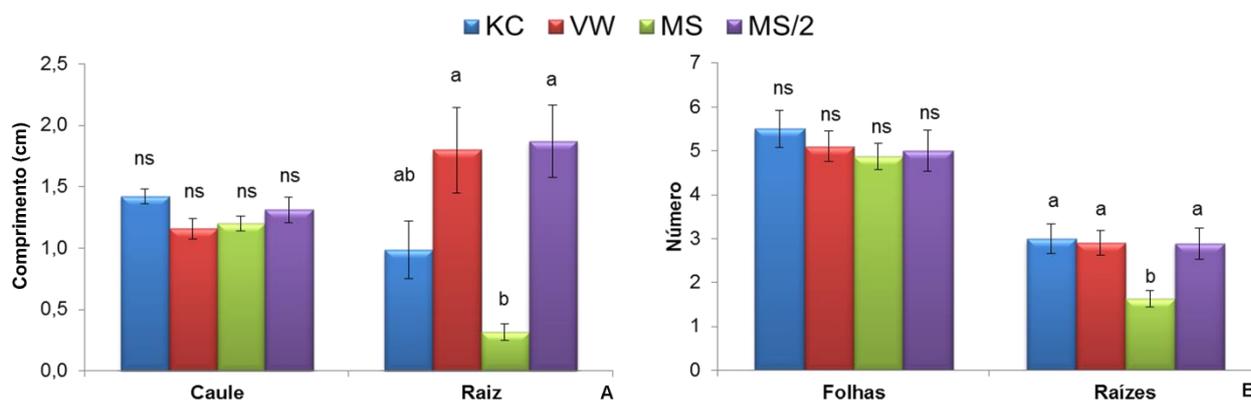


Figura 8. Efeitos de diferentes meios de cultura no comprimento caulinar e da raiz maior (8A) e no número de folhas e raízes (8B) de *Cattleya xanthina*, após 360 dias de cultivo *in vitro*. Colunas com barras representam erro padrão e letras diferentes demonstram variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=8$).

A massa de matéria fresca caulinar das plântulas não apresentou diferença significativa entre os meios de cultura utilizados (figura 9A). A massa de matéria fresca radicular foi maior nas plântulas cultivadas no meio VW (40,9 mg), seguido pelos meios MS/2 e KC (respectivamente 26,7 e 25,3 mg) (figura 9A). Diferentemente do ocorrido em *C. xanthina*, em que o meio VW, com menor quantidade de cálcio e maior quantidade de amônio, apresentou maior acúmulo de matéria fresca, Dijk & Eck (1995) demonstraram em *Dactylorhiza incarnata*, que a interação de cálcio e amônio influenciaria ativamente a matéria fresca; o cálcio efetuando a regulação osmótica e potencial hídrico (George *et al.* 2008).

As plântulas cultivadas no meio KC demonstraram maior acúmulo de massa de matéria seca caulinar (4,3 mg) em comparação com as cultivadas nos meios MS, MS/2 e VW (2,6; 2,5; 2,2 mg, respectivamente) (figura 9B). A massa de matéria seca radicular das plântulas apresentou maior acúmulo quando estas foram cultivadas no meio MS/2 (7,2 mg) em comparação com os meios VW, KC e MS (respectivamente 2,7, 2,6 e 0,8 mg) (figura 9B). Semelhante aos resultados apresentado em *Laelia longipes* Rchb.f. (Stancato *et al.* 2008) utilizando os meios KC, VW e MS, dentre os quais verificaram menor acúmulo de massa de

matéria seca radicular no meio MS. No entanto o oposto ocorreu no trabalho realizado em *Cattleya bicolor* (Suzuki *et al.* 2010), no qual o meio MS apresentou plantas com maior acúmulo de massa de matéria seca radicular quando comparado a KC e VW.

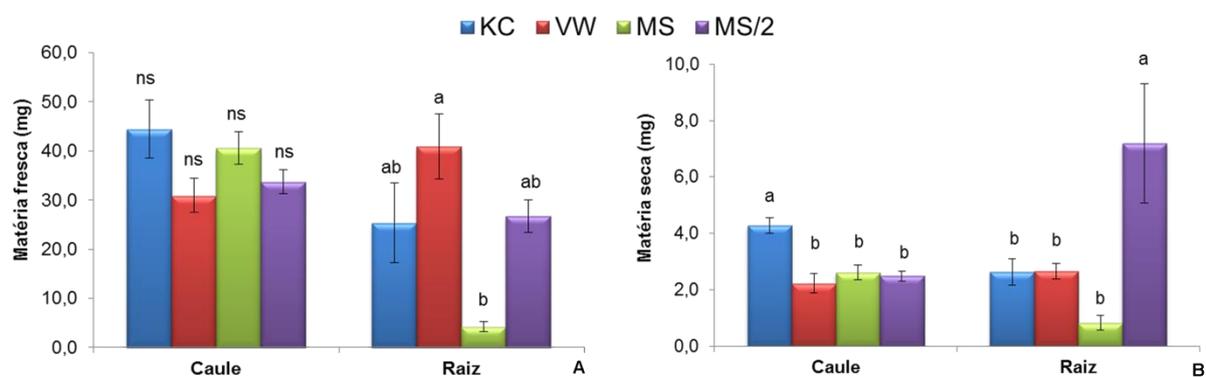


Figura 9. Efeitos de diferentes meios de cultura sobre o acúmulo de massa de matéria fresca (9A) e de massa de matéria seca (9B) de caules e raízes de *Cattleya xanthina* após 360 dias de cultivo *in vitro*. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes indicam variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=8$).

6.4.1. Status de Nitrogênio

6.4.1.1. Quantificação de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-)

A concentração de amônio nas plantas cultivadas nos meios KC e VW foi maior em comparação aos outros meios, apresentando respectivamente $60,6$ e $49,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF de amônio. Enquanto que, as plantas nos meios MS e MS/2 apresentaram $32,2$ e $15,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF (figura 10A).

As plantas cultivadas no meio de cultura MS apresentaram nitrogênio sob forma de nitrato em maior concentração em relação às plantas crescidas nos outros meios (figura 10B); atingindo $683,7 \mu\text{g}$ de nitrato, enquanto as plantas cultivadas nos meios VW, MS/2 e KC apresentaram respectivamente $221,8$, $171,8$ e $40,6 \mu\text{g}$ de nitrato. As altas concentrações de

nitrito contida nas plantas podem ser devidas ao acúmulo de tal nutriente em vacúolos; até o momento de ocorrer a transformação de nitrito em amônio, permitindo sua absorção pela planta (Kerbaui 2004).

Tais resultados confirmam a absorção eficiente de amônio e nitrito pelas plantas em todos os meios de cultura, pois os meios KC e VW possuem, em sua composição química, uma relação maior de amônio/nitrito (0,89, 1,46, respectivamente), e o meio MS possui a maior relação no balanço de nitrito/amônio (1,9).

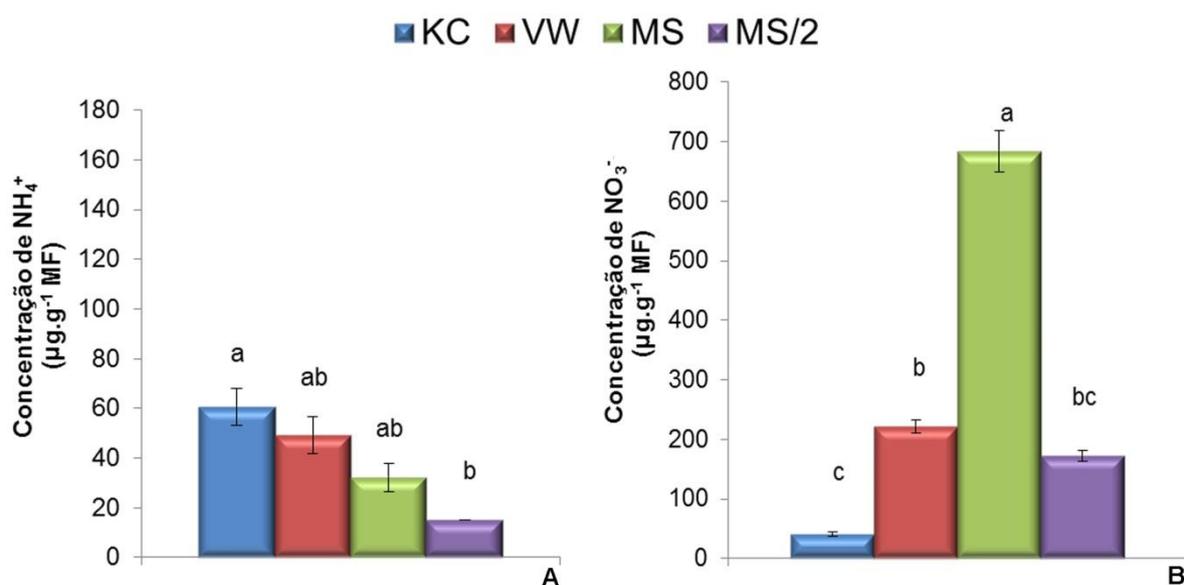


Figura 10. Efeitos de diferentes meios de cultura no acúmulo de amônio (A) e nitrito (B) nas plantas de *Cattleya xanthina* após 360 dias de cultivo *in vitro*. Colunas com barras representam erro padrão e letras diferentes demonstram variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey (P<0,05) (n=9).

6.4.1.2. Quantificação de clorofilas e carotenoide

A síntese de pigmentos fotossintéticos foi estimulada nas plantas cultivadas nos meios KC e VW (227,1 e 177,7 μg de clorofila $a.g^{-1}$ MF, respectivamente nas plantas cultivadas no meio KC e VW). A concentração de clorofila b apresentou 98,1 $\mu\text{g}.g^{-1}$ nas plantas cultivadas em KC e 68,1 $\mu\text{g}.g^{-1}$ em VW, as maiores concentrações dentre os meios, no entanto, não houve diferença significativa de clorofila b entre os tratamentos. O teor de carotenoides também foi maior nas plantas cultivadas nos meios KC e VW, apresentando, respectivamente, 69,5 μg e 60,4 μg de clorofila $b.g^{-1}$ MF (figura 11).

Aparentemente, a formação de pigmentos fotossintéticos foi promovida nas plantas cultivadas nos meios que apresentavam maior concentração de nitrogênio no formato de amônio do que de nitrato, com relação ao balanço nitrogenado total. Resultado semelhante foi demonstrado em *Epidendrum fulgens* Brongn. (Mercier & Kerbauy 1991), no qual os meios com a presença de amônio proporcionaram maior produção de clorofila. Da mesma forma em *Catasetum fibriatum* (Majerowicz *et al.* 2000), no qual o aumento da concentração de amônio em relação ao nitrato, promoveu o aumento da produção clorofila.

A produção de pigmentos demonstra alta relação positiva ao crescimento caulinar e foliar nas plantas cultivadas no meio KC, provavelmente devido ao aumento da taxa fotossintética proporcionada pelo aumento de clorofila. A clorofila presente nos cloroplastos absorve a energia luminosa, ativando o sistema fotossintético e transformando-a em energia química (Li *et al.* 2013), o que promove o crescimento vegetativo.

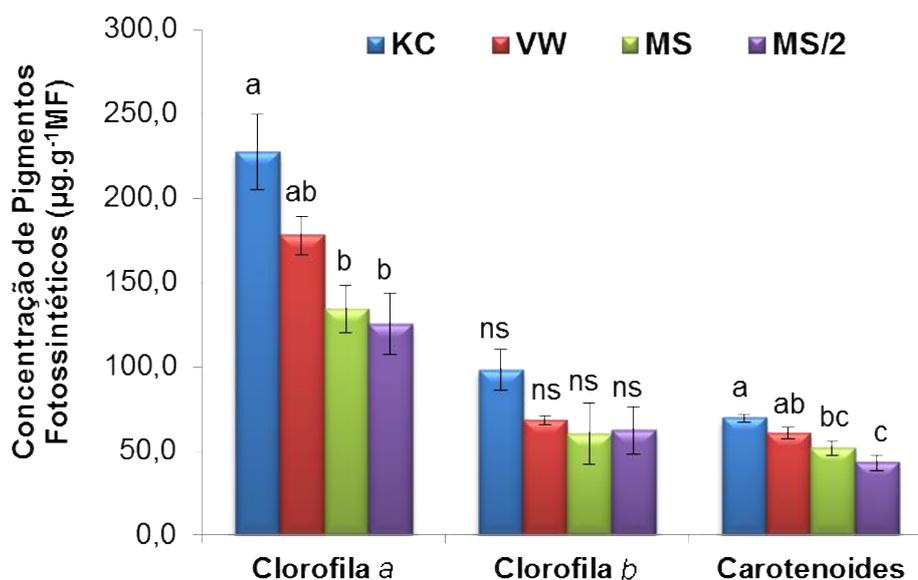


Figura 11. Efeitos de diferentes meios de cultura na síntese de pigmentos fotossintéticos nas plantas de *Cattleya xanthina* após 360 dias de cultivo *in vitro*. Colunas com barras representam erro padrão e letras diferentes demonstram variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=9$).

6.4.1.3. Quantificação de Proteína total

A maior concentração de Proteína total foi apresentada pelas plantas cultivadas em meio KC ($2,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de matéria fresca), enquanto as plantas do meio MS/2 apresentaram o menor nível de proteína total ($1,2 \text{ mg.g}^{-1}$ MF) comparativamente aos outros meios (figura 12). Segundo George *et al.* (2008), a presença do íon amônio estimula mais rapidamente a síntese de proteína e aminoácidos, no entanto tal processo influi no metabolismo de carboidratos causando hiper-hidricidade, por este motivo é de extrema importância a nutrição balanceada com magnésio para obter o equilíbrio na produção de carboidratos, além de possuir como função a síntese de proteínas e composição de moléculas de clorofilas.

Diferentemente dos resultados apresentados no presente estudo, Rocha *et al.* (1979) demonstraram em gramíneas que maior concentração de nitrogênio promove maior síntese de

proteína, no entanto, para *C. xanthina* os meios MS e MS/2 que possuem maior quantidade do nutriente, apresentaram plantas com os menores teores de proteína total (figura 12).

As proteínas também atuam na divisão celular, desempenhando um papel importante principalmente na separação dos cromossomos e organelas (Gallardo *et al.* 2003), assim como no alongamento celular com a mobilização e transferência de lipídios (Jiménez 2001); confirmando o verificado no presente estudo, uma vez que as plantas cultivadas nos meios KC e VW apresentaram maior crescimento, bem como maior acúmulo de proteína.

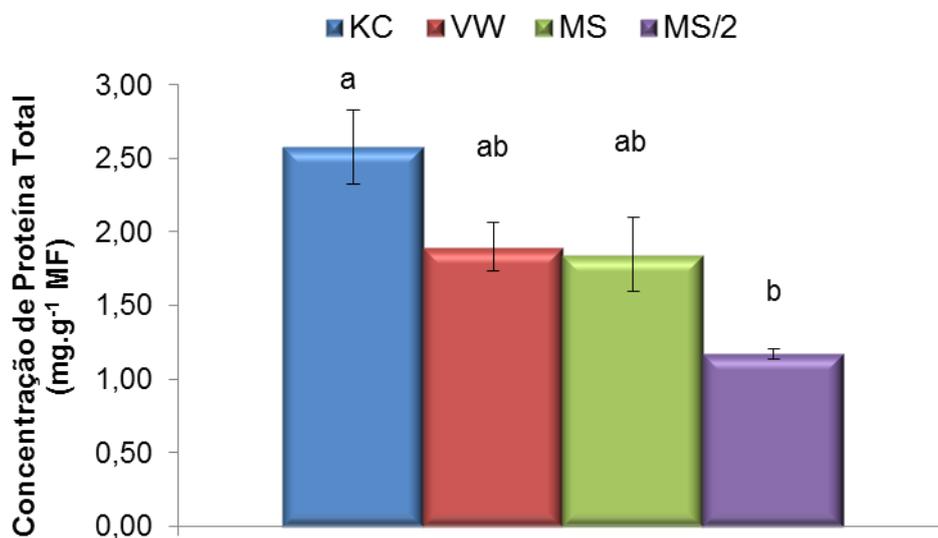


Figura 12. Efeitos de diferentes meios de cultura na concentração de proteína total nas plantas de *Cattleya xanthina* após 360 dias de cultivo *in vitro*. Colunas com barras representam erro padrão e letras diferentes demonstram variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=9$).

6.5. Análise do crescimento de plantas de *C. xanthina* submetidas a diferentes balanços de ácido naftalenoacético e benziladenina.

Os balanços hormonais de ácido naftalenoacético e benziladenina utilizados mostraram, de modo geral, promoção do crescimento caulinar, pois as plantas cultivadas no meio MS sem a adição dos hormônios (controle) foram as que tiveram o menor comprimento caulinar (em média 1,0 cm) (figura 13). O balanço hormonal de citocinina e auxina não apresentou diferença significativa no crescimento caulinar, no entanto, as plantas cultivadas somente com BA apresentaram os maiores comprimentos caulinares (2,28 e 0,57 μM de BA, ambos 1,3 cm) em relação às cultivadas somente com ANA (2,28 e 0,57 μM de ANA, ambos 1,1 cm); de todos os meios com balanços hormonais de BA e ANA os melhores resultados foram obtidos com adição de 0,57 μM ANA+2,28 μM BA (1,6 cm) (figura 14A).

Tais resultados corroboram a teoria de que a citocinina promove a divisão celular e estimula o desenvolvimento aéreo da planta (Lexa 2003), além de promover a mobilização de nutrientes (Lo *et al.* 2004). Segundo Grattapaglia & Machado (1998) o balanço auxina/citocinina tende a promover o desenvolvimento da planta, o que é confirmado pela eficiência de crescimento em *C. xanthina* na adição de 0,57 μM ANA+2,28 μM BA, com relação ao controle.

Quanto ao desenvolvimento radicular os balanços hormonais de ácido naftalenoacético e benziladenina utilizados não foram significativamente diferentes do controle (MS) (figura 13), que apresentou plantas com as maiores raízes (0,6 cm) (figura 14A). Os tratamentos com hormônios vegetais não influenciaram no desenvolvimento radicular possivelmente devido à alta concentração de nutrientes presente no meio MS.

A formação de folhas foi influenciada pelos balanços hormonais de ácido naftalenoacético e benziladenina utilizados (figura 13). Plantas cultivadas nos meios 0,57 μM ANA+2,28 μM BA e 0,57 μM BA (9 e 7 folhas, respectivamente), mostraram maior número

de folhas em relação ao controle (5 folhas) (figura 14B). O efeito adicional da citocinina sintetizada nas raízes e mobilizada via xilema até as folhas juntamente com a citocinina exógena poderia ter atuado na promoção da formação de folhas.

O maior número de raízes foi encontrado nas plantas cultivadas no meio com 0,57 μ M de ANA (em média 3 raízes por planta) (figura 14B). As plantas cultivadas nos meios que tinham somente a adição de citocinina apresentaram a menor quantidade de raízes (0,57 e 2,28 μ M BA, ambos 1 raiz por planta). Este resultado foi semelhante em *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi. (Vogel & Macedo 2010), no qual todos os tratamentos com auxina proporcionaram a obtenção de plantas com maior número de raízes quando comparados com os tratamentos contendo citocinina isoladamente. O resultado apresentado nas plantas de *C. xanthina* confirma a afirmação de que a formação de raízes adventícias é estimulada pelo fluxo de auxina, mobilizada pelas células do periciclo, que são responsáveis pelo início do processo de divisão e alongamento celular (Casimiro *et al.* 2001).



Figura 13. Aspectos das plantas de *Cattleya xanthina* após 540 dias de cultivo *in vitro*, cultivadas no meio MS com adição de diferentes concentrações de auxina (ANA) e citocinina (BA). A) Plantas cultivadas no meio MS; B) Plantas cultivadas no meio MS+ANA 0,57 μM ; C) Plantas cultivadas no meio MS+ANA 2,28 μM ; D) Plantas cultivadas no meio MS+BA 0,57 μM ; E) Plantas cultivadas no meio MS+BA 2,28 μM ; F) Plantas cultivadas no meio MS+ANA 0,57 μM +BA 0,57 μM ; G) Plantas cultivadas no meio MS+ANA 0,57 μM +BA 2,28 μM ; H) Plantas cultivadas no meio MS+ANA 2,28 μM +BA 0,57 μM ; I) Plantas cultivadas no meio MS+ANA 2,28 μM +BA 2,28 μM . Barra de escala 1 cm.

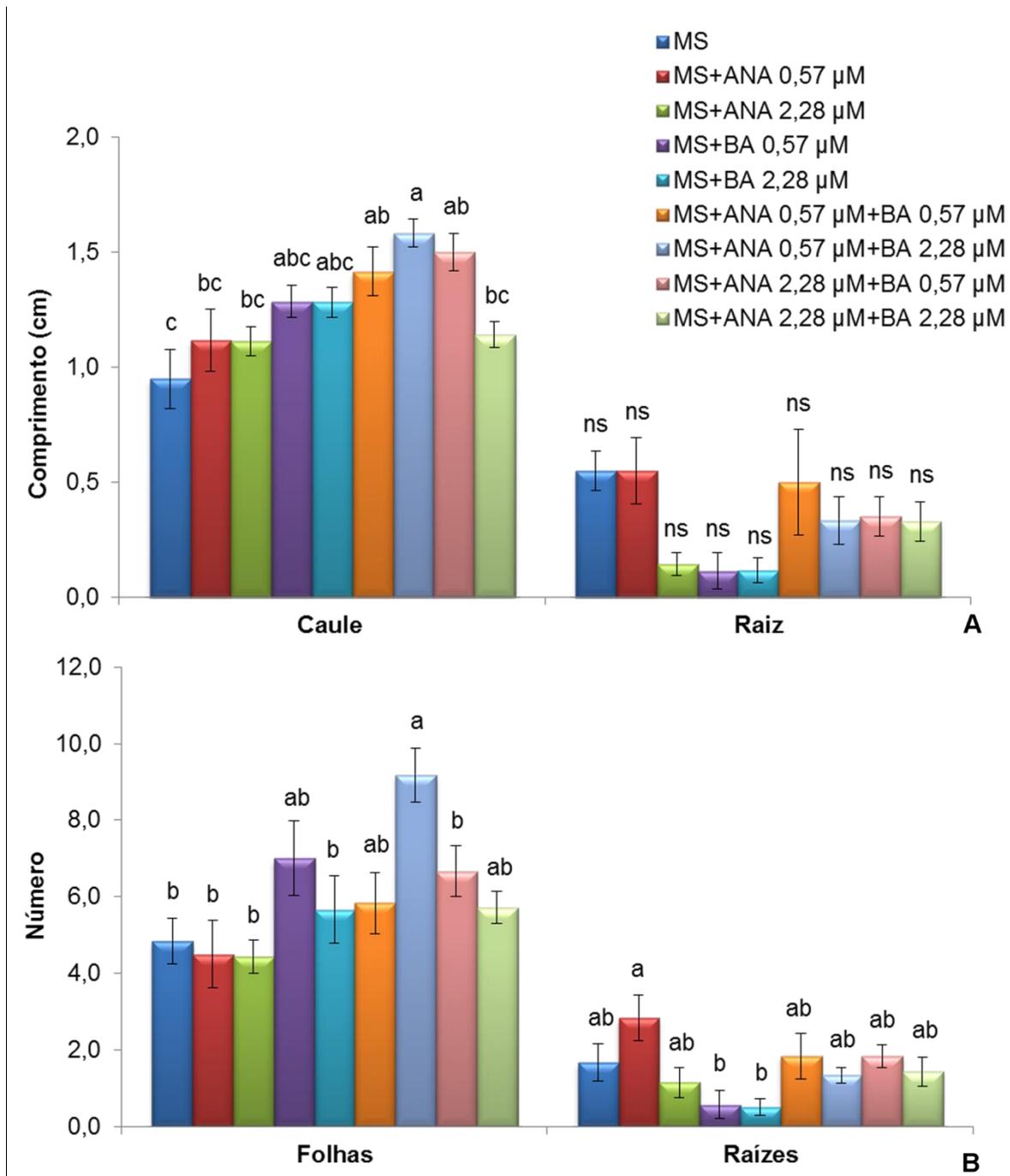


Figura 14. Efeito da adição de diferentes balanços de benziladenina e ácido naftalenoacético hormônios vegetais ao meio MS, no comprimento de caules e da raiz maior (A) e no número de folhas e raízes (B) de *Cattleya xanthina* após 540 dias de cultivo *in vitro*. Concentrações: ANA 0,57 μM; ANA 2,28 μM; BA 0,57 μM; BA 2,28 μM; ANA 0,57 μM+BA 0,57 μM; ANA 0,57 μM+BA 2,28 μM; ANA 2,28 μM+BA 0,57 μM e ANA 2,28 μM+BA 2,28 μM. Colunas com barras representam erro padrão e letras diferentes demonstram variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n = 8$).

A massa de matéria fresca caulinar foi influenciada significativamente pela ação dos hormônios vegetais em relação ao controle (MS), sendo que as plantas cultivadas no meio com 2,28 μM ANA+0,57 μM BA apresentaram maior matéria fresca (70,5 mg), seguido pelos meios 2,28 μM BA+0,57 μM ANA (61,4 mg) e 2,28 μM ANA+2,28 μM BA (57,8 mg) (figura 15A). A maior massa de matéria fresca encontrada nas plantas de *C. xanthina*, crescidas no meio adicionado de 2,28 μM ANA+0,57 μM BA foi diferente dos resultados obtidos em *Cyrtopodium glutiniferum* por Vogel & Macedo (2010), que verificaram maior acúmulo nos meios com balanço favorável às citocininas.

Os balanços hormonais de ácido naftalenoacético e benziladenina utilizados não promoveram aumento significativo da massa de matéria fresca em comparação com o controle, sendo que os meios com 0,57 μM BA, 2,28 μM BA, 2,28 μM ANA, 2,28 μM ANA+2,28 μM BA mostraram-se inibitórios para a massa de matéria fresca radicular das plantas (respectivamente, 0,6, 1,2, 1,4 e 2,2 mg), quando comparados ao controle (4,4 mg). Embora não seja significativamente diferente do controle, o meio adicionado de 0,57 μM ANA apresentou maior massa de matéria fresca radicular nas plantas (12,4 mg) (figura 15A).

As plantas com as maiores massas de matéria seca caulinar foram encontradas nos meios 2,28 ANA+0,57 μM BA (6,2 mg); 0,57 μM ANA+2,28 μM BA (5,5 mg) e 2,28 μM ANA+2,28 μM BA (4,5 mg). O controle (MS) apresentou plantas com massa de matéria fresca de 2,9 mg em média (figura 15B).

As plantas que apresentaram a maior massa de matéria seca radicular foram aquelas crescidas no meio 0,57 μM ANA (1,4 mg) e 2,28 μM ANA+0,57 μM BA (1,0 mg), apesar de não diferirem significativamente do controle (MS) que apresentou plantas com 0,5 mg de massa de matéria seca radicular (figura 15B).

O balanço auxina/citocinina tende ao equilíbrio para promoção de um desenvolvimento balanceado da planta, ou seja, estimulando tanto o crescimento caulinar quanto o radicular, no entanto quando elevadamente positiva para a citocinina estimularia

maior desenvolvimento caulinar e quando o balanço é deslocado para a auxina haveria maior estimulação do crescimento radicular (Kersten 1987; Skoog & Miller 1957). No presente estudo, no entanto, as plantas de *C. xanthina* cultivadas com balanço mais favorável à auxina apresentaram maior acúmulo de matéria fresca e seca caulinar, contradizendo a hipótese anterior.

No entanto os resultados obtidos quanto às massas de matéria fresca e seca radicular das plantas de *C. xanthina*, foram mais influenciados nos meios contendo somente auxina, concordando com a informação de que a inclusão de auxina exógena auxiliaria na qualidade e velocidade do enraizamento (Hartmann & Kester 1983).

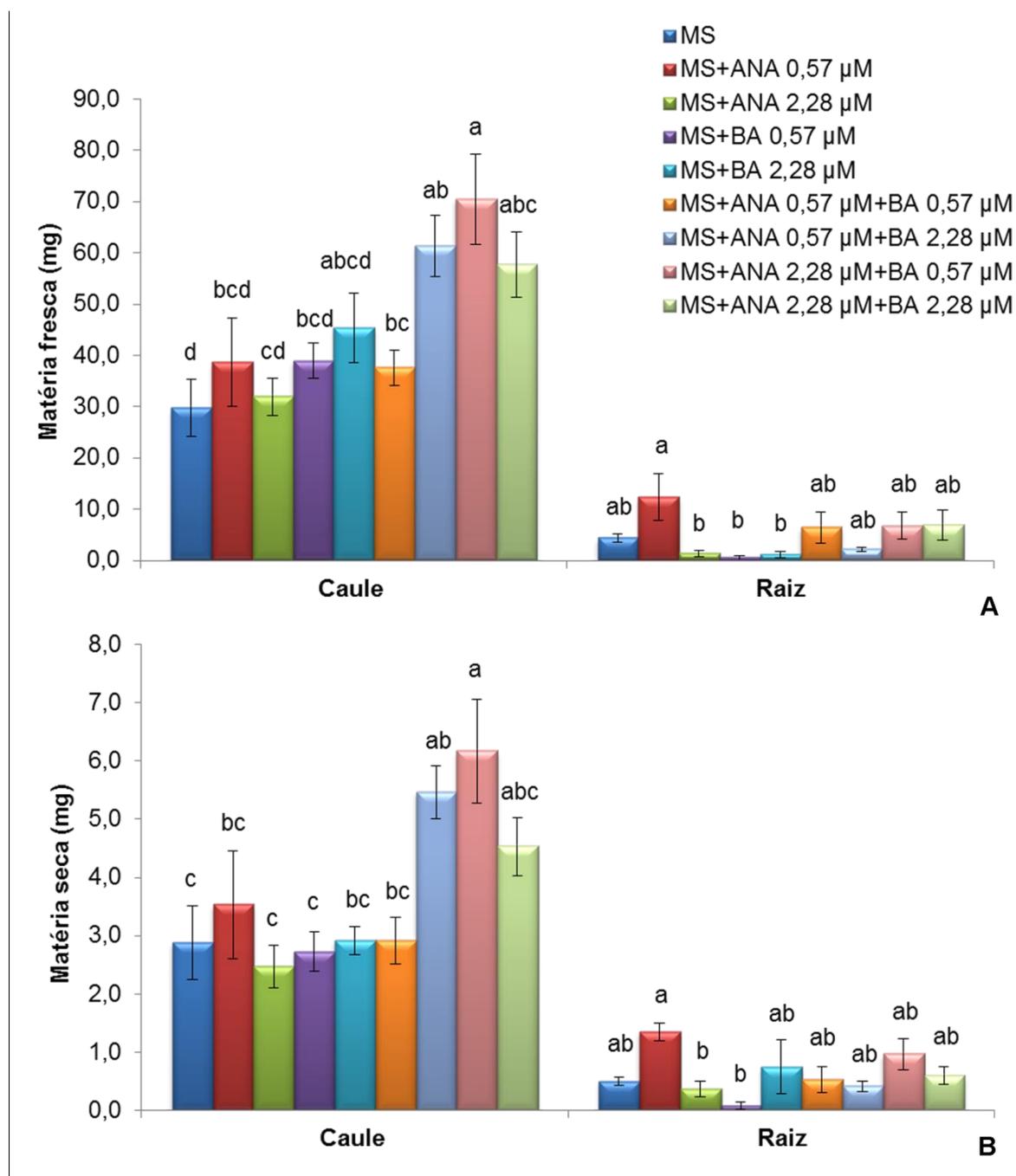


Figura 15. Efeito da adição de diferentes balanços de benziladenina e ácido naftalenoacético ao meio MS, sobre o acúmulo de massa de matéria fresca (A) e de massa de matéria seca (B) de caules e raízes de *Cattleya xanthina* após 540 dias de cultivo *in vitro*. Concentrações: ANA 0,57 μ M; ANA 2,28 μ M; BA 0,57 μ M; BA 2,28 μ M; ANA 0,57 μ M+BA 0,57 μ M; ANA 0,57 μ M+BA 2,28 μ M; ANA 2,28 μ M+BA 0,57 μ M e ANA 2,28 μ M+BA 2,28 μ M. Colunas com barras representam erro padrão e letras diferentes demonstram variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=8$).

6.5.1. Status de Nitrogênio

6.5.1.1. Quantificação de clorofila e carotenoide

A formação de pigmentos fotossintéticos não foi significativamente promovida pela adição dos diferentes balanços hormonais de ácido naftalenoacético e benziladenina, quando comparados com o controle (MS) que apresentou a maior concentração de clorofila *a* (172 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matéria fresca), seguido dos meios 2,28 μM ANA+2,28 μM BA (171,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e 2,28 μM ANA+0,57 μM BA (167,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (figura 16).

Apesar de não apresentar diferença significativa, a clorofila *b* foi maior nas plantas crescidas nos meios 2,28 μM ANA+0,57 μM BA (87,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF); 2,28 μM ANA+2,28 μM BA (87,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF); e 0,57 μM ANA (84,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) (figura 16).

A produção de carotenoides foi maior nas plantas cultivadas nos meios com 2,28 μM ANA+0,57 μM BA (66,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) e 0,57 μM ANA (65,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF), embora não tenham sido significativamente diferentes do controle (MS) (55,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) (figura 16). As plantas crescidas no meio com 2,28 μM BA apresentaram as menores concentrações de todos os pigmentos fotossintéticos analisados, 110,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de clorofila *a*; 53,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de clorofila *b* e 44,7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de carotenoides (figura 16). Em geral a produção dos pigmentos fotossintéticos foi estimulada pela maior concentração de auxina, promovendo uma relação positiva entre desenvolvimento radicular e produção de pigmentos. Segundo Krouk *et al.* (2011) o aumento da auxina promove o desenvolvimento radicular que amplia a absorção de nutrientes, entre eles o nitrogênio, que possui participação fundamental na composição da molécula de clorofila.

O nitrogênio compõe a molécula de adenina, para a formação de citocinina (Mok *et al.* 1979), portanto, a adição de citocinina elevaria a concentração de nitrogênio e, conseqüentemente, a produção de clorofila, no entanto tal teoria não foi confirmada no estudo realizado com *C. xanthina*.

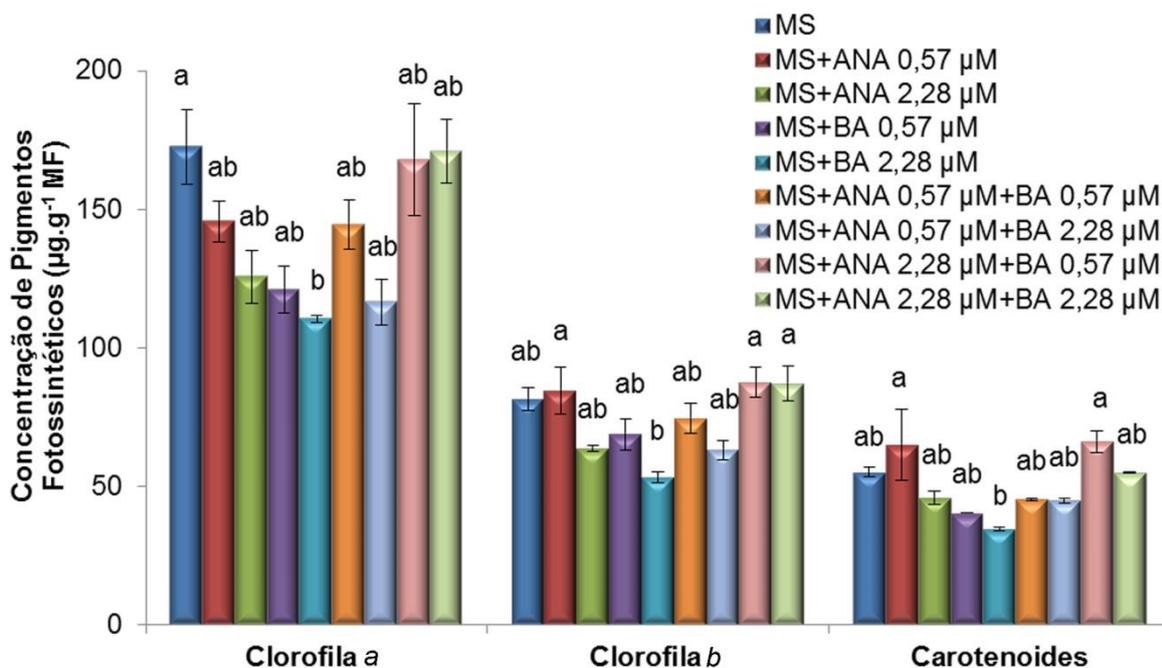


Figura 16. Efeito da adição de diferentes balanços de benziladenina (BA) e ácido naftalenoacético (ANA) ao meio MS, na síntese de pigmentos fotossintéticos nas plantas de *Cattleya xanthina* após 540 dias de cultivo *in vitro*. Concentrações: ANA 0,57 µM; ANA 2,28 µM; BA 0,57 µM; BA 2,28 µM; ANA 0,57 µM+BA 0,57 µM; ANA 0,57 µM+BA 2,28 µM; ANA 2,28 µM+BA 0,57 µM e ANA 2,28 µM+BA 2,28 µM. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os meses, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=3$).

6.5.1.2. Quantificação de Proteína total

A concentração de Proteína total foi estimulada pela adição dos diferentes balanços hormonais de ácido naftalenoacético e benziladenina nos meios de cultura, o meio MS sem adição de fitormônios (controle) apresentou plantas com o menor conteúdo de Proteína total ($1,3 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MF}$). As plantas apresentaram maior produção de proteínas quando cultivadas nos meios $0,57 \text{ µM ANA}+2,28 \text{ µM BA}$ e $2,28 \text{ µM BA}$ ($2,5$ e $2,4 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MF}$, respectivamente) (figura 17).

As proteínas constituem aproximadamente 30% da matéria seca total em uma planta (Taiz & Zeiger 2004) o que é confirmado pelos resultados obtidos em *C. xanthina*, quando comparados ao acúmulo de matéria seca, em que o meio com adição de 0,57 μM ANA+2,28 μM BA apresentou maior teor de proteína total e também está entre as maiores produções de matéria seca (figura 17, 15).

Nível elevado de Proteína total pode ter correlação com as altas taxas de divisões mitóticas, pois a síntese proteica gera alterações fisico-químicas em diferentes fases de desenvolvimento (Silveira *et al.* 2004). Segundo Krouk *et al.* (2011) a mobilização de citocinina ao caule ocorre quando há abundância de nitrogênio, por este motivo a maior quantidade de citocinina poderia ter promovido maior utilização do nitrogênio na região caulinar da planta promovendo a divisão celular e, conseqüentemente, a síntese proteica.

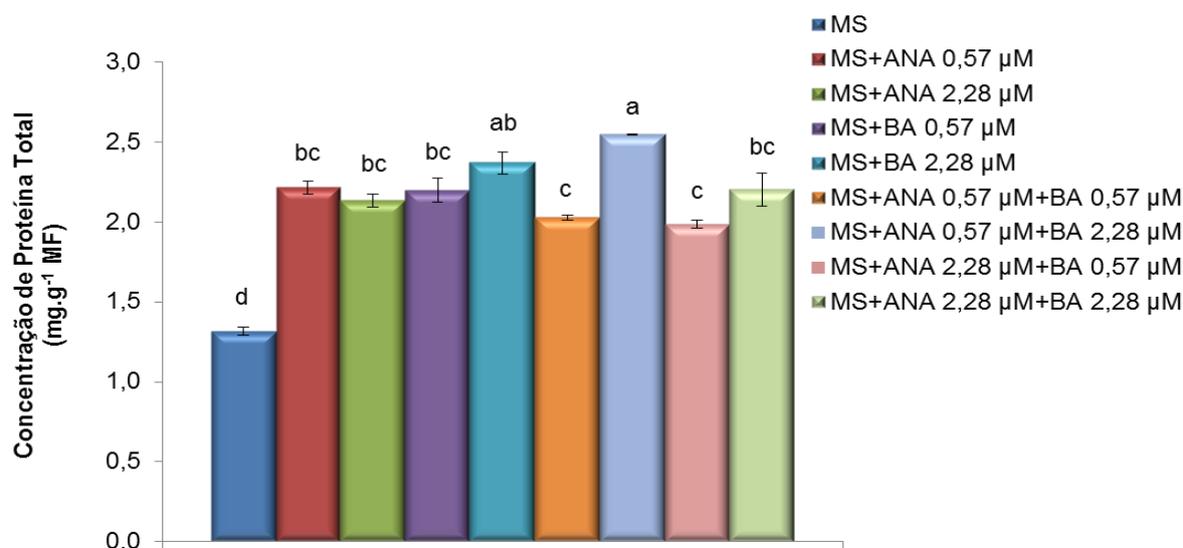


Figura 17. Efeito da adição de diferentes balanços de benziladenina (BA) e ácido naftalenoacético (ANA) ao meio MS, no conteúdo de proteína total nas plantas de *Cattleya xanthina* após 360 dias de cultivo *in vitro*. Concentrações: ANA 0,57 μM ; ANA 2,28 μM ; BA 0,57 μM ; BA 2,28 μM ; ANA 0,57 μM +BA 0,57 μM ; ANA 0,57 μM +BA 2,28 μM ; ANA 2,28 μM +BA 0,57 μM e ANA 2,28 μM +BA 2,28 μM . Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=3$).

7. Considerações Finais

Os tratamentos em geral proporcionaram um eficiente fornecimento de nitrogênio para *Cattleya xanthina*, sendo que os meios com maior concentração de nitrato (MS e MS/2) em geral promoveram maior percentagem de germinação, exceto em sementes muito imaturas (4 meses) para as quais, os meios mais eficientes foram KC e VW.

No desenvolvimento de plântulas, os meios com maior relação de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (KC e VW) estimularam o desenvolvimento inicial, a produção de pigmentos fotossintéticos e de proteína total. Tais resultados seriam eficientes para promover o crescimento das plantas mais rapidamente.

Os hormônios vegetais não apresentaram grande influência sobre o desenvolvimento das plântulas; os tratamentos contendo balanços de citocinina/auxina promoveram um ligeiro crescimento caulinar e, conseqüentemente, maior síntese de proteína, comparativamente à adição de reguladores isoladamente.

Tais resultados demonstram que a concentração e forma de nitrogênio presentes em cada meio de cultura é de extrema importância em cada etapa do desenvolvimento da planta, sendo necessárias avaliações durante as diferentes fases de crescimento, para que se possa proporcionar às plantas crescimento ativo e mais rápido, auxiliando na conservação dessas espécies.

8. Referências Bibliográficas

- ALBERT, B., LE CAHÉREC, F., NIOGRET, M.-F., FAES, P., AVICE, J.-C., LEPORT, L. & BOUCHEREAU, A. 2012. Nitrogen availability impacts oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant water status and proline production efficiency under water-limited conditions. *Planta* 236:659–76.
- ALVAREZ-PARDO, V. & FERREIRA, A.G. 2006. Armazenamento de sementes de orquídeas. *Revista Brasileira de Sementes* 28:92–98.
- ALVAREZ-PARDO, V., FERREIRA, A. & NUNES, V. 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. *Bot. The Botanical Review* 33:1–97.
- ATWOOD, J.T.J. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9:171–186.
- BARROS, F. DE, VINHOS, F., RODRIGUES, V.T., BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C.N. & PESSOA, E.M. 2012. Orchidaceae. *In* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB011732>).
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
- CASIMIRO, I., MARCHANT, A, BHALERAO, R.P., BEECKMAN, T., DHOOGHE, S., SWARUP, R., GRAHAM, N., INZÉ, D., SANDBERG, G., CASERO, P.J. & BENNETT, M. 2001. Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant cell* 13:843–52.
- CATALDO, D.A., HAROON, M., SCHRADER, L.E. & YOUNGS, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6:71–80.
- CHASE, M.W., CAMERON, K.M., BARRETT, R.L. & FREUDENSTEIN, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. *In* Orchid conservation. (K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb, eds.). Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, p.69–89.
- CHENG, L. 2003. Xanthophyll cycle pool size and composition in relation to the nitrogen content of apple leaves. *Journal of Experimental Botany* 54:385–393.
- CRAFTS, C.B.B. & MILLER, C.O.O. 1974. Detection and identification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi. *Plant physiology* 54:586–8.
- DE PAUW, M.A., REMPHREY, W.R. & PALMER, C.E. 1995. The Cytokinin Preference for *in-Vitro* Germination and Protocorm Growth of *Cypripedium-Candidum*. *Annals of Botany* 75:267–275.

- DECKER, J.S. 1956. As orquídeas e sua cultura. 2^a ed., Melhoramentos.
- DIJK, E. & ECK, N. 1995. Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. *New Phytologist* 131:361–367.
- DRESSLER, R.L. 1981. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland.
- DUTRA, D., JOHNSON, T.R., KAUTH, P.J., STEWART, S.L., KANE, M.E. & RICHARDSON, L. 2008. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94:11–21.
- FERREIRA, W.M. & SUZUKI, R.M. 2008. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. *In Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. (M.I.B. Loiola, I.G. Baseia & J.E. Lichston., eds.). Imagem Gráfica, Natal, p.67–68.
- GALLARDO, K., SIGNOR, C. LE, VANDEKERCKHOVE, J., THOMPSON, R.D. & BURSTIN, J. 2003. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiology* 133:664–682.
- GEORGE, E.F., HALL, M.A. & KLERK, G.-J. DE. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture: The Background* (Vol.1). 3^a ed., Springer.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. *In Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. (J.A. TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, ed.). EMBRAPA-CBAB, Brasília, p.183–260.
- HADLEY, G. & HARVAIS, G. 1968. The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. *New Phytologist* 67:441–445.
- HARTMANN, H.T. & KESTER, D.E. 1983. *Plant Propagation: principles and practices*. 4th ed., Englewood Clippis, New York.
- HOEHNE, F.C. (1953) Orchidaceas. p. 1-397. *In* (F.C. HOEHNE, ed.). *Flora Brasílica* 12(7). Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, São Paulo.
- JIMÉNEZ, V. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13:196–223.
- KERBAUY, G.B. 2004. *Fisiologia vegetal*. 1st ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- KERSTEN, E. 1987. *Propagação vegetativa dos citros por métodos não convencionais*. Esalq, Piracicaba.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 15:214–217.

- KROUK, G., RUFFEL, S., GUTIÉRREZ, R.A., GOJON, A., CRAWFORD, N.M., CORUZZI, G. & LACOMBE, B. 2011. A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends in Plant Science* 16:178–182.
- KUIPER, D., SCHUIT, J. & KUIPER, P.J.C. 1988. Effects of internal and external cytokinin concentrations on root growth and shoot to root ratio of *Plantago major* ssp. *Pleiosperma* at different nutrient condition. *Plant and Soil* 111:231–236.
- LEE, Y.-I., YEUNG, E.C., LEE, N. & CHUNG, M.-C. 2006. Embryo development in the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. *Annals of botany* 98:1311–1319.
- LEXA, M. 2003. Dynamics of Endogenous Cytokinin Pools in *Tobacco* Seedlings: a Modelling Approach. *Annals of Botany* 91:585–597.
- LI, D., TIAN, M., CAI, J., JIANG, D., CAO, W. & DAI, T. 2013. Effects of low nitrogen supply on relationships between photosynthesis and nitrogen status at different leaf position in wheat seedlings. *Plant Growth Regulation* 70:257–263.
- LICHTENTHALER, H.K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350–382.
- LO, S.-F., NALAWADE, S.M., KUO, C.-L., CHEN, C.-L. & TSAY, H.-S. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino—A medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40:528–535.
- LONG, B., NIEMIERA, A.X., CHENG, Z. & LONG, C. 2010. *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 101:151–162.
- MAGALHÃES, J.R., HUBER, D.M. & TSAI, C.Y. 1992. Evidence of increased 15N-ammonium assimilation in tomato plants with exogenous α -ketoglutarate. *Plant Science* 85:135–141.
- MAJEROWICZ, N., KERBAUY, G.B., NIEVOLA, C.C. & SUZUKI, R.M. 2000. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environmental and experimental botany* 44:195–206.
- MALAVOLTA, E., VITTI, G.C. & OLIVEIRA, S.A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2nd ed., Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba.
- MANNING, J.C. & VAN STADEN, J. 1987. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. *Australian Journal of Botany* 35:343–353.
- MENGEL, K. & KIRKBY, E.A. 1978. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Worblau-Bern, Switzerland.
- MERCIER, H. & KERBAUY, G.B. 1991. Effects of Nitrogen Source on Growth Rates and Levels of Endogenous Cytokinins and Chlorophyll in Protocorms of *Epidendrum fulgens*. *Journal of Plant Physiology* 138:195–199.

- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2008. Instrução normativa n.6. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. 1–55.
- MOK, M.C., KIM, S.G., ARMSTRONG, D.J. & MOK, D.W. 1979. Induction of cytokinin autonomy by N,N'-diphenylurea in tissue cultures of *Phaseolus lunatus* L. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76:3880–4.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with *Tobacco* Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497.
- NETO, A.D., SIQUEIRA, D.L., PEREIRA, P.R.G. & ALVAREZ V., V.H. 2002. Diagnóstico do estado nutricional de N em porta-enxertos de citros, utilizando-se de teores foliares de clorofila. *Revista Brasileira de Fruticultura- Jaboticabal* 24:204–207.
- PEDROSO-DE-MORAES, C. 2012. Da escarificação química e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr.(Orchidaceae). *Acta Botanica Brasilica* 26:714–719.
- REGO-OLIVEIRA, L. & FARIA, R. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum- Agronomy* 27:1–4.
- ROCHA, G.P., EVANGELISTA, A.R. & LIMA, J.A. 1979. Nitrogênio na produção de matéria seca , teor e rendimento de proteína bruta de gramíneas tropicais. *Pasturas Tropicais* 22:4–8.
- RUÍZ, B. & LAGUNA, C. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Revista Internacional de Botânica Experimental* 77:203–215.
- SILVEIRA, V., FLOH, E., HANDRO, W. & GUERRA, M. 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76:53–60.
- SKOOG, F. & MILLER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11:118–131.
- STADEN, J. VAN;, DAVEY, J.E.. & BROWN, N.A.C. 1982. Cytokinins in seed development and germination. *In* The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination. (A.A. Khan, ed.). Elsevier, Amsterdam, p.137–156.
- STANCATO, G.C., ABREU, M.F. & FURLANI, Â.M.C. 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. *Bragantia* 67:51–57.
- STEWART, S.L. & KANE, M.E. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86:147–158.

- SUZUKI, R.M., MOREIRA, V.C., NAKABASHI, M. & FERREIRA, W.M. 2009a. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & VP Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. *Hoehnea* 36:657–666.
- SUZUKI, R.M., MOREIRA, V.C., SOUTO, J.S. & MORIMOTO, J.M. 2009b. Efeitos do fotoperíodo e BA sobre a germinação de sementes de *Hoffmannseggella cinnabarina* (Orchidaceae). *In Anais do 12º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Anais do 12º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal Fortaleza-CE.*
- SUZUKI, R., ALMEIDA, V., PESCADOR, R. & FERREIRA, W. 2010. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). *Hoehnea* 37:731–742.
- SUZUKI, R.M., MOREIRA, V.C., PESCADOR, R. & FERREIRA, W.M. 2012. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 48:500–511.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. 3rd ed., Artmed, Porto Alegre.
- ULRICH, J.M. 1960. Auxin production by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 13:429–443.
- VACIN, E.F. & WENT, F.W. 1949. Some pH Changes in Nutrient Solutions. *Botanical Gazette* 110:605–613.
- VALLETTA, A., ATTORRE, F., BRUNO, F. & PASQUA, G. 2008. *In vitro* asymbiotic germination of *Orchis mascula* L. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 142:653–655.
- VOGEL, I.N. & MACEDO, A.F. 2010. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 104:147–155.
- WEATHERBURN, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39:971–974.