

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE GOIÁS Uni-ANHANGUERA
CURSO DE AGRONOMIA

INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE TROCAS GASOSAS NO CULTIVO *IN*
***VITRO* DE *Cohniella cepula* (Hoffmanns.) Carnevali & G. Romero E**
***Lockhartia goyazensis* Rchb. f.**

GISELLE DE CARVALHO SILVA

GOIÂNIA
Junho / 2018

GISELLE DE CARVALHO SILVA

INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE TROCAS GASOSAS NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Cohniella cepula* (Hoffmanns.) Carnevali & G. Romero E *Lockhartia goyazensis* Rchb. f.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro Universitário de
Goiás – Uni-ANHANGUERA, sob
orientação da Prof. Dra. Camila de
Marillac Costa Nunes, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharelado em Agronomia.

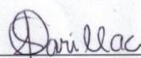
GOIÂNIA
Junho / 2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

GISELLE DE CARVALHO SILVA

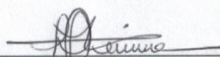
INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE TROCAS GASOSAS NO CULTIVO *IN VITRO* DE
Cohniella cepula (Hoffmanns.) Carnevali & Romero e *Lockhartia goyazensis* Rehb. f.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora como requisito parcial
para obtenção do Bacharelado em Agronomia do Centro Universitário de Goiás – Uni-
Anhanguera, defendido e aprovado em 23 de 05 de 2018 pela banca examinadora
constituída por:



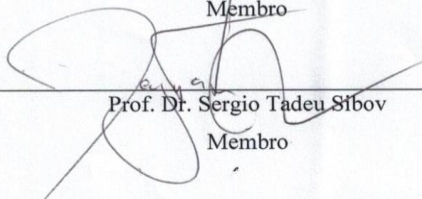
Prof. Dra. Camila de Marillac Costa Nunes

Orientadora



Prof. Dra. Luciana Domingues Bittencourt Ferreira

Membro



Prof. Dr. Sergio Tadeu Sibov

Membro

Dedico este trabalho a Deus, pelo seu imenso cuidado comigo. Aos meus pais, Eleuza e Evangelino, pela confiança e por sempre acreditarem em mim. Ao meu esposo Danilo, pelo apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me capacitou e encorajou a sempre seguir em frente, olhando o lado bom de cada situação e me proporcionando oportunidades de aprender cada dia mais.

À Prof. Dra. Camila de Marillac, pela paciência, apoio, amizade e disponibilidade de sempre, sem você esse trabalho não seria possível.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Uni – Anhanguera, pela oportunidade de condução do trabalho.

À todos os alunos (as) do laboratório de cultura de tecidos, que tive a oportunidade de trabalhar junto, somos uma equipe.

É a todos que de alguma forma fizeram parte dessa trajetória, com palavras de incentivo e auxílio. Muito obrigada a todos!

RESUMO

A obtenção de mudas em larga escala de espécies pertencentes à família Orchidaceae, tem sido realizada através de técnicas de cultivo *in vitro*, como a micropropagação. Na literatura, diversos protocolos são descritos para a multiplicação de espécies pertencentes à esta família. Porém a maioria destes utiliza frascos completamente vedados, sistema este denominado de heterotrófico. Alternativo a este modo de cultivo *in vitro* e favorável para o desenvolvimento de um grande número de espécies, o sistema mixotrófico tem como diferencial o favorecimento das trocas gasosas no interior do frasco. Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência dos sistemas de ventilação dos frascos no desenvolvimento *in vitro* de duas espécies de orquídeas encontradas no Cerrado com potencial ornamental: *Cohniella cepula* e *Lockhartia goyazensis*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos, Centro Universitário de Goiás Uni-Anhanguera (Uni-LCTV). Plântulas de, aproximadamente 1,5 a 2,0 cm, cultivadas *in vitro* foram transferidas para frascos de 200 mL contendo 30 mL de cada um dos seguintes meios de cultura: MS completo e MS com metade da concentração de macronutrientes ($\frac{1}{2}$ MS). Metade dos frascos recebeu a vedação total (heterotrófica) e a outra metade vedação parcial (mixotrófica). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, constituindo um fatorial 2 x 2, com 4 tratamentos e 16 repetições para cada espécie. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz / 8 h escuro a 25°C $\pm$ 1°C. Aos 30, 60, 90 e 120 dias, procedeu-se à avaliação do tamanho da parte aérea, tamanho da maior raiz e número de folhas. As médias referentes à avaliação aos 120 dias foram submetidas à análise de variância, a 5% de probabilidade. O sistema heterotrófico favoreceu o número de folhas de *C. cepula*, mantidas em meio MS. Para *L. goyazensis* o meio $\frac{1}{2}$ MS e sistema mixotrófico favoreceram o desenvolvimento de parte aérea e número de folhas.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae. Cultura de tecidos. Sistemas de ventilação.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas	10
2.2	O gênero <i>Cohniella</i> sp.	11
2.3	O gênero <i>Lockhartia</i> sp.	12
2.4	Sistemas heteretrófico e mixotrófico do cultivo <i>in vitro</i>	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Cohniella cepula</i>	16
4.2	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Lockhartia goyazensis</i>	18
5	CONCLUSÕES	21
	REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas constituem o segundo maior grupo de plantas entre as angiospermas, com, aproximadamente, 850 gêneros e mais de 26 mil espécies (GOVAERTS et al., 2011). De acordo com Barros et al. (2014), no Brasil, considera-se a ocorrência de 2.447 espécies para a família Orchidaceae. Diversas espécies de orquídeas já apresentam protocolos de multiplicação *in vitro* definidos, porém, para diversas espécies do Cerrado ainda há carência de informações relacionadas à germinação, conservação e cultivo.

Dentro da família Orchidaceae pode-se ressaltar diversos gêneros de importância econômica para o setor florístico, como: *Cattleya* (NUNES, 2009), *Oncidium*, *Phalaenopsis* (CHUGH et al., 2009), *Dendrobium* (FERREIRA et al., 2006; FARIA et al., 2013) e *Cymbidium* (KOSTENYUK et al., 1999). Espécies pertencentes a estes gêneros se sobressaem pelo exuberante adorno e, também, por apresentarem protocolos de multiplicação *in vitro* bem estabelecidos.

O Brasil é bem representado no mercado externo, atuando como importador e exportador de mudas de orquídeas, com maior expressividade na exportação para EUA, Itália, Holanda e, para importação, da Holanda, Tailândia, Japão, EUA e Equador (JUNQUEIRA e PEETZ, 2014). O mercado brasileiro expressa um amplo potencial de crescimento. Nos últimos anos, o faturamento do setor cresce significativamente. Foi obtido um faturamento de R\$ 6,65 bilhões em 2016, a previsão de crescimento para 2017 em todo o país foi de 9% com faturamento de R\$ 7,2 bilhões (IBRAFLOR, 2017).

Dentre os gêneros de orquídeas que ocorrem no Cerrado, uma das principais características está sua adaptação a extensos períodos de estiagem, fazendo-se resistente a desidratação e a ocorrências no declínio da umidade relativa do ar, apresenta alta variabilidade morfológica (OLIVEIRA et al., 1996 apud CARNEIRO, 2014). De acordo com Menezes (2000), entre as espécies vegetais do Cerrado, as Orchidaceae destacam-se como uma das cinco famílias mais representativas da flora sendo os gêneros mais significativos: *Catasetum* Rich. Kunth., *Cattleya* Lindl., *Cleisthes* Rich. Lindl., *Epidendrum* L. e *Cyrtopodium* Rchb. f.

O cultivo *in vitro* consiste em uma ferramenta biotecnológica que pode favorecer a manutenção de diversas espécies de orquídeas na natureza, bem como possibilitar que a produção de mudas em larga escala torne espécies com potencial ornamental uma realidade comercial. Os sistemas atuais de micropropagação, na grande maioria têm na sua composição sacarose e utilizam frascos com vedação total, sendo denominados de heterotróficos

(CARNEIRO, 2014). O sistema mixotrófico foi proposto com o objetivo de reduzir o acúmulo de etileno dentro dos frascos, diminuindo as ações deletérias na qualidade das plantas. Este sistema tem a vantagem de permitir trocas gasosas para o ambiente interno e externo do frasco utilizado, favorecendo o desenvolvimento de algumas espécies cultivadas *in vitro* (CARDOSO, 2015). Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência dos sistemas de ventilação e dos meios de cultura no desenvolvimento *in vitro* de *Cohniella cepula* (Hoffmanns.) Carnevali & G. Romero e *Lockhartia goyazensis* Rchb. f.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultivo *in vitro* de orquídeas

A cultura de tecidos é ferramenta fundamental para o melhoramento genético de plantas, possibilita obtenção de mudas com boa fitossanidade, produção em larga escala de plantas geneticamente idênticas, levando assim à sua descendência os caracteres de interesse para produção em diferentes ambientes, atendendo a demanda do mercado atual. Mesmo que, há tempos, diversos meios de cultura tenham sido utilizados para cultivo *in vitro* de orquídeas, pouco se sabe sobre os compostos nutricionais capazes de assegurar, com precisão, a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (ANDRADE, 2002).

Os recursos do cultivo *in vitro* são cada vez mais utilizados, principalmente nas últimas décadas, para propagação de orquídeas. O cultivo *in vitro* se fundamenta, na aplicação da totipotência em células vegetais, respectivamente, na possibilidade de produzir órgãos, como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos, que reestruturam uma planta completa (embriogênese somática) num meio de cultivo favorável (CARVALHO et al., 2008).

Os meios para cultura de tecidos são nutritivos e responsáveis por fornecer os sais minerais e nutrientes necessários para o bom estabelecimento da cultura *in vitro*, e por assegurar a divisão celular e a proliferação dos tecidos. Dentre os meios mais utilizados para a maioria das espécies de orquídeas, estão os meios de KNUDSON (1946) e MURASHIGE e SKOOG (1962) (SUZUKI, 2010).

São relacionadas à família Orchidaceae, aproximadamente, 850 gêneros e 26.567 espécies (GOVAERTS et al., 2011). Cada gênero possui suas características e particularidades, as espécies pertencentes a esse gênero são responsáveis por movimentar mensalmente no mercado das flores uma grande importância financeira. A utilização da micropropagação para diversas espécies de orquídeas é uma alternativa interessante, devido a sua dificuldade de reprodução, uma vez que apresenta uma grande quantidade de sementes nas cápsulas, mas em condições naturais poucas germinam, devido a não apresentarem endosperma, que se faz necessário para iniciar a germinação (YAMAZAKI e MIYOSHI, 2006).

A baixa taxa de germinação das sementes de orquídeas nos solos do Cerrado está relacionada à ocorrência de fogo no período de propagação das espécies pertencentes a essa família, e à dependência das sementes de serem induzidas por um fungo micorrízico para germinar (SILVA et al., 2017). Assim, a técnica da cultura de tecidos pode ser utilizada para conservação, melhoramento e desenvolvimento dessas espécies.

2.2 O gênero *Cohniella* sp.

Este gênero desenvolve plantas de porte médio a grande, constituídas por pequenos pseudobulbos verdes, 0,5-0,7 x 0,3-0,7 cm, folhas espessas e cônicas, coloridas com pontilhados em vermelho ou roxo (Figura 1). Têm aptidão neotropical e pode ser identificada na América do Sul e Central. Apenas 13 espécies de *Cohniella* sp. são conhecidas e todas apresentam hábito epífita. À princípio, este grupo participava do gênero *Oncidium*, que logo depois foi subdividido em *Cohniella*, *Lophiaris*, *Oncidium* e *Trichocentrum*. *Cohniella cepula* (Hoffmanns.) detém extensa abrangência, tendo sido encontrada no sul da Bacia Amazônica e em ampla parte do bioma Cerrado (FERNÁNDEZ-CONCHA; G. ROMERO, 2010).

Ocorrência de espécies de *Cohniella* sp. também foram verificadas na Argentina, Bolívia, Paraguai, Peru e Brasil (CETZAL Ix et al., 2012). No Brasil, *Cohniella* sp. dissemina-se no Distrito Federal e também em estados do Acre, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia e Tocantins.

Dispõe de abundante variabilidade morfológica, de natureza igual as demais dentro dessa espécie do gênero e, constantemente, é classificada ou observada como sinônimo de *Cohniella cebolleta* (CETZAL Ix et al., 2012). As espécies de *Cohniella* sp. podem ser distinguidas em função da sua distribuição geográfica e, em especial, pela pequena distinção no comprimento da coluna e no ângulo formado entre a coluna e o labelo (FERNÁNDEZ-CONCHA et al., 2010). Informações dessa espécie referentes ao cultivo *in vitro* e aperfeiçoamento comercial ainda são incomuns, ressaltando a importância de estudos que possibilitem sua propagação (CARNEIRO, 2014).



Figura 1. *Cohniella cepula* mantida em meio MS, aos 120 dias de cultivo *in vitro*.

Fonte: Silva, 2018.

2.3 O gênero *Lockhartia* sp

Espécies pertencentes ao gênero *Lockarthia* sp. podem ser encontradas em diversos países da América do Sul e Central e agrega representantes de hábito, predominantemente, epífita e de porte variável de pequeno a médio (BARROS, 2014). *Lockhartia goyazensis* Rchb. f. já foi encontrada na Bolívia e no Brasil. No Brasil espécies pertencentes a este gênero já foram encontradas no Distrito Federal, Amapá, Amazonas, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Rondônia, Sergipe e Tocantins, nas regiões Centro-Oeste (BARROS et al., 2014, QUEIROZ 2015). No Brasil há registros da ocorrência de sete espécies de *Lockarthia* sp., das quais quatro são endêmicas (BARROS, 2014).

Plantas de *L. goyazensis* possuem folhas complanadas, dísticas, imbricadas, triangulares e curtas (Figura 2), apresentando cápsulas pequenas com grande quantidade de sementes minúsculas (PESSOA e ALVES, 2012). Contém calo maciço, cobrindo em torno de 50% do labelo, sendo seguidamente confundida com *Lockhartia ludibunda* (BLANCO, 2014).



Figura 2. *Lockhartia goyazensis* mantida em meio $\frac{1}{2}$ MS, aos 120 dias de cultivo *in vitro*.

Fonte: Silva, 2018.

2.4 Sistemas heterotrófico e mixotrófico do cultivo *in vitro*

A integridade das características genéticas, fisiológicas e morfológicas, é determinante para produção de mudas em sistemas *in vitro*. Com o sistema controlado pode se atingir essa qualidade desejada. No sistema heterotrófico, os explantes são colocados em meio de cultura com açúcares e nutrientes, mantidos em salas de crescimento os frascos devidamente lacrados, em luminosidade reduzida, temperatura e umidade controladas (SILVEIRA, 2015).

O termo heterotrófico significa que os carboidratos exógenos serão a fonte de energia para o vegetal (KOZAI; KUBOTA, 2005). Garantindo que a possibilidade de contaminação por microrganismos seja praticamente nula. Dentro desse mesmo sistema, há a possibilidade de acúmulo de gases dentro do frasco (ex: etileno) e umidade. Plantas cultivadas em meio heterotrófico, constituem pouca lignina, células de baixa densidade, baixo desenvolvimento do sistema vascular, propiciando desordens fisiológicas e morfológicas, deficiência de estômatos (KOZAI; KUBOTA, 2001).

Já no sistema mixotrófico, que favorece a fotossíntese, ocorre ventilação dentro do frasco (Figura 3), resultando na normalização da transpiração, regulando o funcionamento dos estômatos. Dentro das condições mixotróficas, os explantes farão uso os hidratos de carbono sendo eles endógenos e exógenos como fonte de energia (KOZAI; KUBOTA, 2005).

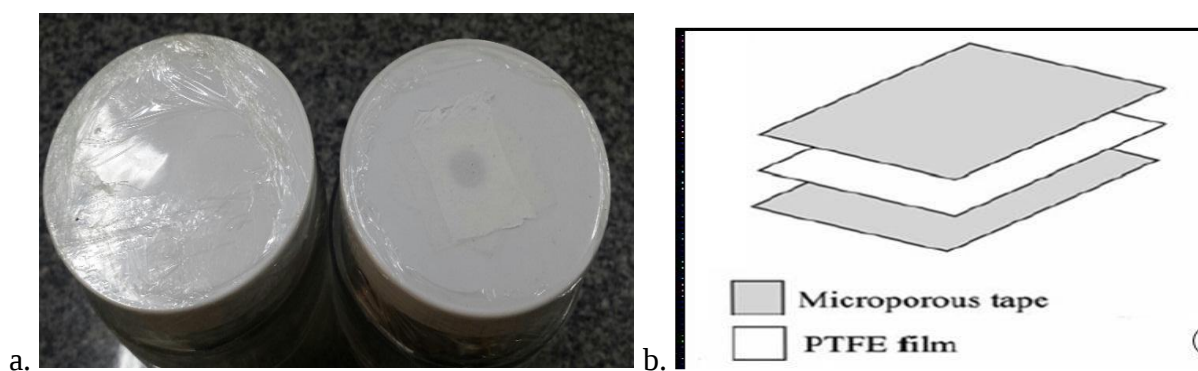


Figura 3. Tipos de vedações dos frascos utilizados no cultivo *in vitro* de *Cohniella cepula* e *Lockhartia goyazensis*. Os frascos de todos tratamentos foram ainda, vedados com uma camada de filme PVC em torno da base da vedação.

Fonte: a: Silva, 2018; b: Saldanha et al. (2012).

Meios de cultura contendo sacarose acontece de inibir a síntese de clorofila. Quando transplantadas, na fase de aclimatização, sofrem muitas alterações como, crescimento reduzido ou até mesmo levar a morte das mudas (KOZAI, 1991). Consequentemente, na generalidade, a anatomia interna e a estrutura são bem diferentes em relação as crescidas em sistema fotoautófico, em casa de vegetação ou em campo (KOZAI; KITAYA, 1995). Torna-se

necessário o desenvolvimento de novas alternativas no cultivo *in vitro* em benefício da planta, objetivando-se aproximar do ambiente *ex vitro* para que ocorra maior eficiência no processo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais no Centro Universitário de Goiás Uni-Anhanguera (Uni-LCTV), em Goiânia – GO, no período de agosto de 2017 a maio de 2018. Para propagação das orquídeas, foram utilizadas plântulas de *Cohniella cepula* e *Lockhartia goyazensis* cultivadas *in vitro*, 1,5 a 2 cm de altura, oriundas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFG.

No presente estudo, dois experimentos foram estabelecidos, sendo um para cada espécie. Em ambos, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, constituindo um fatorial 2 x 2, no qual foram testados dois meios de cultura (MS e ½ MS) e dois sistemas de ventilação nos frascos (heterotrófico e mixotrófico) (Tabela 1), totalizando quatro tratamentos com 16 repetições cada.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para avaliação do desenvolvimento *in vitro* de *Cohniella cepula* e *Lockhartia goyazensis*, durante 120 dias de cultivo.

Tratamento	Meio de cultura	Sistema de ventilação
T1	MS	Mixotrófico
T2	½ MS	Mixotrófico

T3	MS	Heterotrófico
T4	½ MS	Heterotrófico

Em cada tratamento foram utilizadas duas observações (plantas por frasco). O sistema heterotrófico foi constituído por frascos de 200 mL, vedados com tampa e plástico filme. O sistema mixotrófico foi constituído por frascos de 200 mL, vedados com tampa contendo um furo de aproximadamente 8 mm, lacrados com duas camadas de fita micropore sendo intercalado com uma camada de fita veda rosca (Figura 3). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz / 8 h escuro a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Aos 30, 60, 90 e 120 dias, procedeu-se à avaliação observando as seguintes variáveis: número de folhas (por contagem), tamanho de parte aérea e tamanho da maior raiz, medidas com auxílio de uma régua. Aos 120 dias de cultivo *in vitro*, os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de F ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento *in vitro* de *Cohniella cepula*

A Tabela 2 ilustra os valores de F resultantes da análise de variância referentes aos três caracteres avaliados em plântulas de *C. cepula*, aos 120 dias de cultivo *in vitro*. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos testados para o desenvolvimento da parte aérea desta espécie. Todavia, para o tamanho da maior raiz e número de folhas foi possível verificar influência do meio de cultura sobre estes ($F > F$ crítico). No que se refere ao sistema de ventilação, ocorreu influência apenas sobre o desenvolvimento do sistema radicular de *C. cepula*.

Tabela 2. Valores de F calculado e crítico referentes a três caracteres avaliados em plântulas de *Cohniella cepula*, aos 120 dias de cultivo *in vitro*. (a.) Parte aérea (cm), (b.) Tamanho da maior raiz (cm) e (c.) Número de folhas.

a. Parte aérea (cm)	F	F crítico
Sistema de Ventilação	2.26	3.91
Meio de Cultura (½ MS e MS)	0.16	3.91
Interações (Sistema x Meio)	2.98	3.91
b. Tamanho da maior raiz (cm)	F	F crítico

Sistema de Ventilação	*10.78	3.91
Meio de Cultura (½ MS e MS)	*7.21	3.91
Interações (Sistema x Meio)	2.15	3.91
c. Número de folhas	F	F crítico
Sistema de Ventilação	1.01	3.91
Meio de Cultura (½ MS e MS)	*10.71	3.91
Interações (Sistema x Meio)	0.07	3.91

*Resultados estatisticamente significativos, à 5% de probabilidade.

Os dados referentes ao desenvolvimento da parte aérea indicam que, para meio de cultura, os resultados foram semelhantes, ou seja, *C. cepula* se desenvolve bem tanto em meio MS, quanto o meio ½ MS. Quanto ao sistema de ventilação, o sistema heterotrófico favoreceu o desenvolvimento da parte aérea desta espécie, as quais, aos 120 dias de cultivo *in vitro*, apresentaram um tamanho médio de 4,24 cm (Tabela 3a). Diversos pesquisadores evidenciam que a presença de alguns nutrientes no meio de cultura pode restringir a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas, supostamente porque algumas espécies de orquídeas, a princípio, são carentes de enzimas pertinentes ao metabolismo (RAGHAVAN e TORREY, 1964; VAN WAES e DEBERGH, 1986; RASMUSSEN, 1995 apud SUZUKI, 2010).

Quanto ao sistema radicular, foi possível verificar diferenças estatísticas significativas, tanto entre os sistemas de ventilação testados, quanto entre os meios de cultura. A partir dos 90 dias de cultivo *in vitro*, verificou-se que o sistema heterotrófico favoreceu o desenvolvimento das raízes, bem como o meio de cultura ½ MS (Tabela 3b). Massaro et al. (2012) verificaram que para a espécie *Epidendrum secundum* o meio ½ MS também influenciou o desenvolvimento dessa característica, mediante a outros meios de cultura testados.

Para o número de folhas, a escolha do meio de cultura e do sistema de ventilação do frasco resultou em diferenças significativas para o desenvolvimento *in vitro* de *C. cepula*. Observa-se na Tabela 3c, que a quantidade média de folhas das plântulas mantidas em meio MS foi superior (7,70 folhas) em relação às plântulas cultivadas em meio ½ MS (5,22 folhas), bem como o sistema heterotrófico foi mais favorável do que o mixotrófico.

Estes resultados sugerem que *C. cepula* possa ser uma espécie mais exigente nutricionalmente, desenvolvendo maior quantidade de folhas quando cultivada em um meio de cultura que apresenta maiores quantidades de macronutrientes (MS) (Carneiro, 2014). Rego-Oliveira e Faria (2005) observaram em *Catasetum fimbriatum* que o meio MS favoreceu o crescimento caulinar e radicular, quando comparado a outros meios de cultura testados e que em *Cyrtopodium paranaenses* o comprimento do caule também foi favorecido pelo meio MS.

Tabela 3. Médias referente ao desenvolvimento da parte aérea (a), do sistema radicular (b) e do número de folhas (c) de *Cohniella cepula*, durante 120 dias de cultivo *in vitro*, sob influência dos sistemas de ventilação mixotrófico e heterotrófico.

a. Parte aérea (cm)	Média
Sistema de Ventilação	
Mixotrófico	3.65
Heterotrófico	4.24
b. Tamanho da maior raiz (cm)	Média
Sistema de Ventilação	
Mixotrófico	0.96
Heterotrófico	1.51
Meio de Cultura	
Meio ½ MS	1.46
Meio MS	1.01
c. Número de folhas	Média
Meio de Cultura	
Meio ½ MS	5.22
Meio MS	7.70

Trinta dias após o estabelecimento das plântulas de *C. cepula in vitro*, foi observado mudança na coloração do meio de cultura. Além da cor marrom, que pode ser característica do processo de oxidação, também foi possível verificar uma coloração rosada, sugerindo uma possível contaminação por bactérias endofíticas. Contudo, as referidas alterações de coloração dos meios de cultura não demonstraram alterar o desenvolvimento das plântulas ao longo do estudo. Estas alterações ocorreram tanto no meio MS, quanto no meio ½ MS e, no sistema heterotrófico, ocorreram em maior quantidade de frascos.

Algumas tentativas de tratamento foram utilizadas, como renovação dos meios de cultura acrescidos de hipoclorito de sódio 0,5% de cloro ativo, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Esta alternativa se mostrou eficaz, uma vez que a intensidade da coloração “rosada” do meio de cultura passou a ser menos intensa. Barreti et. al., (2008), encontrou resultados positivos no cultivo *in vitro* de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) juntamente a isolados de bactérias, as quais apresentaram melhor desenvolvimento de parte aérea, área foliar e número de folhas.

4.2 Desenvolvimento *in vitro* de *Lockhartia goyazensis*

Os valores de F resultantes da análise de variância dos caracteres avaliados em *Lockhartia goyazensis* estão ilustrados na Tabela 4. Observa-se que o meio de cultura influenciou de forma positiva o desenvolvimento da parte aérea desta espécie. Pela Tabela 5a é possível verificar que o meio ½ MS favoreceu o desenvolvimento da parte aérea de *L.*

goyazensis. Resultados semelhantes para esse mesmo caráter foi apresentado por Sorace et. al., (2008), que demonstraram melhores resultados quando utilizado o meio de cultura composto com metade dos macronutrientes ($\frac{1}{2}$ MS) para *Oncidium baueri* (Orchidaceae).

Assim como verificado para *C. cepula*, o sistema de ventilação do frasco proporcionado pelo sistema mixotrófico não demonstrou resultado significativo para o desenvolvimento da parte aérea de *L. goyazensis*. Silveira (2015) trabalhando com *Eugenia dysenterica* (Mart.), pode verificar que frascos com ventilação não proporcionou melhor desenvolvimento para as plantas cultivadas nesse sistema. Os frascos com ventilação oferecem a planta condições semelhantes ao ambiente externo, elas possuem tendência a um melhor crescimento radicular sendo que a parte aérea entra em repouso por aproximadamente um ano, ao fim desse período retoma seu desenvolvimento lentamente (Silveira et. al., 2013).

Tabela 4. Valores de F calculado e crítico referentes a três caracteres avaliados em plântulas de *Lockhartia goyazensis*, aos 120 dias de cultivo *in vitro*. (a.) Parte aérea (cm), (b.) Tamanho da maior raiz (cm) e (c.) Número de folhas.

a. Parte aérea (cm)	F	F crítico
Sistema de Ventilação	3.89	3.91
Meio de Cultura ($\frac{1}{2}$ MS e MS)	*7.87	3.91
Interações (Sistema x Meio)	0.25	3.91
b. Tamanho da maior raiz (cm)	F	F crítico
Sistema de Ventilação	0.46	3.91
Meio de Cultura ($\frac{1}{2}$ MS e MS)	1.06	3.91
Interações (Sistema x Meio)	*5.30	3.91
c. Número de folhas	F	F crítico
Sistema de Ventilação	*34.48	3.91
Meio de Cultura ($\frac{1}{2}$ MS e MS)	*22.38	3.91
Interações (Sistema x Meio)	*12.71	3.91

*Resultados estatisticamente significativos à 5% de probabilidade.

Para o tamanho da maior raiz, observa-se interação estatística significativa entre o meio de cultura utilizado e o sistema de ventilação do frasco, indicando que, o sistema radicular pode-se desenvolver melhor, dependendo da combinação meio x sistema de ventilação. Para essa mesmo caráter, não se observou diferença estatística significativa entre as concentrações de macronutrientes e sistema de ventilação (Tabela 5b). Sorace et. al. (2008) testando dois meios de cultura (MS e $\frac{1}{2}$ MS) com diferentes concentrações de sacarose, relatam melhores resultados para desenvolvimento do sistema radicular de *Oncidium baueri*, quando utilizado o meio $\frac{1}{2}$ MS.

Resultados estatisticamente significativos foram observados para o de número de folhas de *L. goyazensis*, indicando que, tanto o meio de cultura, quanto o sistema de ventilação, e a combinação de ambos, influenciam o desenvolvimento deste caráter (Tabela 5c). O meio ½ MS e a ventilação promovida pelo sistema mixotrófico favoreceram de maneira significativa a quantidade de folhas de *L. goyazensis*. Em relação a esses dados, podemos salientar que por se tratar de uma espécie epífita que habita naturalmente locais com disponibilidade limitada de recursos o meio ½ MS tenha favorecido melhores respostas exatamente por ser aquele com menores concentrações de macronutrientes.

Tabela 5. Médias referente ao desenvolvimento da parte aérea (a), do sistema radicular (b) e do número de folhas (c) de *Lockhartia goyazensis*, durante 120 dias de cultivo *in vitro*, em dois meios de cultura e sob influência dos sistemas de ventilação mixotrófico e heterotrófico.

a. Parte aérea (cm)	Média
Meio de Cultura	
Meio ½ MS	2.01
Meio MS	1.69
b. Tamanho da maior raiz (cm)	Média
Sistema x Meio	5.30
c. Número de folhas	Média
Sistema de Ventilação	
Mixotrófico	15.85
Heterotrófico	8.14
Meio de Cultura	
Meio ½ MS	15.10
Meio MS	8.89
Sistema x Meio	12.71

Foi possível verificar que plântulas cultivadas sob o sistema heterotrófico apresentaram folhas menores, ou ausentes, na maioria das repetições (Tabela 5c). Nesse sistema verificou-se também elevação da umidade relativa, representado por gotículas condensadas em seu interior, sendo que nos frascos com ventilação este fato não foi observado, justamente pelas trocas gasosas. Aitken-Christie et al. (1995) apud Silveira (2015) afirmam que o declínio na umidade relativa dentro do frasco obtido através da troca gasosa aumenta expressivamente a taxa de transpiração das plantas, resultando em um melhor aproveitamento de água e de nutrientes.

5 CONCLUSÕES

O sistema heterotrófico favorece o desenvolvimento de folhas e raízes de *Cohniella cepula* mantidas *in vitro*, durante 120 dias de cultivo; O meio MS favoreceu o número de folhas, enquanto que o meio $\frac{1}{2}$ MS foi o mais favorável para o desenvolvimento da maior raiz desta espécie.

O sistema mixotrófico e o meio $\frac{1}{2}$ MS favoreceram o desenvolvimento da parte aérea, do sistema radicular e do número de folhas de plântulas de *Lockarthia goyazensis* mantidas *in vitro*, durante 120 dias.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S.R.M. **Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Cerrado. Planaltina, DF, Documentos 58 p. 1-16, 2002.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBARENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI, N, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARAES, L.R.S. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2014. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 20 out. 2017.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agente promotores do crescimento de plantas de Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciênc. agrotec. Lavras**, v. 32, n. 3, p. 731-739, maio/jun., 2008.

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

CARNEIRO, L.L. **Pré-Melhoramento genético, floração in vitro e criopreservação de orquídeas nativas do cerrado**. 2014. 88f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

CARDOSO, M. C.; **Estabelecimento in vitro sob condições mixotróficas e criopreservação de *Hancornia speciosa* Gomes**. 2015. 78f. Dissertação (Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. S.; SILVA, P, M. A. **Preservação e Intercâmbio de Germoplasma**. ed. Paraíba: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2008. cap. 5, p.14.

CETZAL IX, W.R.C., FERNÁNDEZ-CONCHA, G.C. & CASTRO, V.P. *Cohniella* (Orchidaceae: Oncidiinae) South of the Amazon River. **Systematic Botany**, 37:58-77, 2012.

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

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

FERREIRA, W. D.; KERBAUY, G. B.; COSTA, A. P. P. Micropropagation and genetic stability of a *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, n. 6, p. 568–571, 2006. FERNÁNDEZ-CONCHA, G. C.; CETZAL-IX, W. R.; NARVAEZ, R. B.; ROMERO-GONZALEZ, G. A. A. synopsis of *Cohniella* (Orchidaceae, Oncidiinae). **Brittonia**, v. 62, n. 2, p. 153–177, 2010.

FERNÁNDEZ-CONCHA, G. C., CETZAL-IX., BALAM, R., LEOPARDI, C., ROMERO-GONZALEZ, G.A. A combined evidence phylogenetic re-circumscription and a taxonomic revision of *Lophiarella* (Orchidaceae: *Oncidiinae*). **Systematic Botany**, v.38, p. 46-63, 2013.

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

GOVAERTS, R.; KRATOCHVIL, K.; GERLANCH, G.; CARR, G.; ALRICH, P.; PRIDGEON, A. M.; CAMPACCI, M. A.; HOLLAND BAPTISTA, D.; CRIBB, P.; GEORGE, A.; KREUZ, K.; WOOD, J.J. **World checklist of Orchidaceae 2011**. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/monocots/>>. Acesso em: 20 out. 2017.

IBRAFLOR, I. B. DE F. Informativo: dados do mercado de flores e plantas ornamentais. **Ibraflor**. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/site/2017/11/04/mercado-de-flores>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, S. Balanço do comercio exterior da floricultura Brasileira 2013. **Hórtica**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2014.

JORGENSEN, P. M.; NEE, M. H.; BECK, S. G. Catálogo de plantas vasculares de Bolívia. Jardim Botânico de Missouri, **Tropicos**. 2014. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 15: p. 214-217, 1946.

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

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. (Ed.). Photoautotrophic (Sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Netherlands: **Springer**, 2005. cap. 3, p. 19-22.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, p. 525-537, 2001.

KOZAI T. Photoautotrophic micropropagation. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, **Springer**, v.27, n. 2, p.47-51, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02632127>>. Acesso em: 30 out. 2017.

KOZAI, T.; KITAYA, Y. Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. London: **Kluwer Academic**, p. 659-667, 1995.

MASSARO, R.; CORDEIRO, M. C.; LEAL, S. T.; MORAES, P. C.; Desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. Em meios de cultivo simplificado. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.5, n.2, p. 337-351, maio/ago. 2012.

MENEZES, L. C. **Orquídeas genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras**. 1. ed. Brasília: IBAMA, 2000. 208 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NUNES, C. M. C. **Fenologia, Biologia floral e Germinação *in vitro* de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. F. Warm. (ORCHIDACEAE)**. 2009. 102f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

PESSOA, E.; ALVES, M. *Lockhartia viruensis* (Orchidaceae-Oncidiinae), a new species from Roraima state, Brazilian Amazonia region. **Brittonia**, v. 64, n. 2, p. 162–164, 2012.

QUEIROZ, V.V., PROENÇA, C. E. B., BIANCHETTI, L. B.; Subtribo Oncidiinae Benth. (Orchidaceae Juss.) no Distrito Federal, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 4, p. 663-686, out./dez. 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hoehnea/v42n4/2236-8906-hoehnea-42-04-0663.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2017.

REGO-OLIVEIRA & FARIA; Propagação in vitro de orquídeas brasileiras utilizando meios de cultura tradicionais e formulações com fertilizantes comerciais - Maringá, Brasil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2005.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M. & OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 110, p. 413-422, 2012.

SILVA, I. V. DA et al. Estratégias anatômicas foliares de treze espécies de Orchidaceae ocorrentes em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - MG, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 741–750, 2006.

SILVA, C. S. de.; ARAÚJO, L. G. de.; SOUSA, K. C. I.; SILVA, M. S.; SIBOV, S. T.; FARIA, P. R. Germinação e desenvolvimento in vitro de orquídea epífita do Cerrado. **Technical Article**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 96-100, 2017.

SILVEIRA, C. E. S.; DARIO PALHARES; PEREIRA, L. A. R.; PEREIRA, K. B. D.; SILVA, F. A. B. Strategies of plant establishment of two Cerrado species: *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae) and *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC (Myrtaceae). **Plant Species Biology**, Kyoto, v. 28, p. 130–137, 2013.

SILVEIRA, A.A.C.; **Criopreservação de ápices caulinares e micropropagação em condições Heterotrófica e Mixotrófica de *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC.** 2015. Dissertação (Pós-Graduação Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SORACE, M.; F. R. T. de F.; JÚNIOR, C. V.; GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L.; T. L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento in vitro de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 775-782, out./dez. 2008.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento in vitro de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae), **Hoehnea**, v.37, n.4, p. 1-12, 2010, São Paulo. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062010000400004>>

YAMAZAKI, J.; MIYOSHI, K. In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). **Annals of botany**, v. 98, n. 6, p. 1197–1206, dez. 2006.

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE TROCAS GASOSAS NO CULTIVO *IN VITRO*
DE *Cohniella cepula* (Hoffmanns.) Carnevali & G. Romero E *Lockhartia*
goyazensis Rchb. f.**

SILVA, Giselle de Carvalho¹; NUNES, Camila de Marillac Costa²

¹Aluna do curso de Agronomia do Centro Universitário de Goiás – Uni-ANHANGUERA. ² Professora orientadora Dra. Do curso de Agronomia do Centro Universitário de Goiás – Uni ANHANGUERA.

A obtenção de mudas em larga escala de espécies pertencentes à família Orchidaceae, tem sido realizada através de técnicas de cultivo *in vitro*, como a micropropagação. Na literatura, diversos protocolos são descritos para a multiplicação de espécies pertencentes à esta família, porém a maioria destes utiliza frascos completamente vedados, sistema este denominado de heterotrófico. Alternativo a este modo de cultivo *in vitro* e favorável para o desenvolvimento de um grande número de espécies, o sistema mixotrófico tem como diferencial o favorecimento das trocas gasosas no interior do frasco. Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência dos sistemas de ventilação dos frascos no desenvolvimento *in vitro* de duas espécies de orquídeas encontradas no Cerrado com potencial ornamental: *Cohniella cepula* e *Lockhartia goyazensis*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos, Centro Universitário de Goiás Uni-Anhanguera (Uni-LCTV). Plântulas de, aproximadamente 1,5 e 2 cm, cultivadas *in vitro* foram transferidas para frascos de 200 mL contendo 30 mL de cada um dos seguintes meios de cultura: MS completo e MS com metade da concentração de macronutrientes (½ MS). Metade dos frascos recebeu a vedação total (heterotrófica) e a outra metade vedação parcial (mixotrófica). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, constituindo um fatorial 2 x 2, com 4 tratamentos e 16 repetições de cada espécie. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz / 8 h escuro a 25°C ± 1°C. Aos 30, 60, 90 e 120 dias, procedeu-se à avaliação do tamanho da parte aérea, tamanho da maior raiz e número de folhas. As médias referentes à avaliação aos 120 dias foram submetidas à análise de variância, a 5% de probabilidade. O sistema heterotrófico favoreceu o número de folhas de *C. cepula*, mantidas em meio MS. Para *L. goyazensis* o meio ½ MS e sistema mixotrófico favoreceram o desenvolvimento de parte aérea e número de folhas.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae. Cultura de tecidos. Sistemas de ventilação.

