



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO

VARIABILIDADE GENÉTICA, BIOLOGIA FLORAL E
PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA ORQUÍDEA SAPATINHO
Phragmipedium lindleyanum (R.H. Schomb. ex Lindl.) Rolfe var.
sargentianum (Rolfe) O. Gruss

DANIELA DE SOUZA HANSEN

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2011

VARIABILIDADE GENÉTICA, BIOLOGIA FLORAL E PROPAGAÇÃO
IN VITRO DA ORQUÍDEA SAPATINHO *Phragmipedium lindleyanum*
(R.H. Schomb. ex Lindl.) Rolfe var. *sargentianum* (Rolfe) O. Gruss

DANIELA DE SOUZA HANSEN

Engenheira Agrônoma
Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 2004

Tese submetida ao Colegiado de Curso do
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias
da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
como requisito parcial para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências Agrárias, Área de
Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Co-Orientadoras: Prof.^a Dr.^a Maria Angélica P. de C. Costa
Prof.^a Dr.^a Lidyanne Yuriko S. Aona

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

H248 Hansen, Daniela de Souza

Variabilidade genética, biologia floral e propagação *in vitro* da orquídea sapatinho *Phragmipedium lindleyanum* (R.H. Schomb. ex Lindl.) Rolfe var *sargentianum* (Rolfe) O. Gruss/ Daniela de Souza Hansen. – Cruz das Almas-BA, 2011.

96 f.; il.

Orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo

Co-Orientadores: Maria Angélica P. de C. Costa e Lidyanne Yuriko S. Aona

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Plantas – Propagação *in vitro*. 2. Plantas ornamentais Brasil.

I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 635.9

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DA
ESTUDANTE DANIELA DE SOUZA HANSEN**

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical
(Orientador)

Prof. Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Pesquisadora Dr^a. Ana da Silva Ledo
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Pesquisadora Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Prof. Dr. Rogério Marcos de Oliveira Alves
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano - IFBAIANO

Tese homologada pelo Colegiado do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias
em.....
Conferindo o Grau de Doutor em Ciências Agrárias
em.....

A Antonio Augusto, meu amado esposo, por todo amor, companheirismo, cumplicidade, respeito e orientação durante esses 12 anos juntos;

À minha família pela compreensão, paciência e carinho, em especial aos meus pais Vanilda e Augusto; meus irmãos Orlando, Ana e Júlia; meu padrasto Antonio e minha madrasta Amélia, e as minhas queridas tias Dira e Telma.

DEDICO

A todas as pessoas que possam se beneficiar das informações contidas nessa Tese, e que possam dar continuidade a trabalhos visando à preservação e conservação da espécie.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus amigos de luz, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, e a Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela colaboração e amizade dos professores e Funcionários.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e casa de vegetação, sem os quais não seria possível a realização do terceiro capítulo da Tese.

Ao meu esposo Antonio Augusto Oliveira Fonseca, pelo apoio, incentivo e ajuda na coleta de dados durante toda a pesquisa.

Ao Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo, Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa e Dra. Lidyanne Yuriko Saleme Aona, pela orientação, confiança e amizade.

Ao Dr. Antonio da Silva Souza pela paciência, ensinamentos e oportunidades durante nosso período de convivência.

A Rogério Marcos de Oliveira Alves pela sugestão de trabalho com a espécie *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum*.

Ao Dr. Carlos Alfredo de Carvalho Lopes, por disponibilizar equipamentos para realização da viabilidade polínica e pela identificação das abelhas.

Ao Dr. Sergio Antonio Vanin, pela atenção e disponibilidade para identificação dos curculionídeos, além das sugestões bibliográficas.

Ao Dr. José Fernandes Mello, pela orientação sobre a demarcação da área para coleta de dados sobre a distribuição espacial da espécie.

Aos estagiários Fabio Ribeiro Garcia e Natiana de Oliveira França pela ajuda na coleta de dados em campo e pela grande amizade e respeito.

A todos os funcionários e estagiários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em especial a Juraci Cortes Costa, Honorato Pereira da Silva Neto, Tânia Maria Ferreira Dias Conceição, Hélder Lima Carvalho, Sandra Santa Rosa, Lucymeire Souza Morais Lino, Maria Gerolina Silva Cardoso, Taliane Leila Soares e Adila Melo Vidal pelos momentos de alegria e amizade que tornaram as dificuldades mais amenas.

A Moema Angélica Rocha pela amizade e por toda a ajuda na defesa da Qualificação.

A todos os colegas do Doutorado, em especial Valdir José de Almeida Fonseca, José Torquato de Queiroz Tavares, Cerilene Santiago Machado e José Carlos Cerqueira Morais pelo estímulo e solidariedade durante todo o Curso.

À Flávia Sabino de Jesus e Rejane Barbosa Cardoso, por todos os esclarecimentos e ajuda referentes aos assuntos da Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o andamento do trabalho meu sincero obrigada.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO | |
| ABSTRACT | |
| INTRODUÇÃO..... | 01 |
| Capítulo 1 | |
| VARIABILIDADE GENÉTICA EM QUATRO POPULAÇÕES DE ORQUÍDEA SAPATINHO EM SANTA TERESINHA, BAHIA..... | 13 |
| Capítulo 2 | |
| BIOLOGIA FLORAL DE ORQUÍDEA SAPATINHO EM REMANESCENTE DE MATA ATLÂNTICA, BAHIA, BRASIL..... | 36 |
| Capítulo 3 | |
| PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ORQUÍDEA SAPATINHO ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA, BRASIL..... | 68 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 108 |

VARIABILIDADE GENÉTICA, BIOLOGIA FLORAL E PROPAGAÇÃO IN VITRO DA ORQUÍDEA SAPATINHO *Phragmipedium lindleyanum* (R.H. Schomb. ex Lindl.) Rolfe var. *sargentianum* (Rolfe) O. Gruss

Autor: Daniela de Souza Hansen

Orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética, a biologia floral e a propagação *in vitro* de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* em remanescente de Mata Atlântica no Estado da Bahia. Para o estudo da variabilidade genética foi utilizada análise morfométrica das peças florais empregando-se métodos estatísticos univariados e multivariados. A biologia floral foi realizada por meio de observações em campo, e a propagação *in vitro* por meio de experimentos de germinação, multiplicação e crescimento. Houve diferença significativa entre as populações, para 11 caracteres florais, sendo as populações 2 e 3 as mais distantes geneticamente. A floração durou cerca de 2 meses e meio, e o seu pico ocorreu em setembro. As flores duraram em média 9,4 dias. A frutificação natural foi alta, assim como a frutificação após a polinização cruzada manual e autopolinização manual, e os frutos necessitaram de cerca de 75 dias para alcançarem a maturidade. Os principais visitantes florais foram os curculionídeos e as abelhas. O padrão de distribuição espacial foi agregado. Os meios de cultura compostos por 1/3 dos sais de MS na presença de luz e 1/4 dos sais de MS na ausência de luz, promoveram uma cultura rica em protocormos na germinação *in vitro*. A utilização de BAP na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA resultou em maior número de brotos adventícios, e a concentração de 40 g.L⁻¹ de sacarose foi a mais eficiente no crescimento *in vitro* das plantas.

Palavras-chave: Mata Atlântica, Orchidaceae, Cyripedioideae, caracteres florais, sistemas de reprodução.

GENETIC VARIABILITY, FLORAL BIOLOGY AND *IN VITRO* PROPAGATION OF THE SAPATINHO ORCHID *Phragmipedium lindleyanum* (R.H. Schomb. ex Lindl.) Rolfe var. *sargentianum* (Rolfe) O. Gruss

Author: Daniela de Souza Hansen

Adviser: Carlos Alberto da Silva Ledo

ABSTRACT: The objective of the present work was to study the genetic variability, floral biology and *in vitro* propagation of *P. lindleyanum* var. *sargentianum* in remaining Atlantic Forest in the State of Bahia. Morphometric analysis of the floral parts was used for the genetic variability by univariate and multivariate statistic methods. The floral biology was carried out by field observations and *in vitro* propagation by germination, multiplication and growth experiments. There was significant difference between the populations for 11 floral characteristics; whereas populations 2 and 3 were the most genetically distant. Flowering lasted about 2 and a half months with its peak in September. Flowers lasted in average, 9.4 days. Natural frutification was high as well as frutification after manual cross pollination and manual self pollination and fruits needed approximately 75 days to reach maturity. Main flower visitors were weevils and bees. The special distribution pattern was aggregated. Culture medium with 1/3 of MS salts in the presence of light and 1/4 MS salts in the absence of light, promoted a culture rich in protocorms in the *in vitro* germination. BAP at 1.0 mg.L⁻¹ with 0.1 mg.L⁻¹ of NAA resulted in a greater number of adventitious buds and the concentration of 40 g.L⁻¹ of sucrose was the most efficient for *in vitro* plant growth.

Key-words: Atlantic Forest, Orchidaceae, Cyripedioideae, floral characteristics, reproduction systems.

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um complexo e exuberante conjunto de ecossistemas de grande importância por abrigar uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil, reconhecida nacional e internacionalmente no meio científico. Lamentavelmente, é também um dos biomas mais ameaçados do mundo devido às constantes agressões ou ameaças de destruição dos habitats nas suas variadas tipologias e ecossistemas associados (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE, 2009). A destruição vem ocorrendo de maneira intensiva principalmente pelo corte ilegal, cultivo e ocupação humana, onde apenas 7-8% da área original (1,5 milhão de km²) persistem como um mosaico de fragmentos isolados, tornando-a uma das regiões mais devastadas e seriamente ameaçadas do planeta (GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2005).

A Serra da Jiboia é um fragmento da Mata Atlântica localizado no Estado da Bahia e selecionado como uma das 147 áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade (CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, 2000), devido à grande diversidade e endemismo de espécies vegetais e animais, além de espécies novas ainda não descritas pela ciência. O endemismo encontrado neste fragmento é decorrente da especiação local devido ao seu isolamento geográfico. Entre as espécies vegetais há um grande número de orquídeas, a exemplo da *Sobralia lilliastrum*, *Epidendrum secundum* e *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum* (TOMASONI & SANTOS, 2003).

A conservação de habitats naturais afetados pela fragmentação tem sido baseada em estudos sobre a biologia da polinização e reprodução, pois podem fornecer informações importantes relacionadas à partilha e competição por polinizadores, sucesso reprodutivo e manutenção do fluxo gênico intraespecífico (KEARNS *et al.*, 1998).

A família Orchidaceae pertence à Ordem Aspargales, Classe Liliopsida e a Divisão Magnoliophyta (DRESSLER, 1993), encontrando-se distribuída por todo o globo terrestre, à exceção das regiões polares, podendo ser encontrada em diferentes altitudes, em florestas tropicais, tundras, regiões desérticas, pântanos ou pradarias (PRIDGEON, 2001). Os mais recentes sistemas de classificação para esta família são propostos por Dressler (1993) e Pridgeon *et al.* (1999, 2001, 2003, 2005), sendo este último baseado em características morfológicas e moleculares. Essa classificação divide a família Orchidaceae em cinco subfamílias sendo elas a Cyripedioideae, Apostasioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae.

As orquídeas são plantas herbáceas, perenes e de porte extremamente variável. Podem ser terrestres, epífitas, rupícolas, saxícolas ou, menos frequentemente, saprófitas (DUNSTERVILLE & GARAY, 1976). Possuem habito de crescimento monopódico ou simpódico (HÁGSATER *et al.*, 2005), sendo morfológicamente constituídas de raiz, caule, folhas, inflorescência, flores, frutos e sementes (PAULA & SILVA, 2001). As sementes são pequenas e sem endosperma, as flores zigomorfas com ovário ínfero, possuem três sépalas, três pétalas, uma das quais diferenciada em labelo, órgãos reprodutivos parcialmente unidos num ginostêmio, pólen quase sempre em polínias, folhas com nervação paralela e raízes fasciculadas dotadas de velame (DRESSLER, 1993; PINHEIRO *et al.*, 2004). De acordo com Blossfeld (1999) a principal parte do aparelho reprodutor é a coluna ou ginostêmio. O ginostêmio é uma estrutura constituída pela união de pistilos e estames, localizado na porção inferior do labelo onde se encontra inserido o estilete e o estigma forrado por uma porção filamentosa que serve como condutor do tubo polínico ao ovário. O ovário é sempre ínfero, em geral tricarpelar, e em quase todas as espécies a produção de óvulos ocorre apenas logo após a polinização. O estigma encontra-se na extremidade do estilete e constitui-se em uma cavidade preenchida por uma substância viscosa (viscina), que serve de depósito das políneas e também da abertura que conduz ao ovário, onde se processa a fecundação. No ápice do filete do estame, encontra-se uma porção dilatada sacular que encerra as políneas constituídas por massas de grãos de pólen, que se encontram agrupadas na antera.

Nas orquídeas, após a polinização, os grãos de pólen germinam na superfície estigmática e os tubos polínicos se estendem ao ovário. Se a

fecundação não ocorrer não haverá desenvolvimento de cápsula ou fruto. O embrião formado na fecundação é coberto por um tegumento ou testa e quase não possuem endosperma de modo que necessita de fontes externa de nutrientes para se desenvolver até um estágio autotrófico. Em condições naturais, estas fontes de nutrientes são obtidas a partir da associação com fungos (KUAN & GONZALEZ, 1993). Desta forma, as orquídeas apresentam micotrofia, e a presença de determinados tipos de fungos são muito importantes durante os primeiros estádios de desenvolvimento da plântula (CLEMENTS, 1988), sendo que a maior dependência ocorre em espécies terrestres (BRITO & CRIBB, 2005).

As orquídeas em seus ecossistemas naturais vivem um delicado equilíbrio com outros organismos do ambiente, de modo que pequenas mudanças ambientais exercem efeitos adversos sobre elas podendo resultar em reduções nas populações, e em último caso levá-las a extinção (ABDELNOUR & MUÑOZ, 1997). A flor é o órgão que possui maior diversidade morfológica, e a sua morfologia e oferta de recursos delimitam as síndromes de polinização, podendo restringir ou orientar a acessibilidade do visitante aos recursos florais. A diversidade de interações planta-polinizador em orquídeas é inigualável se comparada a qualquer outro grupo de plantas (WATERMAN *et al.*, 2008), e os Hymenoptera, principalmente as abelhas, têm sido reconhecidos como o grupo mais importante de polinizadores, responsável pela polinização de cerca de 60% das espécies (VAN DER PIJL & DODSON 1966, DRESSLER 1981).

A subfamília Cypripedioideae abrange plantas terrestres, rupícolas ou, mais raramente, epífitas. A inflorescência é terminal, as sépalas laterais são normalmente coalescentes, formando um sinsépalo mais ou menos semelhante à sépala dorsal, o labelo é sacciforme, o ginostêmio possui dois estames férteis e um estaminódio, e o ovário é uni ou trilocular. Ocorre na Europa, Ásia e América do Norte, Central e do Sul, e compreende cinco gêneros (PRIDGEON *et al.*, 1999).

O gênero *Phragmipedium* abrange aproximadamente 21 espécies, sendo encontradas desde o Sul do México e Guatemala, passando pela América Central e América do Sul (Bolívia e Brasil). Possuem rizoma curto e folhas em formato de V, de coloração verde maçante ou brilhante e de formato oblongo a linear, ocorrendo em duas fileiras ou linhas em lados opostos do caule. Suas flores

apresentam labelo modificado, o que lembra o formato de um sapatinho (Koopowitz, 2008).

A espécie *Phragmipedium lindleyanum* (R.H.Schomb. ex Lindl.) Rolfe var. *sargentianum* (Rolfe) O. Gruss é endêmica do Brasil, sendo encontrada nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro (FELIX & GUERRA, 2005; BARBOSA, 2007; AMORIM *et al.*, 2009), e considerada como ameaçada de extinção pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008).

Em condições naturais, a propagação das orquídeas se dá pela proliferação de mudas laterais ou pela disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas. A cápsula contém milhares de sementes desprovidas de endosperma e com tamanho muito pequeno, contendo um embrião de aproximadamente 0,1 mm que, durante a germinação, dilata-se para formar uma pequena estrutura denominada de protocormo ou protocormóide (HOFFMANN *et al.*, 1997). Segundo Milaneze (1997), com as descobertas do pesquisador norte-americano Lewis Knudson nas décadas de vinte a quarenta, tornou-se possível à germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas de orquídeas *in vitro*, na presença de sais minerais e carboidratos solúveis em meio de cultura geleificado com ágar.

A propagação *in vitro* de orquídeas é de grande importância por possibilitar a obtenção de um grande número de mudas de qualidade em pequeno espaço físico e, em pouco tempo (ALTAFIN *et al.*, 2003). Esse tipo de propagação tem sido utilizado no Brasil para aumentar a produção de mudas de alta qualidade genética e conseqüentemente reduzir seu custo, contribuindo para salvar muitas espécies que se encontram ameaçadas de extinção (STANCATO *et al.*, 2001).

No México, considera-se de vital importância tomar ações que levem a um manejo sustentável das orquídeas, e entre elas o cultivo *in vitro* se destaca por possibilitar a reprodução de forma massiva a partir de sementes e tecidos vegetativos mantendo uma produção contínua de plantas e minimizando os efeitos do saque de espécies de suas populações naturais (LEE & LEE, 1991).

Em geral os trabalhos de cultivo *in vitro* de orquídea reportam sobre a cultura assimbiótica ou semeadura *in vitro*. Esta técnica é bastante relevante do ponto de vista comercial, que além de possibilitar a criação de híbridos interespecíficos e intergenéricos torna possível o aproveitamento máximo das sementes raras ou escassas (COSTA *et al.*, 2009).

As plantas produzidas desta forma são interessantes para programas de melhoramento e para a reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. Este método permite uma multiplicação rápida e eficiente, diminuindo o ciclo de vida, substituindo a simbiose (micorriza) e excluindo a competição com outros microorganismos (MACHADO & VENTURIERI, 2006).

Vários são os protocolos reportando a germinação assimbiótica desde aqueles que utilizam ou não combinações de reguladores vegetais. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas em protocolos de micropropagação. De uma maneira geral as auxinas estão relacionadas com a indução da rizogênese e indução de calos embriogênicos, enquanto que as citocininas induzem a diferenciação celular e formação de múltiplos brotos. Portanto, o balanço adequado entre estes dois reguladores vegetais, é que possibilitará o desenvolvimento de microplantas (SOUZA & JUNGHANS, 2006).

Segundo Pauw *et al.* (1995) a adição de BAP (6-benzilaminopurina) no meio de cultura para germinação de sementes de orquídeas apresentou efeitos positivos, como a redução do tempo de germinação de *Encyclia phoenicea*. Por outro lado, a adição de BAP a diversos meios nutritivos resultou em efeitos deletérios para a germinação de sementes imaturas de *Cyrtopodium eugenii* e *C. cristatum* (CARAMASCHI & CALDAS, 1999). Martini (2001) obteve maior número de plantas quando sementes de *Gongora quinquenervis* foram incubadas em meio MS sem a adição de reguladores vegetais. No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFRB, testes de germinação com vários gêneros e híbridos de orquídeas, tais como *Schomb x Cattleya aelandiae*, *Brassavola flageralis x Cattleya hausman*, *Cattleya aelandiae X Laelia grandis*, revelaram que a ausência de reguladores vegetais no meio de cultura favorece uma germinação homogênea, com cerca de 30 a 60 dias de incubação. De acordo com Bicalho (2001), algumas espécies de orquídeas apresentam inibidores nas sementes, como o *Cypripedium*, sendo necessário pré-tratamento das sementes, antes da germinação.

O cultivo *in vitro* de orquídeas utilizando folhas jovens atualmente vem sendo relatado em *Phalaenopsis* e *Vanda* (TISSERAT & JONES, 1999; SEENI *et al.*, 2000), *Acampe praemorsa* (NAYAK *et al.*, 1997), *Spathoglottis plicata* (TENG *et al.*, 1997) e *Oncidium Gower Ramsey* (CHEN *et al.*, 1999; MURTHY & PYATI,

2002). Outros tipos de explantes que também vem sendo utilizados no cultivo são as inflorescências (KUMAR *et al.*, 1999), protocormos (CHEN *et al.*, 2002), ápice meristemático (SILVA, 1977), dentre outros. O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, onde os reguladores vegetais se destacam como um dos principais controladores da morfogênese. O tipo e concentrações possibilitam as mais diferentes respostas das células *in vitro* (BASTOS *et al.*, 2007).

O presente trabalho objetivou estudar a variabilidade genética, biologia floral e a propagação *in vitro* de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* oriunda de remanescente de Mata Atlântica no Estado da Bahia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOUR, A. MUÑOZ, A. **Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción.** Cartago, Costa Rica: Instituto Tecnológico da Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación y Extensión. p 4-10. 1997.

ALTAFIN, R. L. M.; MENEZES, M. O.; LIMA, R. R. F.; PITOMBO, L. M. Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal. **Boletim Técnico**, Espírito Santo do Pinhal, n. 7, 2003. 14p.

AMORIM, A. M.; JARDIM, J. G.; LOPES, M. M. M.; FIASCHI, P.; BORGES, R. A. X. B.; PERDIZ, R. DE O.; THOMAS, W. W. **Angiospermas em remanescentes de floresta montana no sul da Bahia, Brasil.** *Biota Neotropica*, São Paulo, v.9, n. 3, p. 313-348, 2009.

BARBOSA, F. R. **Fungos conidiais associados a folhas em decomposição de *Clusiamelchiori* Gleason e *C. nemorosa* G. Mey em fragmento de Mata Atlântica, Bahia, Brasil.** Recife, PE, 2007. Dissertação (mestrado em Biologia). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.

BASTOS, L. P.; MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. DE C.; ROCHA, M. A. C. da; HANSEN, D. de S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. da S.

Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1122-1124, 2007.

BICALHO, H. D. **Subsídios ao melhoramento nas orquídeas do gênero *Paphiopedium***. São Paulo: Instituto de Botânica, p. 100-115, 2001.

BLOSSFELD, A. **Orquidologia, orquidofilia e orquicultura**. Rio Claro: Funep, 1999. 89p.

BRITO, A. L. V. T.; CRIBB, P. J. **Orquídeas da chapada Diamantina**. 1. Ed., Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2005. 399 p.

CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H.; SUZIN, M. Anatomic analyses and biomass of strawberry plants cultivated *in vitro* and *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p. 649-653, 2002.

CARAMASCHI, G. M. C. L.; CALDAS, L. S. Comparação da germinação *in vitro* de sementes provenientes de frutos imaturos de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae) com idades diferentes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, p. 175, 1999. Suplemento.

CHEN L. R, CHEN J. T, CHANG W. C. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. **In vitro Cellular & Developmental Biology-plant**, Heidelberg, v. 38, n. 5, p. 441-445, 2002.

CHEN, J. T.; CHANG, C.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 19, n. 2 , p. 143-149, 1999

CLEMENTS, M. A. Orchid mycorrhizal associations. **Lindleyana**, Costa Rica, v.3, p.73-86, 1988.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecologias & Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. **Avaliações e ações prioritárias para a conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos.** Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2000.

COSTA, M. A. P. de C.; PEREIRA, M. J. ; ROCHA, M. A. C.; HANSEN, D. de S.; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R.. Micropropagação de Orquídeas. In: GOES, T. J.; SOUZA A. da S. (Eds.). **Aspectos práticos de micropropagação de plantas.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. v.1, p. 351-370.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family.** Cambridge: Harvard University Press, 1993. 314p.

DRESSLER, R. L. **The orchids:** natural history and classification. Cambridge: Harvard University Press, 1981. 352p.

DUNSTERVILLE, G. C. K.; GARAY, L. A. **Venezuelan orchids illustrated.** v.6, London: Andre Deutsch, 1976. 463 p.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution**, Austria, v. 254, n. 3-4, p.131-148, 2005.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2005–2008.** Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo. 2009.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. (eds.). **Mata Atlântica:** biodiversidade, ameaças e perspectivas. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica - Belo Horizonte: Conservação Internacional. p. 3-12, 2005.

HAGSATER, E.; M. A. SOTO ARENAS; G. A. SALAZAR CHÁVEZ; R. JIMÉNEZ MACHORRO; M. A. LÓPEZ ROSAS; R. L. DRESSLER. **Las orquídeas de México**. México: Instituto Chinoín, 2005. 303 p.

HOFFMANN, A. M.; PASQUAL, G. R.; CARVALHO, N. N. J.; CHALFUN, J. D. **Cultura de tecidos**: aplicações na propagação de plantas. Lavras: UFLA. 1997. 130 p.

KEARNS, C. A., INOUE, D. W.; WASER, N. M. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 83-112, 1998.

KOPOWITZ, H. **Tropical Slipper Orchids: *Paphiopedilum* and *Phragmipedium* species and hybrids**. Portland: Timber Press, 2008. 411 p.

KUAN, C.; GONZÁLEZ, L. **Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas**. San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. pp 1-16, 47-53, 75-76. 1993.

KUMAR, A.; SOOD, A.; PALNI, L.; GUPTA, A. K. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis - Micropropagation of gladiolus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 57, n. 2, p. 105-112, 1999.

LEE, J. Y LEE H. **Micropropagación de orquídeas a partir de semillas**. Boletín informativo de FIRA XXIV, n. 2 p. 15-30. 1991.

MACHADO, G. S.; VENTURIERI, G. A. Meios para germinação e crescimento de *Encyclia randii* Porto & Brade – Orchidaceae. In: Reunião Anual da SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC, 2006

MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. S. propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 36 n. 10, p. 24-29, 2001.

MILANEZE, M. A. **Estudos em orquídeas nativas do Brasil:** Morfologia de sementes e cultivo assimbiótico. Rio Claro, 234 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista. 1997.

MINISTRO DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção.** 2008. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-florestais/wp-content/files/IN-MMA_06-2008.pdf>. Acesso em: 22 de out. 2010.

MURTHY, N.; PYATI, A. N. Micropropagation of *Aerides maculosum* lindl. (Orchidaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 37, n. 2, p.10 -13, 2001.

NAYAK, N. R., S. PATNAIK; RATH, S. P. Direct shoot regeneration from foliar explant of anepiphytic orchid *Acampe praemorsa* (Rosb.) Blatter and McCann. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, n.1, p. 538-586, 1997.

PAULA, C. C., SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas.** Viçosa: UFV, 2001. 63p.

PAUW, M. A. de; REMPHREY, W. R.; PALMER, C. E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and growth of *Cypripedium candidum*. **Annals of Botany**, London, v. 75, p. 267-275, 1995.

PINHEIRO, F., BARROS, F.; LOURENÇO, R. A. O que é uma orquídea? In: F. Barros; G. B., Kerbauy (orgs.). **Orquidologia sul-americana:** uma compilação científica. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, p. 11-33. 2004.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum.** New York: Oxford University Press, v.2, 2001. 416p.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum.** New York: Oxford University Press, v.3, 2003. 358 p.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press, v.4, 2005. 672 p.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum**. v. 1. New York: Oxford University Press. 1999. 197p.

ROBERTS, D. L.; BRODIE, C.; KOWALCZYK, J. **An introduction to slipper orchids covered by the convention on international trade in endangered species**. London: Royal Botanic Gardens, Kew. 2006.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SEENI, S.; P. G. LATHA. *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2000.

SILVA, W. **O cultivo de orquídeas no Brasil**. 4 ed. São Paulo: Nobel, 1977. 98 p.

SKREBSKY, E. C., NICOLOSO, F. T.; FERRAO, G. da E. Sucrose and duration of *in vitro* growth on *ex vitro* acclimatization of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p.1471-1477, 2004.

SOUZA, A. DA S.; JUNGHANS, T. G. (Org.). **Introdução à Micropropagação de Plantas**. 1 ed., v. 1, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

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

TENG, W. L.; NICHOLSON, L.; TENG, M. C. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, n. 12, p. 831-835, 1997.

TISSERAT, B.; JONES, D. Clonal propagation of Orchids. *In: Methods in Molecular Biology*. **Plant Cell Culture Protocols**, Netherlands, v. 111, n. 12, p. 127-134, 1999.

TOMASONI, M. A.; SANTOS, S. D. Lágrimas da Serra: Os impactos das atividades agropecuárias sobre o geossistema da APA Municipal da Serra da Jibóia, no Município de Elísio Medrado-BA. *In: Simpósio Nacional de Geografia Física Aplicada*, 10., 2003, **Anais...** Rio de Janeiro, RJ, 2003.

VAN DEN PIJL, L.; DODSON, C. H. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. Coral Gables: University of Miami Press, 1966. 214p.

WATERMAN, R. J.; BIDARTONDO, M. I. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. **Journal of Experimental Botany**, England, v.59, n. 5, p.1085–1096, 2008

CAPÍTULO 1

VARIABILIDADE GENÉTICA EM QUATRO POPULAÇÕES DE ORQUÍDEA SAPATINHO EM SANTA TERESINHA, BAHIA ¹

¹ Artigo ajustado e submetido ao Comitê Editorial da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

VARIABILIDADE GENÉTICA EM QUATRO POPULAÇÕES DE ORQUÍDEA SAPATINHO EM SANTA TERESINHA, BAHIA

RESUMO: O trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética em quatro populações de *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum* em Santa Teresinha, Bahia, a partir da análise morfométrica de caracteres florais. Foram avaliadas quatro populações do Monte da Pioneira, considerando-se 13 caracteres florais e empregando-se métodos estatísticos univariados e multivariados (análise discriminante canônica e análise de agrupamento a partir de distância de Mahalanobis). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações, pelo teste F, para 11 caracteres florais. Os indivíduos das populações 1 e 2 apresentaram maiores tamanhos de peças florais e os indivíduos da população 3 os menores tamanhos. O primeiro eixo canônico separou as populações 1 e 2, da 3 e 4. O segundo eixo canônico separou a população 3 da 1 e 2. De acordo com a análise de agrupamento, a população 3 divergiu das demais. Observou-se que as populações 2 e 3 são as mais distantes geneticamente, e os caracteres florais que mais contribuíram para a formação dos grupos foram a largura e o comprimento da sinsépala.

Palavras-chave: Orchidaceae, *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum*, flor, morfometria, análise multivariada.

GENETIC VARIABILITY IN FOUR POPULATIONS OF THE LADY SLIPPER ORCHID IN SANTA TERESINHA, BAHIA

ABSTRACT: The objective of the present work was to study the genetic variability in four populations of *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum* in Santa Teresinha, Bahia, by morphometric and floral characteristics. Four populations from the Monte da Pioneira, considering 13 floral characteristics and using univariate and multivariate statistical methods (canonical discriminant analysis and cluster analysis with Mahalanobis distance), were evaluated. There was significant difference ($p < 0,05$) between the populations by the F test for 11 floral characteristics. Plants from populations 1 and 2 presented larger flowers and those in population 3, smaller ones. The first canonical axis separated populations 1 and 2 from 3 and 4. The second canonical axis separated population 3 from 1 and 2. According to the cluster analysis, population 3 diverged from the others. Populations 2 and 3 were the most genetically different and the floral characteristics that mostly contributed to the clustering of the groups were width and length of the sinsepal.

Key-words: Orchidaceae, *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum*, flower, morphometry, multivariate analysis.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande diversidade e quantidade de espécies de orquídeas (SACHS, 2002), entretanto muitos representantes desta família estão sob ameaça de extinção nos seus habitats naturais. Os principais fatores de ameaça às orquídeas consistem na coleta de espécies em larga escala para fins comerciais, ornamentais ou medicinais, e nas mudanças das condições ecológicas naturais dos habitats (CRIBB & HERMANS, 2005; DUNKAN & COATES, 2005). A coleta total de uma espécie em um determinado fragmento de mata, além de desencadear desequilíbrio entre outras espécies, levam os infratores a procurarem outros pontos de coletas e assim sucessivamente, ocasionando a sua extinção regional (NAMBA, 2010).

O conhecimento da diversidade genética das orquídeas ocorrentes numa determinada região abre várias possibilidades tanto para a conservação *in situ*, como para o uso sustentável desta diversidade (PERLEBERG, 2009).

O formato das flores, as cores das peças florais e fragrância são responsáveis pelo potencial ornamental das orquídeas, e as peculiaridades de cada gênero ou espécie intensificam a sua importância econômica (MESQUITA *et al.*, 2007). O fato de serem amplamente disseminadas dentro da horticultura, não modifica a situação de muitas espécies que se encontram em vias de extinção, havendo grande necessidade de retirá-las desta condição (FARIA *et al.*, 2001).

As orquídeas sapatinho (Cyripedioideae: Orchidaceae), devido a sua grande importância horticultural, provavelmente constituem a subfamília melhor caracterizada entre as orquídeas, onde extensas coleções têm sido utilizadas como material para estudo contribuindo significativamente para o desenvolvimento de pesquisas científicas (COX *et al.*, 1998). Essa subfamília compreende os gêneros *Cyripedium*, *Selenipedium*, *Phragmipedium*, *Paphiopedilum* e *Mexipedium* (ALBERT, 1994). A separação dos gêneros tem sido realizada por meio de caracteres vegetativos e florais (ATWOOD, 1984),

associados ou não aos marcadores moleculares (CAMERON *et al.*, 1999; BORBA *et al.*, 2002; BORBA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2008).

O gênero *Phragmipedium* encontra-se distribuído desde o México a América do Sul, e está se tornando cada vez mais popular (OAKELEY, 2009). No Brasil, a espécie *P. lindleyanum* var. *sargentianum* é endêmica da Mata Atlântica e pouco se conhece ao seu respeito. O desenvolvimento de estudos envolvendo a variabilidade genética desta espécie possibilitará conhecer o seu comportamento no habitat natural e traçar estratégias para o seu aproveitamento e conservação.

A variabilidade genética de uma espécie pode ser afetada diretamente pela forma e pelo tamanho da população, onde as populações pequenas sofrem mais com os efeitos de endogamia, deriva genética e efeitos estocásticos, promovendo diferenciação através da queda da heterozigosidade e redução na variação dentro da população (CRAWFORD, 1984; LOVELESS & HAMRICK, 1984; HAMRICK, 1989; HAMRICK & GODT, 1990). A variabilidade genética também é essencial para o melhorista, pois sem ela não seria possível a obtenção de progressos no melhoramento das plantas, além disso, viabiliza o emprego de técnicas que possibilitam a identificação de genótipos superiores (COIMBRA *et al.*, 2004).

As flores são menos afetadas por princípios não genéticos de variação do que os órgãos vegetativos. Muitas características florais não somente permanecem relativamente constantes dentro os indivíduos, mas também exibem um plano estereotipado entre populações, espécies e, freqüentemente, famílias (RICHARDS & BARRET, 1992).

Em orquídeas, poucos são os trabalhos envolvendo o estudo da variabilidade genética por meio de caracteres florais. Normalmente empregam-se esses caracteres aliados a técnicas de análise multivariadas para identificação de espécies próximas (PINHEIRO & BARROS, 2007). Tremblay (1997), investigando a variação na morfologia floral entre populações de três espécies de *Lepanthes* Sw. em Porto Rico, verificou que os métodos univariados e multivariados apresentaram diferenças significativas para a maioria dos grupos de indivíduos (populações), demonstrando ser uma técnica eficiente, acessível e de baixo custo.

O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética em quatro populações de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* de Santa Teresinha, Bahia, a partir da análise morfométrica de caracteres florais.

MATERIAL E MÉTODOS.

1. Área de amostragem.

O estudo foi realizado na Serra da Jibóia, região do Monte da Pioneira, nas proximidades da Vila de Pedra Branca em Santa Teresinha no Estado da Bahia, Brasil. A Serra da Jibóia é composta por montes de altitude entre 750 m e 840 m, e se estende no sentido Norte-Sul com uma crista de 26 km de comprimento. Sua área aproximada é de 59,28 km², abrangendo parte do território de cinco municípios integrantes da Região Econômica do Recôncavo Sul da Bahia, sendo eles Varzedo (31%); Santa Teresinha (27%); Elísio Medrado (21%); Castro Alves (19%) e São Miguel das Matas (2%). A localização geográfica da Serra da Jibóia situa-se em uma zona ecótona ou de transição, com clima variando entre o tropical úmido, mais ao Sudeste e ao leste, e o tropical semi-úmido, mais ao Norte e a Oeste. A temperatura média anual é de 21°C e o índice pluviométrico é de 1.200 mm, apresentando variações em função da altitude e da maritimidade. Na serra encontra-se um mosaico de formações vegetais, desde floresta ombrofila densa, passando para a floresta estacional decidual à caatinga arbórea com palmeiras, e no topo os campos rupestres. Os solos variam em função da altitude, mas predominam os latossolos e os podzólicos (TOMASONI & SANTOS, 2003).

2. Material vegetal.

Foram realizadas, em agosto de 2007, viagens de prospecção para localização de populações de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. Das cinco populações identificadas, quatro estavam em período de floração sendo utilizadas para coleta de dados (Tabela 1). As plantas foram escolhidas aleatoriamente em seus locais de origem, e as amostras constituídas por diferentes tamanhos respeitando-se a abundância das populações na natureza (Tabela 1). Devido à coleta indiscriminada e predatória dessa espécie não serão fornecidos dados mais precisos da localização das populações. Para a coleta de dados foram utilizados apenas caracteres florais (Tabela 2), conforme ilustra a Figura 1, sendo eles mensurados em milímetros com auxílio de um paquímetro digital. Para cada caráter considerou-se a média de três flores por planta.

Tabela 1. Populações de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, com respectivos tamanhos amostrais e altitudes dos locais de coleta. Santa Teresinha-BA, 2007.

| População | Tamanho amostral | Altitude (m) |
|-----------|------------------|--------------|
| 1 | 17 | 225-655 |
| 2 | 11 | 246-733 |
| 3 | 10 | 337-463 |
| 4 | 14 | 201-764 |

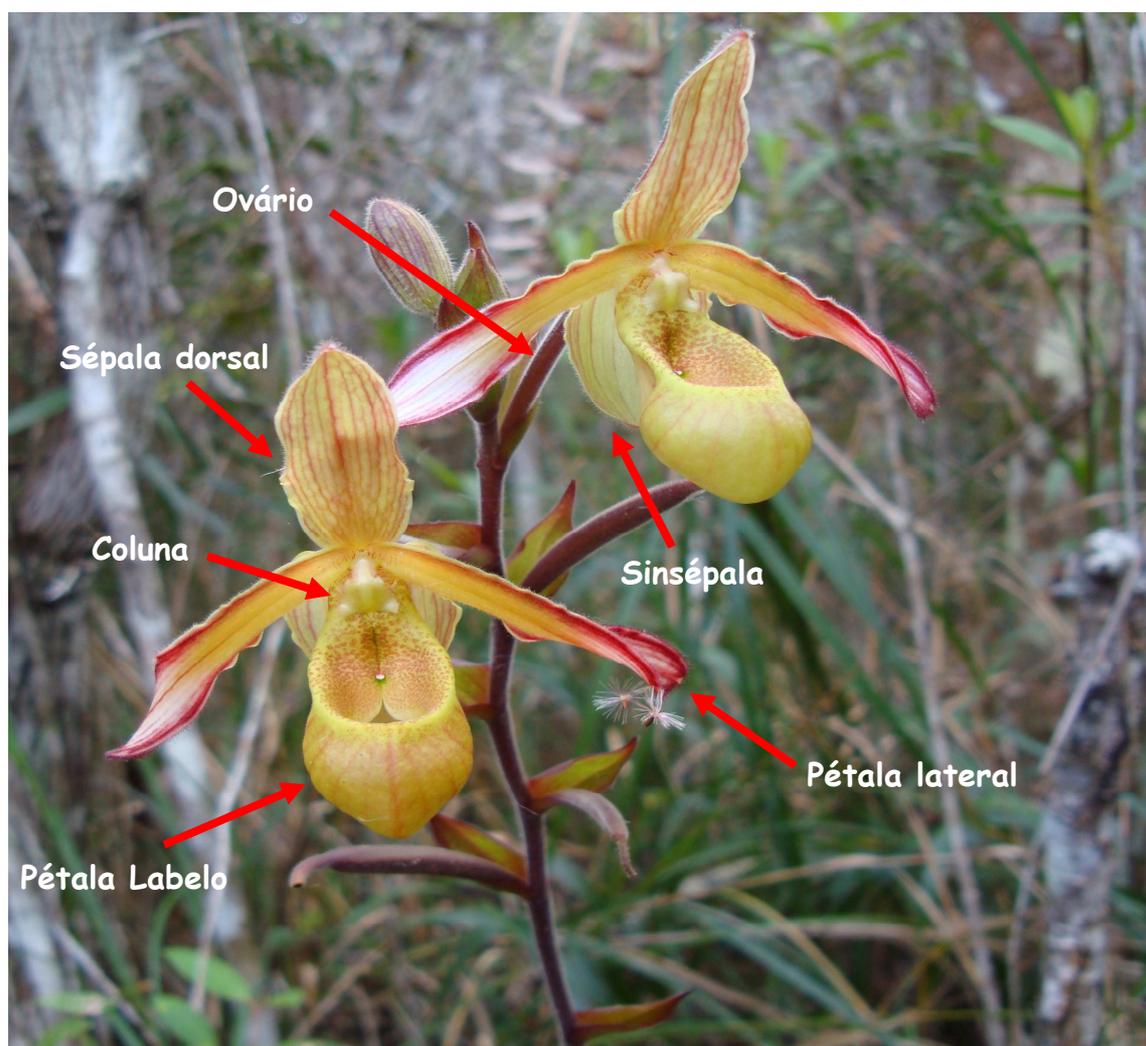


Figura 1. Flores de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. Santa Teresinha-BA, 2007. **Foto:** Daniela de Souza Hansen.

Tabela 2. Caracteres florais avaliados e siglas correspondentes em *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. Santa Teresinha-BA, 2007.

| Caracteres | Sigla dos caracteres |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Comprimento da sépala dorsal | CS |
| Largura da sépala dorsal | LS |
| Comprimento da pétala lateral | CP |
| Largura da pétala lateral | LP |
| Comprimento da sinsépala | CSI |
| Largura da sinsépala | LSI |
| Comprimento da pétala labelo | CL |
| Largura da pétala labelo | LL |
| Diâmetro da entrada da pétala labelo | DL |
| Comprimento do ovário | CO |
| Espessura do ovário | EO |
| Comprimento da coluna | CC |
| Largura da coluna | LC |

3. Análise estatística.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância univariada e a significância das populações foi feita pelo teste de F. As médias das populações foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram calculadas as correlações de Pearson entre os caracteres avaliados e sua significância foi testada pelo teste de t a 5% de probabilidade. Foi realizada análise multivariada de agrupamento considerando a distância generalizada de Mahalanobis. Para o agrupamento entre as populações utilizou-se o método *UPGMA*. Foi calculado o coeficiente de correlação cofenético entre a matriz de distância original e a matriz de agrupamento. Foi realizada também análise multivariada discriminante canônica para verificar as relações entre as populações. Esta análise foi utilizada por considerar as correlações residuais existentes entre as médias das observações, o que se traduz numa vantagem em relação aos componentes principais. Na análise de variáveis canônicas, o princípio de conglomeração baseou-se na distância de Mahalanobis. As análises foram realizadas com os

programas SISVAR (FERREIRA, 2003), GENES (CRUZ, 2001) e STATISTICA (STATSOFT INC., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 pode-se observar que as populações de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na análise de variância pelo teste de *F* para todos os caracteres analisados com exceção da espessura do ovário (EO) e largura da coluna (LC). Pinheiro & Barros (2007), encontram seis caracteres florais que apresentaram diferenças significativas entre *Epidendrum secundum* e *Epidendrum denticulatum*. Cardim et al. (2001), estudando a variabilidade genética intra-específica em *Oncidium varicosum* Lindl., observou que houve diferença significativa entre as populações, pelo teste *F*, para todos os caracteres florais avaliados.

Tabela 3. Análise de variância e teste *F* para os caracteres¹ florais avaliados em quatro populações de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. Santa Teresinha-BA, 2007.

| F.V. | G.L. | Quadrados médios | | | | | | |
|------------|------|------------------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| | | CS ¹ | LS ¹ | CP ¹ | LP ¹ | CSI ¹ | LSI ¹ | CL ¹ |
| Populações | 3 | 422,03** | 109,20** | 784,28** | 57,06** | 427,24** | 219,24** | 295,28** |
| Resíduo | 48 | 3,92 | 1,28 | 3,87 | 0,59 | 1,31 | 0,78 | 5,76 |
| F.V. | G.L. | Quadrados médios | | | | | | |
| | | LL ¹ | DL ¹ | CO ¹ | EO ¹ | CC ¹ | LC ¹ | |
| Populações | 3 | 107,07** | 31,22** | 540,27** | 0,78 ^{ns} | 12,75** | 0,41 ^{ns} | |
| Resíduo | 48 | 1,60 | 2,80 | 23,62 | 0,30 | 0,66 | 0,20 | |

¹ Caracteres descritos na Tabela 2.

^{ns} não significativo, pelo teste *F*, * significativo a 5% pelo teste *F*, ** significativo a 1% pelo teste de *F*.

As médias e os desvios-padrões de todos os caracteres, bem como o teste de Tukey para contrastes entre as médias das populações, encontram-se na Tabela 4. A população 1 apresentou os maiores valores para comprimento da sépala dorsal, largura da sépala dorsal e comprimento da pétala lateral (49,24 mm, 19,41 mm e 68,94 mm, respectivamente), e a população 3 apresentou os menores valores (35,80 mm, 12,60 mm e 51,90 mm, respectivamente). Para comprimento e largura da sinsépala os maiores valores foram observados na população 2 (40,73 mm e 23,82 mm), seguida pela população 1 (36,65 mm e 24,59 mm), e os menores valores na população 3 (26,70 mm e 15,00 mm). O

comprimento, largura e diâmetro da pétala labelo tiveram maiores valores na população 2 (46,82 mm, 24,73 mm e 18,09 mm, respectivamente), enquanto a população 4 apresentou para largura e diâmetro da pétala labelo os menores valores (17,71 mm e 14,36 mm). A população 2 também apresentou os maiores valores para comprimento do ovário (69,27 mm) e comprimento da coluna (5,64 mm).

Tabela 4. Médias e desvios-padrões (entre parênteses) em mm, considerando 13 caracteres em quatro populações de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. Santa Teresinha-BA, 2007.

| Caráter ¹ | População | | | |
|----------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| CS | 49,24 (2,66) a | 40,55 (1,75) c | 35,80 (1,81) d | 44,64 (1,08) b |
| LS | 19,41 (1,73) a | 16,27 (0,47) b | 12,60 (0,70) d | 14,93 (0,73) c |
| CP | 68,94 (2,14) a | 63,91 (1,76) b | 51,90 (0,99) d | 55,93 (2,37) c |
| LP | 11,24 (0,75) b | 14,00 (0,89) a | 8,30 (0,82) c | 11,57 (0,65) b |
| CSI | 36,65 (1,11) b | 40,73 (1,49) a | 26,70 (0,82) d | 30,93 (1,07) c |
| LSI | 24,59 (0,71) a | 23,82 (0,75) a | 15,00 (0,82) c | 20,50 (1,16) b |
| CL | 36,53 (4,00) c | 46,82 (0,87) a | 40,20 (0,79) b | 44,64 (0,74) a |
| LL | 19,53 (1,46) b | 24,73 (1,10) a | 19,80 (0,92) b | 17,71 (1,33) c |
| DL | 16,65 (2,47) ab | 18,09 (1,45) a | 15,60 (0,52) bc | 14,36 (1,01) c |
| CO | 60,94 (6,12) b | 69,27 (5,02) a | 51,90 (0,99) c | 59,00 (4,59) b |
| EO | 3,35 (0,49) a | 3,45 (0,69) a | 3,20 (0,42) a | 3,79 (0,58) a |
| CC | 3,65 (1,00) b | 5,64 (0,50) a | 3,30 (0,48) b | 3,64 (0,93) b |
| LC | 2,82 (0,53) a | 2,91 (0,30) a | 3,00 (0,00) a | 3,21 (0,58) a |

¹ Caracteres descritos na Tabela 2.

Populações com a mesma letra nas linhas não diferem significativamente ($p > 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Os resultados observados nas populações 1 e 2 provavelmente exercem grande influência sobre os vetores de pólen, já que flores com maior tamanho, aliado a sua coloração amarela, podem tornar a espécie mais evidente em meio a vegetação favorecendo o seu sucesso reprodutivo. Cruzamentos entre genótipos das populações 1 e 2 possivelmente favoreçam a obtenção de plantas com boa conformação de flor potencializando a sua aptidão ornamental, podendo servir

também como base para o cruzamento com outras espécies de *Phragmipedium* para a obtenção de híbridos. Características como boa coloração, tamanho e número de flores aumentam o valor comercial de uma espécie. Entretanto a planta para ser inserida no mercado de ornamentais precisa ser competitiva com os híbridos já disponíveis (FILLIETTAZ, 2007). Koopowitz (2008) relata que a espécie *P. lindleyanum* var. *sargentianum* originou 43 híbridos, destacando-se entre eles o *P. Andean Fire* (cruzamento com *P. besseae*).

O conhecimento sobre as correlações de caracteres florais em orquídeas é uma ferramenta importante para a compreensão do seu comportamento na natureza e o melhoramento genético, pois permite conhecer a influência que uma característica terá sobre outras aparentemente independentes. As características morfológicas capazes de diferenciar indivíduos, ou seja, os fenótipos de fácil identificação são normalmente determinados por um único alelo e possuidores de alta herdabilidade (RAMALHO *et al.*, 2004).

Em caracteres florais, devido à especificidade entre flor e agente polinizador, a influência do ambiente é mínima e a sua variabilidade é quase que exclusivamente genética (CARDIM *et al.*, 2001), desta forma a seleção de genótipos com características de interesse pode ser realizada em qualquer ano de floração. Assim, nas correlações fenotípicas positivas e significativas, os caracteres podem ser considerados uma única unidade de seleção, enquanto nas correlações negativas, há dificuldade em selecionar, simultaneamente, os caracteres superiores.

A Tabela 5 apresenta os resultados da correlação entre as peças florais de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. A alta correlação observada entre vários pares de caracteres justificou a realização de análises multivariadas (MANLY, 1994).

Tabela 5. Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os pares de caracteres florais em quatro populações de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. Santa Teresinha-BA, 2007.

| | LS ¹ | CP ¹ | LP ¹ | CSI ¹ | LSI ¹ | CL ¹ | LL ¹ | DL ¹ | CO ¹ | EO ¹ | CC ¹ | LC ¹ |
|------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| CS¹ | 0,76** | 0,68** | 0,25 ^{ns} | 0,38** | 0,70** | -0,31* | -0,24 ^{ns} | 0,07 ^{ns} | 0,20 ^{ns} | 0,08 ^{ns} | -0,10 ^{ns} | -0,05 ^{ns} |
| LS¹ | | 0,85** | 0,34** | 0,65** | 0,81** | -0,49** | 0,06 ^{ns} | 0,19 ^{ns} | 0,37* | -0,09 ^{ns} | 0,11 ^{ns} | -0,13 ^{ns} |
| CP¹ | | | 0,45** | 0,79** | 0,88** | -0,35* | 0,26 ^{ns} | 0,45* | 0,45* | -0,13 ^{ns} | 0,25 ^{ns} | -0,27* |
| LP¹ | | | | 0,78** | 0,68** | 0,43* | 0,49** | 0,36* | 0,66** | 0,23 ^{ns} | 0,55** | -0,10 ^{ns} |
| CSI¹ | | | | | 0,85** | 0,06 ^{ns} | 0,60** | 0,47** | 0,74** | -0,02 ^{ns} | 0,54** | -0,23 ^{ns} |
| LSI¹ | | | | | | -0,12 ^{ns} | 0,24 ^{ns} | 0,31* | 0,57** | -0,01 ^{ns} | 0,34* | -0,13 ^{ns} |
| CL¹ | | | | | | | 0,37* | 0,18 ^{ns} | 0,25 ^{ns} | 0,25 ^{ns} | 0,51** | 0,30* |
| LL¹ | | | | | | | | 0,55** | 0,51** | -0,14 ^{ns} | 0,54** | -0,28* |
| DL¹ | | | | | | | | | 0,26 ^{ns} | 0,08 ^{ns} | 0,41* | -0,10 ^{ns} |
| CO¹ | | | | | | | | | | 0,24 ^{ns} | 0,42* | -0,11 ^{ns} |
| EO¹ | | | | | | | | | | | 0,00 ^{ns} | 0,25 ^{ns} |
| CC¹ | | | | | | | | | | | | 0,22 ^{ns} |

¹. Caracteres descritos na Tabela 2.

** e * significativo a 1% e 5%, respectivamente pelo teste de t; **ns**= não significativo.

Houve associação positiva e significativa entre comprimento da sépala dorsal (CS) e largura da sépala dorsal (LS), comprimento da pétala lateral (CP), comprimento da sinsépala (CSI) e largura da sinsépala (LSI), enquanto que a associação negativa significativa foi observada com o comprimento da pétala labelo (CL). Esse resultado indica que genótipos com maior comprimento da sépala possuem flores maiores e provavelmente mais atrativas aos polinizadores na natureza. Entretanto, quando se pretende trabalhar com o melhoramento genético visando um mercado de plantas ornamentais essa característica apesar de possibilitar a obtenção de flores maiores irá proporcionar uma pétala labelo de menor tamanho, o que não é desejável já que sua beleza reside em seu formato exótico.

A largura da pétala lateral é uma característica que agrada bastante aos admiradores de orquídeas, e na correlação realizada verificou-se sua associação positiva e significativa principalmente com o comprimento, largura e diâmetro da pétala labelo. A pétala labelo das orquídeas sapatinho está relacionado ao mecanismo de polinização das espécies (tipo armadilha), conseqüentemente uma pétala labelo maior pode aumentar a probabilidade da flor ser polinizada. A dimensão da boca da pétala labelo e dos orifícios de escape (saída da pétala labelo onde se encontra o estigma e anteras), por exemplo, podem determinar possíveis polinizadores (STOUTAMIRE, 1967).

A largura da pétala lateral também esta associada positivamente e significativamente com o comprimento do ovário e comprimento da coluna. Um maior comprimento do ovário é interessante, pois possibilita uma melhor visualização da flor no escapo floral, já que antes de ser fecundado confunde-se com o pedicelo.

O comprimento da pétala labelo está associado positivamente e significativamente com a largura da coluna. O contato dos agentes polinizadores com a coluna irá influenciar no sucesso reprodutivo das espécies, portanto quanto maior o seu comprimento e largura, maiores as chances de polinização, já que este caráter floral compreende os órgãos sexuais masculinos e femininos.

A análise discriminante canônica tem por finalidade obter a melhor discriminação entre os indivíduos, alocando-os em suas devidas populações, e permitir a classificação de novos materiais genéticos, de comportamento desconhecido, em populações já conhecidas (CRUZ, 2006).

Na Figura 2, pode-se observar os grupos formados pela análise discriminante canônica, onde verifica-se que o primeiro eixo canônico, que representa 81,46% da

variação (Tabela 6), separou completamente as populações 1 e 2 das populações 3 e 4. No segundo eixo canônico, que representa 13,94% da variação (Tabela 6), a população 3 separa-se completamente da população 1 e 2. O primeiro e o segundo eixo canônico representam 95,40% da variação total observada entre as populações. Esses resultados são concordantes com aqueles apresentados pela Tabela 4, havendo uma separação por gradiente de tamanho das flores. Comportamento semelhante foi observado por Cardim et al. (2001), estudando a variabilidade genética intra-específica em *Oncidium varicosum* Lindl.

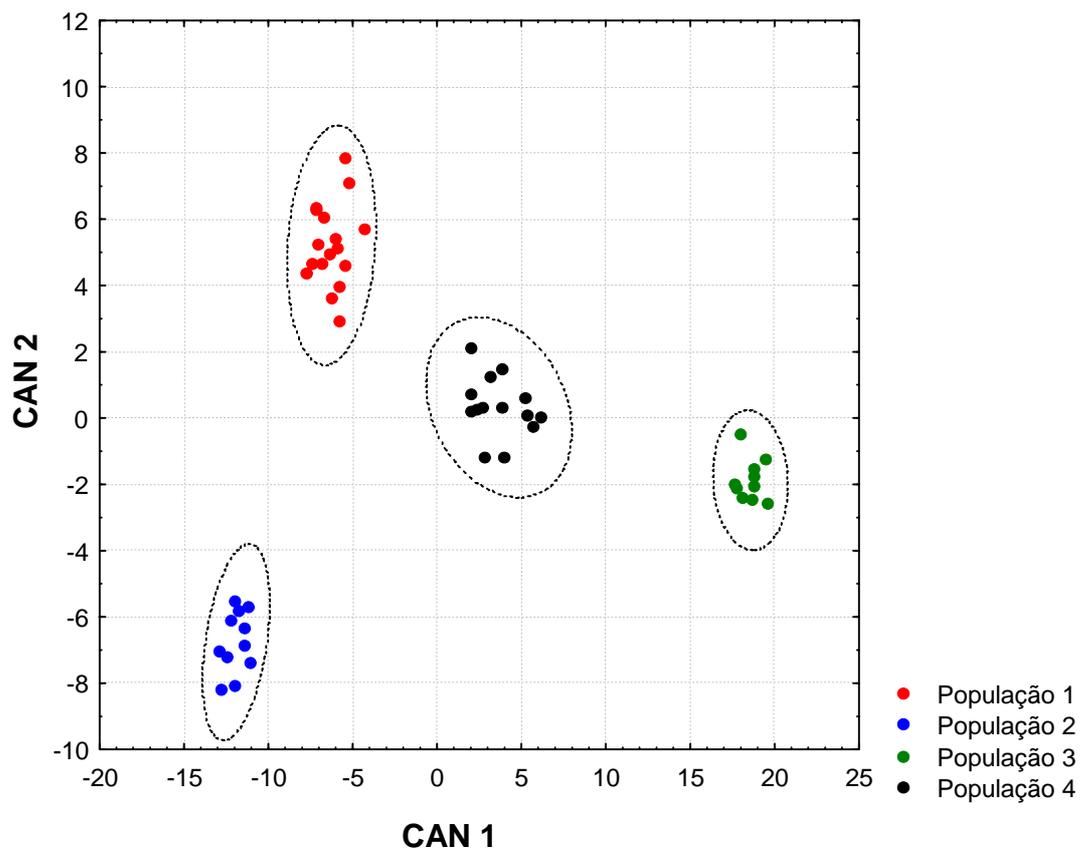


Figura 2. Escores provenientes da análise discriminante canônica entre quatro populações de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, considerando o primeiro e o segundo eixo canônico. Santa Teresinha-BA, 2007.

Tabela 6. Coeficiente padronizado para os caracteres florais em quatro populações *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. Santa Teresinha-BA, 2007.

| Caracteres | Eixo Canônico | |
|---------------|---------------|--------|
| | CAN 1 | CAN 2 |
| CS | 0,060 | 0,803 |
| LS | -0,777 | 0,132 |
| CP | -0,245 | 0,383 |
| LP | -0,430 | -0,278 |
| CSI | -0,846 | -0,153 |
| LSI | -0,970 | -0,036 |
| CL | -0,981 | -0,559 |
| LL | -0,045 | -0,457 |
| DL | -0,020 | -0,093 |
| CO | -0,075 | -0,307 |
| EO | -0,415 | 0,354 |
| CC | 0,029 | -0,313 |
| LC | 0,402 | -0,087 |
| % Acumulativa | 81,46 | 13,94 |

Para testar o poder discriminatório da análise discriminante canônica realizou-se a análise de agrupamento de acordo com o método UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade fundamentada nas distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2). Na Figura 2 observa-se o fenograma resultante da análise que revelou o aparecimento de dois grupos distintos. O coeficiente de correlação cofenético foi médio (0,72), pois valores abaixo de 0,8 indicam distorções significativas no fenograma. A partir dos resultados da análise de agrupamento (Figura 3), sugere-se que as quatro populações sejam classificadas em dois grupos: o primeiro formado pelas populações 1, 2 e 4, que são mais próximas entre si, e o segundo formado pela população 3.

As variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos, por ordem de importância foram LSI (29,46%), CSI (28,65%), LS (10,19%), LP (8,81%), CP (6,61%), CL (6,38%), CS (3,59%), LL (3,33%), CO (1,10%), DL (0,60%), CC (0,55%), EO (0,40%), LC (0,31%).

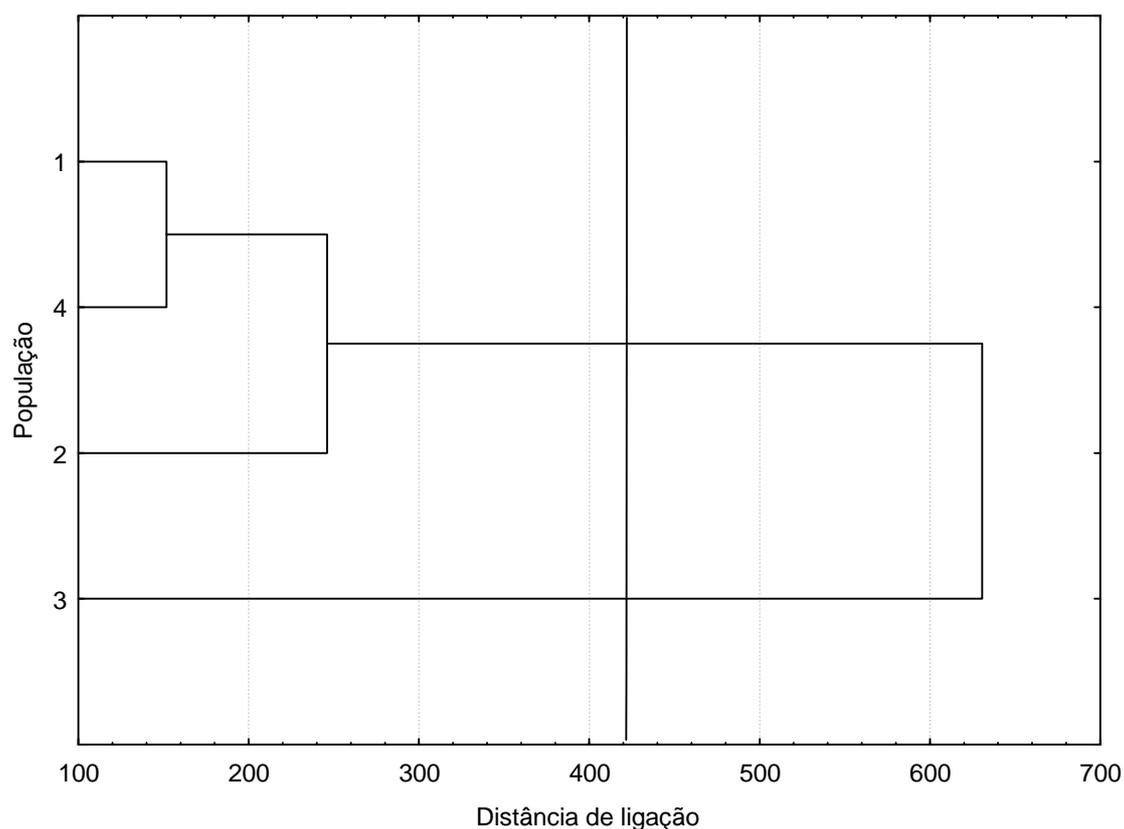


Figura 3. Fenograma obtido a partir da distância generalizada de Mahalanobis entre as quatro populações de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, pelo método UPGMA, considerando caracteres florais. Ponto de corte = 422,62; Correlação cofenética = 0,72. Santa Teresinha-BA, 2007.

A Tabela 7 indica que as populações 2 e 3 são as mais distantes entre si, em concordância com os dois eixos da análise discriminante canônica (Figura 2). O método de agrupamento utilizado foi eficiente indicando que os grupos foram bem definidos.

Tabela 7. Distância generalizada de Mahalanobis entre as quatro populações *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. Santa Teresinha-BA, 2007.

| População | População | | | |
|-----------|-----------|--------|--------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,00 | | | |
| 2 | 175,83 | 0,00 | | |
| 3 | 667,33 | 955,15 | 0,00 | |
| 4 | 151,85 | 316,17 | 269,40 | 0,00 |

O agrupamento obtido para as populações 1, 2 e 4 (Figura 3) provavelmente se deve a um alto fluxo gênico entre elas. Em orquídeas, o vento favorece o fluxo gênico principalmente por meio das sementes. Os tipos de vetores de pólen exercem também grande influência no fluxo gênico das populações, a exemplo das pequenas abelhas dos gêneros *Trigona* e *Melipona* que tem um alcance intermediário por não se distanciarem mais que 200 m de suas colônias (JAZEN, 1971). A polinização por pseudo-mecanismos observada em algumas orquídeas influencia no fluxo gênico das espécies, já que o polinizador ao perceber que está sendo enganado permanece pouco tempo nas flores e vai normalmente embora da população (DRESSLER, 1981; NILSSON, 1992; BORBA & BRAGA, 2003). O isolamento das populações seria máximo se a reprodução ocorresse em sua maioria por autogamia. A autogamia tem sido considerada como uma forma de reprodução que promove baixa variabilidade genética (FAEGRI & VAN DER PIJL, 1979), entretanto a família Orchidaceae apresenta alguns mecanismos para evitar a autopolinização e hibridização entre espécies, principalmente ao nível de polinização (VAN DEN PIJL & DODSON, 1966; DRESSLER, 1993). Em estudo desenvolvido por Peakall & Beattie (1991) foram encontradas evidências de intensa endogamia em populações de uma orquídea australiana polinizada por formigas (51% de autopolinização).

CONCLUSÃO

Existe variabilidade genética entre as populações para a morfometria das peças florais, principalmente entre as populações 2 e 3 por serem mais distantes geneticamente, possibilitando o seu uso em futuras hibridizações, trabalhos de melhoramento genético e conservação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, V. A. Cladistic relationships of the slipper orchids (Cypripedioideae:Orchidaceae) from congruent morphological and molecular data. *Lindleyana*, West Palm Beach, v. 9, n.2, p. 115-132, 1994.
- ATWOOD, J. The relationships of the slipper orchids (subfamily *Cypripedioideae*). *Selbyana*, Maryland, v.7, n.2/4, p.129- 247, 1984.

BORBA E. L., SHEPHERD G. J., VAN DEN BERG C., SEMIR J. Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothalis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. **Annals of Botany**, England, v.90, n.1, p. 219–230, 2002.

BORBA, E. L.; BRAGA, P. I. S. Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.4, p.541-549, 2003.

BORBA, E. L.; FUNCH, R. R.; RIBEIRO, P. L.; SMIDT, E. C.; SILVA-PEREIRA, V. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophranitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, Springer-Verlag, v. 267, n.1-4, p.129–146, 2007.

CAMERON, K. M.; CHASE, M. W.; WHITTEN, W. M.; KORES, P. J.; JARRELL, D. C.; ALBERT, V. A.; YUKAWA, T.; HILLS, H. G.; GOLDMAN, D. H. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *RBCL* nucleotide sequences. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.86, n.2, p. 208–224, 1999.

CARDIM, D. C.; CARLINI-GARCIA, L. A.; MONDIN, M.; MARTINS, M.; VEASEY, E. A.; ANDO, A. Variabilidade intra-específica em cinco populações de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae - Oncidiinae) em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.4 (suplemento), p.553-560, 2001.

COIMBRA, J. L. M.; CARVALHO, F. I. F. de; OLIVEIRA, A. C. de; GUIDOLIN, A. F. Criação de variabilidade genética no caráter estatura de planta em aveia: hibridação artificial x mutação induzida. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n. 3, p. 273-280, 2004.

COX, A. V.; ABDELNOUR, G. J.; BENNETT, M. D. Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, MO, v.85, n.5, p. 681–687, 1998.

CRAWFORD, T. J. What is a population? In: Shorrocks, B. (ed.). **Evolutionary ecology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 135 – 174. 1984.

CRIBB, P. D. R.; HERMANS. J. Distribution, ecology, and threat to selected Madagascan Orchids. **Selbyana**, Sarasota, FL, v. 26, n. 1, 2, p.125-135, 2005.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: análise multivariada e simulação. Viçosa, MG: UFV, 2006. 175 p.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2001. 648 p.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Havard University Press, 1993. 314p.

DRESSLER, R. L. **The orchids**: natural history and classification. Cambridge: Havard University Press, 1981. 352p.

DUNKAN, M., A. P.; COATES, F. Major threats to endangered orchids of Victoria, Australia. **Selbyana**, Sarasota, FL, v. 26, n.1,2, p.189-195, 2005.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. 2.ed. Oxford: Pergamon Press. 1979. 291p.

FARIA, R. T.; REGO, R. V.; BERNARDI, A.; MOLINARI, H. Performance of different genotypes of brazilian orchid cultivation in alternatives substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.44, n.4, p.337-342, 2001.

FERREIRA, D. F. **SISVAR software**: versão 4.6. Lavras: UFLA/DEX, 2003. Software.

FILLIETTAZ, A. Melhoramento genético de plantas ornamentais. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.95, 2007.

HAGSATER, E.; M. A. SOTO ARENAS; G. A. SALAZAR CHÁVEZ; R. JIMÉNEZ MACHORRO; M. A. LÓPEZ ROSAS; R. L. DRESSLER. **Las orquídeas de México**. México: Instituto Chinoin, 2005. 303 p.

HAMRICK, J. L. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P., ed. **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations**. London: Chapman and Hall, p. 87-105, 1989.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S., ed. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, p. 43-63, 1990.

JAZEN, D. H. **Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical trees**. Washington: Science, p.171-203, 1971.

KOPOWITZ, H. **Tropical Slipper Orchids: *Paphiopedilum* and *Phragmipedium* species and hybrids**. Portland: Timber Press, 2008. 411 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant population. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.15, n.1, p. 65-95, 1984.

MANLY, B. F. J. **Multivariate statistical methods: a primer**. 2 ed. London: Chapman & Hall, 1994. 215p.

MESQUITA, E. R.; FONTES, A. A.; RODRIGUES, D. T.; GROSSI, J. A. S.; ALVAREZ, V. V. H. Crescimento de *Epidendrum ibaguensis* e *Laelia purpurata* em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.13, n.1, p. 1813-1816, 2007.

NAMBA, J. K. **Cultivo de Orquídeas**. 2010. Disponível em: <<http://www.aorquidea.com.br/arquivo002.pdf>>. Acesso em: 01 novembro 2010.

NILSON, L. A. Orchid pollination biology. **Trends in Ecology & Evolution**, Londres, v.7, n.8, p.255–259, 1992.

OAKELEY, H. *Phragmipedium*. **Orchid Society of Great Britain Journal**, London, v.58, n.3, p.158-167, 2009.

PEAKALL, R.; BEATTIE, A. J. The genetic consequences of worker ant pollination in a self-compatible clonal orchid. **Evolution**, Kansas, v.45, n.8, p.1837-1848, 1991.

PERLEBERG, T. D. **A família Orchidaceae no Morro Quilongongo**. Pelotas, RS, 2009. 155f. Dissertação (mestrado em Sistemas de Produção Agrícola Familiar). Universidade Federal de Pelotas, UFP.

PINHEIRO, F.; BARROS, F. de. Epidendrum secundum Jacq. e E. denticulatum Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. **Hoehnea**, São Paulo, v.34, n.4, p.563-570, 2007.

RAMALHO, M. A. P; SANTOS, J. B; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. Lavras: UFLA, 2004. 472 p.

RIBEIRO, P. L.; BORBA, E. L.; SMIDT, E. DE C.; LAMBERT, S. M.; SCHNADELBACH, A. S.; VAN DEN BERG, C. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. **Plant Systematics and Evolution**, Springer-Verlag, v.270, n.1-2, p.109–137, 2008.

RICHARDS, J. H.; BARRET, S. C. H. The development of heterostyly. In: BARRET, S. C. H. (ed.). **Evolution and function**. Monographs on theoretical and applied genetics. Springer-Verlag, Berlin, p. 86-127.1992.

SACHS, O. V. J. Cultivo de orquídeas. **Brasil orquídeas**, São Paulo, v.2, n.1, p. 23-28, 2002.

STATSOFT. **Statistica for Windows**: [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, 1999.

STOUTAMIRE, W. P. Flower biology of the lady's slippers (Orchidaceae: *Cypripedium*). **Michigan Botanist**, Michigan, v. 6, n.3, p.107–119, 1967.

TOMASONI, M. A.; SANTOS, S. D. Lágrimas da Serra: Os impactos das atividades agropecuárias sobre o geossistema da APA Municipal da Serra da Jibóia, no

Município de Elísio Medrado-BA. In: Simpósio Nacional de Geografia Física Aplicada, 10., 2003, **Anais...** Rio de Janeiro, RJ, 2003.

TREMBLAY, R. L. Morphological variance among populations of three tropical orchids with restricted gene flow. **Plant Species Biology**, Kyoto, v.12, n.2-3, p. 85-96, 1997.

VAN DEN PIJL, L.; DODSON, C. H. **Orchid flowers:** their pollination and evolution. Coral Gables: University of Miami Press, 1966. 214p.

CAPÍTULO 2

BIOLOGIA FLORAL DE ORQUÍDEA SAPATINHO EM REMANESCENTE DE MATA ATLÂNTICA, BAHIA, BRASIL. ¹

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Australian Journal of Botany.

BIOLOGIA FLORAL DE ORQUÍDEA SAPATINHO EM REMANESCENTE DE MATA ATLÂNTICA, BAHIA, BRASIL.

RESUMO: O objetivo do trabalho foi analisar a biologia floral de *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum* na Serra da Jibóia, município de Santa Teresinha, Bahia, Brasil, por meio de estudos sobre a fenologia da floração, morfologia floral, sistema reprodutivo, visitantes florais e padrão de distribuição espacial, visando propor ações fundamentadas de restauração para a conservação da espécie. O estudo da fenologia da floração foi realizado durante três anos onde se verificou o período de início, o pico e o final da floração. A morfologia floral foi realizada em campo e laboratório por meio de aferições e descrição das peças florais. O sistema reprodutivo foi verificado por meio de testes de polinização. O estudo sobre os visitantes florais foi realizado por meio de observações em campo. O estudo sobre o padrão de distribuição espacial foi realizado amostrando-se 140 parcelas de 4m² cada, inventariando os indivíduos jovens e adultos das parcelas, e calculando-se o índice de Morisita (IM) e a razão de variância/média (R). A floração durou cerca de 2 meses e meio, e o seu pico ocorreu em setembro. As flores duraram em média 9,4 dias, foram amarelas, inodoras, zigomorfas, decíduas, possuíram aproximadamente 8,0 x 12,0 cm, posicionaram-se uma a quatro no topo do escapo floral e em algumas ramificações na parte superior. A frutificação natural foi alta, assim como a frutificação após a polinização cruzada manual e autopolinização manual, e os frutos necessitaram de cerca de 75 dias para alcançarem a maturidade. Os principais visitantes florais foram os curculionídeos *Montella* sp. e *Stethobaris* sp., e as abelhas *Nannotrigona testaceicornis*, *Trigona fuscipennis* Friese e *Augochloropsis* sp. O padrão de distribuição espacial foi agregado.

Palavras-chave: *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum*, fenologia, reprodução, visitantes florais, distribuição espacial.

FLORAL BIOLOGY OF THE LADY SLIPPER ORCHID IN REMAINING ATLANTIC FOREST IN BAHIA, BRAZIL.

ABSTRACT: The objective of the present work was to analyze the floral biology of *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum* in Serra da Jibóia in the county of Santa Teresinha, Bahia, Brazil, by studying the floral phenology, floral morphology, reproductive system, floral visitors and special distribution pattern aiming to provide basic fundamental restoration practices for preservation of the species. The floral phenology study was carried out during three years whereas the initial peak and final flowering period were analyzed. Floral morphology was carried out in the field and in the laboratory by measurements and description of the flowers. The reproductive system was evaluated by pollination tests. Study regarding floral visitors was carried out by field observations. The study regarding the spacial distribution pattern was carried out by sampling 140 plots of 4m² each, counting the young and adult plants of the plots and calculating the Morisita index (MI) and the variance/average ratio (R). Flowering lasted for approximately 2 months and a half and its peak was in September. Flowers lasted in average, 9.4 days, were yellow, scentless, zigomorphic, deciduous, approximately 8.0 x 12.0 cm, 1 to 4 positioned at the top of the floral scape and in some ramifications at the top. Natural frutification was high as well as frutification after manual cross pollination and self manual pollination and fruits needed approximately 75 days in order to reach maturity. Main floral visitors were the *Montella* sp. and *Stethobaris* sp. weevils and *Nannotrigona testaceicornis*, *Trigona fuscipennis* Friese and *Augochloropsis* sp. bees. The spacial distribution pattern was aggregated.

Key-words: *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum*, phenology, reproduction. flower visitors, special distribution.

INTRODUÇÃO

O gênero *Phragmipedium*, conhecido popularmente, como “sapatinho”, pertence à subfamília Cypridioideae, encontra-se distribuído desde o México à América do Sul e abrange 21 espécies em seis seções classificadas como *Phragmipedium*, *Himantopetalum*, *Lorifolia*, *Micropetalum*, *Platypetalum* e *Schluckebieria*, (GRUSS, 2003; BRAEM, 2004; OAKELEY, 2009). A lista oficial da flora brasileira ameaçada de extinção (MMA, 2008) inclui *Phragmipedium lindleyanum* (R.H.Schomb. ex Lindl.) Rolfe var. *sargentianum* (Rolfe) O. Gruss, uma espécie de distribuição restrita ao bioma Mata Atlântica. No Brasil, esta espécie é encontrada apenas nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro (FELIX & GUERRA, 2005; BARBOSA, 2007; AMORIM *et al.*, 2009). Esta espécie, como as demais da subfamília Cypridioideae, difere das outras orquídeas por possuir dois estames férteis; uma sépala dorsal grande e uma sinsépala composta por sépalas laterais fundidas; um labelo grande em forma de saco; e um estaminóide grande em forma de escudo (BURNS-BALOGH & HESSE, 1988; COX *et al.*, 1997).

A maioria das espécies de orquídeas tende a ser polinizada por uma ou poucas espécies de polinizadores (DODSON, 1962; VAN DER PIJL & DODSON, 1966; TREMBLAY, 1992). Apesar de muitas vezes não apresentarem barreiras reprodutivas, tanto inter como intra-específica, adaptações morfológicas para polinizadores específicos asseguram, na maioria das vezes, a polinização cruzada. Estes são considerados os fatores mais importantes no desenvolvimento e manutenção do grande número de espécies na família (GARAY, 1960; DODSON, 1962; VAN DER PIJL & DODSON, 1966; FAEGRI & VAN DER PIJL, 1979). Por essa razão, vários autores como Dodson (1962), Dressler (1968, 1981, 1993) e van der Pijl & Dodson (1966) vêm enfatizando a importância de se conhecer a biologia reprodutiva das espécies de Orchidaceae, principalmente a polinização, para melhor entendimento dos padrões de variação e da evolução deste grupo e, partindo

desses conhecimentos, elaborarem um sistema de classificação mais natural para a família.

As Orchidaceae normalmente atraem seus polinizadores por meio de recompensas como pólen, néctar, óleos florais, tricomas, resinas e compostos aromáticos. Outras atraem os polinizadores enganando-os por meio de caracteres como cores e fragrâncias florais, que estimulam a busca por alimento. Há também aquelas que produzem fragrâncias florais mimetizando os feromônios sexuais de fêmeas de insetos, ou que possuem características da flor semelhantes a fêmeas de insetos atraindo-os pela possibilidade de copulação. Entre os grupos de insetos responsáveis pela polinização de orquídeas têm-se as ordens Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera e Coleoptera, (VAN DER PIJL & DODSON, 1966; GREGG, 1991a,b; KAISER, 1993; SINGER, 2004).

No gênero *Phragmipedium*, as flores funcionam como armadilhas que capturam os insetos, e na tentativa de saírem da pétala labelo encontram em seu caminho os órgãos sexuais da flor. Estas armadilhas só tendem a funcionar se o inseto vetor é do tipo e tamanho apropriados. Se o vetor é muito grande, ele será incapaz de escapar e vai morrer na armadilha. Se for muito pequeno, pode escapar, mas ser incapaz para efeito de polinização. Nessas espécies o polinizador normalmente é uma abelha ou uma pequena mosca da família Syrphidae (DRESSLER, 1993; KOOPOWITZ, 2008).

A morfologia floral também tem grande influência sobre a polinização, pois pode favorecer a transferência de pólen entre as flores ou desestimular ou impedir o acesso aos recursos florais por outros animais que não os agentes de polinização mais eficientes (WILSON & THOMSON, 1996; AIGNER, 2004). O modo como o pólen é depositado e removido do corpo dos polinizadores e a quantidade de pólen transferido por visita também está relacionado à morfologia da flor (CAMPBELL *et al.*, 1991).

Em *Orchidaceae*, a ocorrência de autopolinização é evitada, principalmente, devido à existência de mecanismos florais (JOHANSEN, 1990). A coluna ou ginostêmio é a principal parte do aparelho reprodutor das orquídeas sendo constituído por pistilos e estames. Esta estrutura localiza-se na porção inferior da pétala labelo e nela encontra-se inserido o estilete e o estigma que serve de condutor do tubo polínico ao ovário. No ápice do filete do estame encontra-se uma porção dilatada sacular que encerra as políneas, constituídas por massas de grãos de pólen agrupadas na antera (BLOSSFELD, 1999).

Estudos da biologia floral e seus eventos biológicos possibilitam auxiliar às etapas de manejo, domesticação e melhoramento genético de espécies, explicar as relações existentes entre as plantas e o ambiente em que vivem, além de contribuir na interpretação de mecanismos relacionados à polinização (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O conhecimento sobre a fenologia floral permite estabelecer o momento, duração e intensidade da florada em uma espécie, assim como a sua influência sobre o comportamento dos polinizadores (AKER, 1982; TSCHAPKA, 2004). Estudos fenológicos procuram discutir como eventos biológicos repetitivos, tais como floração e frutificação, estão relacionados com a sazonalidade climática e as interações ecológicas (FRANKIE *et al.*, 1974). Entretanto, a fenologia das plantas pode ser interrompida devido a alterações climáticas ocasionadas por perturbações ambientais e mudanças de paisagens.

O objetivo deste trabalho foi analisar a biologia floral de *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum* na Serra da Jibóia, município de Santa Teresinha, Bahia, Brasil, por meio de estudos sobre a fenologia da floração, morfologia floral, sistema reprodutivo, visitantes florais e padrão de distribuição espacial, visando propor ações fundamentadas de restauração para a conservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local de estudo.

O estudo foi realizado na Serra da Jibóia, região do Monte da Pioneira, nas proximidades da Vila de Pedra Branca em Santa Teresinha no Estado da Bahia, Brasil. A Serra da Jibóia é composta por montes de altitude entre 750 m e 840 m, e se estende no sentido Norte-Sul com uma crista de 26 km de comprimento. Sua área aproximada é de 59,28 km², abrangendo parte do território de cinco municípios integrantes da Região Econômica do Recôncavo Sul da Bahia, sendo eles Varzedo (31%); Santa Teresinha (27%); Elísio Medrado (21%); Castro Alves (19%) e São Miguel das Matas (2%). A localização geográfica da Serra da Jibóia situa-se em uma zona ecótona ou de transição, com clima variando entre o tropical úmido, mas ao Sudeste e ao leste, e o tropical semi-úmido, mais ao Norte e a Oeste. A temperatura média anual é de 21°C e o índice pluviométrico é de 1.200 mm, apresentando variações em função da altitude e da maritimidade. Na serra encontra-se um mosaico de formações vegetais, desde floresta ombrófila densa, passando para a

floresta estacional decidual à caatinga arbórea com palmeiras, e no topo os campos rupestres. Os solos variam em função da altitude, mas predominam os latossolos e os podzólicos (TOMASONI & SANTOS, 2003).

2. Material vegetal.

Foram utilizadas plantas, flores e frutos de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* para a coleta de dados e confecção de excicata. O material testemunho foi herborizado e está depositado no herbário da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) – D.S. Hansen 001. Devido à coleta indiscriminada e predatória dessa espécie não serão fornecidos dados mais precisos da população encontrada.

3. Fenologia da floração.

A observação da fenologia floral foi realizada de oito em oito dias, nos meses de julho a dezembro de 2007, 2008 e 2009. Foram etiquetados 55 indivíduos em 2007, 42 em 2008 e outros 38 em 2009, escolhidos aleatoriamente. Verificou-se o período de início, o pico, e o final da floração. Considerou-se como pico de floração o período no qual mais que 50% dos indivíduos amostrados estavam floridos. Com o auxílio de um termohigrômetro digital MOD.HY 303C, foram aferidas temperatura e umidade três vezes ao dia às 05:30 h, 12:00h e 17:30 h.

4. Morfologia floral.

O estudo da morfologia floral foi desenvolvido em outubro de 2009, sendo as flores analisadas frescas ou após terem sido previamente conservadas em álcool 70%, quando necessário sob estereomicroscópio da marca Leica EZ4D. As imagens foram registradas com auxílio de Câmera Digital Sony Cyber-Shot DSC-W290. A duração das flores foi registrada utilizando-se 1 flor de 12 indivíduos.

5. Sistema reprodutivo.

O sistema reprodutivo foi verificado no campo em outubro de 2009, com base na metodologia de Kearns & Inoue (1993), aplicando-se os seguintes tratamentos: 1) polinização aberta – botões florais foram apenas etiquetados; 2) autopolinização espontânea – flores em pré-antese foram ensacadas e permaneceram assim até a

frutificação ou queda da flor; 3) autopolinização manual – flores foram ensacadas na pré-antese e, na antese, foram polinizadas com a própria polínea; 4) polinização cruzada manual – flores foram ensacadas na pré-antese e, na antese, foram polinizadas com polínea de outro indivíduo; 5) agamospermia – flores foram emasculadas (polínea foi retirada) e ensacadas, permanecendo assim até a frutificação ou queda da flor. Todos os tratamentos foram realizados sob as mesmas condições, forçando a deposição de polinários recém removidos e ainda túrgidos nos estigmas das flores. Nas polinizações cruzadas os polinários foram colocados em uma placa de Petri com um disco de papel filtro previamente umedecido com água destilada. As flores foram ensacadas com sacos de tule utilizando um total de 32 indivíduos. Devido à escassez de flores produzidas pelos indivíduos, foram utilizadas apenas dez flores por tratamento encontrando-se todas as flores no primeiro dia de antese, com isso buscou-se também não manipular toda a inflorescência. A frutificação foi acompanhada semanalmente até a maturação dos frutos.

6. Visitantes florais.

Os visitantes florais foram observados no campo entre 31 de agosto a 02 de dezembro de 2009, sendo realizada nesse período uma visita por semana com duração de três dias de 05:30 h às 17:30 h, totalizando 504 horas. Foram anotados, para cada visitante floral, dados como o comportamento e horário de visita. As coletas foram efetuadas com sacos plásticos transparentes no momento em que o visitante floral se encontrava dentro do labelo, sendo as plantas floridas escolhidas aleatoriamente. Os indivíduos capturados foram acondicionados em câmaras mortíferas contendo acetato de etila e separados individualmente, por data e horário de coleta. No Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia foram armazenados por via seca (montagem em triângulo de plástico em alfinete entomológico ou só em alfinete entomológico) e fotografados, sendo enviados para identificação por especialistas. O material coletado se encontra na coleção do Laboratório de Entomologia da UFRB e na coleção do Museu de Zoologia - USP. Não foram realizadas observações noturnas. A eventual ocorrência de visitas noturnas foi investigada através da conferência, pela manhã, de flores marcadas na tarde anterior.

7. Distribuição espacial.

Para o estudo da distribuição espacial foram demarcadas 140 parcelas de 2x2 m, totalizando 1.000 m² de área amostrada. As parcelas foram arranjadas em 12 transecções, paralelas a única trilha que dá acesso a maior população de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* no local. As transecções apresentaram seis parcelas cada, sendo 72 a direita da trilha e 72 à esquerda, com referenciamento de 5 m em 5 m entre parcelas e 2 m em e 2 m entre transecto. Foi realizado previamente em campo, nos anos de 2007, 2008 e 2009, o acompanhamento da fenologia reprodutiva da espécie, caracterizando como “adultos” os indivíduos que apresentavam inflorescências durante o período de observação correspondente à fase reprodutiva da espécie. Na categoria “jovens” foram enquadrados aqueles pertencentes aos demais estádios ontogenéticos. Como a espécie apresenta reprodução clonal, cada touceira (conjunto de rebentos) isolada foi considerada como um indivíduo. O inventário de jovens e adultos foi feito durante o mês de novembro de 2009. Para identificar o padrão de distribuição espacial, utilizou-se o Índice de Morisita (IM) e a Razão Variância/média (R) (KREBS, 1989). Os dados foram organizados e analisados pelo programa Excel 2007. A significância estatística foi constatada através do valor χ^2 (Qui Quadrado) para um dado número de graus de liberdade (gl), e a nível de significância, desejados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Fenologia da floração.

A floração de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* durou cerca de 2 meses e meio. Esse tempo pode estar sujeito a influência de diversos fatores como hereditariedade, fatores químicos, taxa de crescimento, termo e fotoperiodismo, e o estado nutricional (ARDITTI, 1992).

Em 2007, a floração iniciou na primeira quinzena de agosto e se estendeu até a última quinzena de outubro, em 2008 e 2009 iniciou na segunda quinzena de agosto e se estendeu até a primeira quinzena de novembro. O início da floração sempre ocorreu no período de menor precipitação pluvial e o período final correspondeu ao aumento dessa precipitação (CPTEC, 2010). As temperaturas no

período de estudo foram geralmente em torno 20,8° C a 34,4°C e as umidades 51% a 78% .

O período de floração pode estar relacionado a estratégias para atração de vetores de pólen como as abelhas. De acordo com Schemske (1980), a floração tem relação com o comportamento dos polinizadores e o sistema reprodutivo das plantas. Para Rathcke & Lacey (1985), pode haver um ajuste evolutivo entre as estações do ano mais favoráveis, os insetos polinizadores e a época de floração das orquídeas, visando favorecer a polinização e também a alimentação desses insetos.

Os picos de floração de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* ocorreram sempre em setembro, registrando-se 52 indivíduos floridos em 2007, 36 em 2008, e 31 em 2009. Observou-se neste período uma diminuição no número de plantas da população provavelmente relacionada à coleta predatória, atividade muito comum na região. Em estudo desenvolvido com *Paphiopedilum barbiggerum* no sudoeste da China, em condições climáticas semelhantes, o período de floração iniciou-se no final de agosto durando entre cinco a seis semanas, e o pico de floração foi em setembro (SHI *et al.*, 2008).

As plantas de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* floriram seqüencialmente, e segundo Catling & Catling (1991) este tipo de mecanismo é muito comum entre as orquídeas, favorecendo também à polinização cruzada.

2. Morfologia e biologia floral.

As flores de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* (Figura 1) apresentaram-se amarelas, inodoras, zigomorfas, decíduas, possuíram aproximadamente 8,0 x 12,0 cm (excluindo o comprimento do ovário ínfero), posicionaram-se uma a quatro no topo do escapo floral e em algumas ramificações na parte superior, localizando-se cerca de 1 m do solo.

A sépala dorsal apresentou-se ereta, o seu tamanho aproximado foi de 4,4 x 1,6 cm, a coloração foi amarela-pálida com veias vermelhas no sentido longitudinal, apresentou-se oblonga, encontrando-se unida a pétala, sinsépala e coluna na sua base.

As pétalas laterais posicionaram-se horizontalmente em relação à flor, o tamanho aproximado foi de 6,1 x 1,1 cm, apresentando-se amarelas-pálidas, ciliadas, possuindo tricomas vermelhos próximos a coluna com aproximadamente 1 mm de comprimento e posição ascendente e inclinada, suas margens foram

onduladas com uma listra vermelha brilhante contornando-as, em suas pontas (aproximadamente metade do seu comprimento) observou-se veias vermelhas brilhantes no sentido longitudinal.

A sinsépala foi formada pela fusão de duas sépalas, medindo 3,4 x 2,1 cm aproximadamente, foi oblonga e possui coloração amarela-pálida.

A pétala labelo apresentou aproximadamente 4,2 x 2,0 cm, foi amarela-pálida com veias vermelhas, lisa, oblonga, saquiforme como um sapato, com entrada (bolsa) arredondada, as suas margens apresentaram-se salpicadas de vermelho e possuíram abas laterais internas que provavelmente impedem os visitantes florais de retornarem pelo mesmo caminho que entraram. As abas apresentaram-se unidas por um pequeno nódulo branco. O interior da pétala labelo funciona como um túnel que dá acesso ao estigma e polínias, localizando-se logo abaixo da coluna. Na pétala labelo, em frente ao estigma e próximo às saídas laterais observou-se tricomas vermelhos que provavelmente favorecem a saída dos insetos do seu interior. De acordo com Brito & Cribb (2005), a pétala labelo é uma importante estrutura da orquídea, pois o seu formato, localização e às vezes a presença de uma coloração diferenciada, propiciam o pouso de polinizadores facilitando assim a polinização.

A coluna é recurvada, o formato foi parecido ao de um trapézio, possui 0,4 x 0,3 cm, foi amarela-pálida e no seu dorso encontraram-se dois estames férteis, as anteras e um estaminóide.

A antera foi amarela-pálida e possui duas polínias macias que são removidas completamente após a visita do polinizador, essas polínias são na verdade o pólen que é constituído por uma massa amorfa de cor amarelo-pálido.

O estaminóide apresentou-se amarelo-pálido, largo, ovalado, e ciliado.

O ovário ínfero foi trilocular, mediu cerca de 6,0 x 2,0 cm aproximadamente, e sua coloração foi marrom avermelhado.

A antese das flores de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* durou, em média, seis dias e ocorreu pela manhã, sendo caracterizada inicialmente pela separação da sépala dorsal e da sinsépala, seguidas das pétalas laterais (Figura 2). As flores duraram, em média, duas semanas, semelhante às flores de *Cypripedium guttatum* (BÄNZIGER *et al.*, 2005).

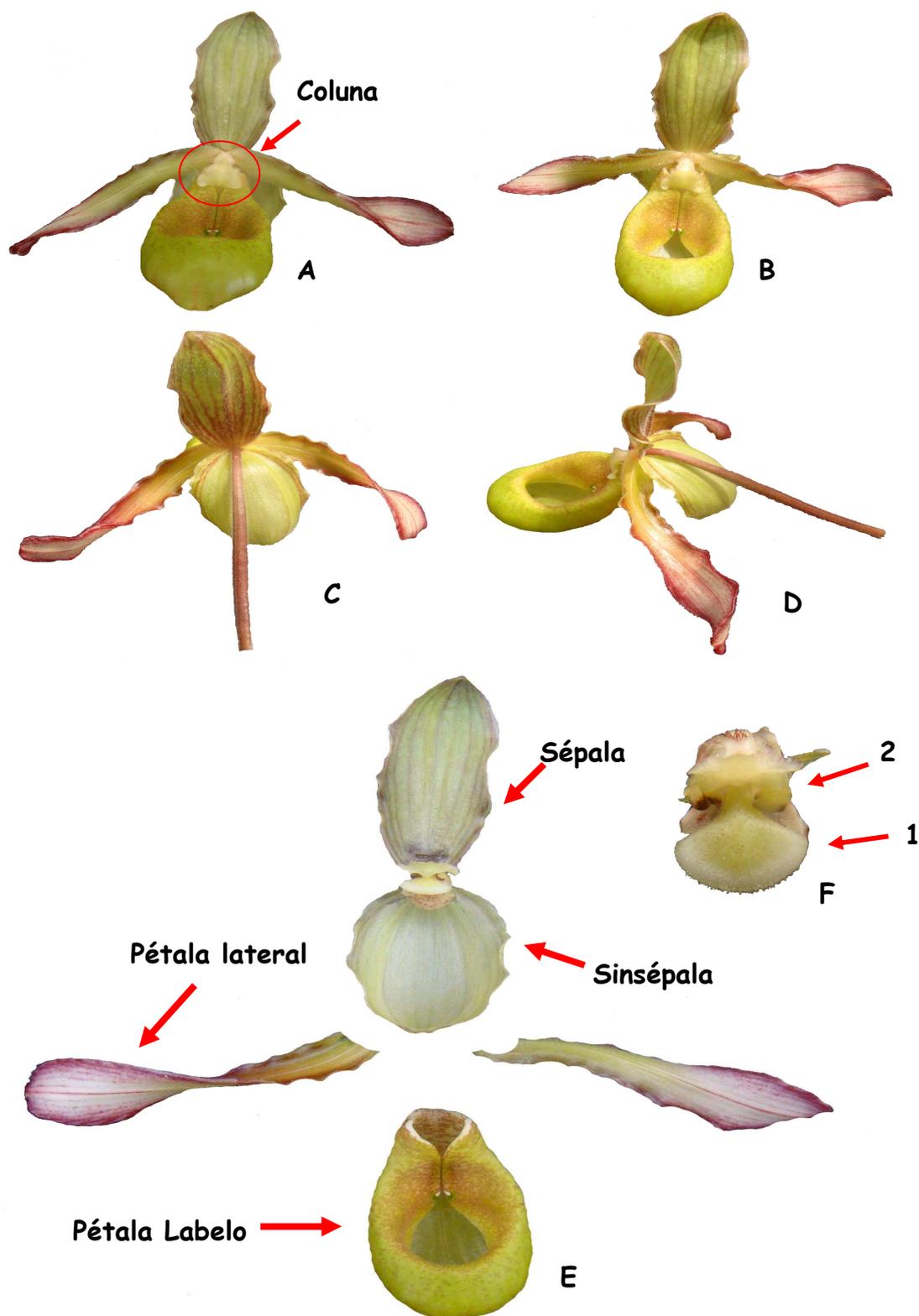


Figura 1. Morfologia da flor de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*: **A** e **B** – Flor em vista frontal; **C** – Flor em vista dorsal; **D** – Flor em vista lateral; **E** – Estruturas florais; **F** – Estaminóide (1) e antera (2). Santa Teresinha-BA, 2009. **Foto:** Rogério Marcos Oliveira.



Figura 2. Antese em *P. lindleyanum* var. *sargentianum* em seis dias de observação: **A** - Separação entre a sépala dorsal e sinsépala (primeiro dia); **B** – Aumento na fissura de separação entre a sépala dorsal e sinsépala (segundo e terceiro dia); **C** – Início da separação das pétalas (quarto dia); Separação entre as pétalas laterais e a pétala labelo (quinto dia); **D** - Flor aberta (sexto dia). Santa Teresinha-BA, 2009. **Foto:** Daniela de Souza Hansen.

3. Sistema reprodutivo.

As frutificações obtidas em *P. lindleyanum* var. *sargentianum* por meio dos tratamentos de polinização demonstraram bons resultados nas condições ambientais em que foi desenvolvido o experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da polinização natural e artificial em flores de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* nas condições ambientais do Monte da Pioneira, Santa Teresinha-BA, 2009.

| Tratamento | Nº Indivíduos | Nº Flor | Fruto | |
|-----------------------------------|---------------|---------|-------|--------|
| | | | Nº | % |
| Polinização aberta | 10 | 10 | 7 | 70,00 |
| Polinização cruzada manual | 10 | 10 | 10 | 100,00 |
| Autopolinização manual | 10 | 10 | 10 | 100,00 |
| Autopolinização espontânea | 10 | 10 | 0 | 0,00 |
| Agamospermia | 10 | 10 | 0 | 0,00 |

A taxa de frutificação variou de 70 a 100%, e o resultado obtido com a autopolinização manual demonstrou que a espécie é autocompatível. De acordo com Catling & Catling (1991) a autocompatibilidade em orquídeas é comum, embora as barreiras mecânicas da flor normalmente evitem autopolinizações. Em algumas orquídeas a autopolinização pode resultar na fixação de frutos, mas poucos embriões se desenvolvem no interior das sementes (TREMBLAY *et al.*, 2005). Em muitos gêneros de orquídeas auto-incompatíveis, os indivíduos caracterizam-se por floração em massa o que aumenta a possibilidade de geitonogamia (ACKERMAN & MONTALVO, 1990). Peakall & Beattie (1991) estudando uma espécie de orquídea australiana polinizada por formigas observaram evidências de intensa endogamia devido à autopolinização da espécie (51%). A maioria das orquídeas, entretanto, mantém o potencial de cruzamento por terem polinários funcionais que autopolinizam o estigma somente se ele não for removido por insetos (CATLING, 1990).

Na polinização aberta verificou-se a eficiência dos polinizadores em seu habitat natural, enquanto que na agamospermia não houve formação de frutos. Em estudo sobre o sistema reprodutivo de *Cypripedium plectrochilum* a polinização cruzada manual proporcionou 90% de frutificação, enquanto a autopolinização manual foi de 80% (LI *et al.*, 2008), em *C. tibeticum*, para ambas as polinizações, obteve-se 100% de frutificação (LI *et al.*, 2006). Em estudo com *Cyrtopodium polyphyllum*, Mickeliunas *et al.* (2007) relatam altas taxas de frutificação tanto na autopolinização quanto em polinizações cruzadas manuais, sendo que em condições naturais 2,2% são obtidos por meio de autopolinização assistida pela chuva.

O conhecimento detalhado das estratégias reprodutivas das orquídeas em seu habitat natural permite compreender o modo de transmissão dos genes através das gerações, possibilitando a organização eficiente de programas de reintrodução, conservação e manejo das espécies na natureza (PEREIRA *et al.*, 2003).

A flor de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, após a polinização durou aproximadamente uma semana, senesceu e despreendeu-se do ovário, sendo observado um crescimento no sentido transversal do ovário fecundado (Figura 3). Em orquídeas a polinização e emasculação levam a um aumento rápido na produção de etileno semelhante à resposta observada no climatério de frutos que estão amadurecendo (ARDITTI, 1973; NAIR, 1990).

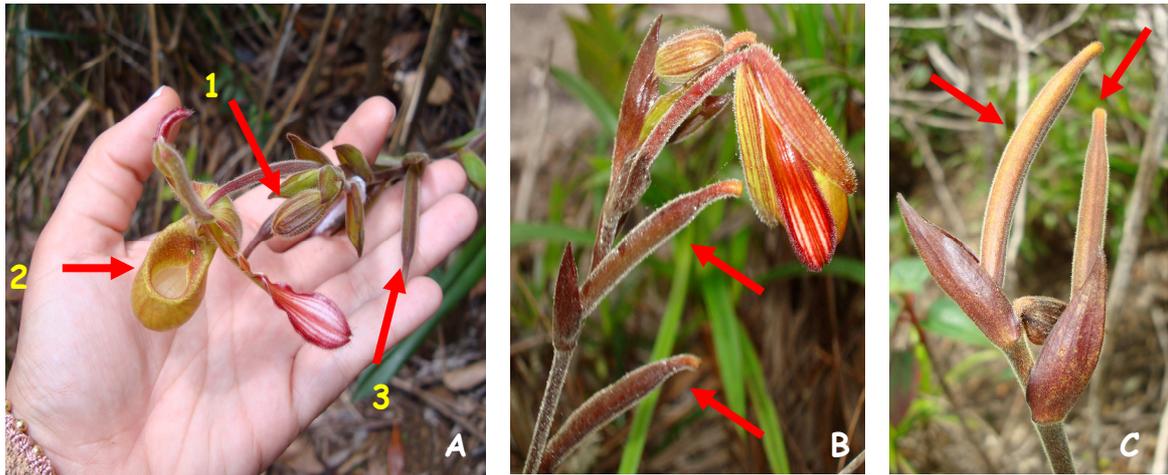


Figura 3. Formação de frutos em *P. lindleyanum* var. *sargentianum*: **A1** - Botão; **A2** - Flor; **A3** - Ovário recém fecundado; **B** - Aumento da largura dos ovários; **C** - Frutos maduros. Santa Teresinha-BA, 2009. **Foto:** Daniela de Souza Hansen.

Os frutos (cápsulas) demoraram cerca de dois meses para alcançar a maturidade (Figura 4) e atingir o tamanho aproximado de 59 mm x 8,0 mm, com uma coloração mais clara do que em seu estágio inicial, tendendo para o amarelo.

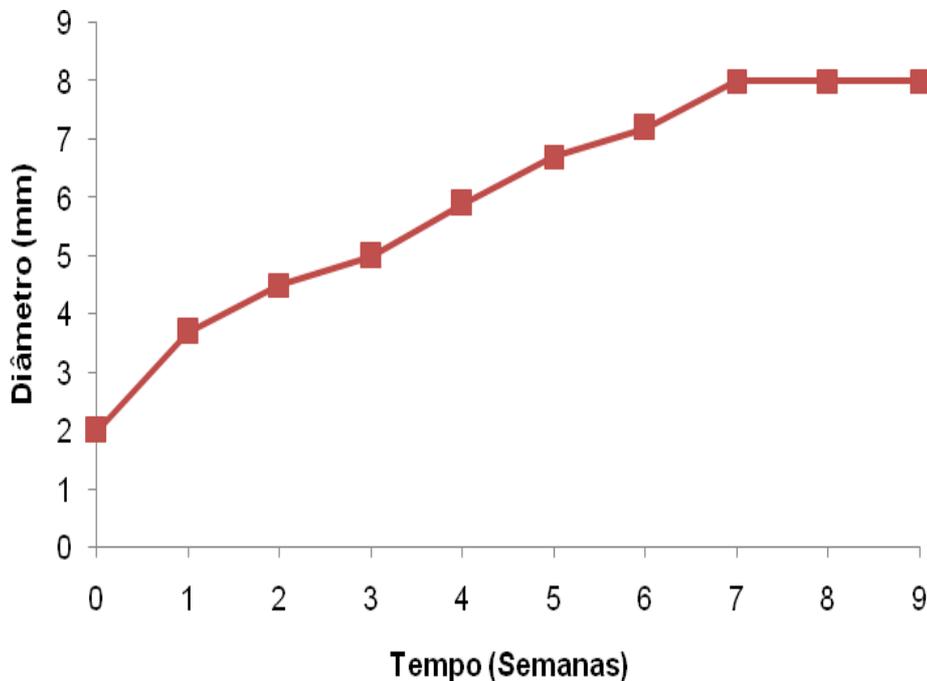


Figura 4. Desenvolvimento do diâmetro em frutos de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* após polinização. Santa Teresinha-BA, 2009.

Em trabalho realizado por Muñoz & Jiménez (2008), foram observados comportamentos semelhantes, onde *P. pearcei* atingiu a maturidade dos frutos em aproximadamente 9,8 semanas e o tamanho médio de 42 mm x 4,2 mm, enquanto que em *P. longifolium* foi dezesseis semanas alcançando um tamanho aproximado de 60 mm x 5,6 mm. Além disso, estes autores verificaram que o comprimento das cápsulas das espécies estudadas não variou, e que ocorreu uma mudança na coloração das cápsulas de *P. humboldtii* para amarela ao atingirem a maturação. De acordo com Koopowitz (2008) o menor tempo entre a polinização e maturação dos frutos em algumas espécies de *Phragmipedium* é de três meses.

Na deiscência dos frutos de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* observou-se o surgimento de uma fissura no sentido longitudinal por onde eram liberadas as sementes nos meses de outubro e novembro. Os frutos apresentaram sementes abundantes de coloração preta.

4. Visitantes florais.

Como visitantes de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* foram registrados duas espécies de besouros (Curculionidae: Centrinini), *Montella* sp. (Figura 5A) e *Stethobaris* sp. (Figura 5B), e três espécies de abelhas (Hymenoptera: Apidae e Halictidae), *Nannotrigona testaceicornis* (Figura 5C), *Trigona fuscipennis* Friese (Figura 5D) e *Augochloropsis* sp. (Figura 5E).

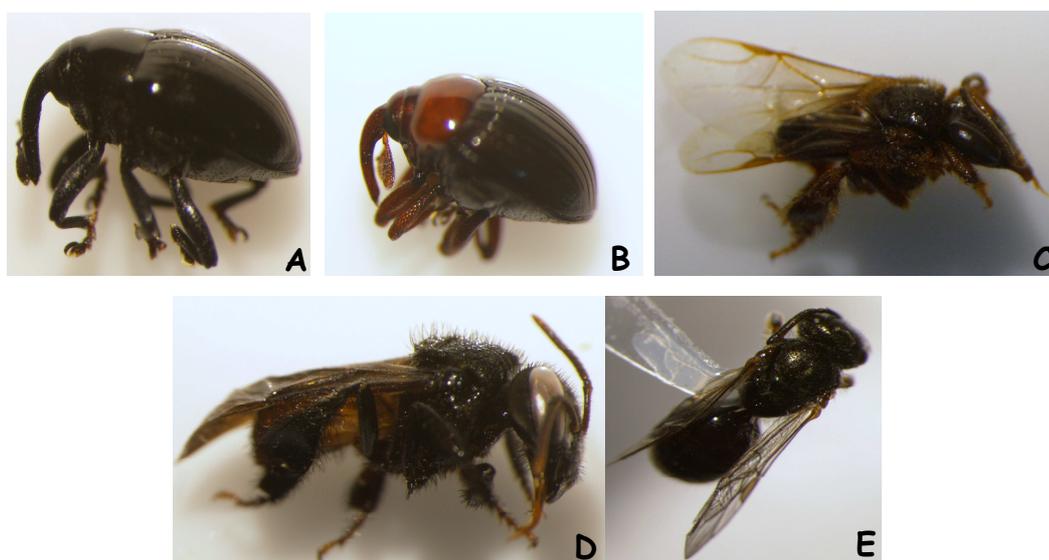


Figura 5. Visitantes florais de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*: **A** - *Montella* sp.; **B** - *Stethobaris* sp.; **C** - *Nannotrigona testaceicornis*, **D** - *Trigona fuscipennis* Friese; **E** - *Augochloropsis* sp. Santa Teresinha-BA, 2009. **Foto:** Daniela de Souza Hansen.

Stethobaris sp. (Figura 5B) foi o principal visitante, sendo registradas 17 visitas no horário de 08:30 h às 14:30 h, enquanto para *Montella* sp. (Figura 5A) 6 visitas de 13:30 h às 16:30 h. Na inflorescência era possível encontrar de um a dois indivíduos em uma ou duas flores. Quando observados sob a lupa, verificou-se a presença de grãos de pólen espalhados sobre a parte externa das asas. Os curculionídeos foram observados caminhando sobre os botões florais e diversas estruturas das flores abertas (Figura 6), como as anteras e estaminóides.

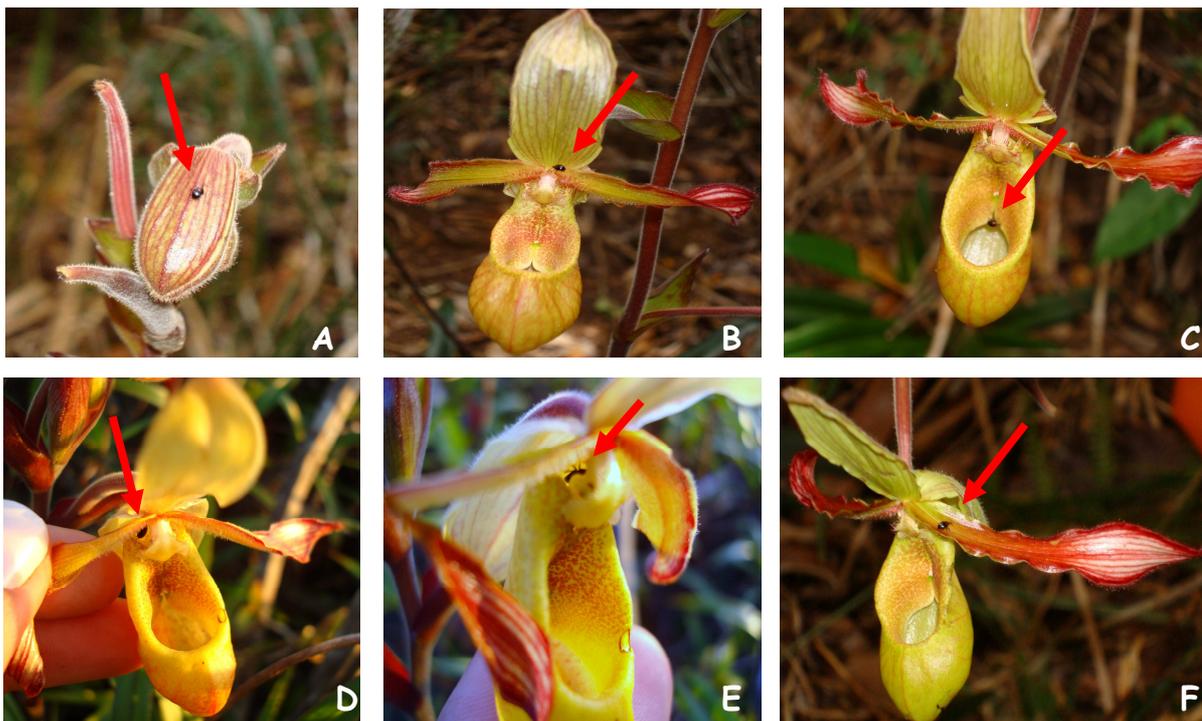


Figura 6. Comportamento de besouro curculionídeo em *P. lindleyanum* var. *sargentianum*: **A** - Sobre o botão floral; **B** - Caminhando nas pétalas laterais; **C** - Entrando na pétala labelo; **D** - Entrando por trás da coluna; **E** - Em cima da antera; **F** - Saindo de trás da coluna. Santa Teresinha-BA, 2009. **Foto:** Daniela de Souza Hansen.

Curculionídeos *Stethobaris* estão associados a orquídeas incluindo *Cypripedium* spp (HULL SIEG, 1993). De acordo com Mickeliunas *et al.* (2006) em flores de *Grobya amherstiae* Lindl., foi observada a presença de *Montella* sp. que deslocava a antera da flor e consumia as paredes que separavam as polínias, e na procura de outras substâncias comestíveis, deslocava o polinário depositando-o no estigma, o que resultava em 100% de autopolinizações e posterior desenvolvimento de frutos. Em flores de *Cattleya eldorado* estes besouros foram relacionados a perfurações apresentadas pelos frutos (STORTI, 2007). Em *P. lindleyanum* var.

sargentianum pode-se observar a presença de perfurações em alguns botões florais e flores provavelmente ocasionadas por estes insetos (Figura 7). Coleópteros da família Curculionidae são comuns em diversas espécies de orquídeas sendo considerados como pragas (LEHNEBACH & ROBERTSON, 2004; DUNFORD, 2006; PRENA, 2008), poucos trabalhos relatam sua função como polinizadores. Em Honolulu foram registradas seis espécies de curculionídeos de orquídeas que se alimentavam das flores e partes da planta, e em outros locais do Havaí mais 24 espécies oriundas de diferentes regiões do mundo (SWEZEY, 1945).



Figura 7. Danos observados na estrutura floral de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*: **A** - Botão floral danificado, **B e C** - Pétala labelo danificada. Santa Teresinha-BA, 2009. **Foto:** Daniela de Souza Hansen.

A abelha *T. fuscipennis* (Figura 5D) foi observada visitando as flores nos horários de 09:30 h às 11:30 h, sendo registradas 4 visitas. Já a abelha *Augochloropsis* sp. (Figura 5E) visitou as flores 3 vezes entre 11:30 h e 12:30 h, enquanto a *N. testaceicornis* (Figura 5C) 3 vezes entre 11:30 h às 15:30 h. Segundo Ribeiro *et al.* (2006) os insetos visitam as flores preferencialmente em dias com temperaturas acima dos 23°C e sem vento, entre as 10:00 h e às 16:00 h. As abelhas preferem o período do dia com temperatura próxima aos 25°C ou o período com temperaturas mais amenas para forrageamento (SILVEIRA-NETO *et al.*, 1976). *T. fuscipennis* pousava apenas em uma flor, na borda da pétala labelo e descia para dentro da mesma em direção a sua base, então saía por trás da coluna passando sob o estigma e saindo pelas aberturas traseiras em cada antera após 01:45 minutos. *Augochloropsis* sp. e *N. testaceicornis* também visitaram apenas uma flor, descendo diretamente pela abertura da pétala labelo e se dirigindo para a saída traseira após 30 segundos aproximadamente. Em *T. fuscipennis* foi possível observar uma massa de pólen fixada ao seu tórax. Segundo Singer *et al.* (2004), em

Phragmipedium o pólen é pastoso e não forma polínias verdadeiras. Em *Cypripedium* spp. verificou-se que abelhas pequenas foram os únicos dispersores efetivos de pólen (LI et al., 2008), e em *C. guttatum* Sw destacou-se as abelhas da família Halictidae (BANZIGER et al., 2005). A abelha *Augochloropsis* tem sido relatada como polinizadora de orquídeas terrestres do gênero *Cyclopogon* e *Prescottia densiflora* Lindl. (SINGER & COCUCCI, 1999; SINGER & SAZIMA, 2001), e operárias de *Trigona* estão relacionadas à coleta de tricomas no labelo de orquídeas da espécie *Maxillaria* ocasionando a polinização das flores (FLACH et al., 2004; SINGER & KOEHLER, 2004).

O período de maior visita em *P. lindleyanum* var. *sargentianum* foi no pico de floração, provavelmente por haver um maior efeito visual em função da coloração das flores, já que nesta subfamília não há recompensas comestíveis (DRESSLER, 1993). Orquídeas com pseudo-mecanismos de polinização enfrentam o desafio de atrair polinizadores sem oferecer uma recompensa, e algumas delas são visitadas somente durante os primeiros 2 ou 3 dias do florescimento por polinizadores recém-emergidos que ainda não conhecem as devidas flores nectaríferas. Estes polinizadores após algum tempo passam a reconhecer estas orquídeas e aprendem a evitá-las (NILSON, 1980, 1992). Em *Cypripedium calceolus* L., Nilsson (1979) constatou que as abelhas ao voarem perto das flores foram fortemente atraídas principalmente pela cor amarela, pelo padrão da pétala labelo, localização dos estaminóides e pétala labelo, e fragrância floral rica em acetato.

Através da conferência das flores marcadas, não foram detectados visitantes noturnos para *P. lindleyanum* var. *sargentianum*.

5. Distribuição espacial.

Foram amostrados um total de 178 indivíduos de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* em uma população localizada no Monte da Pioneira. Entre os indivíduos amostrados 114 eram jovens e 64 adultos.

No estudo da distribuição espacial os valores de IM e R menores que 1,0 indicam a inexistência de agrupamento. Valores de IM e R iguais a 1,0 indicam distribuição regular, e os valores maiores que 1,0 indicam agrupamento. Para o *P. lindleyanum* var. *sargentianum* observou-se uma distribuição espacial agrupada, sendo que os adultos apresentaram IM = 1,45 e R = 1,45, enquanto os jovens IM = 1,71 e R = 2,07. O número de indivíduos adultos oscilou de zero a cinco por parcela,

enquanto que os jovens entre zero a sete. A significância estatística foi constatada através do valor de Qui-quadrado ($\chi^2 = 206,84$ adultos/ $\chi^2 = 296,03$ jovens) maior que o de tabela, para ambos os índices.

O padrão de distribuição espacial agrupado é muito comum entre as orquídeas. Em trabalho realizado por Schmitt & Windisch (2007) com *Cyathea delgadii* Sternb., os indivíduos jovens apresentaram-se mais fortemente agrupados (IM = 4,88; R = 4,52 e $\chi^2 = 173$) que os adultos (IM = 2,71; R = 1,28 e $\chi^2 = 49$). Em *Mesadenella cuspidata*, Budke et al. (2004) observou um alto agrupamento dos indivíduos adultos (IM = 2,17; R = 4,52 e $\chi^2 = 266,94$) e dos jovens (IM = 1,82; R = 7,82 e $\chi^2 = 266,94$). Pereira & Ribeiro (2004), observaram em três áreas de estudo (A1, A2, A3) que os indivíduos da comunidade de Orchidaceae apresentaram sempre padrão de distribuição agrupado (IM_{A1} = 10,66; IM_{A2} = 8,59; e IM_{A3} = 6,057).

O padrão de distribuição agrupado pode estar relacionado à estrutura da área, às condições estruturais da vegetação, a incidência luminosa (ANTONINI & NUNES-FREITAS, 2004), e a disponibilidade de algum recurso importante ao desenvolvimento da planta (água e nutrientes), além disso, pode estar relacionado à dispersão de sementes por autocoria e baracoria, que se caracteriza pela deposição das sementes próximas a planta mãe (JANZEN, 1976). Em orquídeas apesar das milhares (ou milhões) de sementes produzidas por cápsula, apenas algumas chegam a germinar, e as densidades em populações naturais apresentam-se relativamente baixas (BERG, 1998). Otero & Flanagan (2006) relatam que a presença de um polinizador compatível, a capacidade genética de cada espécie de se adaptar ao ambiente, e a associação micorrizica com um fungo compatível são também fatores de grande influencia na distribuição espacial das orquídeas.

CONCLUSÕES

O sucesso reprodutivo da espécie é favorecido pela floração no período de estiagem, florescimento seqüencial, coloração da flor e formato da pétala labelo.

A formação de frutos é dependente de vetores de pólen e o principal visitante floral é o curculionídeo *Stethobaris* sp.

O padrão de distribuição espacial é agregado e constituem-se em valiosa informação, para futuros estudos sobre regeneração natural e dinâmica pós-distúrbios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, J. D.; MONTALVO, A. M. Short and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. **Ecology**, Washington, v.71, n.1, p. 263-272, 1990.

AIGNER, P.A. Floral specialization without trade-offs: optimal corolla flare in contrasting pollination environment. **Ecology**, Washington, v.85, n.9, p. 2560-2569, 2004.

AKER, C. L. Spatial and temporal dispersion patterns of pollinators and their relationship to the flowering strategy of *Yucca whipplei*. **Oecologia**, Heidelberg, v.54, n.2, p. 243-252, 1982.

AMORIM, A. M.; JARDIM, J. G.; LOPES, M. M. M.; FIASCHI, P.; BORGES, R. A. X. B.; PERDIZ, R. DE O.; THOMAS, W. W. **Angiospermas em remanescentes de floresta montana no sul da Bahia, Brasil**. Biota Neotropica, São Paulo, v.9, n.3, p. 313-348, 2009.

ANTONINI R. D.; NUNES, A. F. Estrutura populacional e distribuição espacial de *Miconia prasina* D.C. (*Melastomataceae*) em duas áreas de Floresta Atlântica na Ilha Grande, RJ, Sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.18, n.3, p. 671-676, 2004.

ARDITTI, J. **Fundamentals of Orchid Biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 691 p.

ARDITTI, J.; HOGAN, N. M.; CHADWICK, A. V. Post-pollination phenomena in orchid flowers. IV. Effects of ethylene. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 60, n.9, p.883–88, 1973.

BÄNZIGER, H.; SUN, H. Q.; LUO, Y. B. Pollination of a slippery lady slipper orchid in south-west China: *Cypripedium guttatum* (*Orchidaceae*). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.148, n.3, p.251–264, 2005.

BARBOSA, F. R. **Fungos conidiais associados a folhas em decomposição de *Clusiamelchiori Gleason* e *C. nemorosa G. Mey* em fragmento de Mata Atlântica, Bahia, Brasil.** Recife, PE, 2007. Dissertação (mestrado em Biologia). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.

BLOSSFELD, A. **Orquidologia, orquidofilia e orquicultura.** Rio Claro: Funep, 1999. 89p.

BRAEM, G. *Phragmipedium kovachii*, *Schluckebieria* - nouvelle section du genre *Phragmipedium* - et réflexions sur les pratiques taxinomiques. **Richardiana**, Voreppe, v.4, n.3, p.89-102, 2004.

BRITO, A. L. V. T.; CRIBB, P. J. **Orquídeas da chapada diamantina.** 1. Ed., Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2005. 399 p.

BUDKE, J. C.; GIEHL, E. L. H.; ATHAYDE, E. A. A.; ZÁCHIA, R. A. Distribuição espacial de *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay (Orchidaceae) em uma floresta ribeirinha em Santa Maria, RS, Brasil. **Acta botânica brasílica**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 31-35, 2004.

BURNS-BALOGH, P.; HESSE, M. Pollen morphology of the cyripedioid orchids. **Plant Systematics and Evolution**, Springer Wien, v.158, n.2-4, p.165- 182, 1988.

CAMPBELL, D. R.; WASER, N. M.; PRICE, M. V.; LYNCH, E. A.; MITCHELL, R. J. Components of phenotypic selection: pollen export and flower corolla width in *Ipomopsis aggregata*. **Evolution**, Malden, v.45, n.6, p.1458-1467, 1991.

CATLING, P. M. Auto-pollination in the Orchidaceae. In: ARDITTI, J. (ed.). **Orchid biology, reviews and perspectives V.** Portland: Timber Press, p. 121-158, 1990.

CATLING, P. M.; CATLING, V. R. A synopsis of breeding systems and pollination in north American orchids. **Lindleyana**, Florida, v.6, n.1, p.187-210, 1991.

CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS (CEPTEC): **Banco de Dados**. Disponível em: <<http://bancodedados.cptec.inpe.br/climatologia/Controller>>. Acesso em: 25 ago. 2010.

COX, A. V.; PRIDGEON, A. M.; ALBERT, C. V. A.; CHASE, M. W. Phylogenetics of the slipper orchids (*Cypripedioideae*, *Orchidaceae*): nuclear rDNA ITS sequences. **Plant Systematics and Evolution**, Springer Wien, v.208, n.3-4, p.197-223, 1997.

CRUDEN, R. W.; MILLER-WARD, S. Pollen-ovule ratio, pollen size, and the ratio of stigmatic area to the pollenbearing area of the pollinator: an hypothesis. **Evolution**, Malden, v.35, n.5, p.964-74, 1981.

DODSON, C. H. The importance of pollination in the evolution of the orchids in tropical America. **American Orchid Society Bulletin**, Florida, v.31, p.641-649, 1962.

DRESSLER, R. L. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge: Havard University Press, 1981. 352p.

DRESSLER, R. L. Observations on orchids and euglossine bees in Panama and Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**, Costa Rica, v.15, n.1, p.143-183, 1968.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 314p.

DUNFORD, J. C.; YOUNG, D. K.; KRAUTH, S. J. *Stethobaris ovata* (LeConte) (Curculionidae) on eastern prairie fringed orchid [*Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley] in Wisconsin. **Coleopterists bulletin**, Washington, v.60, n.1, p.51-52, 2006.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. 2.ed. Oxford: Pergamon Press. 1979. 291p.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution**, Austria, v.254, n.3-4, p.131-148, 2005.

FLACH, A.; DONDON, R. C.; SINGER, R. B.; KOEHLER, S.; AMARAL, M. E. C.; MARSAIOLI, A. J. The chemistry of pollination in selected Brazilian Maxillariinae orchids: floral rewards and fragrance. **Journal of Chemical Ecology**, Kentucky, v.30, n.5, p. 1039-1050, 2004.

FRANKIE, W. G.; BAKER, H. G.; OPLER, P. A. Comparative phenological studies of trees in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. **Journal of Ecology**, Oxford, v.62, n.3, p. 881-919, 1974.

GARAY, L. A. On the origin of the orchidaceae. **Botanical Museum Leaflets Of Harvard University**, Londres, v.19, n.3, p.57-96, 1960.

GREGG, K. B. Defrauding the deceitful orchid: pollen collection by pollinators of *Cleistes divaricata*. **Lindleyana**, West Palm Beach, v.6, n.4, p. 214-220, 1991b.

GREGG, K. B. Reproductive biology of the orchid *Cleistes divaricata* (L.) Ames var. *bifaria* Fernald growing in a West Virginia meadow. **Castanea**, Olathe, v.54, n.2, p. 57-78, 1989a.

GRUSS, O. A checklist of the genus *Phragmipedium*. **Orchid Digest**, Laguna Niguel, v.67, n.4, p.213-241, 2003.

JANZEN, D. H. Why bamboos take so long to flower? **Annual Review of Ecology and Systematics**. Palo Alto, v.7, p.347-391, 1976.

JOHANSEN, B. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.103, n.2, p.165-196, 1990.

KAISER, R. **The scent of orchids: olfactory and chemical investigations**. Amsterdam: Elsevier, 1993. 264p.

KEARNS, A. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologist**. Colorado: University Press. 1993, 583 p.

KOOPOWITZ, H. **Tropical Slipper Orchids: *Paphiopedilum* and *Phragmipedium* species and hybrids.** Portland: Timber Press, 2008. 411 p.

KREBS, C. J. **Ecological Methodology.** New York: Harper Collins, 1989. 620p.

LEHNEBACH, C. A.; ROBERTSON, A. W.; Pollination Ecology of Four Epiphytic Orchids of New Zealand. **Annals of Botany**, London, v.93, n.6, p.773-781, 2004.

LI, P.; LUO, Y. B.; BERNHARDT, P.; YANG, X. Q.; KOU, Y. Deceptive pollination of the Lady's Slipper *Cypripedium tibeticum* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Austria, v.262, p.53–63, 2006.

LI, P.; LUO, Y.; BERNHARDT, P.; KOU, Y.; PERNER, H. Pollination of *Cypripedium plectrochilum* (Orchidaceae) by *Lasioglossum* spp. (Halictidae): the roles of generalist attractants versus restrictive floral architecture. **Plant Biology**, Malden, v.10, p.220–230, 2008.

MICKELIUNAS, L.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Biologia Floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.29, n.2, p.251-258, 2006.

MICKELIUNAS, L.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Biologia reprodutiva de *Cyrtopodium polyphyllum* (orchidaceae): uma Cyrtopodiinae polinizada por engano. In: Congresso de Ecologia do Brasil, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu, MG, 2007.

MINISTRO DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção.** 2008. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-florestais/wp-content/files/IN-MMA_06-2008.pdf>. Acesso em: 22 de out. 2010.

MUÑOZ, M.; JIMÉNEZ, V. M. Capsule development, in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. **Lankesteriana**, Costa Rica, v.8, n.2, p. 23-31, 2008.

NAIR, H. Postharvest physiology and handling of orchids. **Malayan Orchid Review**, Singapura, v.18, p.62–68, 1990.

NILSON, L. A. Orchid pollination biology. **Trends in Ecology & Evolution**, Londres, v.7, n.8, p.255–259, 1992.

NILSON, L. A. The pollination ecology of *Dactylorhiza-sambucina* (Orchidaceae). **Botany Notiser**, Suécia, v.133, p.367–385, 1980.

NILSSON L. A. Anthecological studies on the lady's slipper, *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). **Botany Notiser**, Suécia, v.132, p.329–347, 1979.

OAKELEY, H. *Phragmipedium*. **Orchid Society of Great Britain Journal**, London, v.58, n.3, p.158-167, 2009.

OLIVEIRA, M. DO S. P. DE; COUTURIER, G.; PAULO BEZERRA, P. Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* mart.) em Belém, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.17, n.3, p. 343-353, 2003.

OTERO, J. T.; FLANAGAN, N. S. Orchid diversity – beyond deception. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 21, n. 2, p. 64-65, 2006.

PEAKALL, R.; BEATTIE, A. J. The genetic consequences of worker ant pollination in a self-compatible clonal orchid. **Evolution**, Malden, v.45, p.1837-1848, 1991.

PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L. & KASUYA, M.C.M. Association des mycorhizies dans les orchidees – perspectives d'utilisation dans les programmes de propagation symbiotique. **Orchidees**, Paris, v.55, p.24-27, 2003.

PEREIRA, U. Z; RIBEIRO, L. F. Caracterização de comunidades de Orchidaceae em fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, em diferentes estágios de regeneração em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, Santa Tereza, v. 2, n. 2, p. 52–60, 2004.

PRENA, J. A synopsis of the orchid weevil genus *Orchidophilus* Buchanan (Curculionidae, Baridinae), with taxonomic rectifications and description of one new species. **Zootaxa**, Nova Zelândia, v.1783, n.6, p.18–30, 2008.

RADFORD, A. E, DICKISON, W. C, MASSEY, J. R., BELL, C. R. **Vascular Plant Systematics**. New York: Harper & Row, 1974. 891p.

RATHCKE, B. J.; LACEY, E. P. Phenological patterns in terrestrial plants. **Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v.16, p.179-214, 1985.

RIBEIRO, M. F.; KÖHLER, A.; BOELTER, C. R. Polinização de *Acianthera aphotosa* (lindl.) Pridgeon & m. W. Chase (Orchidaceae) por *otitidae* (diptera). **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.13, n.2, p. 85-89, 2006.

SCHEMSKE, D. W. Evolution of floral display in the Orchid *Brassavola nodosa*. **Evolution**, Malden, v.34, n.3, p.489-493, 1980.

SCHMITT, J. L.; WINDISCH, P. G. Estrutura populacional e desenvolvimento da fase esporofítica de *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae, Monilophyta) no sul do Brasil. **Acta botânica brasileira**, São paulo, v. 21, n. 3, p. 731-740, 2007.

SHI, J.; LUO, Y. B.; BERNHARDT, P.; RAN, J. C.; LIU, J. C.; ZHOU, Q. Pollination by deceit in *Paphiopedilum barbigerum* (Orchidaceae): a staminode exploits the innate colour preferences of hoverflies (Syrphidae). **Plant Biology**, England, v.11, n.1, p.17-28, 2009.

SILVA, C. A. **Biologia reprodutiva de três espécies distílicas de *Psychotria* L. e efeitos da fragmentação florestal no sucesso reprodutivo e na diversidade genética de *P. hastisepala* Müll. Arg. (Rubiaceae)**. Viçosa, MG, 2007. 63 f. Tese (doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa, UFV.

SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; VILA NOVA, N. A. **Manual de ecologia de insetos**. Piracicaba: Ceres, 1976. 419p.

SINGER, R. B. **Orquídeas brasileiras e abelhas**. 2004. Disponível em <http://www.webbee.org.br/singer/texto_singer.pdf>. Acesso em: 22 de out. 2010.

SINGER, R. B.; COCUCCHI, A. A. Pollination mechanism in southern Brazilian orchids which are exclusively or mainly pollinated by halictid bees. **Plant Systematics and Evolution**, Austria, v.217, n.1-2, p.101-117, 1999.

SINGER, R. B; KOEHLER, S. Pollinarium morphology and floral rewards in Brazilian Maxillariinae. **Annals of Botany**, London, v.93, p.39-51, 2004.

SINGER, R. B; SAZIMA, M. Pollination mechanism in three sympatric *Prescottia* (Orchidaceae: Prescottinae) species from Southeastern Brazil. **Annals of Botany**, London, v.88, n.6, p.999-1005. 2001.

STORTI, E. F. **Dinâmica populacional e biologia reprodutiva de *Cattleya eldorado* Linden (Orchidaceae)**. Manaus, AM, 2007. 131 f. Tese (doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Amazonas, UFAM.

SWEZEY, O. H. Insects Associated with Orchids. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, Hawaii, v.12, n. 2, p. 343–403, 1945.

TOMASONI, M. A.; SANTOS, S. D. Lágrimas da Serra: Os impactos das atividades agropecuárias sobre o geossistema da APA Municipal da Serra da Jibóia, no Município de Elísio Medrado-BA. In: Simpósio Nacional de Geografia Física Aplicada, 10., 2003, **Anais...** Rio de Janeiro, RJ, 2003.

TREMBLAY, R. L. Larger is better: The effect of floral display on reproductive success in two populations of *Caladenia* (*Stegostyla*) *gracilis* R. Br. **Muelleria**, Australia, v.22, p.77-85, 2005.

TREMBLAY, R. L. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. **Canadian Journal of Botany**, Canada, v.70, n.1, p.642-650, 1992.

TSCHAPKA, M. Energy density patterns of nectar resources permit coexistence within a guild of neotropical flower-visiting bats. **Journal of Zoology**, Cambridge, v.263, n.1, p. 7-21, abr., 2004.

VAN DEN PIJL, L.; DODSON, C. H. **Orchid flowers**: their pollination and evolution. Coral Gables: University of Miami Press, 1966. 214p.

WILSON, P.; THOMSON, J. D. How do flowers diverge? In: LOYD, D. G.; BARRETT, S. C. H. (eds.). **Floral biology**: studies on floral evolution in animal-pollinated plants. New York: Chapman & Hall, p.88-111, 1996.

CAPÍTULO 3

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEA SAPATINHO ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA, BRASIL¹

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial da Revista Scientia Agrícola.

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEA SAPATINHO ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA, BRASIL

RESUMO: Os objetivos do trabalho foram desenvolver um protocolo eficiente para a germinação *in vitro* de sementes de *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum*; avaliar os efeitos dos reguladores vegetais na proliferação de brotos, e investigar o efeito da sacarose no desenvolvimento das plantas. Para a germinação *in vitro* foram testadas diferentes concentrações do meio de cultura MS (completo, 1/2, 1/3 e 1/4) e dois meios alternativos por polpa de frutas. Para o estudo da multiplicação *in vitro*, plantas foram inoculadas em meio de cultura com 1/3 dos sais do MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg.L⁻¹) combinadas ou não a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA. O crescimento *in vitro* foi testado utilizando-se o meio de cultura com 1/3 dos sais do MS com diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20, 40 e 70 g.L⁻¹). O uso do meio 1/3 MS na fase inicial do trabalho foi ideal para promover uma cultura rica em protocormos. A utilização de BAP na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA promoveu maior número de brotos. A concentração de 40 g.L⁻¹ de sacarose foi eficiente no crescimento *in vitro* das plantas. Os estudos demonstram a possibilidade da propagação da espécie *in vitro*, fornecendo informações básicas para futuros trabalhos visando sua conservação e comercialização.

Palavras-chave: *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum*, micropropagação, meio de cultura, reguladores de crescimento, sacarose.

IN VITRO PROPAGATION OF THE LADY SLIPPER ORCHID ENDEMIC TO THE ATLANTIC FOREST IN BRAZIL.

ABSTRACT: The objectives of the present work were to develop an efficient protocol for *in vitro* germination of *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum* seeds, evaluate the effects of plant regulators in the proliferation of buds and investigate the effect of sucrose in plant development. For the *in vitro* germination, different concentrations of the MS culture medium (complete, 1/2, 1/3 and 1/4) and two alternative medium with fruit pulps, were tested. For the *in vitro* multiplication, plants were inoculated in culture medium with 1/3 MS salts supplemented with different concentrations of BAP (0.0; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0 mg.L⁻¹) combined or not with 0.1 mg.L⁻¹ of NAA. *In vitro* growth was tested using the culture medium with 1/3 MS salts with different concentrations of sucrose (0, 10, 20, 40 and 70 g.L⁻¹). The use of 1/3 MS medium in the initial phase of the work was ideal to promote a culture rich in protocorms. The use of BAP in the concentration of 1.0 mg.L⁻¹ supplemented with 0.1 mg.L⁻¹ NAA promoted a higher number of buds. The concentration of 40 g.L⁻¹ of sucrose was efficient in the *in vitro* growth of plants. Studies show the possibility of *in vitro* propagation of the species also providing basic information for future works aiming conservation and marketing.

Key-words: *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum*, micropropagation, culture medium, growth regulators, sucrose.

INTRODUÇÃO

A orquídea sapatinho, *Phragmipedium lindleyanum* var. *sargentianum*, é uma espécie terrestre, endêmica da Mata Atlântica (AMORIM *et al.*, 2009; STEHMANN *et al.*, 2009), pertencente a subfamília Cyripedioideae (ALBERT, 1994) e classificada como espécie ameaçada de extinção no Apêndice I da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora (CITES, 2010).

As orquídeas em perigo de extinção podem ser utilizadas em métodos de propagação artificial, onde a cultura de sementes é uma estratégia sólida para a propagação em massa por meio de amostragem não-destrutiva da planta matriz (KRIKORIAN, 1991; ZETTLER *et al.*, 2001). A germinação assimbiótica de sementes tem se mostrado uma ferramenta eficiente para a conservação *ex situ* e fins de reintrodução (STENBERG & KANE 1998; STEWART & KANE, 2006), pois possibilita redução das pressões sobre as populações selvagens (KALIMUTHU *et al.*, 2007), através da produção em massa de uma grande quantidade de indivíduos, em curto tempo e espaço físico reduzido. Além disso, de servir como suporte a bancos de germoplasma e programas de melhoramento genético (ARDITTI & ERNST, 1992; RAO, 1997; TEXEIRA, 2003).

Na propagação *in vitro* de orquídeas têm-se demonstrado que diferentes espécies exigem diferentes e específicas composições do meio de cultura, sendo as etapas sequenciais de desenvolvimento e as mudanças histomorfológicas do embrião para plântula traçadas apenas para algumas espécies (ROBINSON *et al.*, 2009). Entre os meios de cultura básicos utilizados para a propagação *in vitro* de espécies ornamentais, o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) destaca-se como um dos mais utilizados. Entretanto, para orquídeas, a redução dos seus sais promove melhor desenvolvimento das plântulas (HOFFMANN *et al.*, 2001).

No caso das orquídeas terrestres, verifica-se uma maior dificuldade para a germinação quando comparadas às espécies epífitas, sendo observado que em algumas espécies a germinação pode ser obtida tanto sob luz como no escuro

(ARDITTI & ERNST, 1984; PEDROSO & SALOMI-PAIS, 1992), havendo maiores registros em condições escuras (KAUTH *et al.*, 2006).

A utilização de substâncias reguladoras de crescimento no meio de cultura, como as auxinas e as citocininas, auxiliam no desenvolvimento de plantas *in vitro*, influenciando a divisão e o alongamento celular (GRATAPAGLIA & MACHADO, 1998). O regulador de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) é uma citocinina largamente utilizada para estimular a indução *in vitro* de brotos em plantas ornamentais e em orquídeas como as do grupo *Cattleya*, geralmente em concentrações que variam entre 0,05 e 10 mg.L⁻¹ (CARVALHO, 2002). O ácido naftalenoacético (ANA) faz parte do grupo de auxinas sintéticas, sendo também de grande importância em vários protocolos de cultivo *in vitro* (MERCIER, 2004). Associado ao BAP, o ANA possibilita a anulação do efeito supressivo das altas concentrações desta citocinina sobre a alongação das brotações axilares, restaurando o crescimento normal das mesmas (LUNDERGAN & JANICK, 1980).

Em trabalhos com orquídeas visando à manutenção da integridade genética *in vitro*, deve-se reduzir a adição de reguladores de crescimento vegetal no meio de cultura, pois sua utilização pode possibilitar o aparecimento de variação somaclonal. Uma alternativa a este problema é a manipulação dos nutrientes orgânicos e inorgânicos do meio de cultura para indução do crescimento e desenvolvimento das plantas (NG *et al.*, 2010). Várias combinações de elementos têm sido acrescentadas aos meios de cultura, a exemplo da polpa de batata e banana, água de coco e suco de tomate (CALDAS *et al.*, 1998). O tipo e a concentração dos açúcares também são muito importantes, pois influenciam na germinação e crescimento das plântulas *in vitro* (KERBAUY, 1993). Entre os açúcares mais utilizados para a promoção do crescimento de espécies vegetais pode-se citar, além da sacarose, glicose, frutose, álcool açúcar sorbitol, lactose e maltose (BOZENA & SZCZERBA, 1991; FOLLIOT & MARCHAL, 1993; NICOLOSO *et al.*, 2003).

Zenk *et al.* (1977) observaram que altas concentrações de sacarose induziam a biossíntese de compostos indólicos e, conseqüentemente, a síntese de auxinas, as quais, juntamente com as giberelinas, promoviam o alongamento das brotações. Faria *et al.* (2004), cultivando *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sacarose em meio de cultura MS, observaram que houve crescimento da parte aérea *in vitro* sem a adição de reguladores de crescimento, porém não estimularam o crescimento de novas raízes adventícias. Vários autores têm relatado a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS, para

diversas espécies, visando o melhor desenvolvimento das plantas e redução nos custos (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Este trabalho teve como objetivos: a) desenvolver um protocolo eficiente para a germinação *in vitro* de sementes de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*; b) estudar os efeitos dos reguladores vegetais na multiplicação de brotos; e c) investigar o efeito da sacarose no crescimento das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Área de coleta.

O estudo foi realizado na Serra da Jibóia, região do Monte da Pioneira, nas proximidades da Vila de Pedra Branca em Santa Teresinha no Estado da Bahia, Brasil. A Serra da Jibóia é composta por montes de altitude entre 750 m e 840 m, e se estende no sentido Norte-Sul com uma crista de 26 km de comprimento. Sua área aproximada é de 59,28 km², abrangendo parte do território de cinco municípios integrantes da Região Econômica do Recôncavo Sul da Bahia, sendo eles Varzedo (31%); Santa Teresinha (27%); Elísio Medrado (21%); Castro Alves (19%) e São Miguel das Matas (2%). A localização geográfica da Serra da Jibóia situa-se em uma zona ecótona ou de transição, com clima variando entre o tropical úmido, mas ao Sudeste e ao leste, e o tropical semi-úmido, mais ao Norte e a Oeste. A temperatura média anual é de 21°C e o índice pluviométrico é de 1.200 mm, apresentando variações em função da altitude e da maritimidade. Na serra encontra-se um mosaico de formações vegetais, desde floresta ombrófila densa, passando para a floresta estacional decidual à caatinga arbórea com palmeiras, e no topo os campos rupestres. Os solos variam em função da altitude, mas predominam os latossolos e os podzólicos (TOMASONI & SANTOS, 2003).

2. Material vegetal.

Foram coletadas cápsulas maduras (Figura 1 A e B), naturalmente abertas, em plantas de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* localizadas em quatro populações, sendo elas encaminhadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura para a instalação do experimento de germinação *in vitro*. Foram usadas sementes provenientes de uma amostra compostas pelas cápsulas

coletadas, buscando-se obter uma maior variabilidade na constituição genética da espécie. Os demais experimentos foram instalados utilizando-se plantas com 6 meses de idade medindo cerca de 10 a 15 mm de comprimento, procedentes da germinação *in vitro* (Figura 1 E e F).

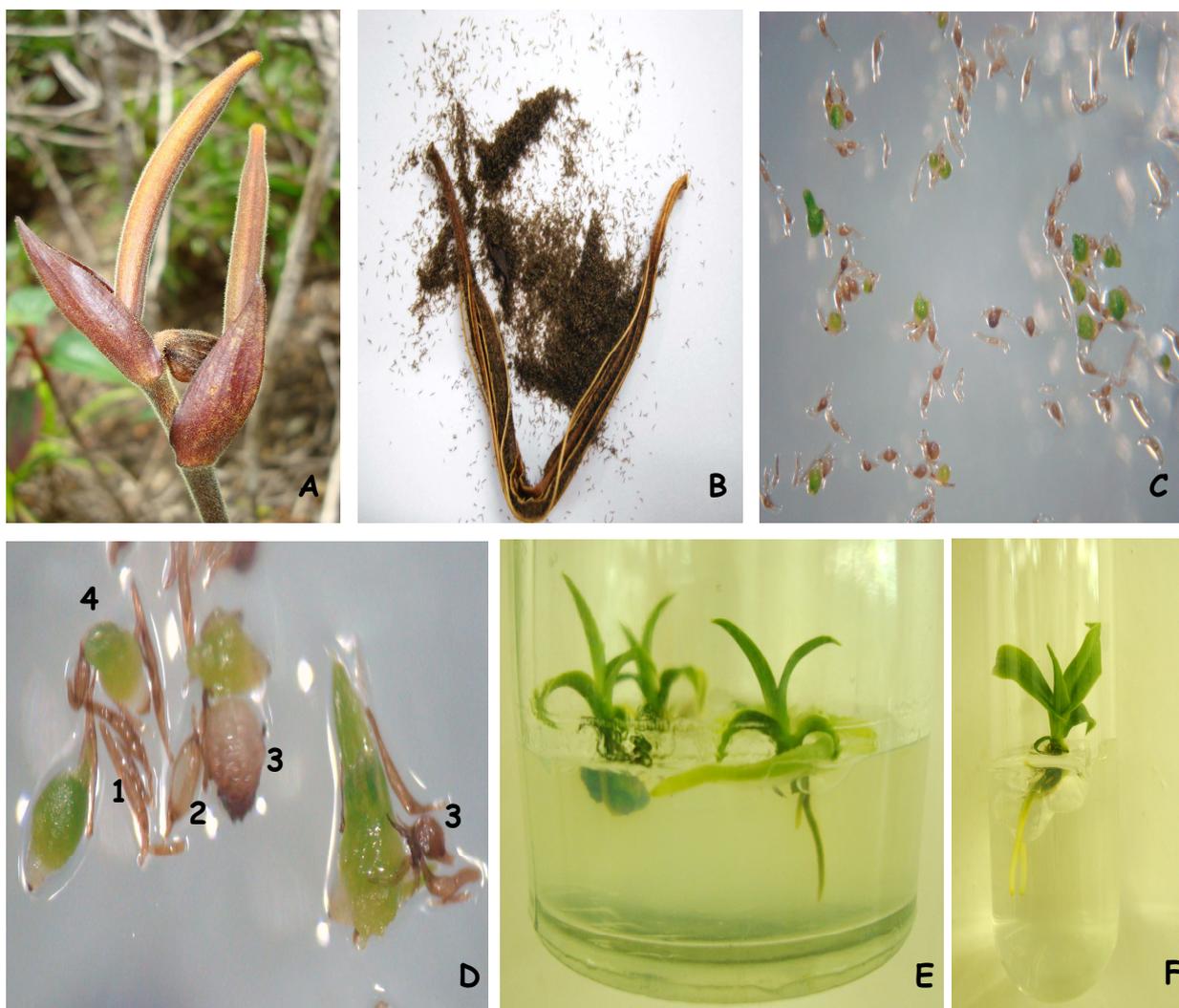


Figura 1. Cápsulas de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* (A); sementes (B); protocormos obtidos *in vitro* (C e D): D1 - semente não germinada, D2 - rompimento da testa da semente, D3 - protocormo morto, D4 - protocormo com gema; plântulas com 10 à 15 mm de comprimento (E); plântula pronta para aclimatização (F). Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010. **Foto:** Daniela de Souza Hansen.

3. Germinação *in vitro* de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*.

As sementes, 80 mg, foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio comercial, Q boa[®], diluída a 2%, e agitadas manualmente durante 20 minutos. Com

auxílio de micropipeta de 5.000 μL e ponteyras autoclavadas, foi retirada a solução de hipoclorito e posteriormente as sementes foram lavadas por três vezes com água destilada autoclavada. Após a terceira lavagem adicionou-se 45 mL de água destilada autoclavada às sementes, com o intuito de auxiliar na distribuição durante a semeadura.

Com auxílio da micropipeta, Foram retiradas 1.500 μL da solução contendo sementes, sendo semeadas em placas de Petri (15 x 90 mm), contendo 20 ml dos meios de cultura: T1 – MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com a concentração total de sais e vitaminas; T2 – MS com metade da concentração de sais e vitaminas (MS/2); T3 – MS com 1/3 da concentração total de sais e vitaminas (MS/3); T4 – MS com 1/4 da concentração total de sais e vitaminas (MS/4); T5 – Meio alternativo (AL1) composto por 50 g.L^{-1} de polpa de banana “nanica” verde, 50 g.L^{-1} de polpa de mamão papaya, 50 g.L^{-1} de polpa de tomate semi maduro, 120 mL.L^{-1} de água de coco da marca Sococo[®], 3 g.L^{-1} de adubo Vitaplan contendo NPK (10:10:10) para orquídeas; T6 – Meio alternativo (AL2) composto por 1.000 mL de água de coco da marca Sococo[®] e 3 g.L^{-1} do adubo Vitaplan. Em todos os tratamentos o meio de cultura foi suplementado com 30g de sacarose e geilificado com 2 g.L^{-1} de Phytigel[®].

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 2 (meios de cultura x efeito da luz), com 5 repetições para cada tratamento, contendo uma média de 53 sementes em cada placa.

As placas de petri contendo as sementes foram incubadas a temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$, sob condição de intensidade luminosa de $30 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas, e na ausência de luminosidade.

Após 60 dias da inoculação das sementes avaliou-se, com auxílio de papel milimetrado e estereomicroscópio da marca Leica EZ4D, o percentual de germinação, contando-se o número de protocormos formados em relação proporcional ao número total de sementes inoculadas; o percentual de protocormos mortos computando-se o número de protocormos escurecidos e oxidados em relação proporcional ao número de protocormos formados; e o percentual de protocormos com gema, contando-se o número de protocormos com gemas em relação proporcional ao número total de protocormos vivos (Figura 1 C e D).

Para a avaliação do desenvolvimento das sementes foram identificadas as etapas de germinação propostas por Mitchell (1989), em amostras compostas por 25 sementes ou protocormos retiradas das placas de Petri. Foram obtidos dados de

tamanho referentes ao comprimento (mm) e largura (mm) das sementes e protocormos utilizando-se estereomicroscópio com ocular milimetrada em aumento de 1,5 vezes e fator de correção (Fc) de 0,065.

4. Influência do BAP na multiplicação *in vitro* de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* var. *sargentianum* .

Plantas oriundas da germinação *in vitro*, foram incubadas em frascos contendo 30 ml do meio de cultura Murashige & Skoog (1962), com 1/3 da concentração total de sais e vitaminas, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg.L⁻¹) combinadas ou não a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA.

Foram realizados três subcultivos em intervalos de 30 dias, totalizando 120 dias de cultivo, sendo avaliados o número médio de brotos adventícios (NB), comprimento médio dos brotos adventícios (CMB, em mm) e explantes que formaram brotos adventícios (EFB, em %).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 2 (concentrações de BAP x ausência ou presença de ANA) com cinco repetições, sendo cada parcela composta por 1 planta /frasco.

O cultivo foi realizado a temperatura de 27+1^o C, intensidade luminosa de 30 mmol.m-2.s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

5. Crescimento *in vitro* de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* utilizando diferentes concentrações de sacarose.

O meio de cultura utilizado foi o de Murashige & Skoog (1962), com 1/3 da concentração total de sais e vitaminas, suplementado com sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) nas concentrações de 0, 10, 20, 40 e 70 g.L⁻¹.

A avaliação foi efetuada aos 60 dias da inoculação, sendo realizada as seguintes aferições: comprimento da parte aérea (mm), número de raízes, comprimento da raiz (mm) e peso massa da fresca total (mg).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada parcela constituída por 3 plantas/frasco contendo 50 ml do meio de cultura. Sendo o cultivo realizado a temperatura de 27+1^o C, intensidade luminosa de 30 mmol.m-2.s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

6. Análise estatística.

Os dados foram submetidos à análise de variância segundo o modelo estatístico do delineamento inteiramente casualizado. As médias dos tratamentos qualitativos foram agrupadas pelo teste de Tukey e Scott-Knott a 5% de probabilidade e para as médias dos tratamentos quantitativos foram ajustados modelos de regressão polinomial. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Germinação *in vitro* de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*.

A análise de variância (Tabela 1) apresentou efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) da interação “meios de cultura x luz” para a variável porcentagem de germinação e de protocormos com gema.

Tabela 1. Análise de variância para % de germinação, % de protocormos mortos e % de protocormos com gema de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, em função de diferentes tipos de meios de cultura e da presença ou ausência de luz. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

| FV | GL | Quadrados Médios ¹ | | |
|-----------------------|----|-------------------------------|--------|--------|
| | | % G | % PM | % PG |
| Meios de Cultura (MC) | 5 | 0,14** | 0,25** | 0,60** |
| Luz | 1 | 0,01 | 0,01 | 1,16** |
| MC x Luz | 5 | 0,02** | 0,01 | 0,18** |
| Resíduo | 48 | 0,00 | 0,00 | 0,05 |
| CV (%) | | 14,95 | 135,51 | 76,05 |

G: Germinação; PM: Protocormos mortos; PG: Protocormos com gema.

¹ Médias transformadas em arco seno.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

Na Tabela 2, pode-se observar que em todos os tratamentos houve germinação após 60 dias de inoculação das sementes, entretanto o melhor resultado na presença de luz foi obtido no meio de cultura 1/3 MS (32,82%), enquanto que na ausência de luz foi obtido no meio de cultura 1/4 MS (35,47%).

Muñoz & Jiménez (2008), utilizando 1/2 MS para germinação de três espécies de *Phragmipedium*, observaram que em *P. humboldtii* a porcentagem de germinação foi de 2,9%, enquanto que para *P. pearcei* foi de 38,7% e *P. longifolium* de 41,3%, não havendo efeito da presença ou ausência de luz.

De acordo com Pierik *et al.* (1988), a germinação de sementes de orquídeas terrestres *in vitro* costuma ser baixa, a exemplo do *Paphiopedilum*. Varias espécies e híbridos de *Paphiopedilum* apresentam sementes recalcitrantes, cuja germinação é mais difícil quando comparada a de outras orquídeas tropicais (ARDITTI, 1992).

Tabela 2. Valores médios para % de germinação, % de protocormos mortos e % de protocormos com gema de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* (Orchidaceae) em função de diferentes tipos de meios de cultura e da presença ou ausência de luz. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

| Tratamentos | Presença de luz | | | Ausência de luz | | |
|---------------|-----------------|---------|---------|-----------------|---------|---------|
| | % G | % PM | % PG | % G | % PM | % PG |
| MS | 16,22 c | 21,82 a | 8,76 a | 10,94 d | 13,57 a | 36,43 a |
| 1/2 MS | 16,60 c | 0,00 b | 3,53 b | 23,77 b | 0,00 b | 46,27 a |
| 1/3 MS | 32,82 a | 0,00 b | 19,21 a | 24,91 b | 0,00 b | 32,07 a |
| 1/4 MS | 22,26 b | 0,00 b | 7,87 a | 35,47 a | 0,00 b | 47,80 a |
| AL1 | 10,94 d | 0,00 b | 0,00 b | 16,22 c | 0,00 b | 0,00 b |
| AL2 | 6,79 d | 0,00 b | 0,00 b | 7,92 d | 0,00 b | 0,00 b |

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

MS: Meio de cultura Murashige & Skoog (1962); **AL1:** Meio de cultura composto por 50 g.L⁻¹ de polpa de banana “nanica” verde, 50 g.L⁻¹ de polpa de mamão papaya, 50 g.L⁻¹ de polpa de tomate semi maduro, 120 ml.L⁻¹ de água de coco da marca Sococo® e 3 g.L⁻¹ do adubo Vitaplan para orquídeas contendo NPK (10:10:10); **AL2:** Meio de cultura composto por 1.000 mL de água de coco da marca Sococo® e 3 g.L⁻¹ de adubo Vitaplan. **G:** Germinação; **PM:** Protocormos mortos; **PG:** Protocormos com gema.

Lee *et al.* (2006), estudando a orquídea *Paphiopedilum delenatii*, relatam à presença de material cuticular nas paredes do embrião e nas paredes internas do tegumento, criando uma proteção responsável pela retenção de umidade nas células do embrião e proteção física. Entretanto, essa proteção dificulta a absorção de nutrientes e a germinação *in vitro*, principalmente em sementes maduras onde a camada cuticular está completamente formada. Em *Orchis papilionacea*, por exemplo, o uso de sementes imaturas para propagação *in vitro* aumentou até 33% a porcentagem de germinação (PEDROSO & SALOMI-PAIS, 1992).

Os reguladores vegetais também podem promover benefícios na germinação de algumas espécies de orquídeas, a exemplo de *Cypripedium candidum* e *C. calceolus*, onde a adição de BAP reduz o tempo de germinação e incrementa a porcentagem de embriões germinados (WAES & DEBERG, 1986; PAUW *et al.*, 1995).

Os meios de cultura “alternativos”, quando comparados aos demais tratamentos, apresentaram as mais baixas porcentagens de germinação nas duas condições de cultivo (Tabela 2). Em estudo com *Encyclia alboxanthina*, Sherlock (2009) verificou que os meios de cultura compostos por polpa de frutas proporcionaram baixa porcentagem de germinação (5,13%). Entretanto, quando utilizados para o crescimento das plântulas em algumas orquídeas, esses meios têm demonstrado bons resultados (ARAÚJO *et al.*, 2006; STANCATO *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2010), inclusive em *Paphiopedilum* (HUANG *et al.*, 2001).

A morte de protocormos foi observada apenas no meio de cultura MS, tanto na presença de luz como na ausência de luz, possivelmente devido a uma maior concentração dos sais e sensibilidade da espécie ao aumento do potencial osmótico.

A formação de gemas nos protocormos ocorreu em todas as concentrações de sais de MS, sendo os melhores resultados obtidos na ausência de luz, possivelmente por esta condição promover a desdiferenciação celular seguido de uma nova diferenciação nas células competentes.

Aos 21 dias após a semeadura foram observados embriões intumescidos e ovalados dentro do tegumento das sementes, e embriões com coloração esbranquiçada rompendo a testa das sementes (Figura 2A), caracterizando a etapa 1 do desenvolvimento das sementes proposta por Micchell (1989), Tabela 3.

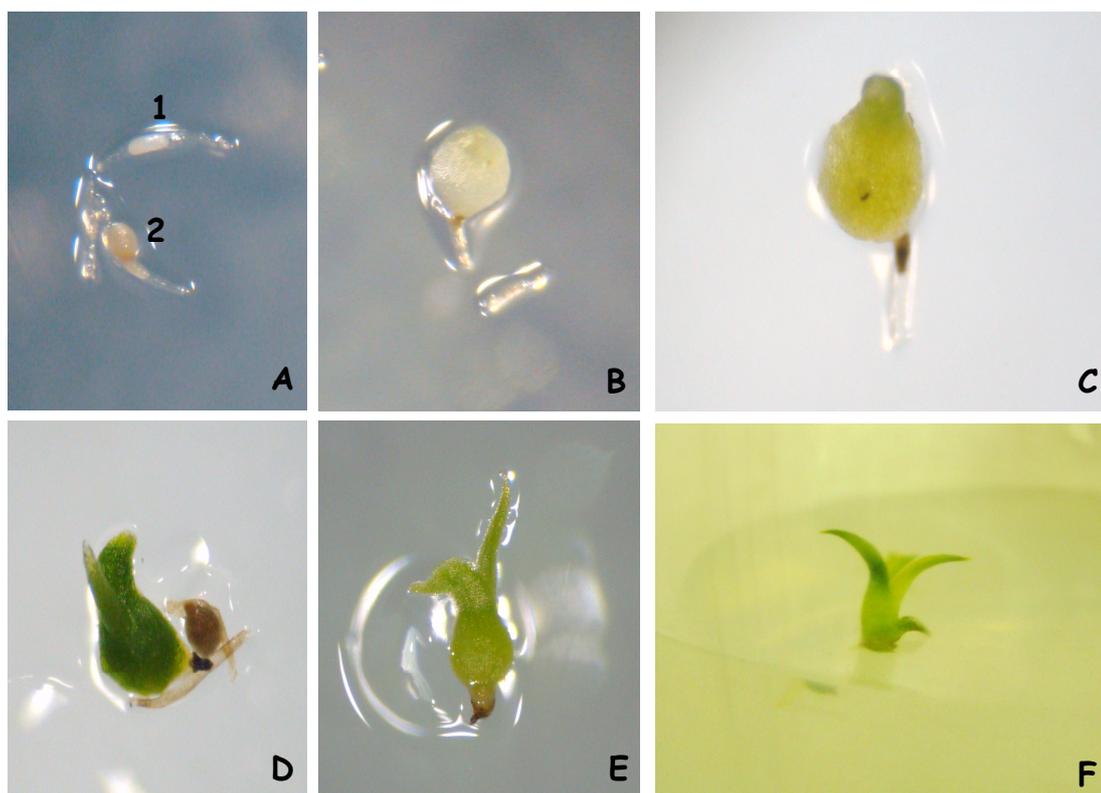


Figura 2. Processo de germinação *in vitro* de sementes de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*. **A1:** Embrião da semente intumescido; **A2:** formação de protocormo a partir da semente; **B:** protocormo; **C, D e E:** diferenciação do protocormo; **F:** crescimento *in vitro* da plântula. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010. **Foto:** do autor.

Tabela 3. Avaliação do desenvolvimento das sementes de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* (Orchidaceae) durante a germinação *in vitro*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

| Caracteres de tamanho do embrião | Etapas* | | | | |
|----------------------------------|---------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Comprimento (mm) | 0,58 | 0,67 | 0,94 | 1,17 | 2,27 |
| Largura (mm) | 0,07 | 0,21 | 0,54 | 0,69 | 0,83 |

* Etapas segundo descrição de Micchell (1989).

Após 10 dias do início da germinação ocorreu a etapa 2, onde constatou-se um aumento na largura e comprimento dos protocormos e aparecimento de radículas em alguns deles. No cultivo em presença de luz foi observado o aparecimento de coloração esverdeada devido o início da síntese de clorofila (Figura

2B). A Figura 2C representa a etapa 3, onde observou-se o surgimento de uma gema 26 dias após a germinação. A etapa 4 (Figura 2D) ocorreu aos 30 dias após a germinação.

2. Influência do BAP na multiplicação *in vitro* de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*.

A análise de variância (Tabela 4) para as concentrações de BAP combinadas a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, apresentou efeito significativo ($p \leq 0,01$) para número de brotos e comprimento médio dos brotos. Para as concentrações apenas de BAP, verificou-se efeito significativo ($p \leq 0,01$) em todas as variáveis analisadas.

Tabela 4. Análise de variância para número de brotos (NB), comprimento médio dos brotos (CMB, em mm) e porcentagem de plantas que formaram brotos (EFB) de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, em função de diferentes concentrações de BAP combinadas ou não a um lastro de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | | | |
|-----------------------------|----|------------------|---------|--------------------|-----------------|---------|------------------|
| | | BAP+ANA | | | BAP | | |
| | | NB ¹ | CMB | EFB ¹ | NB ¹ | CMB | EFB ¹ |
| Concentrações de BAP | 4 | 0,76** | 30,05** | 0,03 ^{ns} | 0,30** | 52,10** | 0,11** |
| Resíduo | 19 | 0,02 | 2,72 | 0,04 | 0,05 | 9,28 | 0,02 |
| CV (%) | | 9,08 | 15,01 | 14,47 | 17,58 | 35,42 | 12,36 |

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F.

^{ns} Não significativo pelo teste de F.

Verificou-se que com o incremento na concentração de BAP no meio de cultura, houve a formação de maior quantidade de brotos adventícios, Figura 3 e 4C. Sendo, a concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP combinada a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, a que possibilitou maior número médio de brotos (4,6).

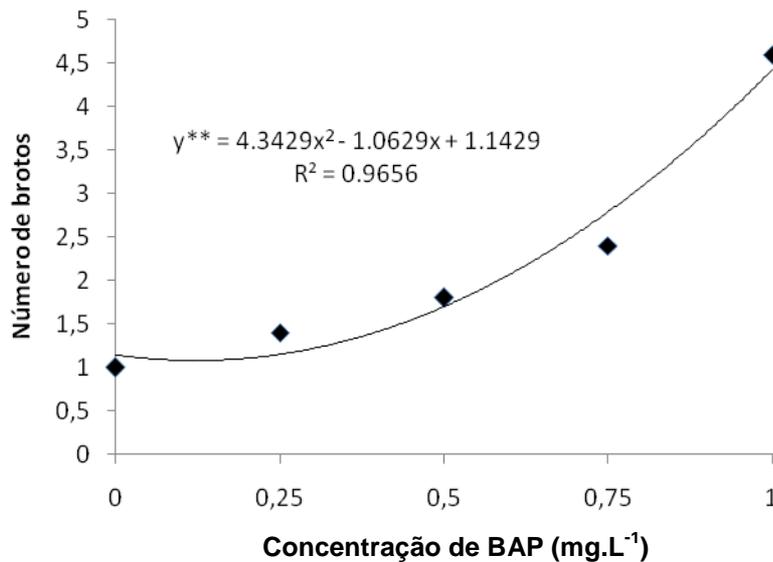


Figura 3. Efeito das concentrações de BAP combinadas a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA no número médio de brotos adventícios de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, após três subcultivos *in vitro*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

Neelam & Chandel (1996) estudando a multiplicação *in vitro* de *Orchis latifolia* observaram bons resultados para número de brotos em meio de cultura MS suplementado com BAP (1,0 mg.L⁻¹) e ANA (0,1 mg.L⁻¹).

Ramos & Carneiro (2007), em trabalho com *Cattleya x mesquitae* observaram que o uso do regulador vegetal BAP (0,5 mg.L⁻¹) combinado com ANA (0,1 mg.L⁻¹) proporcionou a formação de brotações de tamanho médio e mais robustas, indicando maiores possibilidades de regeneração e formação de novos explantes.

Nayak *et al.* (1997) obtiveram os melhores resultados para a formação de brotos em *Cymbidium aloifolium* com a utilização de 22 µM de BAP isoladamente ou combinado a 5,4 µM de ANA.

Costa *et al.* (2009) relatam que para a multiplicação *in vitro* de orquídeas, o meio de cultura mais utilizado é o MS semissólido, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

A utilização de auxina no meio de cultura visa anular o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento das plantas (HU & WANG, 1986). Souto *et al.* (2010) relatam que a utilização de ANA no cultivo *in vitro* de *Cattleya bicolor* estimulou o desenvolvimento caulinar e radicular da espécie.

De acordo com Colombo *et al.* (2010), durante a fase de isolamento dos brotos nota-se a necessidade da utilização e combinação de reguladores de crescimento que possam suprir as deficiências dos teores endógenos de hormônios, já que estes se encontram isolados da planta matriz.

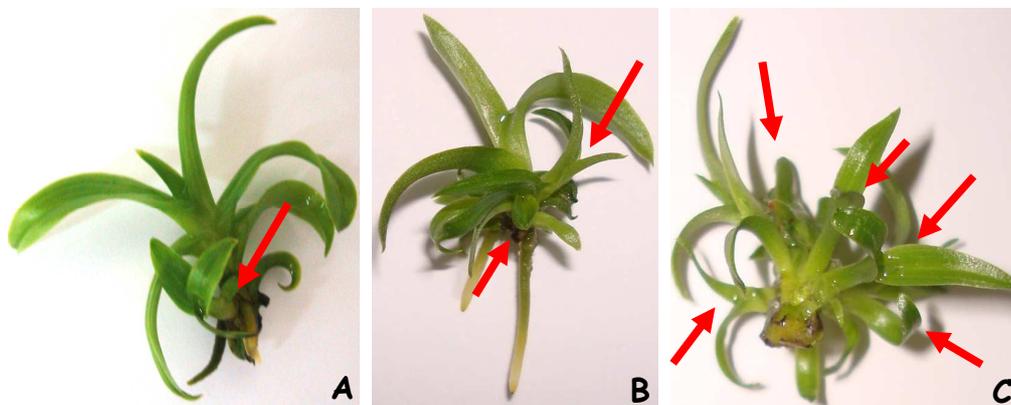


Figura 4. Aspecto da multiplicação de brotos adventícios em *P. lindleyanum* var. *sargentianum* formados a partir de plantas germinadas *in vitro*. **A e B:** Brotações obtidas com meio adicionado de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP; **C:** Brotações obtidas com meio adicionado de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP combinado a $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010. **Foto:** Daniela de Souza Hansen.

Quanto ao comprimento médio dos brotos, Figura 5, observou-se uma relação inversa ao aumento das concentrações de BAP. Resultados semelhantes foram relatados por Lucas *et al.* (2007) estudando a multiplicação *in vitro* em violeta-africana, e por Cantagallo *et al.* (2005) em citrumelo 'Swingle'. Para Nachtigal *et al.* (1995) e George, (1984), este fato se deve provavelmente a competição entre os brotos por nutrientes, luz e oxigênio.

A obtenção de brotos com comprimentos reduzidos implica na necessidade de se induzir um alongamento visando acelerar o processo de produção *in vitro*. Segundo Mayer (2006), as brotações mais alongadas são mais desejáveis, pois podem ser transferidas diretamente para o meio de cultura de enraizamento.

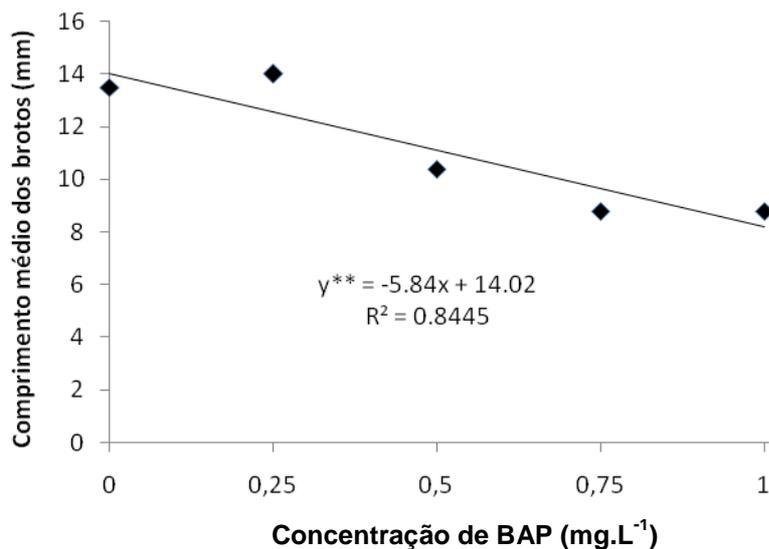


Figura 5. Efeito das concentrações de BAP combinadas a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA no comprimento médio dos brotos de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, após três subcultivos *in vitro*. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas-BA. 2010.

Com relação ao efeito isolado do BAP, o maior valor para número médio de brotos, Figura 6, foi obtido no meio de cultura acrescido de 1,0 mg.L⁻¹, proporcionando a formação de 2,0 brotos adventícios por explante (Figura 4 A e B). Esse comportamento foi semelhante ao experimento com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP combinado a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, entretanto o número médio de brotos foi inferior.

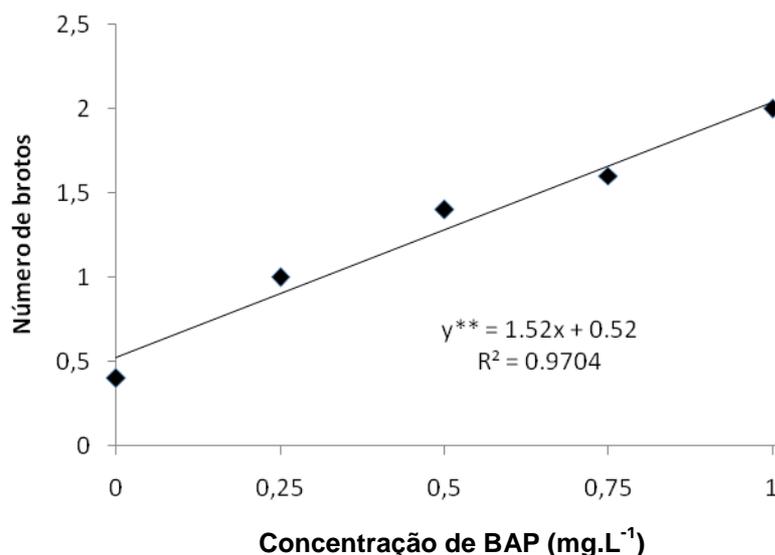


Figura 6. Efeito das concentrações de BAP no número de brotos de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, após três subcultivos *in vitro*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

Em *Oncidium* sp., a multiplicação e desenvolvimento das plântulas foi obtida com sucesso em meio de cultura MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP (KALIMUTHU *et al.*, 2007). Araújo *et al.* (2004) estudando a multiplicação *in vitro* de gloxínia observaram que o maior número de brotos ocorreu no meio de cultura 1/2 MS acrescido de 2,25 mg.L⁻¹ de BAP. Diniz *et al.* (2008) relatam que em lírio-da-paz a maior emissão de gemas foi observada em meio de cultura MS com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP independente da presença do ANA.

Em gérbera, Barbosa *et al.* (1993) verificaram um maior número de brotos em meio de cultura MS acrescido de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP. Chagas *et al.* (2004) estudando a multiplicação *in vitro* de crisântemo observaram que a concentração de 1,4 mg.L⁻¹ de BAP na ausência de ANA foi a que apresentou maior taxa de multiplicação.

Segundo Santos *et al.* (2008), o maior número médio de brotos por explante em abacaxi ornamental foi obtido em meio de cultura MS líquido com a concentração de 1,2 mg.L⁻¹ de BAP. Em *Aechmea blanchetiana* o maior número de brotações foi obtido no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA + 5,0 mg L⁻¹ de 6-BA em meio líquido, e com 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 1,0 mg L⁻¹ de 6-BA no meio semi-sólido (GALVANESE *et al.*, 2007).

Na figura 7 pode-se observar que o comprimento médio dos brotos foi maior na concentração 0,75 mg.L⁻¹ de BAP, podendo estar relacionado à baixa produção de brotos e menor competição por nutrientes. Comportamento semelhante foi obtido por Sherlock (2009) em *Encyclia alboxanthina*, onde houve um maior comprimento médio dos brotos com o aumento das concentrações de BAP.

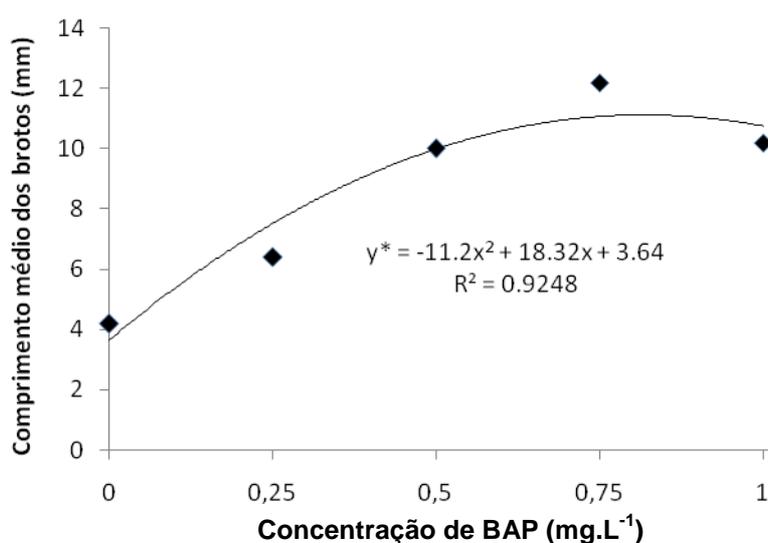


Figura 7. Efeito das concentrações de BAP no comprimento médio dos brotos de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, após três subcultivos *in vitro*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

O número de explantes que formaram brotos quando submetidos as diferentes concentrações de BAP, embora tenha apresentado significância estatística, não possibilitou um ajuste de modelo estatístico com valor biológico e alto valor de R².

3. Crescimento *in vitro* de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* utilizando diferentes concentrações de sacarose.

A concentração de sacarose interferiu diretamente no comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e massa fresca total das plantas, conforme resumo da análise de variância (Tabela 6).

Tabela 5. Análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA, em mm), número de raízes (NR), comprimento da raiz (CR, em mm) e massa fresca total (MFT, em mg) de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, em função de diferentes concentrações de sacarose. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | |
|----------------------------------|----|------------------|--------------------|---------|-----------|
| | | CPA | NR ¹ | CR | MFT |
| Concentrações de Sacarose | 4 | 92,68** | 0,09 ^{ns} | 224,17* | 1199,77** |
| Resíduo | 19 | 5,48 | 0,08 | 49,62 | 214,90 |
| CV (%) | | 7,24 | 21,92 | 39,11 | 11,24 |

¹ Médias transformadas em raiz quadrada (x+5).

** Significativo ao nível de 1%, * Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.

^{ns} Não significativo pelo teste de F.

Observar-se, Figura 8, que a melhor concentração de sacarose para comprimento da parte aérea (39,77 mm) foi de 40 g.L⁻¹.

Os níveis de sacarose no meio de cultura influenciam vários processos metabólicos devido a sua alta solubilidade e rápida metabolização pela maioria das células vegetais (THORPE & BEAUDOIN-EAGAN, 1984), atuando no crescimento e diferenciação dos tecidos. Entretanto, concentrações de sacarose acima de 4% podem aumentar o potencial osmótico do meio de cultura, acarretando prejuízos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

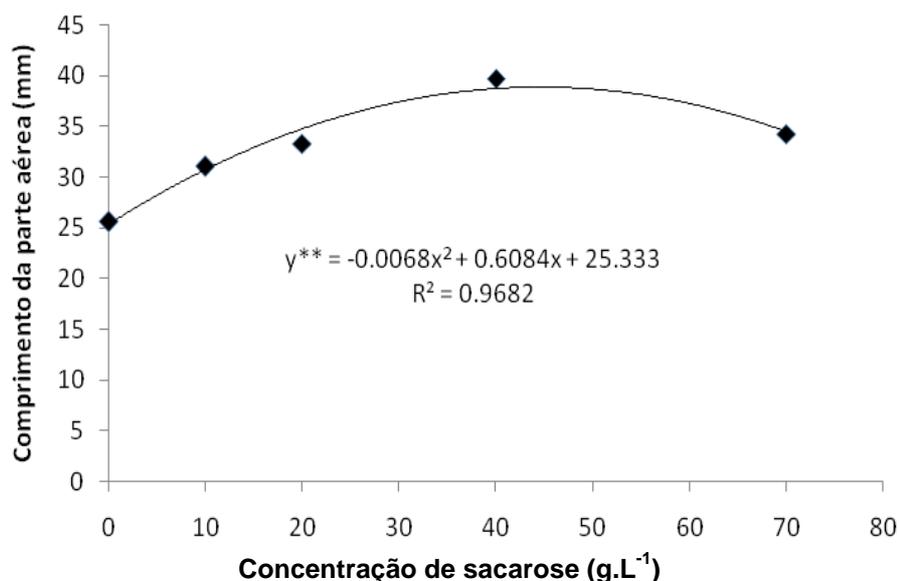


Figura 8. Efeito das concentrações de sacarose no comprimento da parte aérea de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

FRÁGUAS *et al.* (2003) relatam que em estudo com um híbrido de *Cattleya labiata* X *Laelia itambana* cultivado em meio de cultura Knudson e diferentes concentrações de sacarose, constatou-se que a concentração de 40 g.L⁻¹ de sacarose proporcionou o melhor resultado para comprimento da parte aérea. Moreira *et al.* (2007) observou que, em um híbrido de *Laelia purpurata* var. *venosa* X *Cattleya warneri* alba, o maior comprimento das plantas foi obtido com 20 g.L⁻¹ de sacarose em meio de cultura Knudson.

A relação positiva entre o aumento da concentração de sacarose e aumento no comprimento da parte aérea também foi observada por Rego-Oliveira (2003) em *Oncidium varicosum* cultivado em meio de cultura 1/2 MS, sendo o melhor resultado obtido com a concentração de 60 g.L⁻¹ de sacarose. Em *Oncidium baueri* o tratamento contendo 40 g.L⁻¹ de sacarose em 1/2 MS, foi o mais eficiente (SORACE *et al.*, 2008).

Estudo realizado por Pivetta *et al.* (2010) com *Caularthron bicornutum* demonstrou que a concentração de 23 g L⁻¹ de sacarose apresentou melhor valor para comprimento da parte aérea. Besson *et al.* (2010), em estudo com *Miltonia flavescens* Lindl., observaram que o meio de cultura 1/2 MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose foi o melhor.

No crescimento *in vitro* de copo-de-leite, a obtenção de maior comprimento da parte aérea foi observada em meio de cultura MS acrescido de 45,3 g.L⁻¹ de sacarose e 10 mg L⁻¹ de GA₃ (RIBEIRO et al., 2009).

Na análise de variância (Tabela 5) verifica-se que não houve significância quanto ao número de raízes sob as diferentes concentrações de sacarose, sendo que os valores médios variaram entre 1,06 a 2,17. O maior valor para comprimento da raiz (35 mg) ocorreu na concentração de sacarose de 70 g.L⁻¹ (Figura 9).

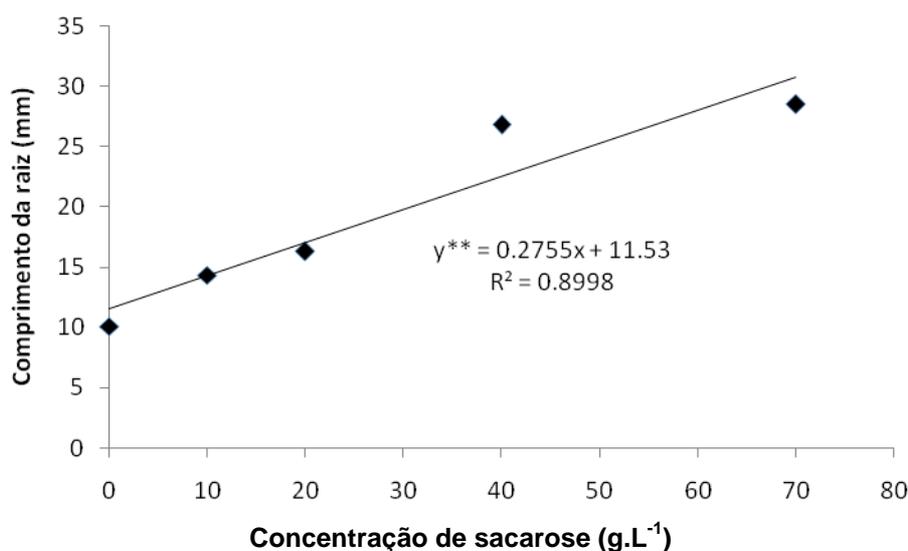


Figura 9. Efeito das concentrações de sacarose no comprimento da raiz de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

Aumentos na porcentagem de enraizamento com o incremento da concentração de sacarose têm sido relatados em alguns protocolos *in vitro* (SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). Rezende *et al.* (2009) observaram que em *Cattleya loddigesii* sp. o melhor enraizamento e crescimento da raiz ocorreu na presença de 60 g L⁻¹ de sacarose em meio de cultura MS acrescido de 2,0 g de carvão vegetal. Em *Caularthron bicornutum* as concentrações de sacarose de 13 a 29 g.L⁻¹ em meio de cultura 1/2 MS demonstraram bons resultados para comprimento da raiz (PIVETTA *et al.*, 2010). Em copo-de-leite o melhor resultado para comprimento da raiz foi observado em meio de cultura MS acrescido de 51,13 a 56,5 g.L⁻¹ de sacarose (RIBEIRO *et al.*, 2009).

O maior valor para massa fresca total (152,48 mg) ocorreu na presença de 40 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 10).

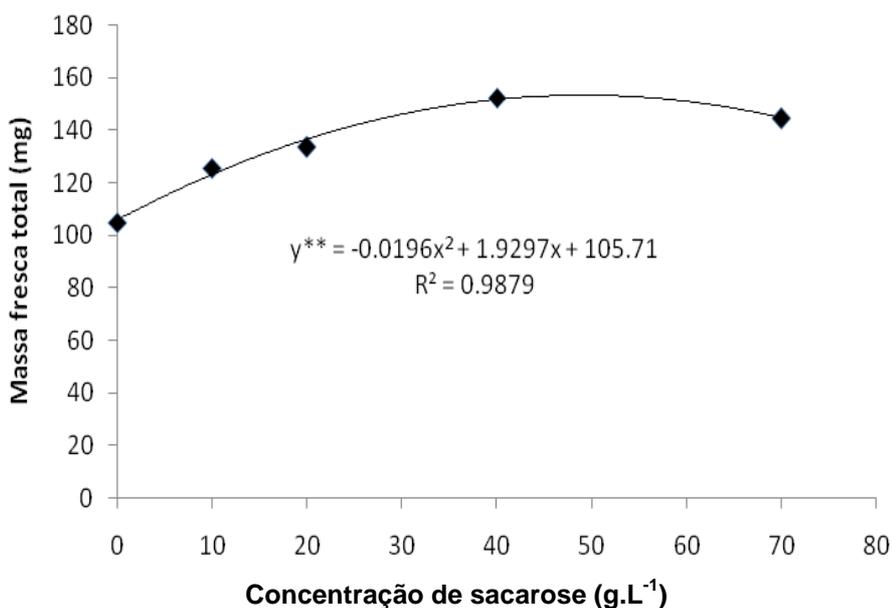


Figura 10. Efeito das concentrações de sacarose na massa fresca total de *P. lindleyanum* var. *sargentianum*, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2010.

Besson *et al.* (2010), em estudo com *Miltonia flavescens* Lindl., observaram que o meio de cultura 1/2 MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose promoveu massa fresca total (0,70g). Em *Oncidium varicosum* cultivado em meio de cultura MS verificou-se que o melhor resultado para massa fresca total foi obtido em 60 g.L⁻¹ de sacarose (REGO-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

CONCLUSÃO

O uso do meio 1/3 MS na presença de luz e 1/4 MS na ausência de luz promoveram culturas ricas em protocormos.

A utilização de BAP na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA promove maior número de brotos.

A concentração de 40 g.L⁻¹ de sacarose é eficiente no crescimento *in vitro* das plantas.

Os estudos demonstram a possibilidade de produção da espécie *in vitro* fornecendo informações básicas para futuros trabalhos visando sua conservação e multiplicação para fins comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, V. A. Cladistic relationships of the slipper orchids (*Cypripedioideae*:Orchidaceae) from congruent morphological and molecular data. **Lindleyana**, West Palm Beach, v. 9, p. 115-132, 1994.

AMORIM, A. M.; JARDIM, J. G.; LOPES, M. M. M.; FIASCHI, P. Angiospermas em remanescentes de floresta montana no sul da Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v.9, n.3, p. 313-348, 2009.

ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Revista Ceres**, Viçosa, v.53, n.310, p. 608-613, 2006.

ARAÚJO, A. G. de; FIORINI, C. V. A.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B. da; VILLA, F. Multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* LOOD. HIERN.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 117-127, 2004.

ARDITTI J.; ERNST R. **Micropropagation of orchids**. 1. ed. New York: John Wiley and Sons, 1992. 682p.

ARDITTI J.; ERNST R. Physiology of germinating orchid seeds. In: ARDITTI J. (Eds.). **Orchid biology: Reviews and perspectives**. v. 3. Ithaca: Cornell University Press, p. 179-204, 1984.

BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; BARROS, I. de. Efeitos da Benzilaminopurina e Ácido Índole-3-Acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook cv. *Appelbloesem*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 15-19, 1993.

BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; BONETT, L. P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 9-13, 2010.

BOZENA, B.; SZCZERBA, J. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n.7, p. 911-915, 1991.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.1, Brasília: EMBRAPA - SPI/ CNPH, p. 87-132, 1998.

CALVETE, E. O. **Concentração de sacarose in vitro e seleção de substratos para aclimatização ex vitro de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. Porto Alegre, RS. 1998. 108f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRS.

CANTAGALLO, F. de S.; AZEVEDO, F. A. de; SCHINO, E. H.; MOURÃO FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J. Micropropagação de citrumelo 'Swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n.1, p. 136-138, 2005.

CARVALHO, V. S. **Morfogênese in vitro de orquídeas do grupo *Cattleya***. Viçosa, MG, 2002. 179 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, UFV.

CHAGAS, E. A.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, E. F. da; PASQUAL, M.; MENDONÇA, V. Multiplicação in vitro de crisântemo cv. White polaris. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 123-126, 2004.

CITES: **The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora**. Disponível em: <www.cites.org/eng/app/e-appendices.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2010.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.27, n.1, p.145-150, 2005.

COLOMBO, L. A.; ASSIS, A. M. de; FARIA, R. T. de; ROBERTO, S. R. Estabelecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p.695-700, 2010.

COSTA, M. A. P. de C.; PEREIRA, M. J. ; ROCHA, M. A. C.; HANSEN, D. de S.; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R.. Micropropagação de Orquídeas. In: GOES, T. J.; SOUZA A. da S. (Eds.). **Aspectos práticos de micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. v.1, p. 351-370.

DEBERGH, P. C. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.289, p. 291-300, 1991.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; OLIVEIRA, A. B. de; BEZERRA, A. M. E. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 107-113, 2008.

FARIA, R. T., RODRIGUES, F. N., OLIVEIRA, L. V. R.; MÜLLER, C. Crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) sob diversas concentrações de sacarose. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v.22, n.4, p. 780-783, 2004.

FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; FARIA, R. T. de. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.24, n.3, p. 636-639, 2010.

FERREIRA, D. F. **SISVAR software**: versão 4.6. Lavras: UFLA/DEX, 2003. Software.

FOLLIOT, M.; MARCHAL, J. *In vitro* growth of bananas (cv. Grande Naine): study of utilization of the carbon source and the main mineral elements of the culture medium. **Fruits**, Paris, v. 47, n. 5, p. 565-571, 1993.

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

GALDINO JÚNIOR, R. F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas**. Jaboticabal, SP, 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual Paulista, UNESP.

GALVANESE, M. S.; TAVARES, A. R.; AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; CHU, E. P.; STANCATO, G. C.; HARDER, I. C. F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 311, p. 63-67, 2007.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S. (Ed.) **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CNPH, p.99-169. 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Hortaliças. p.183-260, 1998.

GUILLEMIN, J. P.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARCHAL, J. Contribution of endomycorrhizas to biological protection of micropropagated pineapple (*Annanas comosus* (L.) Merr) against *Phytophthora cinnamomi* Rands. **Agricultural Science in Finland**, Helsinki, v. 3, p. 241-251, 1994.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. HUANG, L. C.; LIN, C. J.; KUO, C. I. *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.91, n.1-2, p.111-121, 2001.

HU, C. Y.; WANG, P. Embryo Culture: Technique and applications. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. A.; AMIRATO, P. V. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. v.4. New York: Macmillan, p.43-96, 1986.

HUANG, L. C., LIN, C. J., KUO, C. I., HUANG, B. L., MURASHIGE, T. *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.91, n.1-2, p.111-121, 2001.

KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; VIJAYAKUMAR, S. In vitro micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.6, n.10, p. 1171-1174, 2007.

KAUTH P. J.; VENDRAME W. A.; KANE M. E. In vitro culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, Netherlands, v. 85, n.1, p. 91–102, 2006.

KERBAUY, G. B. The effects of sucrose and agar on the formation of protocorm-like bodies in recalcitrant root tip meristems of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae). **Lindleyana**, West Palm Beach, v.8, n.3, p.149-154, 1993.

KRIKORIAN, A. D. Propagación clonal in vitro. In: ROCA, W.; MROGINSKI, L. A. (eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, p. 96–125, 1991.

LEE, Y.; YEUNG, E. C.; LEE, N.; CHUNG, M. Embryo development in the Lady's Slipper Orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. **Annals of Botany**, London, v.98, n., p.1311–1319, 2006.

LUCAS, M. A. K.; FAGUNDES, J. D.; PEREIRA, D. D.; SARMENTO, M. B. Micropropagação de violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.): efeito da benzilaminopurina na multiplicação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1380-1385, 2007.

LUNDERGAN, C. A., JANICK, J. Regulation of apple shoot proliferation and growth *in vitro*. **Horticultural Research**, Edinburgh, v.20, p.19-24, 1980.

MAYER, J. L. S. **Anatomia e morfogênese *in vitro* de *Cymbidium* 'Joy Polis' (Orchidaceae)**. Curitiba, PR. 2006. 124 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná, UFPR.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 217-249. 2004.

MITCHELL, R. Growing hardy orchids from seeds at Kew. **Plantsman**, Peterborough, v.11, n.3, p.152-169, 1989.

MOREIRA, B. M. T., TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. C. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lindl. var *venosa* x *Cattleya warneri* T. Moore Alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 2, n. 2, p. 16-21, 2007.

MULLER, T. S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S. Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 252-254, 2007.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; PATNAIK, S. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.71, p. 243-250, 1997.

NACHTIGAL, J. C.; ZECCA, A. G. D.; FIGUEIREDO, S. L. B.; FORTES, G. R. de L. Influência da benzilaminopurina (BAP) NA multiplicação *in vitro* de kiwi (*Actinidia deliciosa*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 1, p. 23-26, 1995.

NEELAM, S.; CHANDEL, K. P. S. *In vitro* conservation of *Orchis latifolia*: A threatened, medicinal terrestrial orchid. **Journal of Plant Genetic Resources**, New Delhi, v.9, n.1, p.109-113, 1996.

NG, C.; SALEH, N. M.; ZAMAN, F. Q. *In vitro* multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.9, n.14, p. 2062-2068, 2010.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.27, n.1, p.84-90, 2003.

PAUW, M. A. de; REMPHREY, W. R.; PALMER, C. E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and growth of *Cypripedium candidum*. **Annals of Botany**, London, v. 75, p. 267-275, 1995.

PEDROSO, M. C.; SALOMI-PAIS, M. Minituber production from immature seed suspension culture of *Orchis papilionacea*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Heidelberg, v.28, n.4, p. 183-186, 1992.

PIERIK, R. L. M.; SPRENKELS, P. A.; VAN DER HARST, B.; VAN DER MEYS, Q. G. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.34, n., p.139–153, 1988.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; RENATA GIMENES, R.; FARIA, R. T. de; R. J. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p. 1897-1902, 2010.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação “*in vitro*” de *Cattleya x mesquita* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, n.1, p.10-15, 2007.

RAO, A. N. Tissue culture in orchids industry. In: BAJAJ, Y. P. S.; REINERT, J. (eds.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, p. 44-69, 1997.

REGO-OLIVEIRA, L. do V.; FARIA, R. T. DE; FONSECA, I. C. de B.; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 265-272, 2003.

REZENDE, M. E., JASMIM, J. M., FREITAS, C. B. Avaliação comparativa da fibra de coco verde no cultivo de *Cattleya forbesii* Lindl. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE INTRAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 49., 2003, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SI HT, 2003.

RIBEIRO, M. de N. O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; CAVALLARI, L. de L. Desenvolvimento *in vitro* de copo-de-leite: efeito das concentrações de sacarose e de ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 575-580, 2009.

ROBINSON, J. P.; BALAKRISHNAN, V.; BRITTO, J. *In Vitro* Seed Germination and Protocorm Development of *Dendrobium aequum* Lindl.: A Rare Orchid Species from Eastern Ghats of Tamil Nadu. **Botany Research International**, Pakistan, v. 2, n. 2, p. 99-102, 2009.

RODRIGUES, T. M. **Substratos e adubação na aclimatização e desenvolvimento inicial de mudas de bromélia imperial**. Lavras, MG. 2003. 62 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, UFLA.

SANTOS, M. do D. M.; RIBEIRO, D. G.; TORRES, A. C. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob o efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.9, p.1115-1120, 2008.

SHERLOCK, E. M. **Propagação *in vitro* de *Encyclia alboxanthina* Fowlie (orchidaceae): espécie endêmica da Chapada Diamantina-Bahia**. Feira de

Santana, BA, 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1471-1477, 2004.

SORACE, M.; R. T. de; DAMASCENO JÚNIOR, C. V.; PAULA GOMES; G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L. da; TAKAHASHI, 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, 2008.

SRISKANDARAJAH, S.;MULLINS, M. G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation "in vitro". **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.56, n.1, p.71-72, 1981.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; CANGIANI FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.1, p.51-57, 2008.

STEFANELLO, S.; SILVEIRA, E. V.; OLIVEIRA, L. K.; BESSON, J. C. F.; DUTRA, G. M. N. Eficiência de substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* Lindl. propagadas *in vitro*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.3, p. 467-476, 2009.

STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. (Org.). **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. 505p.

STENBERG, M. L.; KANE, M. E. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid. **Lindleyana**, West Palm Beach, v.13, p.101–112, 1998.

STEWAT, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.86, n.2, p. 147–158, 2006.

TEIXEIRA, J. A. da S. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology Review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.2, n.12, p. 683-691, 2003.

THORPE, T. A.; BEAUDOIN-EAGAN, L. D. C-metabolism during growth and shoot formation in tobacco callus cultures. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.113, p.337-346, 1984.

TOMASONI, M. A.; SANTOS, S. D. Lágrimas da Serra: Os impactos das atividades agropecuárias sobre o geossistema da APA Municipal da Serra da Jibóia, no Município de Elísio Medrado-BA. In: Simpósio Nacional de Geografia Física Aplicada, 10., 2003, **Anais...** Rio de Janeiro, RJ, 2003.

VIEIRA, J. G. Z.; UNEMOTO, L. K.; YAMAKAMI, J. K., NAGASHIMA, G. T.; FARIA, R. T. de; AGUIAR, R. S. de A. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.48- 52, 2009.

WAES, J. M.; van DEBERG, P. C. In vitro germination of some western European orchids. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 67, p. 253-261, 1986.

ZENK, M. H.; EL SHAGI, H.; ARENS, H.; STOCKIGT, J.; WEILER, E. W.; DEUS, B. In: BARS, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H. (Eds.). **Plant tissue culture and its biotechnological application**. Heidelberg: Springer-Verlag, p.27-47, 1977.

ZETTLER, L.; STEWARDT, S.; BOWLES, M.; JACOBS, K. Mycorrhizal fungi and coldassisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. Am. **Midland Naturalist**, Notre Dame, v.145, n.1 p. 168–175, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A degradação da vegetação encontrada no Monte da Pioneira e a extração ilegal do *P. lindleyanum* var. *sargentianum* para suprir o mercado informal, têm provocado uma forte pressão sobre as populações nativas, sendo observado uma redução acentuada do número de indivíduos, que diante da situação não disponibilizam de tempo para que ocorra uma regeneração natural no ambiente. Isso demonstra a necessidade de uma postura mais rígida das autoridades responsáveis pela fiscalização ambiental na região, e da conscientização por meio da educação ambiental, tanto das comunidades do entorno do Monte da Pioneira, quanto das demais cidades vizinhas desestimulando atividades predatórias.

O presente trabalho possibilitou realizar um diagnóstico preliminar do comportamento de *P. lindleyanum* var. *sargentianum* no seu habitat natural (Cap. I e II), assim como o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação (Cap. III). Verificou-se que as populações possuem variabilidade genética e que a sua reprodução nas condições naturais tem ocorrido de maneira eficiente. O desenvolvimento *in vitro* da orquídea, é lenta, onde barreiras relacionadas à velocidade de desenvolvimento das plantas precisam ser vencidas. Sugere-se o desenvolvimento de estudos envolvendo marcadores moleculares a fim de fortalecer o conhecimento sobre a variabilidade genética da espécie, estrutura populacional e fluxo gênico. Além disso, estudos devem ser desenvolvidos com outras combinações e concentrações entre reguladores vegetais a fim de se obter uma formulação mais eficiente para a produção *in vitro* de plantas para fins comerciais. A realização de trabalhos envolvendo conservação *in vitro* para uma possível instalação de Banco de germoplasma, e novos estudos sobre a adaptação eficiente das plântulas em condições *ex vitro* devem ser realizados. Sugere-se também, que haja a construção de um viveiro na Vila de Pedra Branca para a produção da espécie, além de outras orquídeas nativas da região, visando gerar renda para a comunidade, desestimulando a coleta no meio ambiente e conscientizando os visitantes do dano que essas ações podem gerar.