

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

FABIANA REGINA GALLO FERREIRA

Morfoanatomia de sementes e plântulas de seis espécies da subtribo Laeliinae
Dressler (Orchidaceae), sob diferentes condições de cultivo assimbiótico

Maringá

2013

FABIANA REGINA GALLO FERREIRA

Morfoanatomia de sementes e plântulas de seis espécies da subtribo Laeliinae
Dressler (Orchidaceae), sob diferentes condições de cultivo assimbiótico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas
da Universidade Estadual de Maringá, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio de Souza

Co-orientadora: Prof^a Dra. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre

Maringá

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

G172m Gallo-Ferreira, Fabiana Regina
Morfoanatomia de sementes e plântulas de seis espécies da subtribo Laeliinae Dressler (Orchidaceae), sob diferentes condições de cultivo assimbiótico / Fabiana Regina Gallo Ferreira. -- Maringá, 2013.
72 f. : il., color., tabs., fotos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio de Souza.
Coorientador: Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2013.

1. Morfoanatomia. 2. Nomenclatura científica. 3. Órgãos reprodutivos - plantas. 4. Orquídeas e suplementos. I. Souza, Luiz Antonio, orient. II. Milaneze-Gutierre, Maria Auxiliadora, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia comparada. IV. Título.

CDD 21.ed. 582.1

AHS-001516

FOLHA DE APROVAÇÃO*

FABIANA REGINA GALLO FERREIRA

Morfoanatomia de sementes e plântulas de seis espécies da subtribo Laeliinae Dressler (Orchidaceae), sob diferentes condições de cultivo assimbiótico

Dissertação/tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Luiz Antonio de Souza
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Marisa Santos
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Kathia Socorro Mathias Mourão
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2013.

Local de defesa: Sala 205, Bloco G80, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família, especialmente ao meu esposo e a minha mãe, e também a todos aqueles que contribuíram para a realização deste. Dedico ainda aos professores e funcionários do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a minha família, sobretudo minha mãe e minha irmã que sempre me incentivaram a estudar e batalhar pelo que desejo e ao meu marido que me apoiou mesmo nos momentos de maior angústia.

Aos professores Luiz Antonio de Souza e Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre que foram mais que orientadores, foram modelos a serem seguidos.

A CAPES pela bolsa que me proporcionou dedicação ao projeto.

A Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada pela imensa oportunidade.

Ao COMCAP e a Cíntia pela disponibilidade do microscópio (MEV).

Aos meus colegas de laboratório, principalmente a Luciane que dispôs de muita paciência me auxiliando com diversas técnicas e a Rosimar e Anderson por serem compreensivos e solidários comigo.

Aos colegas de sala da pós-graduação, especialmente ao Igor, Fabio, Karla e Janaina.

A todos do Museu Dinâmico Interdisciplinar da UEM (MUDI), por me cederem o espaço e a companhia.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pela incomensurável ajuda na preparação de técnicas para a realização deste trabalho.

A secretária do Programa de pós-graduação em Biologia Comparada Márcia, por sua fiel dedicação ao programa e pelo atendimento exemplar aos alunos do programa.

Aos doadores de sementes do Banco de sementes do MUDI.

A todos que me ajudaram de alguma forma, mesmo que indiretamente.

E a Deus, que colocou todos em minha vida e sem o qual nada disso seria possível.

EPÍGRAFE

Se temos de esperar,
que seja para colher a semente boa
que lançamos hoje no solo da vida.
Se for para semear,
então que seja para produzir
milhões de sorrisos,
de solidariedade e amizade.

(Cora Coralina)

Morfoanatomia de sementes e plântulas de seis espécies da subtribo Laeliinae Dressler (Orchidaceae), sob diferentes condições de cultivo assimbiótico

RESUMO

Laeliinae é uma subtribo que se destaca na tribo Epidendreae, por sua importância na horticultura, mas que apresenta problemas taxonômicos. As sementes são diminutas e possuem tegumento unisseriado lignificado e embrião indiferenciado, estando sua germinação, sob condições naturais, relacionada com a instalação de uma associação simbiótica com fungos. Entretanto, este processo pode ocorrer assimbioticamente, *in vitro*, sobre meio de cultura suplementado com compostos diversos, com destaque para a polpa de banana e a água de coco. Poucos são os estudos sobre sementes e plântulas, sendo, portanto, a morfologia e anatomia dessas estruturas pouco conhecidas. Com a finalidade de contribuir com a caracterização das espécies, fornecer informações que sejam úteis na definição das subtribos e gêneros e estabelecer o melhor aditivo ao meio de cultura, foram selecionadas as espécies *Cattleya loddigesii* Lindl., *Cattleya tigrina* A. Rich, *Hadrolaelia purpurata* (Lindl.) Chiron & V.P.Castro, *Laelia anceps* Lindl., *Schomburgkia gloriosa* Rchb.f. e *Sophranitis cernua* Lindl. Protocormos e plântulas em diferentes estágios de desenvolvimento, cultivados assimbioticamente, foram fixadas em glutaraldeído. Como é padrão para a família, a germinação inicia-se com a formação do protocormo, caracterizado como massa parenquimática com rizoides na base. No polo oposto do protocormo diferenciam-se uma gema caulinar e respectivas folhas de mesófilo homogêneo, em que a primeira parece ser um cotilédone, e uma ou mais raízes adventícias (triarca ou tetraarca). O estudo mostrou alguns caracteres estruturais de sementes e plântulas diferenciáveis entre as espécies de Laeliinae analisadas, revelando, também, que a polpa de banana nanica é um aditivo ao meio de cultura mais eficiente para a organogênese de *C. loddigesii* e *S. gloriosa* e nas demais mostrou-se pouco específica quando comparada a água de coco.

Palavras-chave: morfoanatomia, nomenclatura, órgãos reprodutivos, orquídeas e suplementos.

Morphoanatomy of seeds and seedlings of six species of subtribe Laeliinae Dressler (Orchidaceae) under different assymbiotic cultivated conditions

ABSTRACT

Laeliinae is a subtribe that stands out in Epidendreae tribe, for its importance in horticulture, but presents taxonomic problems. The seeds are tiny and have uniseriate lignified tegument and undifferentiated embryo, and its germination under natural conditions, related to the installation of a symbiotic association with fungi. However, this process can occur assymbiotically *in vitro* on medium supplemented with various compounds, especially the banana pulp and coconut water. There are few studies on seeds and seedlings, and therefore the morphology and anatomy of these structures are little known. In order to contribute to the characterization of the species, provide information that is useful in defining genera and subtribes and establish the best additive to the culture medium, species *Cattleya loddigesii* Lindl., *Cattleya tigrina* A. Rich, *Hadrolaelia purpurata* (Lindl.) Chiron & VPCastro, *Laelia anceps* Lindl., *Schomburgkia gloriosa* Rchb.f. and *Sophronitis cernua* Lindl were selected. Protocorm-like bodies and seedlings at different stages of development, cultivated assymbiotically, were fixed in glutaraldehyde. As is standard for the family, germination begins with the formation of protocorm characterized as parenchymal mass with rhizoids at the base. At the opposite pole of protocorm differentiate a gem stem and their homogeneous mesophyll leaves, in which the first one appears to be a cotyledon, and one or more adventitious roots (triarch or tetrarch). The study showed some structural characters of seeds and seedlings distinguishable between Laeliinae analyzed species, revealing also that the banana pulp is a culture medium additive more efficient for the organogenesis of *C. loddigesii* and *S. gloriosa* and the others showed little specificity compared to oconut water.

Keywords: morphoanatomy, nomenclature, reproductive organs, orchids and supplements.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figuras 1-10 – Estrutura da semente de *Cattleya loddigesii*, *Cattleya tigrina*, *Hadrolaelia purpurata*, *Laelia anceps* e *Sophronitis cernua*..... 38**
- Figuras 11-16 – Morfologia de plântulas de *Hadrolaelia purpurata* e *Schomburgkia gloriosa*..... 39**
- Figuras 17-22 – Estrutura dos protocormos/plântulas de *Sophronitis cernua* e *Schomburgkia gloriosa*..... 40**
- Figuras 23-25 – Estrutura da primeira raiz de *Sophronitis cernua* e *Schomburgkia gloriosa*..... 41**

CAPÍTULO 3

- Figuras 1 – Plântulas em meio de cultura com adição de água de coco ou polpa de banana nanica 55**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Análise da viabilidade dos lotes de sementes utilizados para a realização dos ensaios	57
Tabela 2 – Análise de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações	58
Tabela 3 – Análise de plântulas de <i>Cattleya tigrina</i> cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações	58
Tabela 4 – Análise de plântulas de <i>Hadrolaelia purpurata</i> cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações	59
Tabela 5 – Análise de plântulas de <i>Laelia anceps</i> cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações.....	60
Tabela 6 – Análise de plântulas de <i>Schomburgkia gloriosa</i> cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações	61
Tabela 7 – Análise de plântulas de <i>Sophronitis cernua</i> cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações	61

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica.....	13
Introdução	2
Revisão Bibliográfica	5
A família e seus taxa	6
Caracterização das espécies	6
Morfologia e anatomia de sementes e plântulas de Orchidaceae.....	6
Referências.....	5

CAPÍTULO 2

Estrutura da semente e ontogenia da plântula de espécies de Laeliinae (Orchidaceae)	13
Anexos	5

CAPÍTULO 3

Comparação entre os suplementos água de coco e polpa de banana em meio Knudson “C”, para o cultivo assimbiótico de espécies da subtribo Laeliinae	13
Anexos	5

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

Segundo Fornari Neto (2001), epífita é um vegetal que vive sobre outro, porém sem utilizar nutrientes deste, ou seja, este vegetal utiliza-o apenas como apoio. As plantas com hábito epifítico têm grande contribuição na riqueza das espécies diretamente ou servindo como recurso espacial e nutritivo para animais, fungos, algas e bactérias do dossel, além de contribuírem mais para a composição material de seu habitat que as plantas terrestres (NIEDER & BARTOLOTT, 2001).

A maioria das espécies de Orchidaceae descritas é epífita, isto é, 73% de um total de 35000 espécies, e 60,7% dos gêneros contêm espécies epífitas (ATWOOD, 1986), consistindo, possivelmente, no maior grupo de plantas com flores e de distribuição cosmopolita (DRESSLER, 1993), com expressiva exuberância de suas estruturas florais (DRESSLER & DODSON, 1960). Esta família tem representantes desde o Ártico à Antártida, podendo estar em vales, planícies, pântanos, desertos, montanhas, no subsolo, entre outros locais (HATCH, 1953). Entretanto, Pabst & Dungs (1975) concluíram que mais de 60% das espécies de orquídeas brasileiras são endêmicas. Em adição, os gêneros *Laelia* e *Cattleya* estão restritos às Américas, não ocorrendo naturalmente em outros continentes (SUTTLEWORTH *et al.*, 1994). Com a contínua degradação das florestas tropicais e comércio baseado no extrativismo, muitas orquídeas estão ameaçadas de extinção, conforme puderam concluir Colombo *et al.* (2004).

As sementes de orquídeas são diminutas e sua germinação é muito lenta sob condições naturais (STANCATO & FARIA, 1996), ocorrendo após o estabelecimento de uma associação micorrízica. Entretanto, o cultivo assimbiótico das sementes de orquídeas (*in vitro*) tem se mostrado adequado para obtenção de plântulas, sendo uma técnica muito comum para produção e comercialização das mesmas (STANCATO *et al.*, 2001).

As espécies selecionadas para o estudo, *Cattleya loddigesii* Lindl., *Cattleya tigrina* A. Rich, *Hadrolaelia purpurata* (Lindl.) Chiron & V.P.Castro, *Laelia anceps* Lindl., *Schomburgkia gloriosa* Rchb.f. e *Sophranitis cernua* Lindl., ocorrem exclusivamente nas Américas e constituem um grupo expressivo na comercialização de orquídeas. As sementes e plântulas destas espécies foram analisadas estruturalmente, sendo as plântulas obtidas em meio de cultura assimbiótico. O trabalho foi complementado analisando-se os efeitos de aditivos (polpa de banana e água de coco) ao meio de cultura básico, sobre o desenvolvimento das plântulas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. A família e seus taxa

A estrutura floral é a característica que agrupa as espécies de Orchidaceae, tendo três sépalas compondo o verticilo externo e três pétalas compondo o verticilo interno, sendo uma destas pétalas modificada em labelo; do centro da flor projeta-se a coluna, onde estão os órgãos femininos e masculinos (SUTTLEWORTH *et al.*, 1994). A maioria das espécies apresenta flor com um único estame fértil e poucas espécies com dois estames (FERRI, 2006). Os grãos de pólen são unidos, entre si, formando uma massa compacta denominada *pollinium*.

Lindley (1826) nomeou muitas orquídeas e as classificou em subfamílias e tribos. Dressler & Dodson (1960) alteraram esta classificação a fim de respeitar o Código Internacional de Botânica, mantendo algumas tribos e criando subtribo como uma nova categoria taxonômica em Orchidaceae. Desta forma, estes autores mantiveram Epidendreae como tribo, criando a subtribo Epidendrinae, que inclui o grupo Laeliinae.

Posteriormente, Dressler (1981) classificou Laeliinae como subtribo dentro da tribo Epidendreae, pertencente à subfamília Epidendroidae. Ele considerou Laeliinae como subtribo neotropical com cinquenta gêneros e cerca de mil e quinhentas espécies. O autor considerou, ainda, a categoria aliança, sendo a principal *Cattleya*, em que se encontravam gêneros estudados como *Cattleya*, *Laelia*, *Sophranitis* e *Schomburgkia*.

Cameron *et al.* (1999) apresentaram Epidendreae como tribo polifilética e Laeliinae como subtribo monofilética. Van den Berg *et al.* (2005) reforçaram essa afirmação, utilizando análise molecular nessa classificação.

Van den Berg *et al.* (2009) propuseram alianças dentro das subtribos: aliança *Cattleya* (gêneros *Cattleya*, *Brassavola*, *Rhyncholaelia* e *Guarianthe*), aliança *Epidendrum* (*Epidendrum*, *Caularthron*, *Orleanesia*, *Barkeria* e *Myrmecophila*), aliança *Laelia* (somente o gênero *Laelia*), aliança *Broughtonia* (*Broughtonia*, *Psychilis* e *Tetramicra*), aliança *Scaphyglottis* (*Scaphyglottis*, *Dimerandra*, *Jacquiniella*, *Acrorchis*, *Dinema* e *Nidema*), aliança *Encyclia* (*Prosthechea*, *Encyclia* e *Artorima*), aliança *Isabelia* (*Isabelia*, *Constantia*, *Pseudolaelia* e *Loefgre*), aliança *Domingoa* (*Domingoa* e *Homalopetalum*), aliança *Pleurothallidinae* (*Anthallis*, *Stelis*, *Restrepiella*, *Acianhera*, *Octomeria*, *Dilomilis* e *Neocogniauxia*), aliança *Ponerinae* (*Isochilus*, *Ponera*, *Helleriella* e *Nemaconia*) e algumas espécies não inseridas em alianças.

Chiron & Castro Neto (2002) verificaram, por análise molecular, que as espécies mexicanas de *Laelia* são diferentes das brasileiras, e que as espécies brasileiras foram incluídas em diferentes gêneros, como *Dugsia*, *Hadrolaelia*, *Hoffmanseggella* e *Microlaelia* além de *Sophronitis*. Ainda por análise molecular, Van den Berg *et al.* (2005, 2009) consideraram gênero *Schomburgkia* como pertencentes ao gênero *Laelia* e *Sophronitis* como *Cattleya*.

2.2. Caracterização das espécies

As espécies dos gêneros *Cattleya*, *Laelia* ou *Hadrolaelia*, *Schomburgkia* e *Sophronitis*, são muito apreciadas por seu valor comercial (DAHLGREN *et al.*, 1985), sendo alvo muitas vezes de hibridização. De acordo com Withner (1998), na maioria das vezes, as espécies de *Schomburgkia* são utilizadas para hibridização, sendo muito comum o cruzamento de *Schomburgkia crispera*, atualmente *Schomburgkia gloriosa*, com *Sophronitis cernua*.

De acordo com Lindley (1835), *Cattleya* apresenta sépalas petaloides explanadas, muitas vezes maiores que as pétalas carnosas, labelo trilobado sem divisão, antera carnosa, 4 polínias, plantas herbáceas, epífitas, com pseudobulbo; já *Laelia* apresenta sépalas explanadas e lanceoladas, pétalas maiores, carnosa e explanadas, coluna áptera, carnosa, com 8 polínias e 4 caudículos, planta herbácea, epífita com folhas carnosas. *Hadrolaelia* apresenta os mesmos caracteres morfológicos de *Laelia*, mas é considerado como gênero independente por Chiron & Castro Neto (2002). *Sophronitis* é composto por microrquídeas (planta com cerca de 8cm de altura), com pseudobulbos curtos com uma única folha no ápice; e *Schomburgkia* é muito semelhante a *Laelia* (SUTTLEWORTH *et al.*, 1994).

Por sua beleza *Hadrolaelia purpurata*, também chamada *Laelia purpurata* Lindl., é considerada flor símbolo do Estado de Santa Catarina, desde 1983, pelo decreto n. 20.829 (<http://www.sc.gov.br>). Apresenta pseudobulbos com 30 a 40cm, com flores de 15 a 40cm de diâmetro e cores variadas, desde branca a rosa escuro (SUTTLEWORTH *et al.*, 1994).

Sophronitis cernua mostra-se com rizoma e pseudobulbos, suas flores atingem no máximo 3 cm de diâmetro de cor vermelha ou alaranjada (SUTTLEWORTH *et al.*, 1994).

Cattleya loddigesii, possui pseudobulbo delgado e cilíndrico. Suas flores têm cerca de 11cm de diâmetro, de cor branca e rosa, labelo trilobado pálido e lilás intenso, com dois lobos laterais eretos e o central quadrangular e crespo, podendo ser epífita ou rupícola (CROIX, 2008).

Cattleya tigrina, descrita como *Cattleya leopoldii* por Versschaff., apresenta as pétalas com coloração bronze-esverdeada e densamente manchadas em marrom; o labelo possui cor rosa pálido nos lobos laterais e lilás no central (CROIX, 2008).

Schomburgkia gloriosa apresenta pseudobulbos com 15 a 30 cm, com uma única folha em seu topo, flores com 10 cm de diâmetro, sépalas e pétalas brancas labelo crespo de cor púrpura (SUTTLEWORTH *et al.*, 1994).

Laelia anceps tem pseudobulbo curto quadrangular com duas folhas em seu ápice, flores com 10 cm de diâmetro de forma variável (SUTTLEWORTH *et al.*, 1994).

Laelia e *Cattleya* são gêneros exclusivamente americanos (SUTTLEWORTH *et al.*, 1994). *Laelia anceps* é oriunda do México (HALBINGER, 1997); *Sophranitis cernua* pode ser encontrada no Paraná (CUNHA & FORZZA, 2007); *Hadrolaelia purpurata* é brasileira, sendo encontrada tipicamente na Mata Atlântica, principalmente no Sul do Brasil (MENEZES, 1995); *Cattleya loddigesii* está presente no litoral sul do Brasil (CRISCUOLO *et al.*, 1978); *Schomburgkia gloriosa* é encontrada no Distrito Federal (BATISTA & BIANCHETTI, 2003); e *Cattleya tigrina* é encontrada no Rio Grande do Sul (BUZATTO *et al.*, 2007).

2.3. Morfologia e anatomia de sementes e plântulas de Orchidaceae

Alvarez (1964) constatou na semente de Orchidaceae a ocorrência de embrião indiferenciado e livre do tegumento; tegumento fino e transparente; e ausência de endosperma.

Veyret (1974) registrou que o endosperma é formado, mas absorvido durante o desenvolvimento da semente, caracterizando esta como exalbuminosa. O autor observou embrião geralmente único na semente e também verificou que após a germinação ocorre a formação de tubérculo chamado protocormo com rizoides, e que a radícula se forma em geral após o surgimento de folhas. Ele constatou, ainda, que o protocormo varia em formato e é característico de certos grupos; que o protocormo tem capacidade de brotar e formar plantas múltiplas; que existem orquídeas acotiledonares (a maioria) e cotiledonares, em que o cotilédone aparece como uma pequena folha envolvendo a primeira folha verdadeira; e que a estrutura do suspensor pode variar até dentro do mesmo gênero e serve para caracterizar espécie.

Barthlott (1976) descreveu as sementes como fusiformes e considerou que sua morfologia geralmente não é aplicável para diferenciar espécies. Entretanto, o autor considerou que a estrutura do tegumento pode servir para a diferenciação de grupos, utilizando-se de detalhes submicroscópicos. Segundo ainda o autor, as sementes são hidrofóbicas, podendo, todavia, ser umedecidas nas depressões em forma de favo de mel.

Harrison (1977) registrou o tamanho diminuto das sementes (menos de 1mm de tamanho) e os caracteres típicos das sementes de Orchidaceae, como a ausência de endosperma e cotilédone e embrião indiferenciado.

Arditti *et al.* (1979) relataram que as sementes apresentam uma abertura na base (calazal ou na extremidade do suspensor) que pode servir de entrada para fungos micorrízicos essenciais para a germinação do embrião oval.

Arditti *et al.* (1980) propuseram que o padrão de reticulação do tegumento da semente tem valor taxonômico em nível de gênero e espécie.

Barthlott & Ziegler (1981) consideraram que o tegumento varia de tamanho e forma, não existindo um padrão de tipo celular. Para os autores as paredes anticlinais e periclinais das células do tegumento apresentam espessamento reticulado anelar ou helicoidal.

Sood & Mohana Rao (1986) mostraram que o núcleo do endosperma primário da maioria das orquídeas se degenera antes de sofrer qualquer divisão.

Manning & Van Staden (1987) registraram presença de lipídeo nas sementes de orquídeas, como reserva indisponível.

Batygina *et al.* (2003) fizeram extensa revisão sobre a multiplicação seminal e vegetativa em orquídeas, em condições naturais e artificiais. Os autores enfatizaram a existência de poliembrião na família.

3. Referências

ALVAREZ, M. R. **A Histochemical study of embryo development in *Sda* (Orchidaceae).** Dissertation of Graduate. University of Florida, 1964.

ARDITTI, J.; MICHAUD, J. D.; HEALEY, P. L. Morphometry of orchid seeds. I. *Paphiopedilum* and native California and related species of *Cypripedium*. **American Journal of Botany**, v. 66, n. 10, p. 1128-1137, 1979.

_____. Morphometry of orchid seeds. II. Native California and related species of *Calypso*, *Cephalanthera*, *Crallorhiza* and *Epipactis*. **American Journal of Botany**, v. 67, n. 3, p. 347-360, 1980.

ATWOOD, J. T. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. **Selbyana**, v. 9, p. 171-186, 1986.

BARTHLOTT, W. Morphologie der Samen von Orchideen in Hinblick auf taxonomische und funktionelle Aspekte. **Proc. 8th World Orchid Conference**, p. 444-455, 1976.

BARTHOLLOT, W.; ZIEGLER, B. Mikromorphologie der Samenschalen als systematisches Merkmal bei Orchiden. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 94, p. 267-273, 1981.

BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. B. Lista atualizada das Orchidaceae do Distrito Federal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, p. 183-201, 2003.

BATYGINA, T. B.; BRAGINA, E. A.; VASILYVA, V. E. The reproductive system and germination in orchids. **Acta Biologica Cracoviensia Serie Botanica**, v. 45, n. 2, p. 21-34, 2003.

BUZATTO, C. R.; FREITAS, E. M.; SILVA, A. P. M.; LIMA, L. F. P. Levantamento florístico das Orchidaceae ocorrentes na Fazenda São Maximiano, Município de Guaíba, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 19-25, 2007.

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

CHIRON, G. R.; CASTRO NETO, V. P. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. **Richardiana**, v. 2, n. 1, p. 4-28, 2002.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. F. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 2, p. 253-258, 2004.

CRISCUOLO, P. D.; PIVA, L. H. O.; MIRANDA, L. C.; BORTOLETO, E. E.; DULLEY, R. D.; BEMELMANS, P. F.; SODRZEIESKI, D.; PEREIRA, I. F. Floricultura na economia agrícola de São Paulo: Parte I Rosas. **Agricultura em São Paulo: Boletim do Instituto de Economia Agrícola**. p. 295-319, 1978.

CROIX, I. **The new encyclopedia of Orchids: 1500 species in cultivation**. London: Timber Press, 2008.

CUNHA, M. F. B.; FORZZA, R. C. Orchidaceae no Parque Natural Municipal da Prainha, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 383-400, 2007.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the Monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy**. New York: Springer, 1985.

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

_____. **Phylogeny and classification of the orchid family.** Cambridge: Cambridge University Press, 1993.

DRESSLER, R.L.; DODSON, C. L. Classification and phylogeny in the Orchidaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 47, n. 1., p. 25-68, 1960.

FERRI, M. G. **Botânica: Morfologia externa das plantas [Organografia].** São Paulo: Nobel , 2006.

FORNARI NETO, E. **Dicionário prático de ecologia.** Brasília: Alhambra, 2001.

HALBINGER, F. **Laelias of Mexico.** Ciudad de Mexico: Herbario AMO, 1997.

HARRISON, C. R. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette**, v. 138, n. 1, p. 41-45, 1977.

HATCH, E. D. Orquídeas subterraneas. **Orquidea**, v. 15, n. 1, p. 2-11, 1953.

LINDLEY, J. **Orchidearum sceletos.** Reproduced in *Linnaea* 2, p.527-532. London, 1826.

_____. **A key to structural physiological and systematic Botany, for the use classes.** Logman: London, 1835.

MANNING, J. C.; VAN STADEN, J. The Development and Mobilisation of Seed Reserves in Some African Orchids. **Australian Journal of Botany**, v. 35, n. 3, p. 343-53, 1987.

MENEZES, L. **Laelia purpurata.** Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1995.

NIEDER, J.; BARTOLOTT, W. **Epiphytes and canopy fauna of the Otonga rain forest (Ecuador):** Results of the Bonn – Quito Epiphyte Project, Funded by the Volkswagen Foundation (v. 2 of 2). Bonn: Books on Demand GmbH, 2001.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses.** Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, 1975.

SIMBOLOS SANTA CATARINA

<<http://www.sc.gov.br/conteudo/governo/paginas/santacatarinaflor.htm>>. Acesso em 24 jul. 2011.

SOOD, S. K.; MOHANA RAO, P. R. Studies in the embryology of the diandrous orchid *Cypripedium cordigerum* (Cypripedieae, Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 160, p. 159-168, 1986.

STANCATO, G.C.; BELMELMONS, P.F.; VEGRO, C.R.L. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 7, p.25-33, 2001.

STANCATO, G.C.; FARIA, R.T. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (ORCHIDACEAE) I: effects of macro and microelements. **Lindleyana**, West Palm Beach, v. 11, n. 1, p. 41-43, 1996.

SUTTLEWORTH FS; ZIM HS; DILON GW. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. Tradução: LEMA FILHO JG. 1994. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1913.

VAN DEN BERG, C.; GOLDMAN, D. H.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; CAMERON, K. M.; CHASE, M. W. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 92, p. 613–624, 2005.

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L.; WHITTEN, W. M.; SOTO-ARENAS, M. A.; CHASE, M. A. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, v. 104, p. 417–430, 2009.

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

WITHNER, C. L. **The Cattleyas and their relatives: *Brassavola*, *Encyclia*, and other genera of Mexico and Central America**, v. 5. London: Timber Press, 1998.

CAPÍTULO 2

Estrutura da semente e ontogenia da plântula de espécies de Laeliinae (Orchidaceae)

Artigo elaborado e formatado conforme as
normas para publicação científica no periódico
Revista Brasileira de Botânica.

Estrutura da semente e ontogenia da plântula de espécies de Laeliinae (Orchidaceae)

FABIANA REGINA GALLO FERREIRA^{1,2}, LUIZ ANTONIO DE SOUZA E MARIA
AUXILIADORA MILANEZE GUTIERRE

1 – Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Av.Colombo, 5790, CEP
87020-900

2 – Autor para correspondência: fabianagalloferreira@gmail.com

RESUMO

Estrutura da semente e ontogenia da plântula de espécies de Laeliinae (Orchidaceae)

Em Orchidaceae, as plantas com maior destaque na floricultura pertencem à subtribo Laeliinae, tribo Epidendreae, porém esta apresenta conflitos de nomenclatura. Devido à lentidão do cultivo de orquídeas, de forma natural, é comum o cultivo artificial assimbiótico como finalidade acelerar a obtenção de mudas. Com o objetivo de colaborar com a caracterização das espécies e fornecer dados úteis na definição de gêneros foram selecionadas as espécies de Laeliinae *Cattleya loddigesii* Lindl., *C. tigrina* A. Rich, *Hadrolaelia purpurata* (Lindl.) Chiron & V.P.Castro, *Laelia anceps* Lindley, *Schomburgkia gloriosa* Rchb.f. e *Sophranitis cernua* Lindl., cujas sementes foram obtidas no Laboratório de Botânica do Museu Interdisciplinar da Universidade Estadual de Maringá, com diversas procedências, e cultivadas *in vitro* em meio Knudson, fixadas em glutaraldeído e emblocadas em historresina para a avaliação anatômica. Verificou-se que as sementes possuem tamanho muito reduzido, tegumento unisseriado lignificado, embrião indiferenciado e suspensor. A primeira estrutura formada logo após a germinação das sementes é um protocormo parenquimático revestido por epideme, formando, na sequência, rizoides e depois gema que forma as folhas, as quais apresentam mesofilo homogêneo e raiz adventícia triarca ou tetarca. Assim, o estudo revelou que os caracteres estruturais analisados são homogêneos na subtribo analisada.

Palavras-chave: desenvolvimento, morfoanatomia, nomenclatura, órgãos reprodutivos.

INTRODUÇÃO

Laeliinae é considerada subtribo de Orchidaceae (Dressler 1981) que apresenta gêneros com problemas nomenclaturais. Esse autor incluiu nesta subtribo os gêneros *Cattleya* Lindl., *Laelia* Lindl., *Schomburgkia* Lindl. e *Sophronitis* Lindl. Van den Berg et al. (2005, 2009) apresentaram modificação nessa nomenclatura, considerando as espécies de *Schomburgkia* como pertencentes a *Laelia* e as de *Sophronitis* foram incluídas em *Cattleya*. Entretanto, a Lista de Espécies da Flora do Brasil (2012), que foi adotada no presente trabalho, mantém os mesmos gêneros de Dressler (1981) adicionado do gênero *Hadrolaelia* Chiron & V. P. Castro.

Os caracteres morfológicos de órgãos reprodutivos são amplamente utilizados na identificação de plantas, embora aqueles referentes a frutos e sementes sejam comumente pouco utilizados pelos botânicos. Nas Orchidaceae, a morfologia de sementes geralmente não é utilizada, mas a estrutura do tegumento seminal pode ser adequada para a finalidade taxonômica da família (Barthlott 1976).

A estrutura de plântulas em desenvolvimento de monocotiledôneas também é pouco utilizada para identificação de suas espécies. Veyret (1974), em seu trabalho sobre análise geral de Orchidaceae, considera que a morfologia do protocormo e a estrutura do suspensor do embrião podem ser úteis na taxonomia de gêneros e espécies.

A obtenção de orquídeas, principalmente as espécies de valor comercial, é dificultada quando se usa sementes para seu cultivo natural. O cultivo assimbiótico de sementes de orquídeas tem se mostrado adequado para obtenção de plântulas, sendo uma técnica muito comum para produção e comercialização dessas plantas (Stancato et al. 2001).

No presente estudo foi analisada a estrutura morfológica e anatômica das sementes e plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl., *C. tigrina* A. Rich, *Hadrolaelia purpurata* (Lindl.)

Chiron & V.P.Castro, *Laelia anceps* Lindley, *Schomburgkia gloriosa* Rchb.f. e *Sophronitis cernua* Lindl., cultivadas em meio assimbiótico, como contribuição na identificação dos gêneros/espécies da subtribo Laellinae.

MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes de *C. loddigesii*, *C. tigrina*, *H. purpurata*, *L. anceps*, *S. gloriosa* e *S. cernua*, de procedências diversas, foram obtidas no banco de sementes do Laboratório de Botânica do Museu Dinâmico Interdisciplinar (MUDI) da Universidade Estadual de Maringá, mantidas em saco de papel sob refrigeração. A viabilidade das sementes foi testada conforme protocolo proposto por Singh (1981).

As sementes foram previamente esterilizadas em hipoclorito de sódio a 15% e lavadas por quatro vezes em água destilada esterilizada. As plântulas desenvolveram-se em frascos esterilizados, em autoclave por 20 minutos a 1 atm, com capacidade para 200 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Este meio foi preparado de acordo com fórmula proposta por Knudson (1946), modificado pela adição dos suplementos orgânicos água de coco (100mL/L) e banana-nanica (100g/L), com conseqüente substituição do mesmo volume de água (Arditti 1982), e com 3,5g de ágar (Himédia ®). Os frascos foram vedados com filme plástico PVC e armazenados, de forma aleatória, em bancadas com iluminação contínua por lâmpada fluorescentes de 40 watts, em temperatura de $26\pm 3^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar 62%, em média.

A primeira coleta ocorreu após 45 dias da sementeira, e outras duas ocorreram com intervalo de 30 dias umas das outras, tendo sido separadas plantas em diversos estágios na mesma coleta. A análise morfológica foi feita em protocormos e plântulas de *C. loddigesii*, *C.*

tigrina, *H. purpurata*, *L. anceps*, *S. gloriosa* e *S. cernua*, em diferentes fases de desenvolvimento.

A análise anatômica foi feita com as sementes de todas as espécies selecionadas de Orchidaceae e com plântulas de *H. purpurata*, *S. gloriosa* e *S. cernua* em microscópio de luz, sendo fixadas em glutaraldeído, armazenadas em álcool 70 % (Johansen, 1940) e emblocadas em historresina Leica[®], conforme recomendação do fabricante. Em sequência, elas foram seccionadas em micrótomo de rotação e as seções foram coradas em azul de toluidina (O'Brien et al. 1964) e solução de azul de toluidina e fucsina básica (Junqueira 1990). Foram realizados testes histoquímicos para lipídios (Sudam IV), amido (Lugol), celulose (IKI mais ácido sulfúrico) (Berlyn & Miksche 1976) e lignina (Foster 1949). As ilustrações foram feitas mediante captação de imagem em microscópio Leica com câmara digital acoplada.

As sementes de todas as espécies foram investigadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu modelo SS 550. Esta análise foi feita em amostras frescas. Em seguida, as amostras foram montadas sobre suportes de alumínio e cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40nm.

RESULTADOS

Semente

As sementes das espécies estudadas são diminutas, fusiformes (Figuras 1, 3 e 4), unitegmentadas, exalbuminosas, com embrião imaturo elipsoidal (Figura 5). O tegumento consiste em geral de um único estrato de células alongadas, estreitas, de extremidades mais ou menos afiladas ou retas (Figuras 2 e 8). As paredes anticlinais das células do tegumento apresentam espessamento secundário pronunciado e as paredes periclinais externas são

delgadas em todas as espécies estudadas. As paredes periclinais internas são delgadas em *C. loddigesii* e *H. purpurata* (Figura 7), e possuem espessamento nas outras espécies. A deposição deste espessamento parietal varia entre as espécies: íntegro e sob forma de faixas (inteira ou bifurcada) em *C. tigrina* e *S. cernua*, faixa única mediana em *S. gloriosa* (Figura 6), e íntegro ou faixa única mediana em *L. anceps*.

O embrião nessas espécies apresenta suspensor pluricelular, relativamente longo, que pode projetar-se pela micrópila. O suspensor em quase todas as espécies consiste de dois estratos celulares na base, junto ao corpo do embrião, em que as células são mais alongadas, e um estrato apical de células mais ou menos arredondadas (Figura 9). *Hadrolaelia purpurata* (Figura 10) tem suspensor semelhante às outras espécies, mas difere por apresentar três estratos celulares basais. Testes microquímicos executados no embrião revelaram presença de celulose nas paredes celulares e conteúdo protoplasmático com escassa quantidade de lipídios, ausência de amido e com celulose e lignina nas paredes das células do tegumento.

Plântula

As plântulas das espécies investigadas iniciam seu desenvolvimento com o rompimento do único tegumento e a protrusão do protocormo de coloração branca. Pouco tempo depois da emergência, o protocormo adquire coloração verde no meio de cultura (Figura 11). O protocormo tem formato mais ou menos arredondado e desenvolve rizoides na face voltada para o meio de cultura e gema vegetativa na face oposta. A partir desta gema formam-se as folhas verdes, espessas, de tamanho reduzido, de ápice afilado, e dispostas helicoidalmente no pequeno eixo da plântula (Figuras 12 e 13). Em *S. gloriosa*, a primeira folha tem morfologia diferente quando comparada com as outras duas espécies, apresentando-se como bainha encimada por pequeno ápice pontiagudo (Figura 16). A primeira raiz

desenvolve-se nas plântulas no estágio de duas a quatro folhas e apresenta, em geral, cor verde (Figura 14).

Durante o experimento foi constatado que menos da metade dos protocormos de todas as espécies investigadas apresentavam desenvolvimento de gemas vegetativas adicionais que formavam dois ou mais eixos caulinares com folhas no mesmo protocormo, cada eixo comportando-se como plântula (Figura 15).

O protocormo, analisado nas três espécies logo após a germinação da semente, consiste de epiderme e tecido parenquimático (Figura 17). A epiderme é unisseriada, cuticularizada, glabra, estomatífera, de células com parede periclinal externa convexa, eventualmente papilosa, e de paredes delgadas. O parênquima possui células relativamente amplas, vacuolizadas, mais ou menos isodiamétricas, também de paredes delgadas e com conteúdo amiláceo. Nesta fase, na base do protocormo diferenciam-se rizoides uni a pluricelulares, e no ápice um grupo de células meristemáticas vegetativas caracterizadas por tamanho reduzido, núcleos grandes e citoplasma relativamente denso (Figura 18).

Em fase posterior o protocormo torna-se mais volumoso e o grupo de células meristemáticas organiza-se no ápice vegetativo, que origina a primeira folha e assume o formato em domo notável pela coloração intensa de suas células (Figura 19). Em meio a massa de células parenquimáticas com amido desenvolve-se tecido procambial. Em sequência pode se desenvolver no ápice eixo caulinar que pode ser longo ou relativamente curto com novas folhas (Figura 20). O protocormo com folhas mantém a estrutura inicial, mas agora com menos conteúdo amiláceo e diferenciação de feixes vasculares colaterais.

O eixo caulinar apresenta epiderme unisseriada, cuticularizada, com células de contorno variável em seção transversal, sendo pentagonal, quadrangular ou levemente alongada no sentido radial. O córtex deste eixo é parenquimático com células amplas que diminuem gradativamente de tamanho nas proximidades do cilindro central, não se

evidenciando endoderme com estrias de Caspary. O cilindro central é constituído por um único feixe vascular colateral.

As primeiras folhas das plântulas apresentam estrutura geral semelhante. Possuem epiderme unisseriada e estomatífera e mesofilo parenquimático homogêneo clorofilado que pode apresentar idioblastos com ráfides. As folhas diferem na vascularização, constatando-se a presença de um único feixe vascular colateral imerso no mesofilo na primeira folha e três feixes, um central de maior calibre e dois laterais menores, nas folhas subsequentes (Figuras 21 e 22).

A raiz, que se desenvolve após a formação das primeiras folhas, apresenta velame com um a três estratos celulares (Figuras 23 e 24), dependendo da região observada, cujas células caracterizam-se por apresentar espessamentos parietais secundários sob forma de faixas finas dispostas anticlinalmente. Sob o velame, já no córtex, ocorre exoderme com estrias de Caspary ou lâmina de suberina nas paredes, tecido parenquimático com espaços intercelulares, que pode apresentar idioblastos com ráfides, e endoderme com estrias de Caspary. O cilindro central apresenta periciclo unisseriado parenquimático envolvendo coluna de xilema e floema primários alternados. As raízes de *H. purpurata* e *S. cernua* são triarcas e a de *S. gloriosa* é tetarca (Figura 25).

DISCUSSÃO

As sementes das espécies de Laeliinae estudadas apresentam semelhança estrutural e possuem os caracteres típicos referidos para Orchidaceae por Barthlott (1976), Boesewinkel & Bouman (1984), Dahlgren et al. (1985). Os caracteres como tamanho diminuto, tegumento unisseriado, embrião reduzido e ausência de endosperma foram observados nas sementes de Laeliinae estudadas, e podem ser consideradas como adaptações morfológicas relacionadas à

anemocoria (Barthlott 1976, Boesewinkel & Bouman 1984, Dahlgren et al. 1985). Boesewinkel & Bouman (1984) também fazem referência ao espaço considerável entre o tegumento e o embrião, verificado principalmente na região calazal das espécies de Laeliinae, como um caractere importante na dispersão da semente pelo vento. De acordo com Arditti & Ghani (2000) as sementes de orquídeas flutuam por longos períodos no ar, devido a caracteres como tamanho reduzido, formato alongado e principalmente acúmulo de ar no espaço interno das sementes.

O embrião das espécies de Laeliinae é indiferenciado, como é comum nas Orchidaceae, e apresenta suspensor relativamente longo. Na literatura, a estrutura e o desenvolvimento do suspensor podem ser usados para distinção de gêneros em Orchidaceae, como sugerido por Veyret (1974). No caso das espécies de Laeliinae analisadas o suspensor diferenciado mostrou-se homogêneo nas espécies, exceto em *H. purpurata* que apresenta um estrato celular adicional. É possível que a ontogênese do embrião e seu suspensor possam revelar caracteres distintivos mais significativos. Veyret (1974) atribui ao suspensor a função de nutrir o embrião, em razão da ausência de endosperma em sementes maduras de Orchidaceae.

A germinação *in vitro* das espécies de Laeliinae mostrou padrão comum em Orchidaceae. Veyret (1974) já registrara este padrão caracterizado pela formação de um tubérculo, denominado protocormo, que desenvolve rizoides e ápice vegetativo com folhas e ausência de radícula. Kraus et al. (2006) registraram possíveis divergências entre os termos protocormo e plântula em Orchidaceae, postulando que estes termos podem ser usados indistintamente, considerando que eles referem-se à mesma estrutura resultante do desenvolvimento do embrião.

Os protocormos de Laeliinae podem apresentar mais de uma gema vegetativa que pode resultar no desenvolvimento de várias plantas no meio de cultura. De acordo com Veyret

(1974), o desenvolvimento de várias gemas no protocormo é um fenômeno comum entre as orquídeas, e sua frequência varia com a espécie e o meio usado para multiplicação.

A primeira folha que se forma no ápice vegetativo do protocormo de Laeliinae apresenta morfologia diferente apenas em *S. gloriosa*, que se caracteriza por apresentar somente a bainha; nas outras espécies ocorre também limbo reduzido. A primeira folha representada por bainha foi registrada por Carlson (1943) em *Calopogon pulchellus* (Sw.) R. Br. A primeira raiz das plântulas de Laeliinae somente aparece no estágio de duas a quatro folhas. O aparecimento da raiz em plântulas ou protocormos de Orchidaceae parece ocorrer apenas quando há folhas desenvolvidas (Carlson 1943, Veyret 1974, Nishimura 1981, Kraus et al. 2006).

A estrutura dos protocormos de Laeliinae segue padrão descrito na literatura para Orchidaceae (Kraus et al. 2006), ou seja, uma massa parenquimática revestida por epiderme com tecido meristemático numa extremidade e rizoides na outra. Nishimura (1981) registrou diferenciação de tecido procambial no protocormo, após início de formação da primeira folha, no ápice vegetativo de *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Lindl.) P.N. Don, como verificado nas espécies de Laeliinae. Também foi verificada nas espécies de Laeliinae a diminuição da quantidade de amido nas células do protocormo durante a diferenciação da plântula, um processo já descrito no desenvolvimento da plântula de *Calopogon pulchellus* (Carlson 1943) e de *Vanda Jones* ex R. Br. (Alvarez 1964).

A subfamília Epidendroideae, à qual pertencem as espécies de Laeliinae estudadas, geralmente possui adaptações para o hábito epifítico, sendo uma delas a presença de raízes aéreas com velame multisseriado (Dahlgren et al. 1985). Nas plântulas de Laeliinae, a primeira raiz já apresentava velame uni a trisseriado, acompanhado de exoderme, provavelmente com a função de absorção e armazenamento de água e substâncias minerais, e evitar a perda de água (Benzing et al. 1982) em condições naturais.

A primeira raiz adventícia das plântulas das espécies de Laeliinae é triarca ou tetraarca, observação também feita em *Calopogon pulchellus* (Carlson 1943). Diferentemente das raízes dessas plântulas, as raízes adventícias de monocotiledôneas adultas em geral são poliarcas (Esau 1959, Mauseth 1988), provavelmente em função da maior demanda destas raízes para o transporte de grande quantidade de água e nutrientes (Mauseth 1988). É importante ressaltar que investigações sobre raízes adicionais das plântulas de Laeliinae poderiam revelar aumento do número de polos de protoxilema, como foi constatado por Carlson (1943) no desenvolvimento da plântula de *Calopogon pulchellus*.

A estrutura das primeiras folhas das plântulas de monocotiledôneas não tem recebido a devida atenção de anatomistas vegetais, registrando-se poucas informações na literatura (Carlson 1943, Souza 2009). As folhas das plântulas de espécies de Laeliinae têm mesofilo homogêneo, como na orquídea *Calopogon pulchellus* (Carlson 1943), mas outras plântulas de monocotiledôneas podem ter folhas com mesofilo homogêneo ou dorsiventral (Souza 2009).

Veyret (1974) registra dois grupos de orquídeas, aquele cujas espécies possuem embrião com cotilédone e outro grupo desprovido de cotilédone. Nishimura (1991) faz menção a *Cattleya aurantiaca* como exemplo de espécie que não apresenta cotilédone. Por outro lado, Velenovsky (1907) propôs que a primeira folha de *Cattleya* pode ser considerada como cotilédone. É provável que esta primeira folha, observada nas três espécies investigadas de Laeliinae, seja de fato folha cotiledonar. Nossa convicção baseia-se em dados estruturais e informações da literatura. Essa primeira folha das Laeliinae é vascularizada por um único feixe vascular, observação feita para cotilédone de espécies epífitas por Boyd (1932), embora esta autora tenha considerado um processo de redução vascular como resposta ao ambiente. Outro fato a favor da interpretação cotiledonar nas Laeliinae refere-se à presença de folha

reduzida, sob forma de bainha, e também com apenas um feixe vascular, na plântula de *S. gloriosa*.

As espécies de Laeliinae investigadas indicam homogeneidade nos caracteres de sementes e plântulas para esta subtribo. Entretanto, registram-se alguns caracteres diferenciáveis no presente estudo, como os relativos ao tegumento seminal, suspensor, desenvolvimento da primeira folha da plântula e número de polos xilemáticos na raiz, que podem ser significativos para a separação das espécies.

REFERÊNCIAS

Alvarez MR. 1964. A Histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). Dissertation of Graduate. University of Florida, Florida.

Arditti J. 1982. Orchid seed germination and seedling culture : A manual. *In*: Arditti, J. (Ed.), Orchid biology: Reviews and perspectives. v.2. Comstock Publishing Associates, Ithaca, p. 244-370.

Arditti J, Ghani AKA 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological Implications. *New Phytology* 145: 367-431.

Barthlott W. 1976. Morphologie der Samen von Orchi-deen in Hinblick auf taxonomische und functionelle Aspekte. Proc. 8th World Orchid Conference, Frankfurt, p. 444-455.

Benzing DH, Ott DW, Friedman WE. 1982. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen exodermis complex. *American Journal of Botany* 69:608-614.

Berlyn GP, Miksche JP. 1976. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: The Iowa State University.

Boesewinkel FD, Bouman F. 1984. The seed: structure. *In: Johri, BM (Ed.). Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, p. 567-610.

Boyd L. 1932. Monocotyledonous seedlings. *Transactions and proceedings Botanical Society* 31: 5-224.

Carlson MC. 1943. The morphology and anatomy of *Calopogon pulchellus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 70: 349-368.

Dahlgren HT, Clifford, HT, Yeo PF. 1985. *The families of the Monocotyledons: structure, evolution and taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin.

Dressler RL. 1981. *The Orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.

Esau K. 1959. *Anatomía Vegetal*. Ediciones Omega, Barcelona.

Foster AS. 1949. *Practical plant anatomy*. D. van Nostrand Company, Princeton.

Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.

Junqueira CU. 1990. O uso de cortes finos de tecidos na Medicina e Biologia. Meios & Métodos, v.66, p. 10-11.

Knudson L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. American Orchid Society Bulletin 15:214-217.

Kraus JE, Kerbaux GB, Monteiro WR. 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. Hoehnea 33: 177-184.

Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2012. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012> (acesso 2012 jan 10).

Mauseth JD. 1988. Plant Anatomy. The Benjamin/Cummings Menlo Park, N.J.

Nishimura G. 1981. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. Botanical Gazette 142:360-365.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59:368-373.

Singh, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. American Orchid Society Bulletin 50:416-418.

Souza LA. 2009. Sementes e plântulas: Germinação, estrutura e adaptação. Todapalavra Editora, Ponta Grossa.

Stancato GC, Belmelmons PF, Vegro CRL. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 7:25-33.

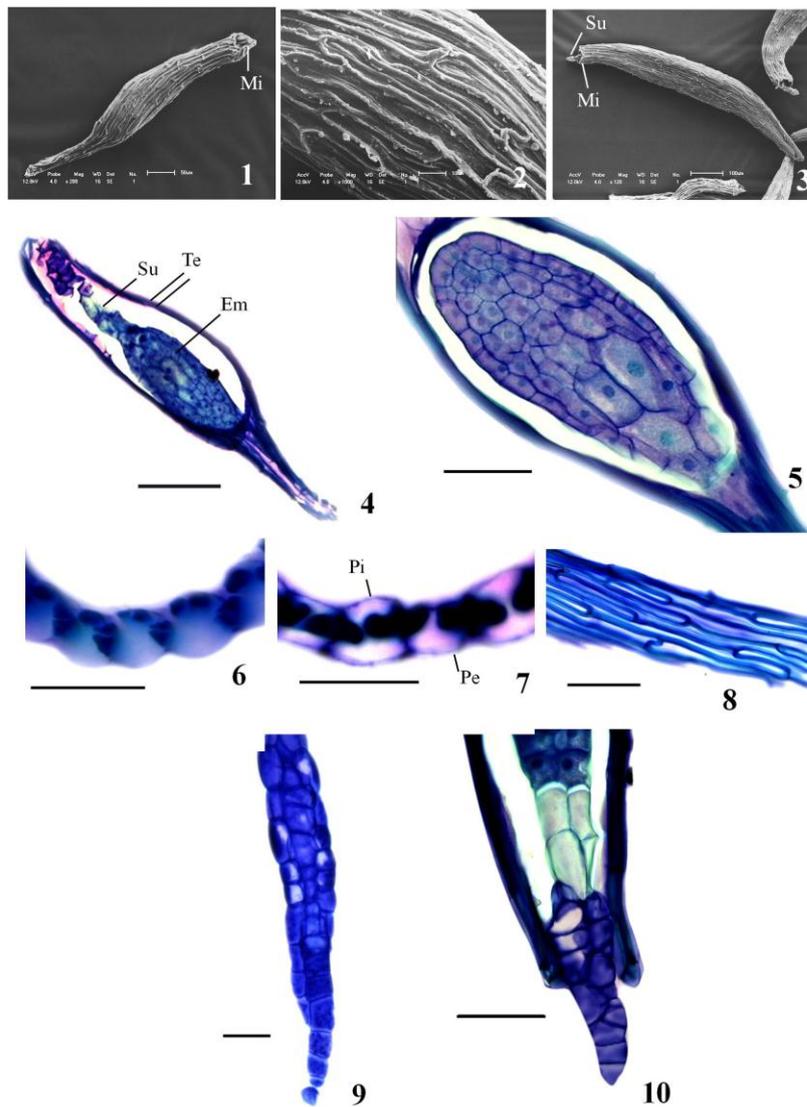
Van den Berg C, Goldman DH, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Cameron KM, Chase MW. 2005. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). American Journal of Botany 92:613–624.

Van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto-Arenas MA, Chase MA. 2009. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. Annals of Botany 104:417–430.

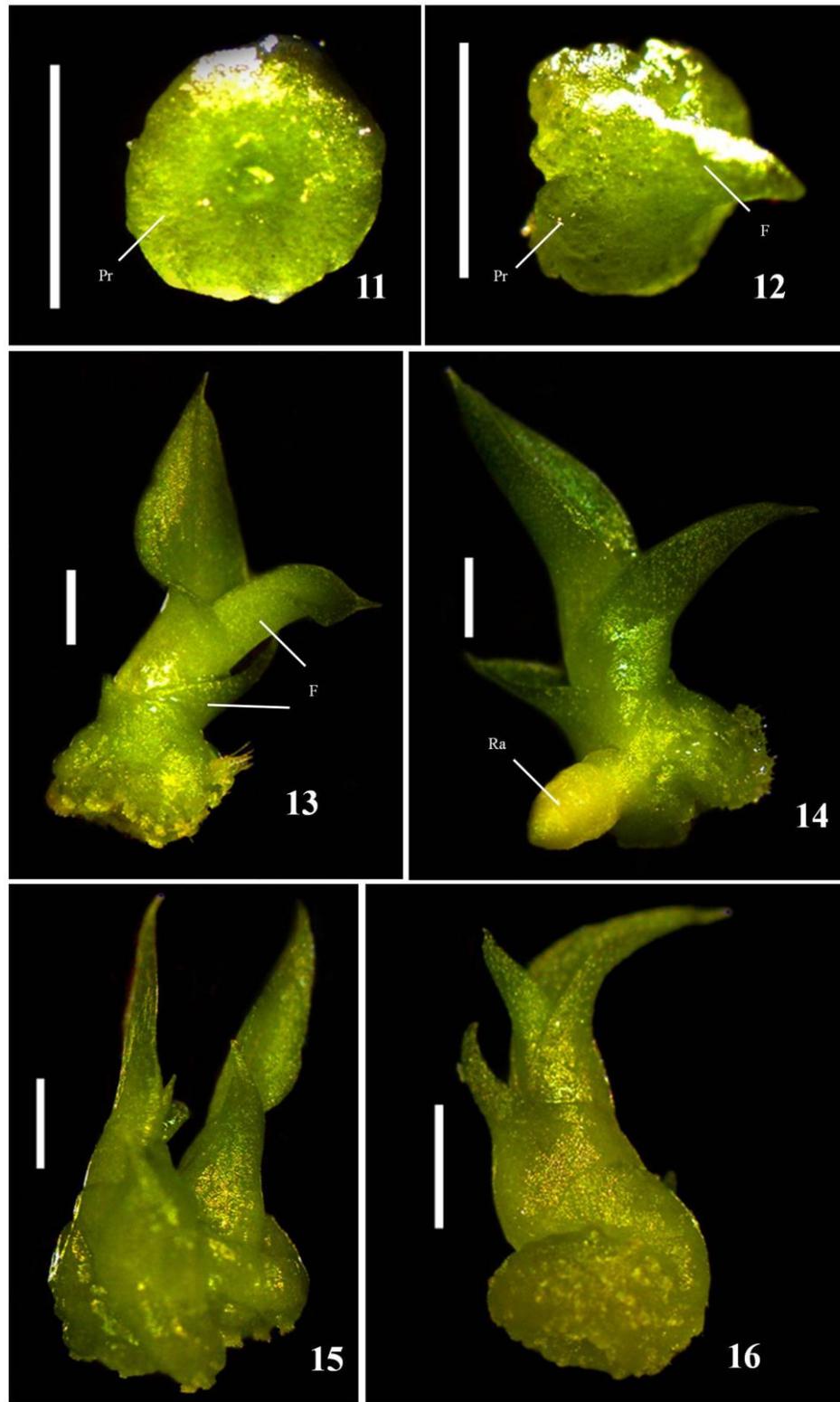
Velenovsky J. 1907. Vergleichende morphologie der Pflanzen, part. 2. Fr. Rivac, Prague.

Veyret Y. 1974. Development of the embryo and the young seedling stages of orchids. *In*:

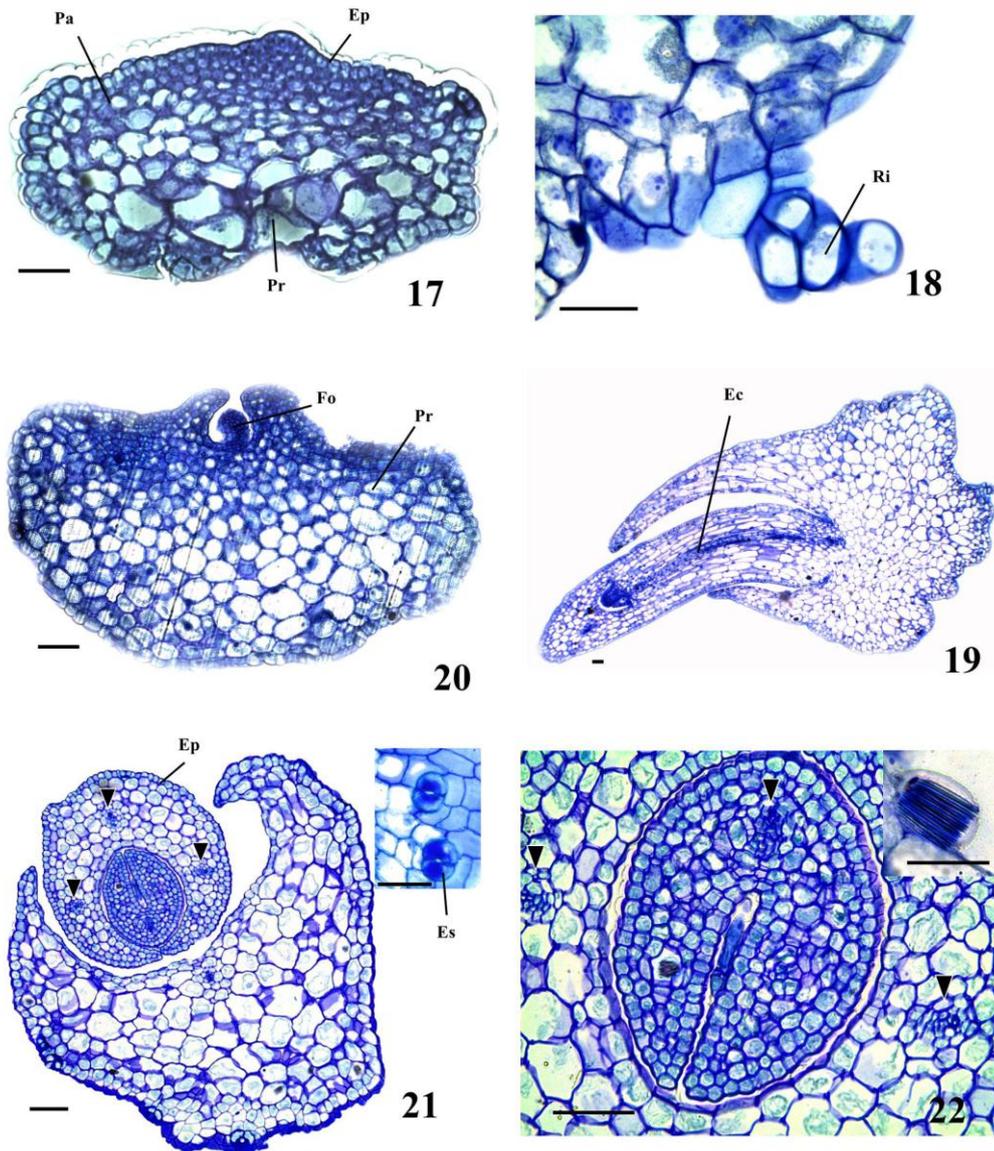
Withner CL. (ed). The orchids. John Wiley and Sons, New York, p. 223-265.



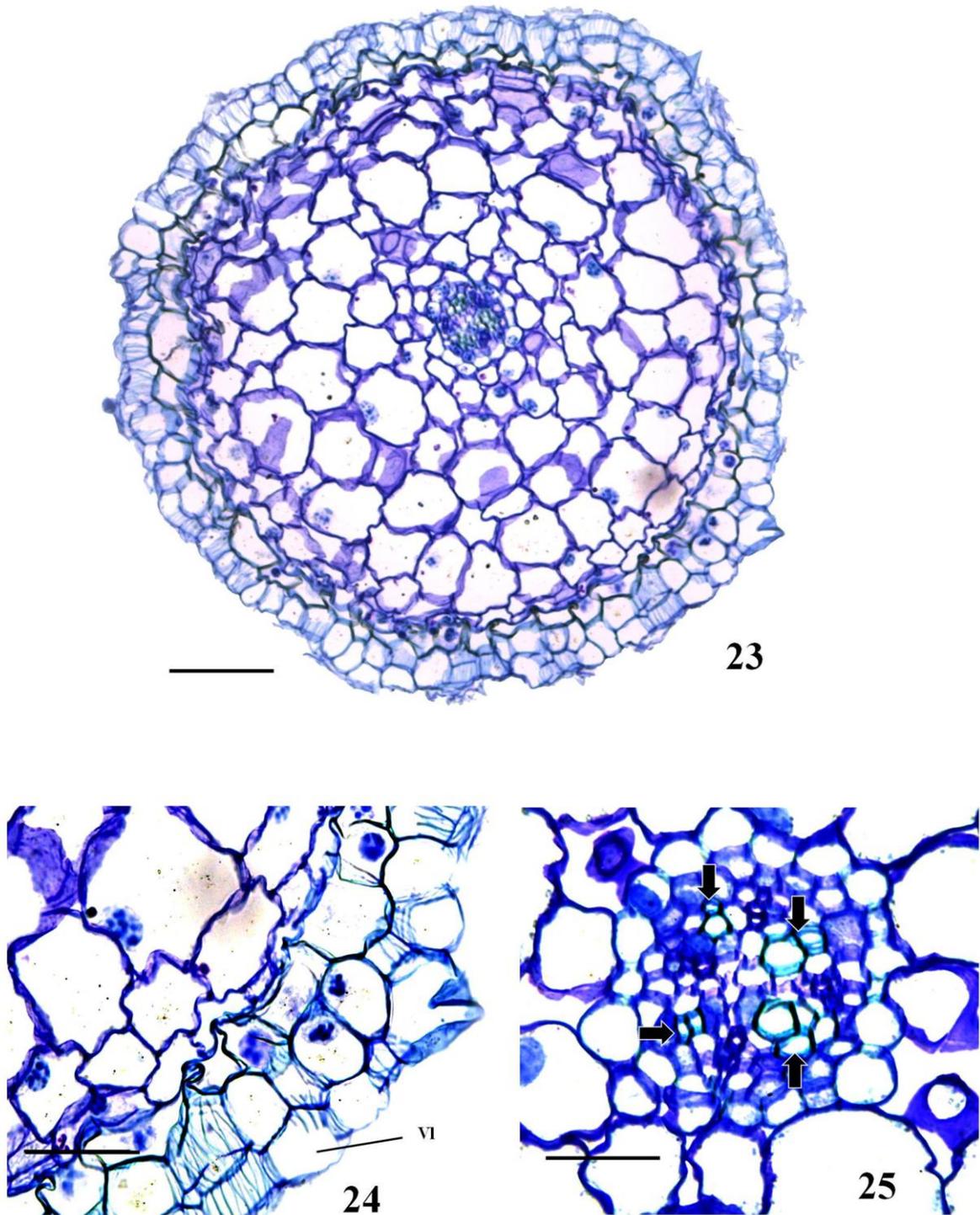
Figuras 1-10 – Figuras 1-10 – Estrutura da semente de *Cattleya loddigesii* (Figura 1, 2, 4), *Cattleya tigrina* (Figura 8), *Hadrolaelia purpurata* (Figura 7-3), *Laelia anceps* (Figura 5-9), *Schomburgkia crista* (Figura 6) e *Sophronitis cernua* (10). Figuras. 1-3. Aspecto geral das sementes e da superfície do tegumento em MEV. Figuras 4-5. Semente em seção longitudinal. Figuras 6-7. Detalhes do tegumento seminal. Figura 8. Tegumento seminal em vista frontal. Figuras 9-10 Detalhes do suspensor. (Me=embrião; Mi= micropila; Pe=parede periclinal externa; Pi= parede periclinal interna; Su= suspensor; Te= tegumento). Barras: 20 μ m (6, 7), 50 μ m (1, 5, 8, 9,10), 100 μ m (2, 3, 4).



Figuras 11-16 - Morfologia de plântulas de *Hadrolaelia purpurata* (11-15) e *Schomburgkia gloriosa* (16), com 45 dias após a sementeira (11-12), 75 dias (13-15) e 105 dias (14-16) de idade após a sementeira. (F= folha; Pr= protocormo; Ra= Raiz). Barras: 1mm.



Figuras 1-10 – Estrutura da semente de *Cattleya loddigesii* (Figura 1, 2, 4), *Cattleya tigrina* (Figura 8), *Hadrolaelia purpurata* (Figura 7-3), *Laelia anceps* (Figura 5-9), *Schomburgkia crispa* (Figura 6) e *Sophronitis cernua* (10). Figuras. 1-3. Aspecto geral das sementes e da superfície do tegumento em MEV. Figuras 4-5. Semente em seção longitudinal. Figuras 6-7. Detalhes do tegumento seminal. Figura 8. Tegumento seminal em vista frontal. Figuras 9-10. Detalhes do suspensor. (Me=embrião; Mi= micropila; Pe=parede periclinal externa; Pi= parede periclinal interna; Su= suspensor; Te= tegumento). Barras: 20 μ m (6, 7), 50 μ m (1, 5, 8, 9,10), 100 μ m (2, 3, 4).



Figuras 23-25 - Estrutura da primeira raiz de *Sophronitis cernua* (23,24) e *Schomburgkia gloriosa* (25). (VI=velame; Seta= polos de xilema). Barras: 50 μ m (24-25); 100 μ m (23).

ANEXO 1

NORMAS DA REVISTA DO CAPÍTULO II: REVISTA BRASILEIRA DE BOTÂNICA
(BRAZILIAN JOURNAL OF BOTANY) – ISSN 1806-9959

Os manuscritos devem ser em espaço duplo, com numeração consecutiva de página. Use o Word para Windows 2000 (ou versões posteriores), fonte Times New Roman, tamanho 12. Colocar apenas um espaço entre palavras e não hifenizar-los no final de uma linha. Não usar tabulação (tecla Tab), exceto no início de cada parágrafo. Não usar negrito ou sublinhado (exceto em legendas). Restringir itálico para nomes científicos, descrições ou diagnóstico de novas taxa, os nomes e números de coletores, e por símbolos genéticos ou estatística.

Formato do manuscrito

Primeira página - Título: conciso e informativo (em negrito), nomes completos dos autores (em letras maiúsculas); filiação, endereço completo, autor correspondente e respectivo e-mail, todos em notas de rodapé; com execução do título.

Segunda página - RESUMO (incluir título), palavras-chave (até 5, em ordem alfabética, sem repetir quaisquer palavras do título).

Texto - Iniciar uma nova página a cada item de acordo com a seguinte sequência Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências. Agradecimentos devem ser colocados antes das referências.

Primeiro nível de títulos - a primeira letra maiúscula, em negrito, não centralizada.

Segundo nível posições-itálico, fonte, negrito mesma que a posição do primeiro nível, seguido do texto na mesma linha, mas separados por hífen (-).

Não usar terceiro nível títulos.

Citar cada figura e tabela no texto em ordem numérica.

As presentes referências devem estar de acordo com os seguintes exemplos: Smith (1960) ou (Smith 1960), Smith (1960, 1973), Smith (1960a, b); Smith & Gomez (1979) ou (Smith & Gomez 1979); Smith et al. (1990) ou (Smith et al. 1990.); (Smith 1989, Liu & Barros 1993, Araújo et al. 1996, Sanches 1997).

Em trabalhos taxonômicos, citar material botânico em detalhe na seguinte sequência: local e data de coleta, nome do coletor e número e sigla do herbário, de acordo com os exemplos: o Brasil. Mato Grosso: Xavantina, s.d., HS Irwin S.N. (HB3689). São Paulo: Amparo, 23-XII-1942, JR Kuhlmann & ER Menezes 290 (SP); Matão, BR 156, 8-VI-1961, Eiten G et al. 2215 (SP, EUA).

Todos os trabalhos deverão citar outros trabalhos.

Autores de nomes científicos de plantas vasculares devem ser abreviados de acordo com IPNI (<http://www.ipni.org/ipni/plantname-searchpage.do>). Espécies e nome (s) de autor (s) devem ser incluídos quando mencionado pela primeira vez no texto, no título apenas quando essencial. Abreviaturas de obras originais sobre taxonomia deve seguir BPH.

Referências a resultados não publicados ou trabalhos submetidos devem aparecer da seguinte forma: (SE Sanchez, dados não publicados).

Fornecer números e unidades da seguinte forma:

- Números de até nove devem ser escritos por extenso, exceto se for seguido por unidades, ou se indicando em tabelas ou figuras (Exemplos: 21 L, 20,32 mg, Tabela 1).

- Unidades independentes de valores, colocando um espaço (exceto para porcentagens, ou graus geográficas, minutos e segundos); usar abreviaturas sempre que possível.

- Para unidades compostas, usar exponenciação, não utilizar barra (Exemplo: mg dia⁻¹ em vez de mg / dia, imol min⁻¹ em vez de μmol / min).

Não inserir espaços para passar para a próxima linha, se a unidade não se encaixar na mesma linha. Não insira figuras no arquivo de texto.

Referências

Adotar o formato utilizado nos exemplos a seguir:

Zar JH. 1999. Análise bioestatística. 4 ed., Prentice Hall, Upper Saddle River.

Ienes AC, RG Olmstead. 2000. A análise filogenética Carex (Cyperaceae): relações genéricas e subgenérico com base em DNA do cloroplasto. Em Monocots: sistemática e evolução (KL Wilson, DA Morrison, eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, p.602-609.

Bentham G. 1862. Leguminosae. Dalbergiae. Na Flora brasiliensis (PCP Martius, Eichler AG, eds.). F. Fleischer, Lipsiae, v.15, pars 1, p.1-349.

Döbereiner J. 1998. Função da Fixação de nitrogênio los Plantas leguminosas e NAO SUA importancia nenhuma Ecosystema brasileiro. In Anais do IV Simpósio de Ecosystemas Brasileiros (S Watanabe, coord.). Aciesp, São Paulo, v.3, p.1-6.

Farrar JF, Pollock CJ, Gallagher JA. 2000. Sacarose e a integração do metabolismo em plantas vasculares. *Plant Science* 154:1-11.

Punt W, S Blackmore, Nilsson S, Le Thomas A. 1999. Glossário de pólen e esporos terminologia. <http://www.biol.ruu.nl/~paleo/glossary/glosint.htm> (acessado em 2003 Abr 10).

Citar dissertações ou teses somente em casos excepcionais, quando a informação fornecida é essencial para uma melhor compreensão do artigo. Quando a informação não foi publicado como um artigo científico. Neste caso, use o formato abaixo:

Sano PT. 1999. Revisão de *Actinocephalus* (Koern.) Sano - Eriocaulaceae. Tese de doutorado da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Não citar resumos de encontros.

Tabelas

Use o Word para recursos de design do Windows e formatação de tabelas.

Evite abreviações (exceto para unidades).

As tabelas devem ser colocados em páginas separadas, com os seus títulos posicionado acima deles, de acordo com o exemplo:

Tabela 1. Flavonóides totais e produção de fenol total (% de massa seca) em folhas de *Pyrostegia venusta*.

Não inserir linhas verticais; usar linhas horizontais apenas para destacar o cabeçalho e fechar a tabela.

Figuras

Apresentar um conjunto de figuras originais com alta resolução. Enviar imagens digitais com um mínimo de 300 dpi. Enviar o ficheiro original (em formato CorelDraw, Photoshop, ou similares), bem como a. Tif de cada imagem digital. O espaço disponível para placas (fotografias, desenhos, gráficos, mapas ou diagramas) é 23,0 × 17,5 centímetros, no

máximo, incluindo, quando possível o espaço necessário para a legenda. Qualquer figura superior a essas dimensões serão redimensionadas. Estas nunca devem ser anexados a arquivos de Ponto MS Word ou Power. Gráficos ou outras figuras pode ser reduzido para caber em uma única coluna (8,5 cm), por isso, certifique-se de que os números ou tamanhos de fonte permanecerá visível mesmo após a redução. O tipo e tamanho de ambas as legendas e gráficos devem ser o mesmo que é utilizado no texto. Gráficos e figuras feitas usando planilhas do Excel devem ser acompanhados pelo arquivo com a folha original. Cada placa deve aparecer em uma página separada. Digite todas as legendas das figuras juntas (numeradas sequencialmente) em outra página. Use escalas de barras para indicar tamanho. Escalas de barras devem ser colocadas na parte inferior da página do lado esquerdo. O lado direito deve conter o número da figura. Evite o uso de letras que são usadas para lendas internas. A falha em seguir corretamente as instruções sobre ilustrações podem resultar em números de má qualidade na versão impressa, em tais casos, o Conselho Editorial pode decidir sobre a sua eliminação ou a rejeição de manuscritos já aceitos. Cada figura deve ter uma legenda concisa e descrever com precisão o que a figura mostra. Incluir as legendas no arquivo de texto do manuscrito, não no arquivo da figura.

Permissão

Autores que desejam incluir figuras, tabelas, ou passagens de texto que já foram publicados em outros lugares é necessário obter a permissão do proprietário dos direitos autorais para ambos os formatos impressos e on-line, e para incluir provas de que tal permissão foi concedida ao apresentarem os seus trabalhos. Todo o material recebido sem essas qualificações será assumido ser original.

Informações adicionais

Detalhes da organização do manuscrito pode ser encontrado nas páginas finais de cada edição do jornal. Para mais informações, consulte a última edição da revista. Os autores só serão informados da aceitação final de um artigo após a sua aprovação pelo Conselho Editorial, tanto em termos de mérito científico e formato gráfico. Para mais informações contacte-nos: brazjbot@gmail.com.

CAPÍTULO 3

**Comparação entre os suplementos água de coco e polpa de banana
em meio Knudson C, para o cultivo assimiótico de espécies da
subtribo Laeliinae**

Artigo elaborado e formatado conforme as
normas para publicação científica no periódico
Revista Rodriguésia.

Comparação entre os suplementos água de coco e polpa de banana em meio Knudson C, para o cultivo assimbiótico de espécies da subtribo Laeliinae

Fabiana Regina Gallo Ferreira¹, Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez² e Luiz Antonio de Souza³

1 – Mestranda da Universidade Estadual de Maringá, 2 – Dra. da Universidade Estadual de Maringá, 3 – Dr. da Universidade Estadual de Maringá. e-mail: fabianagalloferreira@gmail.com

Comparação entre os suplementos água de coco e polpa de banana em meio Knudson “C”, para o cultivo assimbiótico de espécies da subtribo Laeliinae

Resumo

A produção de mudas de orquídeas, sob condições naturais, é considerada rara frente ao elevado número de sementes produzidas em cada fruto. Frequentemente utiliza-se o cultivo *in vitro* para incrementar o processo de produção de mudas destas plantas em larga escala, seja com finalidade comercial ou para a reposição em florestas nativas. Em geral, os meios de cultura são suplementados com polpa de banana e água de coco (pH 5,3), visando incrementar o vigor das plântulas, tendo este estudo o objetivo de comparar os efeitos do meio Knudson C modificado pela adição de polpa de banana ou água de coco, sobre o desenvolvimento inicial das plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl., *C. tigrina* A. Rich, *Hadrolaelia purpurata* (Lindl.) Chiron & V.P.Castro, *Laelia anceps* Lindley, *Schomburgkia gloriosa* Rchb.f. e *Sophronitis cernua* Lindl. Após 12 meses de cultivo sob iluminação contínua com lâmpadas fluorescentes (40 Watts) tipo “luz do dia” e temperatura de $26\pm 3^{\circ}\text{C}$, as plântulas foram analisadas quanto a altura da parte aérea, número de folhas, número de raízes, comprimento das raízes e massa fresca, além do pH no meio de cultura. As análises demonstraram que o meio de cultura suplementado com polpa de banana influenciou positivamente, pelo menos, um parâmetro em todas as espécies, comprovando sua eficiência para o crescimento inicial destas espécies de orquídeas. O pH dos meios de cultura manteve-se semelhante, sofrendo acidificação de modo a alcançar valores entre 3,04 e 4,06.

Palavras-chave: orquídeas, *Cattleya*, *Laelia*, suplementos orgânicos, cultivo *in vitro*.

Comparison between coconut water and banana pulp supplements in the Knudson "C" medium for the the assymbiotic cultivation of subtribe Laeliinae species

Abstract

The seedlings of orchids under natural conditions, is considered rare outside the high number of seeds produced in each fruit. Often it is used *in vitro* cultivation to increase the production of seedlings of these plants on a large scale, whether for commercial purposes or for replacement in native forests. In general, the culture media are supplemented with banana pulp and coconut water (pH 5.3), aimed at increasing the seedling vigor, having this study the objective to compare the effects of the Knudson C medium modified by the addition of banana pulp or coconut water, on the initial development of seedlings of *Cattleya loddigesii* Lindl., *Cattleya tigrina* A. Rich, *Hadrolaelia purpurata* (Lindl.) Chiron & VPCastro, *Laelia anceps* Lindley, *Schomburgkia gloriosa* Rchb.f. and *Sophronitis cernua* Lindl. After 12 months of cultivation under continuous illumination (40 watts) and at $26 \pm 3^\circ\text{C}$, the seedlings were analyzed for number of side shoots, shoot height, number of leaves, number of roots, root length and fresh weight in addition to the pH in the culture medium. The analyzes showed that the culture medium supplemented with banana pulp positively influenced at least one parameter in all species, proving their efficiency for the initial growth of these species of orchids. The pH of both culture media remained similar to each other, ranging between 3.04 and 4.06, which indicates a good buffering capacity of both types of culture media.

Keywords: orchid, *Cattleya*, *Laelia*, organic supplements and *in vitro* culture.

Introdução

O desenvolvimento das orquídeas é deveras lento, tanto em relação à produção de brotos laterais quanto ao desenvolvimento inicial de suas plântulas, e métodos que possam incrementar estes processos devem ser estabelecidos, afim de que sejam obtidas mudas para o comércio floriculturista e também para suprir os projetos de repovoamento em áreas de florestas nativas.

Sob condições naturais, as pequenas sementes de orquídeas estabelecem simbiose com fungos micorrízicos (Arditti 1982), os quais repassam nutrientes que o embrião necessita para germinar (Singer 2004) e para alcançar a fase de plântula heterotrófica (Harrison 1977). Entretanto, as plântulas de orquídeas também podem ser obtidas sob condições assimbióticas *in vitro*, sob a influência de formulações nutritivas específicas, as quais são compostas basicamente por água, sais minerais e sacarose, conforme proposto por Knudson (1946). O cultivo *in vitro* torna a produção de plântulas de orquídeas mais rápida (Zorning 1996), além de aumentar as taxas de germinação (Stancato & Faria 1996; Martini *et al.* 2001), reduzir custos laboratoriais e evitar a extinção de muitas espécies (Stancato *et al.* 2001).

De acordo com Arditti (1982) e Faria *et al.* (2002), sob condições assimbióticas, as orquídeas podem requerer especificidades nutricionais quanto à composição do meio de cultura. Desta forma, a tentativa de obter meios de cultura mais eficazes para a produção de plântulas de orquídeas em larga escala, muitas tentativas de suplementação nutricional são realizadas, com destaque para as polpas de tomate (Caldas *et al.* 1998) ou banana e água de coco (endosperma líquido), ambos destacados por Arditti (1982) como necessários para a germinação e o desenvolvimento inicial de diversas espécies tropicais.

A água de coco é um componente muito rico em elementos orgânicos e inorgânicos, especialmente em magnésio, fosfato e aminoácidos (Krikorian 1991), além de conter alto teor

de glicose, frutose e alguns hormônios vegetais (Nunes *et al.* 2008). Já a polpa de banana é rica em vitaminas A e C, tiamina, riboflavina e niacina, além desta ter os mesmos componentes que a água de coco como potássio, fósforo e magnésio (Arditti & Ernst 1992). Ambos suplementos nutricionais foram utilizados em cultivo de espécies epífitas, tais como *Dendrobium* (Shu *et al.* 2004), *Laelia* e *Miltonia* (Stancato *et al.* 2008), *Hadrolaelia purpurata* e *Encyclia randii* (Gonçalves *et al.* 2012), e também para espécies terrestres, como *Paphiopedilum* sp. (Huang *et al.* 2001), evidenciando excelentes resultados.

Neste contexto, este estudo objetivou comparar os efeitos da suplementação do meio de cultura proposto por Knudson (1946) modificado e suplementado com polpa de banana ou água de coco, em relação ao desenvolvimento inicial das plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl., *Cattleya tigrina* A. Rich, *Hadrolaelia purpurata* (Lindl.) Chiron & V.P.Castro, *Laelia anceps* Lindl., *Schomburgkia gloriosa* Rchb.f. e *Sophronitis cernua* Lindl., todas pertencentes a subtribo Laeliinae, a fim de estabelecer qual suplemento estimula o crescimento de plantas com maior vigor.

Material e métodos

Para este estudo foram obtidas sementes maduras junto aos produtores de orquídeas da região de Maringá (PR), pelo banco de sementes do Laboratório de Botânica do Museu Dinâmico interdisciplinar da UEM, as quais foram mantidas em embalagens de papel em refrigerador comum, até a realização dos ensaios. Amostras dos lotes de sementes foram submetidas ao teste de viabilidade com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (1%) conforme proposto por Singh (1981). Após incubadas por 24h no escuro, as sementes foram lavadas e analisadas com auxílio de microscópio de luz, sendo consideradas viáveis aquelas contendo embrião corado em vermelho vivo, sendo analisadas 100 sementes, com 3 réplicas cada espécie, totalizando 300 sementes. Comprovada a qualidade do lote, com porcentagens de sementes viáveis acima de 50%, outras alíquotas do mesmo lote foram embebidas em água destilada, a fim de serem semeadas *in vitro*.

Os meios de cultura propostos foram preparados tendo por base a formulação de Knudson (1946), modificada pela adição de 3,5g de ágar (Himédia ®) e substituição de 100 mL/L de água destilada, da formulação original, por água de coco (endosperma líquido de frutos imaturos), ou por 100g/L de polpa de banana cultivar ‘nanica’ (pela substituição do volume ocupado), conforme proposto por Arditti (1982). Para cada réplica de cultura assimiótica foram utilizados frascos de vidro com capacidade para 200 mL, tendo cada um recebido 50 mL de meio de cultura. Em seguida, todas as réplicas foram esterilizadas em autoclave por 20 minutos a 1atm.

Nos procedimentos da semeadura, as sementes embebidas em água destilada foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 15% (a partir da solução comercial), e a seguir enxaguadas por 4 vezes com água destilada autoclavada. Com auxílio de seringas descartáveis, 1mL de água e sementes foram inoculados em frascos vedados com filme

plástico de pvc e contendo meio de cultura (Fig. 1). Os frascos foram dispostos de forma aleatória sob bancada e permaneceram expostos sob a iluminação contínua, obtida com lâmpadas fluorescentes de 40 Watts. A temperatura média durante o tempo do experimento (12 meses) permaneceu em $26\pm 3^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa do ar permaneceu em 62%, em média.

Ao término do período experimental (12 meses após a semeadura, sem troca de meio de cultura), 20 plântulas de 4 réplicas por tratamento foram analisadas quanto aos seguintes parâmetros: altura da parte aérea, número de folhas, número de raízes, comprimento das raízes e peso fresco, além do pH do meio de cultura. O experimento foi do tipo inteiramente casualizado, com 2 tratamentos e 4 réplicas, sendo realizada análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% .

Resultados e discussão

A análise do teste de viabilidade (Tab.1) revelou que, com exceção de *Hadrolaelia purpurata*, as espécies apresentaram elevadas porcentagens de sementes com embriões corados em vermelho vivo, indicando a retomada das atividades mitocondriais em suas células após o processo de embebição em água. O uso deste teste de viabilidade, devido ao tegumento transparente da maioria das sementes de orquídeas, torna-se de fácil aplicação e leitura dos resultados ao microscópio de luz. Embora o lote de sementes de *H. purpurata* tenha alcançado a média de apenas 55,33% de viabilidade, pode ser considerado adequado para ser semeado, tendo em vista o grande número de sementes disponíveis em apenas um fruto, que de acordo com Withner (1959) pode alcançar a casa dos 3 milhões.

De acordo com as Tabelas 2 a 7, verificaram-se efeitos positivos da presença da polpa de banana sobre a altura da parte aérea das plântulas da maioria das espécies analisadas, isso somente não foi verificado em *C. tigrina*. Nesta última espécie, por vezes, alcançando o dobro das medidas obtidas na presença da água de coco. Nota-se neste grupo de orquídeas que as plantas são formadas por um eixo caulinar de pequena dimensão, composto basicamente em tecido meristemático, do qual partem folhas eretas, que perfazem a maior parte da altura da parte aérea.

Quanto ao número médio de folhas formadas em cada plântula, as variações foram maiores em relação à composição do meio de cultura, com *H. purpurata*, *L. anceps* e *S. cernua*, apresentando em maior número na presença de água de coco (Tab. 4, 5 e 7); enquanto que *S. gloriosa* o fez na presença da polpa de banana (Tab. 6). *C. loddigesii* e *C. tigrina* mostraram-se indiferentes à composição do meio de cultura em relação à organogênese de novas folhas (Tab. 2 e 3). Entretanto, ao utilizar diversos suplementos orgânicos para o cultivo assimiótico de *Encyclia randii* e *H. purpurata*, Gonçalves *et al.* (2012) também obtiveram números

significativamente maiores de folhas por plântula na presença de polpa de banana. Estes dados confirmam o maior investimento na organogênese foliar das plântulas de *H.purpurata*, *L. anceps* e *S. cernua*, na presença de água de coco, certamente pela presença de citocininas neste suplemento orgânico, fato verificado por Silva *et al.* (2002), fitormônio diretamente relacionado com a formação da parte aérea vegetal. Tais resultados também foram observados pela *C. loddigesii* embora a primeira não apresentasse diferenças estatísticas.

Vyas *et al.* (2009) verificaram incremento no número de raízes por plântula de *Dendrobium lituiflorum* na presença de polpa de banana no meio de cultura, à semelhança dos dados apresentados na Tabela 6, para as plântulas de *S. gloriosa*. As demais espécies de Laeliinae analisadas mostraram-se indiferentes à composição do meio de cultura quanto a este parâmetro. Da mesma forma, quanto ao comprimento das raízes e massa fresca, a presença de polpa de banana esteve relacionada a maior comprimento das raízes em *C. loddigesii*, *C. tigrina* e *S. gloriosa* (Tab. 2, 3 e 6), à semelhança dos resultados obtidos por Araújo (2006), quanto às plântulas de um híbrido de *C. loddigesii*, e por Silva *et al.* (2005), com maior comprimento das raízes de *Brassolaeliocattleya* ‘Pastoral’ x *Laeliocattleya* ‘Amber Glow’. Em adição, Stancato *et al.* (2008) puderam verificar maior massa seca das plântulas em *Laelia longipes*, *L. tenebrosa* e *Miltonia spectabilis* quando cultivadas na presença de polpa de banana. Nas outras espécies analisadas, não foram obtidas diferenças significativas entre os tratamentos aplicados.

A análise de alguns parâmetros apresentou-se com elevado coeficiente de variação, e consequente falta de segregação perante o teste de comparação de médias, evidenciando a ampla variação genética presente nas plântulas de orquídeas, fato também verificado por Chung *et al.* (2006).

O efeito positivo da polpa de banana provavelmente se deve aos aminoácidos, vitaminas e reguladores de crescimento nela contidos (George 1993), que promoveu o

desenvolvimento da parte aérea, espessamento radicular e a formação de brotos (Torres & Barbosa 2001).

De acordo com Torres *et al.* (1998), o pH do meio de cultura interfere diretamente no desenvolvimento dos tecidos vegetais *in vitro*. Nas Tabelas 2 a 7, verificam-se poucas variações de pH em ambos tipos de meios de cultura, estando entre 3,04 e 4,06, ácidos, mas adequados ao desenvolvimento das plântulas das espécies analisadas, tendo em vista que o pH ótimo para o cultivo de orquídeas deve permanecer entre 4,8 a 5,0, segundo as indicações de Arditti (1982).

De acordo com as análises, a suplementação do meio de cultura com polpa de banana influenciou positivamente a maioria dos parâmetros, hora analisados, somente em relação às plântulas de *C. loddigesii* e *S. gloriosa*. As demais Laeliinae analisadas demonstraram pouca especificidade por qualquer um dos suplementos nutricionais utilizados.

Referências

- Araújo, A.G. 2006. Pascoal, M.; Villa, F.; Costa, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. Revista Ceres 53: 608-613.
- Arditti, J. 1982. Orchid seed germination and seedling culture : A manual. *In*: Arditti, J. (Ed.), Orchid biology: Reviews and perspectives. v.2. Comstock Publishing Associates, Ithaca. Pp. 244-370.
- Arditti, J.; Ernest, R. 1992. Micropropagation of orchids. A Wiley – Interscience Publication, California. 680 p.
- Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. Meios Nutritivos. *In*: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. 1998. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. EMBRAPA, Brasília - SPI/ CNPH. Pp. 87-132.
- Chung, M.Y.; Park, C.-W.; Myers, E.R.; Chung, M.G. 2006. Contrasting levels of genetic diversity between the common, self-compatible *Liparis kumokiri* and rare, self-incompatible *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in South Korea. Botanical Journal of the Linnean Society 153:41-48.
- Faria, R.T.; Santiago, D.C.; Saridakis, D.P.; Albino, U.B.; Araújo, R. 2002. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. Crop Breeding and Applied Biotechnology 2:489-492.

George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture, part 1 - the technology. 2. ed. Exegetics Ltd., England. 786 p.

Gonçalves, L.M; Prizão, E.C.; Milaneze-Gutierrez, M.A.; Mangolin, C.A.; Silva-Machado, M.F.P. 2012. Use of complex supplements and light-differential effects for micropropagation of *Hadrolaelia purpurata* (= *Laelia purpurata*) and *Encyclia randii* orchids. *Acta Scientiarum* 34:459-463.

Harrison, C.R. 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 138:41-45.

Huang, L.C.; Lin, C.J.; Kuo, C.I. 2001. Paphiopedilum cloning in vitro. *Scientia Horticulturae* 91:111-121.

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

Krikorian, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *In*: Roca, W.M.; Mrofiniski, L.A. (Ed). 1991. Cultivo de tejidos em la agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colômbia. Pp. 41-77.

Martini, P.C.; Willadino, L.; Alves, G.D.; Donato, V.M.T. 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36:1319-1324.

Nunes, C.F.; Dalilha, M.P.; Santos, N.; Custódio, T.N.; Araújo, A.G. 2008. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-mansão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:9-14.

Shu, F.L.; Satish, M.N.; Chao, L.K.; Chung, L.C.; Hsin, S.T. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino. A medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 40:528–535.

Silva A.L.L.; Franco E.T.H.; Gesing J.P.A.; Pessoa C.C. 2002. Efeitos de alguns meios de cultura sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Rich. *Ex Beer – Orchidaceae ABCTP Notícias* 4-7.

Silva, E.F.; Pasqual, M.; Paiva, P.D.O.; Silva, A.B.; Nogueira, D.A. 2005. Polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de orquídea. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 1:8-12.

Singer, R.B. 2004. Orquídeas brasileiras e abelhas. Disponível em <www.webbee.org.br>. Acesso em 05 outubro 2012.

Singh, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin* 50:416-418.

Stancato, G.S.; Abreu, M.F.; Furlani, A.M.C. 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. *Bragantia* 67:51-57.

Stancato, G.C.; Belmelmons, P.F.; Vegro, C.R.L. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 7:25-33.

Stancato, G.C.; Faria, R.T. 1996. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (ORCHIDACEAE) I: effects of macro and microelements. *Lindleyana* 11:41-43.

Torres A.C; Barbosa, N.V.R. 2001. Condições de incubação para cultura *in vitro*. *ABCTP Notícias*. Pp. 1-7.

Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Ed.). 1998. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, Brasília. Pp. 87-132.

Vyas, S.; Guha, S.; Bhattacharya, M.; Rao, I.U. 2009. Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. *Science Horticulture* 121, 32-37.

Withner, C.L. 1959. Orchid physiology. *In* *The Orchids: A Scientific Survey*. Ronald Press, New York. Pp. 155-188.

Zorning, R.K. 1996. Micropropagação de bromélias. *Bromélia* 3:3-8.



Figura 1 – Plântulas em meio de cultura com adição de água de coco ou polpa de banana nanica

Figure 1 - Seedlings in culture medium with added water or coconut banana pulp

Tabela 1 – Análise da viabilidade dos lotes de sementes utilizados para a realização dos ensaios.

Table 1 - Analysis of the viability of the seed lots used for the tests.

Espécies	Média de sementes viáveis (%)
<i>Cattleya loddigesii</i>	89,67
<i>Cattleya tigrina</i>	97,33
<i>Hadrolaelia purpurata</i>	55,33
<i>Laelia anceps</i>	83,33
<i>Schomburgkia gloriosa</i>	99,00
<i>Sophronitis cernua</i>	81,67

Tabela 2 – Análise das plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações.

Table 2 - Analysis of seedlings of *Cattleya loddigesii* cultivated on a culture medium with different supplements

Suplementos do meio de cultura	Altura da parte aérea (cm)	Número de folhas	Número de raízes	Compr. das raízes (cm)	Massa fresca (g)	pH do meio
Polpa de banana	2,05 a	3,66 a	3,61 a	3,51 a	0,19 a	3,71 a
Água de coco	1,32 b	4,71 a	4,05 a	1,82750 b	0,08 b	3,88 a
Coeficiente de variação (%)	18,62	17,71	20,07	34,62	41,04	20,53

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey.

Means followed by the same letter (column) do not differ at the 5% level of significance, by the Tukey Test.

Tabela 3 – Análise das plântulas de *Cattleya tigrina* cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações.

Table 3 - Analysis of seedlings of *Cattleya tigrina* cultivated on a culture medium with different supplements

Suplementos do meio de cultura	Altura da parte aérea (cm)	Número de folhas	Número de raízes	Compr. das raízes (cm)	Massa fresca (g)	pH do meio
Polpa de banana	1,85 a	4,24 a	2,40 a	2,85 a	0,14 a	3,04 a
Água de coco	1,18 a	5,57 a	2,75 a	1,20 b	0,36 a	3,56 a
Coeficiente de	26,31	19,22	25,22	29,32	158,01	9,15

variação (%)						
--------------	--	--	--	--	--	--

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey.

Means followed by the same letter (column) do not differ at the 5% level of significance, by the Tukey Test.

Tabela 4 – Análise das plântulas de *Hadrolaelia purpurata* cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações.

Table 4 - Analysis of seedlings of *Hadrolaelia purpurata* cultivated on a culture medium with different supplements

Suplementos do meio de cultura	Altura da parte aérea (cm)	Número de folhas	Número de raízes	Compr. das raízes (cm)	Massa fresca (g)	pH do meio
Polpa de banana	2,06 a	4,42 b	5,15 a	2,81 a	0,18 a	3,87 a
Água de coco	1,11 b	4,99 a	3,31 a	1,54 a	0,08 a	4,08 a
Coefficiente de variação (%)	32,71	6,01	30,73	35,07	62,80	12,76

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey.

Means followed by the same letter (column) do not differ at the 5% level of significance, by the Tukey Test.

Tabela 5 – Análise das plântulas de *Laelia anceps* cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações.

Table 5 - Analysis of seedlings of *Laelia anceps* cultivated on a culture medium with different supplements

Suplementos do meio de cultura	Altura da parte aérea (cm)	Número de folhas	Número de raízes	Compr. das raízes (cm)	Massa fresca (g)	pH do meio
Polpa de banana	3,04 a	3,01 b	4,11 a	1,07 a	0,07 a	3,98 a
Água de coco	1,75 b	4,47 a	3,07 a	0,81 a	0,04 a	3,38 a
Coeficiente de variação (%)	19,87	5,5	21,24	24,09	58,85	25,45

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey.

Means followed by the same letter (column) do not differ at the 5% level of significance, by the Tukey Test.

Tabela 6 – Análise das plântulas de *Schomburgkia gloriosa* cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações.

Table 6 - Analysis of seedlings of *Schomburgkia gloriosa* cultivated on a culture medium with different supplements

Suplementos do meio de cultura	Altura da parte aérea (cm)	Número de folhas	Número de raízes	Compr. das raízes (cm)	Massa fresca (g)	pH do meio
Polpa de banana	1,76 a	5,05 a	3,60 a	1,88 a	0,24 a	3,10 a
Água de coco	0,75 b	3,20 b	0,16 b	0,51 b	0,03 b	3,98 a
Coeficiente de variação (%)	18,42	13,48	15,83	38,28	29,63	14,97

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey.

Means followed by the same letter (column) do not differ at the 5% level of significance, by the Tukey Test.

Tabela 7 – Análise das plântulas de *Sophronitis cernua* cultivadas sobre meio de cultura com diferentes suplementações.

Table 7 - Analysis of seedlings of *Sophronitis cernua* cultivated on a culture medium with different supplements

Suplementos do meio de cultura	Altura da parte aérea (cm)	Número de folhas	Número de raízes	Compr. das raízes (cm)	Massa fresca (g)	pH do meio
Polpa de banana	1,87 a	3,49 b	4,80 a	1,41 a	0,14 a	3,55 a
Água de coco	1,23 b	5,82 a	3,54 a	1,31 a	0,09 a	3,92 a
Coeficiente de variação (%)	9,38	22,50	38,30	41,75	34,22	17,20

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey.

Means followed by the same letter (column) do not differ at the 5% level of significance, by the Tukey Test.

ANEXO 2

NORMAS DA REVISTA DO CAPÍTULO III: RODRIGUÉSIA (REVISTA DO JARDIM
BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO) – ISSN 0370-6583

Os artigos devem ter no máximo 30 laudas, aqueles que ultrapassem este limite poderão ser publicados após avaliação do Corpo Editorial. O aceite dos trabalhos depende da decisão do Corpo Editorial.

Artigos Originais: somente serão aceitos artigos originais nas áreas anteriormente citadas para Biologia Vegetal, História da Botânica e Jardins Botânicos.

Artigos de Revisão: serão aceitos preferencialmente aqueles convidados pelo corpo editorial, porém, eventualmente, serão aceitos aqueles provenientes de contribuições voluntárias.

Artigos de Opinião: cartas ao editor, comentários a respeito de outras publicações e ideias, avaliações e outros textos que caracterizados como de opinião, serão aceitos.

Notas Científicas: este formato de publicação compõe-se por informações sucintas e conclusivas (não sendo aceitos dados preliminares), as quais não se mostram apropriadas para serem incluídas em um artigo científico típico. Técnicas novas ou modificadas podem ser apresentadas.

Artigos originais e Artigos de revisão

Os manuscritos submetidos deverão ser formatados em A4, com margens de 2,5 cm e alinhamento justificado, fonte Times New Roman, corpo 12, em espaço duplo, com no máximo 2MB de tamanho. Todas as páginas, exceto a do título, devem ser numeradas, consecutivamente, no canto superior direito. Letras maiúsculas devem ser utilizadas apenas se as palavras exigem iniciais maiúsculas, de acordo com a respectiva língua do manuscrito. Não serão considerados manuscritos escritos inteiramente em maiúsculas. Palavras em latim devem estar em itálico, bem como os nomes científicos genéricos e infragenéricos. Utilizar nomes científicos completos (gênero, espécie e autor) na primeira menção, abreviando o nome genérico subsequentemente, exceto onde referência a outros gêneros cause confusão. Os nomes dos autores de táxons devem ser citados segundo Brummitt & Powell (1992), na obra “Authors of Plant Names” ou de acordo com o site do IPNI (www.ipni.org).

Primeira página - deve incluir o título, autores, instituições, apoio financeiro, autor e endereço para correspondência e título abreviado. O título deverá ser conciso e objetivo, expressando a ideia geral do conteúdo do trabalho. Deve ser escrito em negrito com letras

maiúsculas utilizadas apenas onde as letras e as palavras devam ser publicadas em maiúsculas.

Segunda página - deve conter Resumo (incluindo título em português ou espanhol), Abstract (incluindo título em inglês) e palavras-chave (até cinco, em português ou espanhol e inglês, em ordem alfabética). Resumos e Abstracts devem conter até 200 palavras cada.

Texto – Iniciar em nova página de acordo com sequência apresentada a seguir: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências Bibliográficas.

O item Resultados pode estar associado à Discussão quando mais adequado. Os títulos (Introdução, Material e Métodos etc.) e subtítulos deverão ser apresentados em negrito.

As figuras e tabelas deverão ser enumeradas em arábico de acordo com a sequência em que as mesmas aparecem no texto.

As citações de referências no texto devem seguir os seguintes exemplos: Miller (1993), Miller & Maier (1994), Baker *et al.* (1996) para três ou mais autores; ou (Miller 1993), (Miller & Maier 1994), (Baker *et al.* 1996), (Miller 1993; Miller & Maier 1994). Artigos do mesmo autor ou sequência de citações devem estar em ordem cronológica. A citação de Teses e Dissertações deve ser utilizada apenas quando estritamente necessária. Não citar trabalhos apresentados em Congressos, Encontros e Simpósios.

O material examinado nos trabalhos taxonômicos deve ser citado obedecendo a seguinte ordem: local e data de coleta, bot., fl., fr. (para as fases fenológicas), nome e número do coletor (utilizando *et al.* quando houver mais de dois) e sigla(s) do(s) herbário(s) entre parêntesis, segundo *Index Herbariorum* (Thiers, continuously updated).

Quando não houver número de coletor, o número de registro do espécime, juntamente com a sigla do herbário, deverá ser citado. Os nomes dos países e dos estados/províncias deverão ser citados por extenso, em letras maiúsculas e em ordem alfabética, seguidos dos respectivos materiais estudados.

Exemplo: BRASIL. BAHIA: Ilhéus, Reserva da CEPEC, 15.XII.1996, fl. e fr., R.C. Vieira *et al.* 10987 (MBM, RB, SP).

Para números decimais, use vírgula nos artigos em Português e Espanhol (exemplo: 10,5 m) e ponto em artigos em Inglês (exemplo: 10.5 m). Separe as unidades dos valores por um espaço (exceto em porcentagens, graus, minutos e segundos).

Use abreviações para unidades métricas do Systeme Internacional d'Unités (SI) e símbolos químicos amplamente aceitos. Demais abreviações podem ser utilizadas, devendo ser precedidas de seu significado por extenso na primeira menção.

Ilustrações - Mapas, desenhos, gráficos e fotografias devem ser denominados como Figuras.

Fotografias e ilustrações que pertencem à mesma figura devem ser organizados em pranchas (Ex.: Fig. 1a-d – A figura 1 possui quatro fotografias ou desenhos). Todas as figuras devem ser citadas na sequência em que aparecem e nunca inseridas no arquivo de texto. As pranchas devem possuir 15 cm larg. x 19 cm comp. (altura máxima permitida); também serão aceitas figuras que caibam em uma coluna, ou seja, 7,2 cm larg.x 19 cm comp.

Os gráficos devem ser elaborados em preto e branco.

No texto as figuras devem ser sempre citadas de acordo com os exemplos abaixo:

“Evidencia-se pela análise das Figuras 25 e 26...”

“Lindman (Fig. 3a) destacou as seguintes características para as espécies...”

Envio das imagens para a revista:

- **FASE INICIAL – submissão eletrônica** (<http://rodriguesia-seer.jbrj.gov.br>): as imagens devem ser submetidas em formato PDF ou JPEG, com tamanho máximo de 2MB. Os gráficos devem ser enviados em arquivos formato Excel. Caso o arquivo tenha sido feito em Corel Draw, ou em outro programa, favor transformar em imagem PDF ou JPEG. Ilustrações que não possuírem todos os dados legíveis resultarão na devolução do manuscrito.
- **SEGUNDA FASE – somente se o artigo for aceito para publicação:** nessa fase todas as imagens devem ser enviadas para a Revista Rodriguésia através das seguintes opções:
 - em mídia digital (CD ou DVD) para o endereço da revista que consta em nosso site;
 - através de sites de uploads da preferência do autor (disponibilizamos um link para um programa de upload chamado MediaFire como uma opção para o envio dos arquivos, basta clicar no botão abaixo). O autor deve enviar um email para a revista avisando sobre a disponibilidade das imagens no site e informando o link para acesso aos arquivos.

Neste caso, as imagens devem ter 300 dpi de resolução, nas medidas citadas acima, em formato TIF. No caso dos gráficos, o formato final exigido deve ser Excel ou Corel Draw (versão 12 ou inferior).

IMPORTANTE: Lembramos que as **IMAGENS** (pranchas escaneadas, fotos, desenhos, bitmaps em geral) não podem ser enviadas dentro de qualquer outro programa (Word, Power Point, etc), e devem ter boa qualidade (obs. caso a imagem original tenha baixa resolução, ela não deve ser transformada para uma resolução maior, no Photoshop ou qualquer outro programa de tratamento de imagens. Caso ela possua pouca nitidez, visibilidade, fontes pequenas, etc., deve ser escaneada novamente, ou os originais devem ser enviados para a revista).

Imagens coloridas serão publicadas apenas na versão eletrônica.

*Use sempre o último número publicado como exemplo ao montar suas figuras. *

Legendas – devem vir ao final do arquivo com o manuscrito completo. Solicita-se que as legendas, de figuras e gráficos, em artigos enviados em português ou espanhol venham acompanhadas de versão em inglês.

Tabelas – não inserir no arquivo de texto. Incluir a(s) tabela(s) em um arquivo separado. Todas devem ser apresentadas em preto e branco, no formato Word for Windows. No texto as tabelas devem ser sempre citadas de acordo com os exemplos abaixo:

“Apenas algumas espécies apresentam indumento (Tab. 1)...”

“Os resultados das análises fitoquímicas são apresentados na Tabela 2...”

Solicita-se que os títulos das tabelas, em artigos enviados em português ou espanhol, venham acompanhados de versão em inglês.

Referências Bibliográficas - Todas as referências citadas no texto devem estar listadas neste item. As referências bibliográficas devem ser relacionadas em ordem alfabética, pelo sobrenome do primeiro autor, com apenas a primeira letra em caixa alta, seguido de todos os demais autores. Quando o mesmo autor publicar vários trabalhos num mesmo ano, deverão ser acrescentadas letras alfabéticas após a data. Os títulos de periódicos não devem ser abreviados.

Exemplos:

Tolbert, R.J. & Johnson, M.A. 1966. A survey of the vegetative shoot apices in the family Malvaceae. *American Journal of Botany* 53: 961-970.

Engler, H.G.A. 1878. Araceae. *In*: Martius, C.F.P. von; Eichler, A. W. & Urban, I. *Flora brasiliensis*. Munchen, Wien, Leipzig. Vol. 3. Pp. 26-223.

Sass, J.E. 1951. Botanical microtechnique. 2ed. Iowa State College Press, Iowa. 228p.
Punt, W.; Blackmore, S.; Nilsson, S. & Thomas, A. 1999. Glossary of pollen and spore Terminology. Disponível em <<http://www.biol.ruu.nl/~palaeo/glossary/glos-int.htm>>. Acesso em 15 outubro 2006.

Costa, C.G. 1989. Morfologia e anatomia dos órgãos vegetativos em desenvolvimento de *Marcgravia polyantha* Delp. (Marcgraviaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 325p.

Notas Científicas

Devem ser organizadas de maneira similar aos artigos originais, com as seguintes modificações:

Texto – não deve ser descrito em seções (Introdução, Material e Métodos, Discussão), sendo apresentado como texto corrido. Os Agradecimentos podem ser mencionados, sem título, como um último parágrafo. As Referências Bibliográficas são citadas de acordo com as instruções para manuscrito original, o mesmo para Tabelas e Figuras.

Artigos de Opinião

Deve apresentar resumo/abstract, título, texto, e referências bibliográficas (quando necessário). O texto deve ser conciso, objetivo e não apresentar figuras (a menos que absolutamente necessário).

Conflitos de Interesse

Os autores devem declarar não haver conflitos de interesse pessoais, científicos, comerciais, políticos ou econômicos no manuscrito que está sendo submetido. Caso contrário, uma carta deve ser enviada diretamente ao Editor-chefe.

Declaração de Direito Autoral

Os autores concordam: (a) com a publicação exclusiva do artigo neste periódico; (b) em transferir automaticamente direitos de cópia e permissões à publicadora do periódico. Os

autores assumem a responsabilidade intelectual e legal pelos resultados e pelas considerações apresentados.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.