

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

FERNANDA KELLY MEZZALIRA

**INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM *PHALAENOPSIS* CULTIVADA *IN VITRO*
COM RADIAÇÃO UV E PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES MOLECULARES
POR SSR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2019

FERNANDA KELLY MEZZALIRA

**INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM *PHALAENOPSIS* CULTIVADA *IN VITRO*
COM RADIAÇÃO UV E PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES MOLECULARES
POR SSR**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do curso Superior de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira De Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Betty Cristiane Kuhn.

DOIS VIZINHOS

2019



TERMO DE APROVAÇÃO

INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM *PHALAENOPSIS* CULTIVADA *IN VITRO* COM
RADIAÇÃO UV E PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES MOLECULARES POR SSR

por

FERNANDA KELLY MEZZALIRA

Este trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 25 de Novembro de 2019 como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. O(a) candidato(a) foi arguido(a) pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Betty Cristiane Kuhn
Orientador(a)

Profa. Dra. Simone Neumann Wendt
Membro Titular (UTFPR)

Profa. Dra. Flavia Regina Oliveira de Barros
Membro Titular (UTFPR)

AGRADECIMENTOS

Gostaria, neste momento, de agradecer a minha família por propiciar a dádiva da vida, a doçura e o carinho de um lar. Em especial a minha mãe, Geni Provin Mezzalira, que é meu pilar, minha base de incentivo e segurança em todas as fases de minha vida.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Dois Vizinhos, que no decorrer da graduação também se tornou minha casa, na qual adquiri conhecimento, maturidade e crescimento emocional.

A minha orientadora, professora Dra. Betty Cristiane Kuhn, uma profissional excepcional que com carinho e humildade transcreveu-me seus conhecimentos, seus ensinamentos tão preciosos para uma carreira promissora. Foi paciente, compreensiva e uma grande incentivadora do trabalho, do sucesso e das conquistas durante minha passagem pela graduação e no desenvolvimento do presente Trabalho de Conclusão de Curso (TCC).

Aos professores do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UTFPR-DV, que diretamente e/ou indiretamente, tiveram papel crucial no meu crescimento pessoal e profissional, todos contribuíram a seu modo, em algum momento destes cinco anos de graduação.

A Pink, minha pequena, um ser tão carinhoso e amoroso que mesmo sem dizer uma palavra, estava sempre ao meu lado como uma fiel companheira, seus olhos transbordavam amor e ternura dando força e alegria.

A meus amigos, parceiros e companheiros nessa jornada de aventuras e medos, no desenvolvimento de um trabalho, que de algum modo contribuíram para o mesmo. Em especial ao Guilherme Lucas Moretto, que em todas as etapas construtivas do presente trabalho esteve ao meu lado, auxiliando e incentivando, mostrando o real significado de companheirismo, amizade e amor.

A Deus, sobre todas as coisas, ser divino de luz e amor, com ensinamentos de vida, de humildade e caridade.

EPÍGRAFE

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles. Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerce. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais”.

Augusto Cury

RESUMO

MEZZALIRA, Fernanda K. **Indução de brotações em *Phalaenopsis* cultivada *in vitro* com radiação UV e padronização das análises moleculares por SSR.** 68 p. Monografia de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) na Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

Embora as orquídeas demonstrem uma beleza exuberante, o setor econômico busca o aumento da variabilidade genética de algumas espécies que são de interesse comercial, como a *Phalaenopsis*, para atender a demanda do mercado. Uma alternativa viável para ampliar os fenótipos é adquirir variabilidade genética por meio da mutação induzida que altera a sequência do genoma da orquídea, que pode ser realizada através da exposição à radiação ultravioleta (UV). A radiação UV é um agente mutagênico eficiente, visto que sua energia é capaz de excitar os elétrons e sua eficiência está relacionada ao tempo de exposição da amostra. Logo, o objetivo do presente trabalho foi induzir mutações aleatórias e obter brotações em *Phalaenopsis híbrida* expostas a radiação UV por diferentes períodos de tempo para gerar novos alelos. Para tal, foi utilizado um sistema de cultivo *in vitro*, comparando dois meios de cultivo com quantidades diferentes de explantes inoculadas. Para estabelecer a eficiência do meio de cultivo parâmetros como número de raízes, número de brotos, comprimento da raiz mais longa, altura da parte aérea e número de folhas foram analisados. Os resultados mostrarão que o meio de cultura adequado para o cultivo *in vitro* da *Phalaenopsis híbrida* é o meio Knudson suplementado com 10%(v/v) de suco de cenoura, pois, observou-se menor incidência de contaminação e oxidação das plantas cultivadas. Para obtenção de brotos, além do meio com suco de cenoura, foi verificado que o tempo de exposição a luz UV de 30 minutos foi mais eficaz. As extrações de DNA e as Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas com sucesso, estabelecendo um protocolo eficiente para *Phalaenopsis híbrida*. Não foram evidenciadas mutações, através da análise de fenótipos da *Phalaenopsis híbrida*, por serem plântulas jovens ainda.

Palavras Chaves: Orquídea, Cultivo *in vitro*, Brotos, Mutação, Marcador Molecular, Variabilidade genética.

ABSTRACT

MEZZALIRA, Fernanda K. **Induction of shoots in *In Vitro* cultivated *Phalaenopsis* with UV radiation and standardization of molecular analyzes by SSR.** 68 p. Monograph Final Paper (Bioprocesses and Biotechnology) at the Federal Technological University of Paraná. Two Neighbors, 2019.

Although orchids show exuberant beauty, the economic sector seeks to increase the genetic variability of some species of commercial interest, such as *Phalaenopsis*, to meet Market demand. A viable alternative to broadening phenotypes is to acquire genetic variability through induced mutation that alters the orchid's genome sequence, which can be accomplished by exposure to ultraviolet light (UV). UV light are an efficient mutagenic agent because its energy is able to excite electrons and its efficiency is related to the exposure time of the sample. Therefore, the aim present work is to induce random mutation and get sprouts in *Phalaenopsis hybridum* exposed to UV light for different periods to generate new alleles. For, this, an *in vitro* culture system was used, comparing two culture media with different amounts of explants. To establish the efficiency of the culture medium parameters such as number of roots, number of shoots, length of the longest root, shoot height and number of leaves were measured. The results indicated that the suitable culture medium for *in vitro* cultivation of *hybrid Phalaenopsis* is Knudson medium supplemented with 10 % (v/v) carrot juice, since there was a lower incidence of contamination and oxidation of the cultivated plants. In order to obtain sprouts, besides the carrot juice medium, it was verified that the exposure time to UV light of 30 minutes was more effective. DNA extractions and Polymerase Chain Reaction (PCR) reactions were successfully performed, establishing efficient protocol for *hybrid Phalaenopsis*. No mutations were evidenced by phenotype analysis of *hybrid Phalaenopsis*, as they are Young seedlings.

Keyword: Orchid, *In vitro* culture, Sprouts, Mutation, Molecular Marker, Genetic variability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da flor de uma orquídea do gênero Amaryllidaceae (A) e Cattleya (B).....	17
Figura 2 – Alguns tipos de flores de orquídeas comerciais como: <i>Dendrobium</i> (A), <i>Phajus</i> (B), <i>Oncidium</i> (C), <i>Cymbidium</i> (D) e <i>Paphiopedilum</i> (E)	17
Figura 3 – Exportações internacionais do mercado florícola brasileiro para países como Holanda, Estados Unidos, Itália e outros.....	19
Figura 4 – Exportações do mercado florícola brasileiro, por categorias, o setor de mudas de plantas ornamentais lidera a exportação	19
Figura 5 – Flor de orquídea do gênero <i>Phalaenopsis</i> , com cor branca	20
Figura 6 - <i>Phalaenopsis</i> cultivadas por 365 dias no meio de cultura suplementado com suco de cenoura (C) e no Murashige & Skoog (MS).....	27
Figura 7 - Plantas utilizadas para polinização e obtenção do híbrido utilizado no presente trabalho. A imagem “A” corresponde ao progenitor feminino e a imagem “B” o progenitor masculino.....	31
Figura 8 – Delineamento experimental – fatorial 2 x 2 x 4, em triplicata.....	32
Figura 9 – Caixa escura contendo uma lâmpada UV (125 W) de vapor de mercúrio, imagem à esquerda representa a caixa aberta e a imagem a direita mostra a caixa fechada, sua proporção e sistema de ventoinhas.....	35
Figura 10 - Tratamento T 4.3, meio de cultivo suplementado com suco de cenoura com exposição de 20 minutos a radiação UV com 4 explantes. Esta repetição não obteve clones, somente desenvolvimento da plântula inoculada, demais repetições contaminaram.....	40
Figura 11 – Contaminação de alguns tratamentos após a exposição à radiação UV em caixa escura e fechada.....	42
Figura 12 – O meio de cultura MS com média de 6 folhas por planta, resultados similares obtidos nos tratamentos T 1.2 e T 1.4. Meio de cultura suplementado com suco de cenoura apresentou em média 2 a 3 folhas por planta. As flechas na imagem indicam a quantidade de folhas por planta.....	45
Figura 13 – Tratamentos realizados para obtenção de clones. Inoculação de 1 explante pôr frasco com tamanho médio de 0,8 cm. Meios de cultivo MS (Murashige e Skoog) correspondem aos frascos 1 (0 minutos de exposição - T1.1), frasco 2 (10 minutos de exposição a UV - T1.2), frasco 3 (20 minutos de exposição a UV - T1.3) e frasco 4 (30 minutos de exposição a UV - T1.4). No meio Cenoura (Knudson suplementado com 10% v/v de suco de cenoura) os frascos são correspondentes à frasco 5 (0 minutos de exposição - 2.1), frasco 6 (10 minutos de exposição a UV -T2.2), frasco 7 (20 minutos de exposição a UV - T2.3) e frasco 8 (30 minutos de exposição a UV - T2.4), análise após 6 meses de cultivo.....	46
Figura 14 - Corresponde ao meio de cultura cenoura com 4 explantes, com exposição de 10 minutos a luz UV.....	50
Figura 15 – Tratamentos realizados para obtenção de clones. Inoculação de 4 explante pôr frasco com tamanho médio de 0,8 cm. Meios de cultivo MS (Murashige e Skoog) corresponde aos frascos 9 (0 minutos de exposição - T3.1), frasco 10 (10 minutos de exposição a luz UV - 3.2), frasco 11 (20 minutos de exposição a luz UV - T3.3) e frasco 12 (30 minutos de exposição a luz UV - T3.4). O meio Cenoura (Knudson suplementado	

com 10% v/v de suco de cenoura) é correspondente aos frascos 13 (0 minutos de exposição - T4.1), frasco 14 (10 minutos de exposição a luz UV - T4.2), frasco 15 (20 minutos de exposição a luz UV - T4.3) e frasco 16 (30 minutos de exposição a luz UV T 4.4), após 6 meses de cultivo51

Figura 16 – A imagem registrada do presente gel, contempla somente uma parte das amostras, sendo elas as amostras 1, 2 e 3 duplicadas (amostra A e B) e as demais são amostras únicas, no processo de quantificação das amostras de DNA extraídas dos clones de *Phalaenopsis híbrida* com exposição a 0, 10 e 30 minutos de UV, com uso do padrão de quantificação de DNA com ladder de 100pb.....55

Figura 17 – Padronização do primer ER38 (1) à temperatura de 55°C e ER38 (2) à 55,5°C e do primer ER45 (1) à temperatura de 49°C com concentrações de 0,9 e ER45 (2) com temperatura de 49°C e 1,5 µl de MgCl₂, comparação com uso do padrão de quantificação de DNA com ladder de 100pb. A figura consiste na junção da imagem de dois géis56

LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS

Quadro 1 - Exemplos de alterações genéticas na cor das flores de diferentes espécies, dentre elas a <i>Phalaenopsis</i>	22
Quadro 2 – Denominação dos tratamentos realizados conforme a condição estabelecida, sendo 16 tratamentos ao todo, oito tratamentos com meio MS (Murashige e Skoog) e oito tratamentos com meio Cenoura (meio Knudson suplementado com suco de cenoura a 10% (v/v)).....	33
Quadro 3 – Amostras selecionadas para realização da quantificação. Três clones do tempo 0 minutos, três clones do tempo 10 minutos e quatro clones do tempo de 30 minutos, proveniente de duas plantas mães, das <i>Phalaenopsis</i> cultivadas no meio Cenoura (meio Knudson suplementado com suco de cenoura a 10% (v/v))	36
Quadro 4 – Primers SSR para amplificação de DNA e observação da indução de mutação da orquídea do gênero <i>Phalaenopsis híbrida</i> , com suas respectivas sequências de nucleotídeos e temperatura de anelamento.....	37
Quadro 5 – Composição do Mix para realização da reação de PCR utilizando marcador SSR para a orquídea do gênero <i>Phalaenopsis híbrida</i>	38
Gráfico 1 – Grau de contaminação dos tratamentos, após a exposição à radiação UV, em diferentes períodos de tempo com quantidades diferentes de explantes inoculados em dois meios de cultivo, sendo eles o meio Murashige & Skoog (MS) e o meio Knudson suplementado com suco de cenoura (Cenoura).....	41
Gráfico 2 – Obtenção de brotos de <i>Phalaenopsis híbrida</i> , após a exposição à radiação UV em diferentes tempos, cm quantidades diferentes de explantes inoculados por frascos em dois meios de cultivo, sendo eles o meio MS (Murashige & Skoog) e o meio Cenoura (meio Knudson suplementado com 10% (v/v) de suco de cenoura.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de raíz, para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	43
Tabela 2 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro comprimento da raíz mais longa (cm), para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	44
Tabela 3 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro altura da parte aérea (cm), para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	44
Tabela 4 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de folhas, para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	45
Tabela 5 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de brotos, para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	47
Tabela 6 - Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de raíz, para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	48
Tabela 7 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro comprimento da raíz mais longa (cm), para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	48
Tabela 8 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro altura da parte aérea (cm), para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	49
Tabela 9 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de folhas, para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	50
Tabela 10 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de brotos, para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.....	52
Tabela 11- Seleção das amostras de DNA dos brotos de <i>Phalaenopsis</i> para serem utilizadas nas reações de PCR.....	54
Tabela 12 – Quantidade de DNA (aproximadas) em ng das amostras selecionadas, com base no padrão do ladder de 100 pb, onde cada padrão tem uma quantidade específica de DNA, por comparação ao marcador estipulou-se a quantidade de DNA e posteriormente foi realizada um gel de PCR para confirmar as quantidades.....	55

LISTA DE SIGLAS

ANOVA - Análise De Variância

CBCTP - Congresso Brasileiro De Cultura De Tecidos De Plantas

F - Valor tabelado do teste f estatística

Fc - Valor calculado do teste f estatística

IBRAFLORE - Instituto Brasileiro De Floricultura

MS - Murashige & Skoog

RT-PCR - Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction Quantitative Real Time

PCR - Polimerase Chain Reaction

QM - Quadrado Médio

SSR - Simple Sequence Repeats

TBE - Tris Borato Edta

UV - Ultravioleta

VBP - Valor Bruto De Produção

Sumário

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE.....	16
2.2 DISTRIBUIÇÃO PELO MUNDO E ECONOMIA.....	18
2.3 <i>PHALAENOPSIS</i>	20
2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO NA FAMÍLIA ORCHIDACEAE	21
2.4.1 Indução de mutação	23
2.5 BIOTECNOLOGIA VEGETAL.....	24
2.5.1 Cultivo <i>in vitro</i>	25
2.5.2 Meio de cultura	25
2.5.3 Condições de cultivo.....	27
2.6 ANÁLISES MOLECULARES	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVOS GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	31
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.3 MEIO DE CULTURA	33
4.4 INDUÇÃO DE MUTAÇÃO E OBTENÇÃO DE BROTOS	34
4.5 ANÁLISES MOLECULARES	35
4.5.1 Extração e quantificação estimada de DNA	36
4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
4.5.2.1 <i>Marcador SSR</i>	38
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 MEIO DE CULTURA	40
5.1.1 Análise dos tratamentos com inoculação de um explante por frasco	43
5.1.2 Análise dos tratamentos com inoculação de quatro explantes por frasco.....	47
5.2 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA	54
5.3 PADRONIZAÇÃO DA PCR.....	56

6.	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

As orquídeas são plantas ornamentais de extrema importância econômica, botânica e ecológica (CHUGH et al., 2009). As orquídeas contribuem expressivamente com a economia do país, segundo o informativo do Instituto Brasileiro de Floricultura (Ibraflor) (2017). Dados apresentados no Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, realizado em 2012 (CBCPT), mostram o crescimento de trabalhos realizados com flores e plantas, perfazendo 72,6% destes trabalhos, cerca de 31,23% realizados com orquídeas, enfocando na sua utilização como flores de corte, sua aplicação na medicina tradicional por demonstrar propriedades imunológicas, antitumorais, antioxidantes e na área cosmética com óleos e aromas, reafirmando a tendência mundial de ser a família mais estudada na micropropagação e a mais comercializada (SOUZA; JUNGHANS, 2013; BOSCOLO et al., 2010).

Tendo origem no sudeste asiático, o gênero *Phalaenopsis*, demonstra flores exuberantes devido a elevada contagem floral e a perduração das flores que são achatadas de labelo curto, as sépalas são maiores que as pétalas elaborando agradáveis combinações de flores arredondadas indo da coloração branco pura até o mais intenso violeta, entre os extremos constam uma diversidade de cores e tons (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007).

Considerando sua importância, o cultivo de orquídeas pode explorar ferramentas biotecnológicas para seu melhoramento (ENGELMANN, 2011), porém são escassos os programas de melhoramento em plantas ornamentais no Brasil (SOCCOL; VENTURIERI, 2013a). A cultura de células vegetais *in vitro* é viável economicamente para a propagação de orquídeas, pois possibilita a obtenção de um número elevado de plantas com qualidade fitossanitária (COSTA, 2013).

A indução de mutação aleatória no melhoramento genético é útil para obter variabilidade genética, um dos agentes mutagênicos físicos que podem ser utilizados é a absorção de radiação ultravioleta (UV) que tem potencial de realizar alterações gênicas (RNA ou DNA), que podem ser transmitidas para as gerações seguintes (SARTORI; SEPEL; LORETO, 2008). O processo que realiza a modificação a nível molecular é

denominado fotólise (LAM et al., 2005), trata-se da absorção de luz (exemplo: UV) pelas moléculas, ao absorver a radiação o composto gera estados excitados, formando ou desativando produtos (OPPENLÄNDER, 2003). A resposta obtida no processo de fotólise pode ser a molécula agindo como uma espécie nova, com propriedades distintas da molécula original (STULP; CARVALHO, 2015).

A eficiência da indução de mutação depende do tempo de exposição, intensidade luminosa, distância das lâmpadas, tipo e estado fisiológico do explante utilizado, entre outros (SARTORI; SEPEL; LORETO, 2008).

Diante da problemática apresentada a presente proposta vislumbrou a obtenção de novas variedades de orquídeas do gênero *Phalaenopsis*, para atender a demanda do mercado, através de mutação induzida com aplicações das ferramentas da biotecnologia para o melhoramento genético não convencional. Esse projeto serviu como base para pesquisas científicas referentes a indução de mutação e o uso de marcadores moleculares em orquídeas do gênero *Phalaenopsis* cultivada *in vitro*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

As angiospermas constituem o filo Anthophyta que agrupa a maioria das plantas com flores. Sendo as duas maiores linhas evolutivas de angiospermas as monocotiledôneas e as eudicotiledôneas. Dentro do grupo das monocotiledôneas está a família Orchidaceae, que comporta flores especializadas em teor evolucionar, ou seja, as mais evoluídas geneticamente do reino vegetal. Conhecida como a maior família de Angiospermas e de plantas floreiras com artifício floral exuberantes (RAVEN; EICHHORN; EVERT, 2011).

A família Orchidaceae possui aproximadamente 35.000 espécies distribuídas no planeta, excluindo regiões desérticas e polares (BARROS et al., 2018). O Brasil contém, segundo Barros et al., (2018), 2.500 espécies registradas devido a sua grande biodiversidade.

O conglomerado de caracteres que definem as orquídeas são referentes à morfologia como: flores trímeras; raízes com velame; uma pétala modificada em labelo; caule separado em rizoma e cauloma; ovário ínfero unilocular; a antera é opércula e o pólen é fusionado em polínias; o cauloma é intumescido em pseudobulbo; filete e estilete possuem estrutura colunar; sementes de tamanho microscópico e em grande número. A combinação destes caracteres definem uma orquídea (BARROS et al., 2018).

As orquídeas epífitas (vivem suspensas em árvores) possuem sistema radicular versado, as raízes são aéreas e tem como função o suporte/sustentação da orquídea em troncos e galhos, além da absorção de umidade e nutrientes originados da decomposição de detritos nos troncos das árvores (DEMATTE, J. B. I; DEMATTE, 1996).

As flores correspondem a parte estrutural das orquídeas que atrai olhares (figura 1), nas flores o filete e o estilete constituem a estrutura de ginostêmio, contendo as anteras férteis localizadas no ápice do ginostêmio, no seu interior são obtidos os grãos de pólen que são mantidos em contato por meio de uma substância chamada de viscina (BARROS; PINHEIRO; LOURENÇO, 2008).

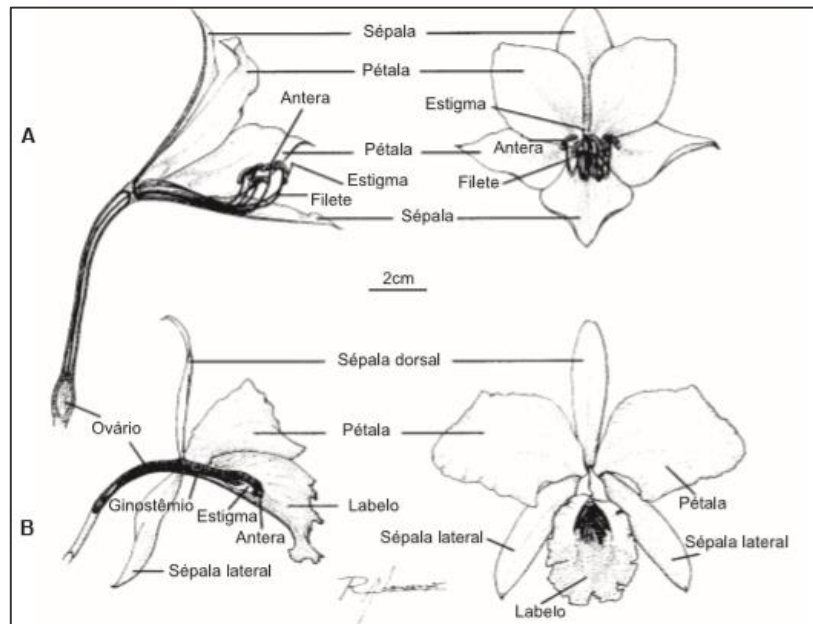


Figura 1 - Estrutura da flor de uma orquídea do gênero *Amaryllidaceae* (A) e *Cattleya* (B)

Fonte: BARBIERI; STUMPF (2008).

Na maioria das monocotiledôneas, como nas orquídeas, a estrutura floral apresenta grupos de três pétalas ou múltiplos (figura 2). Analisando o perianto externo e interno é observado a diferença morfológica existente entre sépala e pétala, somente uma pétala difere das demais, os labelos, sendo ela a pétala localizada opostamente a antera fértil (BARROS; PINHEIRO; LOURENÇO, 2008).

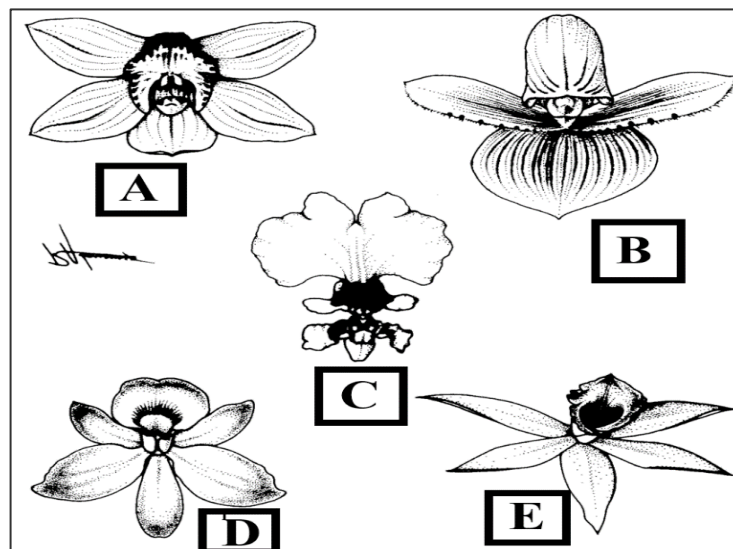


Figura 2 – Alguns tipos de flores de orquídeas comerciais como: *Dendrobium* (A), *Phajus* (B), *Oncidium* (C), *Cymbidium* (D) e *Paphiopedilum* (E)

Fonte: BARBIERI; STUMPF (2008).

Essa única pétala tem a função de atrair os agentes polinizadores e servir como base para o pouso, enquanto os labelos contém os recursos necessários (aroma, néctar, ceras e óleos) para atrair os agentes polinizadores (BARROS; PINHEIRO; LOURENÇO, 2008).

2.2 DISTRIBUIÇÃO PELO MUNDO E ECONOMIA

As orquídeas são plantas ornamentais tão importantes e interessantes (COTTERELL, 2000) que seu cultivo comercial iniciou-se há mais de 150 anos na Europa (PAULA; SILVA, 2001). No mercado interno brasileiro, em 2013, avaliou-se que é majoritário o agronegócio no setor de flores e plantas ornamentais para jardinagem e paisagismo com cerca de 41,55% do valor total do VBP (Valor Bruto da Produção), 84,48% do setor é movido pelo mercado ascendente de orquídeas, bromélias, begônias, entre outras espécies (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014a).

Entre as orquídeas mais famosas comercialmente encontram-se as *Oncidium*, *Dendrobium*, *Cymbidium* e a *Phalaenopsis* que compõe o mercado de orquídeas de maneira majoritária em flores de vasos, somente nos Estados Unidos corresponde a 75% das orquídeas comercializadas (GRIESBACH, 2002). A produção da *Phalaenopsis* elevou-se também em outros países como o Japão, Alemanha, China, Holanda e Tailândia, segundo dados econômicos em 2001 a Tailândia exportou cerca de 20 milhões de *Phalaenopsis* (SU; HSU; CHEN, 2001).

Os valores para comercialização de orquídeas variam, de acordo com o gênero, *Dendrobium* podem custar aproximadamente R\$ 60,00, *Cymbidium* R\$100,00, as orquídeas *Vanda* podem custar R\$ 350,00, *Cattleya walkeriana* R\$ 7.500,00 por uma planta de 10 cm. A *Phalaenopsis* é um dos gêneros mais em conta para comercialização, seu valor é de aproximadamente R\$ 30,00.

Segundo dados do Ibraflor (Instituto Brasileiro de Floricultura) (2017) na Holanda, uma das maiores importadoras de plantas ornamentais, tem-se comercializado aproximadamente 2,3 milhões de *Phalaenopsis* em uma semana, a tendência de ultrapassar esse marco é alta para 2018, caso comprovado esse fato, os preços serão pressionados em decorrência do mercado mundial de flores e plantas ornamentais ser crescente (SCHOENMAKER, 2017).

O Brasil apresenta dados disponibilizados pelo Ibraflor referente ao comércio no ano de 2017, com exportações divididas em 47,70% referentes a mudas de Plantas Ornamentais, seguido de 45,20% de Bulbos, Tubérculos, Rizomas e Similares (SCHOENMAKER, 2017). As importações também foram contabilizadas sendo o demonstrativo de 46,33% mudas de Plantas Ornamentais, 27,02% de Bulbos, Tubérculos, Rizomas e Similares, 25,03% de Flores Frescas e 1,62% de outras. O maior destino continua sendo para a Holanda com 60% (figura 3), de todas as exportações florícolas realizadas em 2017 a maior porcentagem é referente a Mudas de Plantas Ornamentais com 45,70% (figura 4) (SCHOENMAKER, 2017).



Figura 3 – Exportações Internacionais do mercado florícola brasileiro para os países como Holanda, Estados Unidos, Itália e outros
Fonte: SCHOENMAKER (2017).

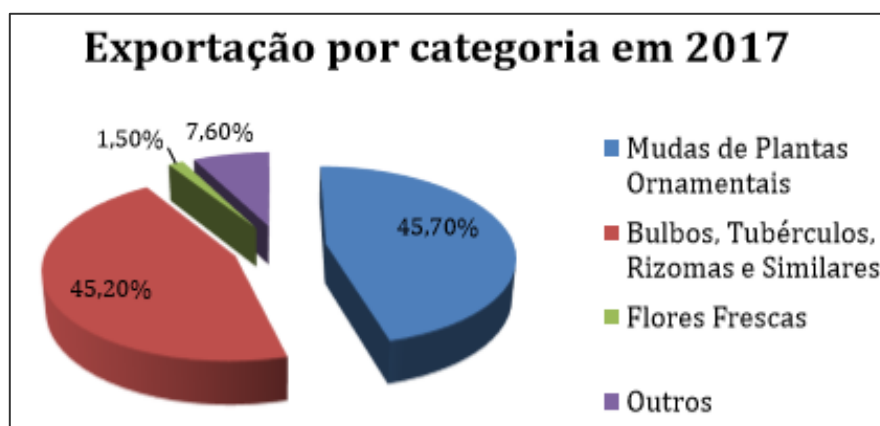


Figura 4 – Exportações do mercado florícola brasileiro, por categorias, o setor de mudas de plantas ornamentais lidera a exportação
Fonte: SCHOENMAKER (2017).

Atualmente as considerações mostram que o momento é de agregação de valor aos produtos comerciais, de maneira especial quanto o uso de novas técnicas e métodos acrescentando valor no produto, segundo o informativo Ibraflor (2017) “Não estamos dizendo que ‘o produto base’ seja menos importante, mas consideramos muito mais importante as melhoras que estão sendo oferecidas aos produtos” (SCHOENMAKER, 2017).

2.3 PHALAEOPSIS

As folhas são exuberantes e possuem em média 46 cm de comprimento por 7 de largura com textura coriácea, utilizadas como reservatório de alimento e água. A inflorescência, local onde se localizam as flores, emerge por entre as folhas podendo constar superioridade a 100 flores dependendo da espécie (PRIDGEON, 1992).

A *Phalaenopsis* é uma orquídea monopodial, logo o crescimento ocorre em caule único e o meristema apical se desenvolve constantemente, alternifólias, possui inflorescência nas axilas foliares e acaba sempre em meristema vegetativo (figura 5) (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007).

Esse gênero de orquídea é altamente híbrido (RENATO, 2015), como as do gênero *Dendrobium*. Por serem de origem asiática, no Brasil, a mesma não possui disponibilidade de agentes polinizadores, nem fungos específicos conhecidos para realizar o acoplamento, que auxilia na germinação de sementes e nutrição para a orquídea (MILIAUSKAS, 2015). Consta-se na literatura, que a *Phalaenopsis* é obtida por polinização artificial e sua propagação ocorre em suma por propagação vegetativa (PRAKASH; GOH, 1996).



Figura 5 – Flor da Orquídea do gênero *Phalaenopsis*, com cor branca

A *Phalaenopsis* constitui um grupo de grande estima dentre os produtores e é mundialmente conhecida, com elevada cotação comercial, sua produção teve um crescimento acentuado nos últimos anos devido ao acesso facilitado das técnicas de cultivo *in vitro*, a geração de hastes floridas com uma diversidade riquíssima de cores, formas e tamanhos que perduram por um período longo de tempo na orquídea (WANG, 2003; COTTERELL, 2000).

2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO NA FAMÍLIA ORCHIDACEAE

Segundo Machado (2014) o melhoramento convencional é definido por “buscar minimizar o efeito do ambiente para que a seleção seja a mais eficiente possível explorando a variância genotípica com destaque especial para a variância aditiva” onde busca-se gerar variabilidade genética por meio do resgate de variedades, indução de mutação e cruzamentos.

Atualmente as tecnologias para obter modificações desejadas, com o auxílio da biologia molecular, com ferramentas de engenharia genética e aplicações de bioinformática referem-se a era do novo melhoramento genético (FILHO; CASCARDO; FONTES, 1999). Segundo Teixeira (2010) a combinação entre o melhoramento clássico e o atual propiciam avanços significativos no melhoramento de plantas.

Na busca por plantas de valor agregado, que sejam superiores e competitivas com as já existentes no mercado florícola, o melhoramento genético de plantas ornamentais almeja novas cultivares com características relevantes como boa formação de flores, durabilidade da flor, novas colorações de flores, resistências a condições adversas, entre outras (FILLIETTAZ, 2007). Belarmino e Mii (2000) relatam que o melhoramento genético pode trazer riscos, como a diminuição da variabilidade genética, pois o uso de materiais de elite afunila a base genética para produção de novos híbridos.

As *Phalaenopsis* híbridas modernas contemplam variedades triploides (57 cromossomos) e tetraploides (76 cromossomos) obtidas por cruzamentos entre diploides ($2n = 38$ cromossomos) e tetraploides (TANG; CHEN, 2007; HSU et al., 2010).

A *Phalaenopsis* foi melhorada para adquirir resistência a vírus que causava a perda das plantas (FILLIETTAZ, 2007). No estudo de Belmiro e Mii (2000) no melhoramento genético de *Phalaenopsis* foram testados a transferência de genes de maneira indireta, ou seja, com o uso de um mediador, nesse caso a *Agrobacterium tumefaciens*. Os resultados obtidos por análises de Southern blot mostrarão que o trabalho obteve uma eficiência de transformação (18%), com 73 linhas transformadas, que foram produzidas de modo estável.

Os caracteres que exercem mais influência na comercialização de ornamentais é o formato e a cor da flor. Em inúmeras espécies a gama de coloração é limitada e tal barreira somente é superada com alterações genéticas, algumas técnicas empregadas em vegetais são a biobalística, um método físico e o co-cultivo com *Agrobacterium*, um método biológico (DEBENER, T.; WINKELMANN, 2010). As pesquisas para modificar essa característica em questão são relacionadas a concentração de carotenoides e antocianinas e como manipula-las, algumas plantas modificadas são listadas no quadro 1 (CHANDLER; SANCHEZ, 2012).

Espécies	Mudança de cor	Citação
<i>Cyclamen persicum</i>	roxo para vermelho/pink	Boase et al. (2010)
<i>Gentiana triflora</i>	branco para azul	Nakatsuka et al. (2011)
<i>Lotus japonicus</i>	Amarelo claro para laranja	Suzuki et al. (2007)
<i>Phalaenopsis spp.</i>	Rosa para rosa claro	Chen et al. (2011)
<i>Tricytis spp.</i>	Vermelho para branco	Kamiishi et al. (2011)

Quadro 1 – Exemplos de alterações genéticas realizadas na cor das flores de diferentes espécies, dentre elas a *Phalaenopsis*

Fonte: Adaptado de CHANDLER; SANCHEZ 2012.

Chen et al. (2011) em seu trabalho relata a relevância da antocianina, pigmento influente na coloração azul, violeta e vermelha das flores. A dissolução de antocianina eleva-se com a glicose, grupo responsável pelos pigmentos iniciais. Por meio de análises de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*), a influência ocasionada pela antocianina, na coloração das flores em *Phalaenopsis*, foi avaliada. Nos resultados obtidos, o gene PeUFGT3 demonstrou resultados relevantes, quanto a coloração vermelha em *Phalaenopsis* quando o mesmo é expresso. Ao ser silenciado o teor de antocianinas caiu e, conseqüentemente, na coloração das flores obteve-se o desbotamento em vários níveis.

2.4.1 Indução de mutação

A mutação é responsável, em eventos naturais, por gerar variabilidade genética através de alterações nas sequências do genoma, no número de cromossomos e na estruturação (FUTUYMA, 2013). Segundo Harten (1998), no livro de Vries “Species and Varieties: Their Origin by Mutation” “devemos esperar que algumas espécies se tornem mutáveis por métodos artificiais” por ser uma maneira mais promissora e inovadora no melhoramento genético pois, mutações espontâneas são raras (VEASEY et al., 2011). Na literatura encontram-se centenas de trabalhos com sucesso referentes ao uso de mutagênicos (LATADO et al., 2001).

Os agentes mutagênicos são divididos em físicos e químicos. Dentre os físicos encontram-se radiações ionizantes e ultravioleta (UV), cujas alterações são substituições de bases nitrogenadas (VEASEY et al., 2011). A luz UV comumente encontrada na natureza é absorvida em tecidos vegetais (aproximadamente 10%) embora a baixa absorção da incidência, a radiação UV é um agente mutagênico físico de eficiência, seu funcionamento ocorre por mutações espontâneas e em comparação com demais radiações apresenta menores riscos à planta (HARTEN, 1998; SARTORI; LEPEL; LORETO, 2008).

A indução de mutação pode ocorrer de maneira dirigida ou aleatória, quando deseja-se obter variabilidade genética faz-se uso de mutações induzidas aleatórias (PILLING; MORAIS; BONFIM). Essa mutação é a possível responsável pela evolução e sobrevivência de muitas espécies, dentre elas as orquídeas (LIMA, 2010).

A mutação induzida por meio de radiação é afetada pelo tempo e dose aplicada ao material exposto. São conhecidos como efeitos agudos aqueles nos quais os efeitos são notáveis após poucas horas e outros em poucas semanas da exposição do material a doses altas de radiação por um pequeno período de tempo. Nos efeitos tardios o material é exposto a radiação por um período de tempo curto e com uma dose baixa de radiação, nestes casos o material pode superar o efeito e não ser modificado, entretanto se a exposição for uma dose baixa mas, por um período de tempo longo o material pode expressar modificações a longo prazo (SARTORI; LEPEL; LORETO, 2008).

Em algumas plantas, encontram-se trabalhos realizados com o intuito de induzir mutações através de radiações. Cultivares de bananeira passarão por um processo de

indução de mutação por da radiação gama, para as bananeiras verificou-se que as doses de radiação gama, indicadas para o cultivo e obtenção de brotos, são de 20 e 30 Gy. Doses superiores a 40 Gy mostram redução de brotos e maiores perdas de plantas (PESTANA, 2010). Para as pereiras, que também foram irradiadas com radiação gama, a dose indicada é de 20 Gy para obter com acréscimo de multiplicação e crescimento de brotações (SILVA, 2009). Em dalias, a radiação utilizada para induzir mutações é o raio-X ou o raio gama, também em doses de 20 e 30 Gy (AUGUSTO; ROCHA, 2007).

A radiação UV é menos energética que as radiações gama, entretanto são eficientes para induzir a multiplicação de brotações e induzir alterações genéticas. Em orquídeas, não há até o momento, trabalhos científicos publicados que relatem o uso da radiação UV para induzir mutações.

2.5 BIOTECNOLOGIA VEGETAL

A biotecnologia vegetal possibilitou avanços tecnológicos quanto ao melhoramento em plantas ornamentais e flores. Inúmeras espécies demonstram híbridos com aroma e beleza exuberantes que encantam e conquistam os consumidores. Merecem destaque as orquídeas, classificadas como flores de corte (VENCOVSKY; RAMALHO, 2000).

A classificação e identificação de espécies é possível graças às características citológicas e morfológicas através de estudos filogenéticos. Porém, com o advento da biotecnologia tornou-se possível a identificação filogenética de orquídeas em níveis taxonômicos distintos e o delineamento da evolução da família Orchidaceae. As técnicas mais utilizadas envolvem o uso de marcadores para quantificar o polimorfismo (HOSSAIN et al., 2013).

As orquídeas demonstram alto valor mundial, sua propagação natural é prolongada e ocorre pela disseminação natural das sementes que são geradas em cápsulas ou pela proliferação de gemas laterais (COSTA et al., 2013). Embora a propagação natural demonstre simplicidade e resultados estáveis, é limitada a quantidade obtida pois, a reprodução depende da divisão de um indivíduo já adulto para gerar uma planta nova,

tal processo leva aproximadamente 8 anos e mais 3-4 anos para começar a florir (CAMPOS, 2002).

2.5.1 Cultivo *in vitro*

A cultura de tecidos segundo Carvalho, Silva e Medeiros (2006) abrange técnicas em condições assépticas na propagação em meio nutritivo de células, tecidos ou órgãos de plantas por meio de condições controladas de fotoperíodo, temperatura, entre outros. Dentre as áreas da biotecnologia a cultura de tecidos é uma das quais apresentam maior êxito, com várias finalidades se trata de uma ferramenta de alta utilidade no agronegócio (JUNGHANS; ALBERTO; OLIVEIRA, 2013).

A cultura de tecidos tem demonstrado eficiência para recuperação e propagação veloz de plantas livres de agentes causadores de doenças em tempo reduzido, obtenção de plantas uniformes em grande quantidade, no melhoramento genético, na engenharia genética, na propagação de plantas comerciais, em pesquisas sobre fisiologia vegetal, produção de compostos secundários *in vitro*, na conservação do germoplasma, custo reduzido para produção e redução dos impactos ambientais (JUNGHANS; ALBERTO; OLIVEIRA, 2013).

O sucesso da cultura de tecidos é influenciado pelo explante utilizado e de seu genótipo, as técnicas mais empregadas são a cultura de embriões, meristemas, anteras, calogênese e suspensão celular (PAIVA, R.; PAIVA, 2008).

Segundo Paiva e Paiva (2008) a maturação do explante é um dos fatores determinantes para o sucesso do cultivo, pois, os explantes obtidos a partir de plantas jovens ou ainda de plântulas demonstram resultados superiores para o crescimento *in vitro* quando comparados aos explantes obtidos de plantas adultas, demais fatores interferentes são referentes às demandas do explante como o meio de cultura, a temperatura e a luminosidade.

2.5.2 Meio de cultura

No cultivo *in vitro* as funções do meio de cultura contemplam desde o suporte físico até a disponibilização de nutrientes para a sobrevivência do explante. Não há um meio de cultura padrão, pois a composição do meio nutritivo depende da variedade/espécie desejada e do estágio de cultura, para orquídeas os meios mais utilizados são o Knudson e o Murashige & Skoog (CARVALHO; et. al., 2011).

O meio de cultura é composto essencialmente por sais minerais na forma de macronutrientes ou micronutrientes juntamente com vitaminas, a fonte de carbono mais usual é a sacarose. O meio de cultura pode ser suplementado, de acordo com o objetivo, com a utilização de reguladores de crescimento vegetal, aditivos orgânicos e agente geleificante, sendo o ágar o mais comumente utilizado para espécies vegetais (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Aditivos orgânicos são utilizados com frequência para obter um bom crescimento, alguns exemplos de aditivos orgânicos utilizados são a água de coco, suco de tomate, extrato de banana, entre outros (ZAHARA et al., 2017). Os reguladores de crescimento vegetal possuem potencial de reproduzir os efeitos de hormônios endógenos, sendo amplamente utilizados pela ocorrência de eventos fisiológicos (germinação, crescimento e desenvolvimento) complexos e integrados (ROSA, 2002).

O Meio MS (Murashige e Skoog) demonstra bons resultados para o cultivo de orquídeas e na obtenção de brotos (ROSA et al., 2015). Segundo Mezzalira e Kuhn (2018) o meio de cultura que proporcionou melhor desenvolvimento de *Phalaenopsis* foi o meio Knudson suplementado com suco de cenoura 10% (v/v), o mesmo foi verificado por Zahara (2017) que obteve resultados similares para o cultivo *in vitro* de orquídeas (figura 6). O suco de cenoura é um aditivo indeterminado, logo os resultados podem variar, de acordo com a concentração utilizada, com o tipo de cenoura e seu grau de maturação.

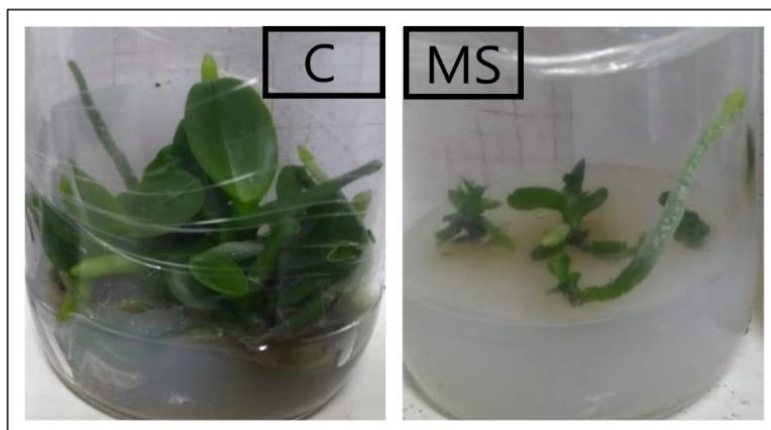


Figura 6 - *Phalaenopsis* cultivadas por 365 dias no meio de cultura suplementado com suco de cenoura (C) e no Murashige & Skoog (MS)

Fonte: MEZZALIRA; KUHN, 2018.

Após 120 dias de cultivo, contando com a germinação das sementes de *Phalaenopsis*, os resultados obtidos quanto o número de brotações foram uma média de 7,79 brotos para as plantas cultivadas no meio de cultura suplementado com cenoura, enquanto o meio MS obteve uma média de 1,09 brotos (MEZZALIRA; KUHN, 2018).

2.5.3 Condições de cultivo

A luz artificial utilizada no cultivo *in vitro* induz respostas durante o processo de micropropagação, pois as plantas são dependentes do processo de fotossíntese (PAIVA, R.; PAIVA, 2008). No cultivo *in vitro* de vegetais geralmente são utilizadas lâmpadas fluorescentes branca-fria (KIM et al., 2004). A qualidade da luminosidade disponível é uma ferramenta de manipulação para modificar balanços fisiológicos (MORINI; MULEO, 2003).

Para *Phalaenopsis* adultas é recomendada uma intensidade da luz entre 135 a 202,7 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em um fotoperíodo dentre 12 a 14 horas (DRONK, 2004), ou um tempo de 16 horas com menor intensidade de luz como no trabalho realizado com orquídeas híbridas de *Cattleya* que fez uso de um fotoperíodo de 16 horas com intensidade de 68 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (MACHADO et al., 2002).

A funcionalidade fisiológica das plantas é influenciada pela temperatura, visto que a mesma controla as atividades metabólicas nas células. Em plantas a sobrevivência é possível quando as mesmas conseguem se adaptar as modificações de temperaturas que devem ocorrer de maneira rápida e eficiente (BROWSE; XIN, 2001). Alguns trabalhos citados por Mollo (2009), demonstram que temperaturas reduzidas a 12°C inibem o crescimento foliar em plantas e em temperaturas elevadas em torno de 30 °C se tem baixa absorção de CO₂ e alta taxa de respiração, ocasionando a inibição do crescimento, na geração de carboidratos e na floração.

No cultivo de orquídeas alguns trabalhos trazem temperaturas relativamente padronizadas. Em trabalhos com *Phalaenopsis* quando a mesma foi cultivada *in vitro* com polpa de banana e fertilizantes comerciais foi estabelecida a temperatura de 26 °C (COLOMBO; FAVETTA; FARIA, 2012), com cultivo de *Phalaenopsis in vitro* a partir de protocormo utilizou-se temperatura de 25 ± 1 °C (TIRADO; NARANJO; ATEHORTÚA, 2005).

2.6 ANÁLISES MOLECULARES

Na literatura são disponibilizados inúmeros protocolos para realizar a extração de DNA e RNA. Dentre as possíveis amostras para extração do material genético de vegetais são utilizadas folhas pois o DNA é facilmente extraído desta amostra, além de ser obtido em grande quantidade. Como as folhas são amostras sólidas é necessária uma etapa para romper as estruturas intransigentes como a maceração para que se eleve a área de contato. O rompimento das células ocorre com ação de detergentes, soluções tamponadas e reagentes tris. As etapas seguintes tratam-se da separação dos constituintes e precipitação do DNA por meio de substâncias, como solventes orgânicos, e centrifugações. Existem no mercado kits que auxiliam no processo com extração e obtenção do DNA de amostras (NONOHAY; HEPP, 2017).

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica altamente empregada na biologia molecular, possibilitando a obtenção de sequências de ácidos nucleicos (MOLINA, A. L.; TOBO, 2004) é baseada na síntese feita pela enzima Taq DNA polimerase para obter cópias desses ácidos nucleicos (GUIMARÃES et al., 2006). A

ferramenta PCR é baseada em variações de temperaturas (MULLIS, K. B.; JOLLA, L.; SMITH, 1993) constituída por três passos, primeiramente a desnaturação do DNA onde a temperatura varia entre 92-96 °C seguido do pareamento dos *primers* com a região complementar do DNA, na qual as temperaturas dependem do *primer* utilizado, por fim o último passo é a amplificação através de enzimas como a *Taq* DNA polimerase com temperatura de 72 °C (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). Os *primers* reconhecem a região de interesse para anelar por meio da complementariedade das bases, sendo os ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação repetidos aproximadamente de 30 a 35 vezes (SANTOS et al., 2014).

Outra ferramenta utilizada nas análises moleculares é a eletroforese que separa macromoléculas de acordo com seus tamanhos por ação de corrente elétrica, como o DNA possui carga negativa o mesmo corre em direção ao polo positivo quando se aplica cargas elétricas, as menores moléculas se deslocam rapidamente e se encaminham para distâncias mais longas que as moléculas mais pesadas. Normalmente são utilizados géis de agarose em cubas com inserção de polos negativos e positivos com a adição de solução tamponada, a carga elétrica aplicada percorre o gel promovendo a migração das moléculas (NONOHAY; HEPP, 2017).

O uso de marcadores moleculares revolucionou a identificação de polimorfismos (GUIMARÃES et al., 2006). O microssatélite SSR (*Simple Sequence Repeats*) é um marcador co-dominante e multialélico, no trabalho de Ferrão et al. (2011) foi considerado um marcador que obtém ótimos resultados em estudos de diversidade genética, visto que o mesmo se distribui aleatoriamente pelo genoma da espécie de interesse cobrindo amplamente o genoma, com reprodutibilidade e límpida informação sobre o genoma.

O polimorfismo é determinado como a ocorrência de alelos em *locus* onde ao menos um alelo aparece (NUSSBAUM et al., 2001) com variáveis que se encontram em regiões que codificam genes, modificando a função de proteína (CHEN et al., 2005), também são os responsáveis pela diversidade existente entre espécies, os fenótipos são obtidos a partir de polimorfismos distintos (OLSSON, M. L.; IRSHAD, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Utilizar ferramentas biotecnológicas, como a cultura de tecidos e a indução de mutação, para obter novas variedades de *Phalaenopsis* com características superiores, que podem ser avaliados com marcador molecular SSR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a eficiência de dois meios de cultivo (Murashige & Skoog e Knudson acrescido de suco de cenoura) e a influência do número de plantas por frasco, para o cultivo *in vitro* e obtenção de Brotos de *Phalaenopsis híbrida*;

- Induzir mutações aleatórias em *Phalaenopsis híbrida* por meio do agente físico, radiação Ultravioleta, para obter novas cultivares de orquídeas;

- Padronizar a extração de DNA e a PCR para *Phalaenopsis híbrida* com o marcador molecular SSR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Os explantes da *Phalaenopsis* foram obtidos de plântulas germinadas *in vitro* no laboratório de cultura de tecidos vegetais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos.

As sementes foram desinfestadas com uso de hipoclorito de sódio (10%), álcool 70 % e tríplice lavagem com água destilada autoclavada, posteriormente as sementes foram inoculadas em três meios de cultivo para germinação, sendo eles o meio Knudson, o meio Murashige & Skoog (MS) e o meio Knudson acrescido de suco de cenoura 10% (v/v), os melhores resultados para germinação foram obtidos no meio acrescido com suco de cenoura (MEZZALIRA; KUHN, 2018).

O híbrido tem origem na empresa Clona Flor localizada em Matelândia-PR, laboratório de produção de mudas *in vitro* de orquídeas, da planta *Phalaenopsis* híbrida que foi polinizada artificialmente. A polinização para obtenção do híbrido ocorreu entre um progenitor masculino *Phalaenopsis* e um progenitor feminino *Phalaenopsis* (figura 7), ambos pertencem a espécie *Phalaenopsis amabilis*, porém de variedades diferentes.



Figura 7 – Plantas utilizadas para polinização e obtenção do híbrido utilizado no presente trabalho. A imagem “A” corresponde ao progenitor feminino e a imagem “B” o progenitor masculino, ambas de *Phalaenopsis*

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental utilizado foi totalmente casualizado, pelo qual brotos foram obtidos através do tratamento com dois meios de cultura distintos, ambos com 60 ml de meio de cultura adicionados em frascos de vidro de 260 ml, sendo os meios o MS (Murashige e Skoog) e o Knudson acrescido de suco de cenoura. Para cada meio de cultura, testou-se o efeito da quantidade de plantas (1 ou 4 por frasco) e o tempo de exposição à luz UV (0, 10, 20 ou 30 min) (figura 8 e quadro 2).

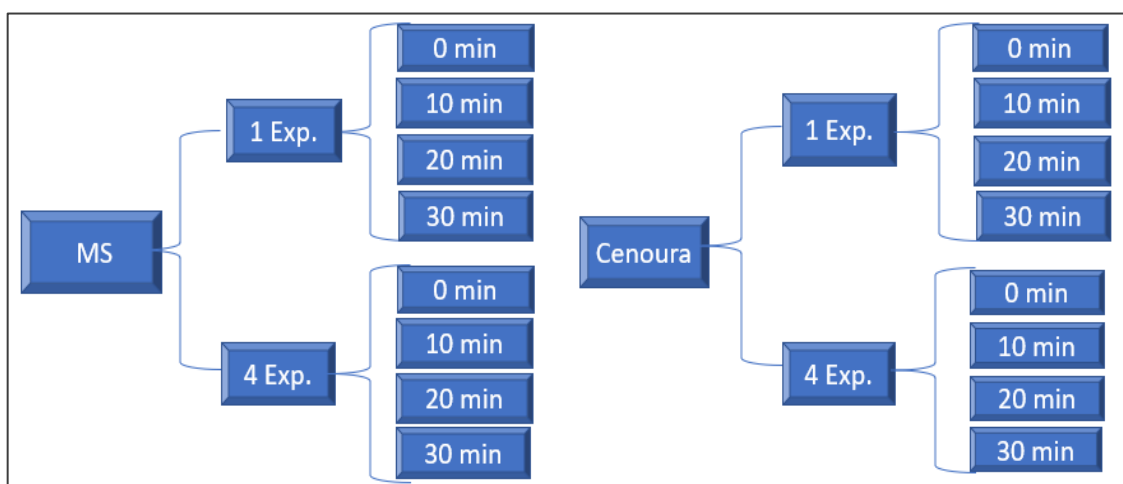


Figura 8 – Delineamento experimental – fatorial 2 x 2 x 4, em triplicata

Os tempos de exposição à radiação, foram definidos previamente por testes realizados para indução de brotações em orquídeas (dados não publicados), realizados pela empresa Clona Flor, localizada em Matelândia-PR. Nos testes foi verificado que o tempo de 20 minutos era eficiente e não ocasionava a morte precoce das plântulas, logo visando melhores resultados quanto a obtenção de brotos e a indução de mutação aumentou-se um período de tempo, estabelecendo assim o último tempo de exposição de 30 minutos.

O estudo foi realizado em triplicata, totalizando 48 amostras. As matrizes utilizadas como base para comparação da indução de mutação, pelos tempos de exposição, referem-se às amostras que não foram expostas a radiação, ou seja, os tratamentos no período de zero minutos de exposição (controle). O sistema de cultura foi definido a partir da análise da quantidade de brotos obtida em cada condição testada.

Tratamento	Condição
T 1.1 (Controle)	Meio MS, 1 Explante por frasco, 0 minuto de exposição a UV
T 1.2	Meio MS, 1 Explante por frasco, 10 minutos de exposição a UV
T 1.3	Meio MS, 1 Explante por frasco, 20 minutos de exposição a UV
T 1.4	Meio MS, 1 Explante por frasco, 30 minutos de exposição a UV
T 2.1 (Controle)	Meio Cenoura, 1 Explante por frasco, 0 minuto de exposição a UV
T 2.2	Meio Cenoura, 1 Explante por frasco, 10 minuto de exposição a UV
T 2.3	Meio Cenoura, 1 Explante por frasco, 20 minutos de exposição a UV
T 2.4	Meio Cenoura, 1 Explante por frasco, 30 minutos de exposição a UV
T 3.1 (Controle)	Meio MS, 4 Explante por frasco, 0 minuto de exposição a UV
T 3.2	Meio MS, 4 Explante por frasco, 10 minutos de exposição a UV
T 3.3	Meio MS, 4 Explante por frasco, 20 minutos de exposição a UV
T 3.4	Meio MS, 4 Explante por frasco, 30 minutos de exposição a UV
T 4.1 (Controle)	Meio Cenoura, 4 Explante por frasco, 0 minuto de exposição a UV
T 4.2	Meio Cenoura, 4 Explante por frasco, 10 minuto de exposição a UV
T 4.3	Meio Cenoura, 4 Explante por frasco, 20 minutos de exposição a UV
T 4.4	Meio Cenoura, 4 Explante por frasco, 30 minutos de exposição a UV

Quadro 2 – Denominação dos tratamentos realizados conforme a condição estabelecida, sendo 16 tratamentos ao todo, oito tratamentos com meio MS (Murashige e Skoog) e oito tratamentos com meio Cenoura (meio Knudson suplementado com suco de cenoura a 10% (v/v))

A análise utilizada para avaliar a indução de mutação, consistiu na verificação das plantas sobreviventes. Análises moleculares subsequentes foram realizadas a partir de quatro plantas clonadas, das quais foram coletadas 3 amostras, totalizando 12 amostras. A indução da mutação foi avaliada através da descrição dos polimorfismos obtidos.

4.3 MEIO DE CULTURA

Esta etapa foi realizada no laboratório de Reprodução Animal, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos.

O meio de cultura Murashige e Skoog (MS) (1962) comercializado como Murashige and Skoog (MS) Basal Medium da SIGMA-ALDRICH Life Science, trata-se de um meio em pó testado para cultura de células vegetais. A dose recomendada para elaboração deste meio segundo fornecedor é de 4,4 g/L, com incremento de 20 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar para obtenção do meio MS basal com a sua concentração original de nutrientes.

E o meio de cultura elaborado a base de suco de cenoura foi baseado na literatura de Zahara (2017). Um meio com os componentes do Knudson (1922) com 10% (v/v) do suco de cenoura obtido pela cenoura inteira processada em juicer compact, suplementado com 20 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar. Ambos os tratamentos com pH ajustado para 5,7-5,8.

A sala de cultivo controlava os parâmetros de temperatura, 24-25 °C e fotoperíodo de 16 horas com lâmpadas de luz branca com 16 W. As plântulas, após exposição à radiação, permaneceram na sala de cultivo pelo período de seis meses. A mensuração dos resultados obtidos foi realizada com uso de papel milimetrado.

4.4 INDUÇÃO DE MUTAÇÃO E OBTENÇÃO DE BROTO

Os frascos contendo os explantes passaram por exposição à radiação UV nos períodos de tempo correspondentes a 0, 10, 20 ou 30 minutos no primeiro estágio, com tamanho médio de 0,8-0,9 mm. A caixa escura de proporções 80 x 52 x 78 (cm) referentes ao comprimento, largura e altura respectivamente, continha na superfície uma lâmpada UV (125 W) de vapor de mercúrio da marca Empalux com vida útil de 24.000 horas de uso (FG, 2016).

A caixa se localiza no Laboratório de Polímeros (LAPOL) no bloco G10, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. Contemplava um suporte de 16 cm da base da caixa para condicionar as amostras, com sistemas de ventoinhas para não superaquecer o interior da caixa (figura 9). Constando que o frasco de vidro com os explantes contém 60 ml de meio de cultivo, correspondendo a 2,1 cm e que somando com a altura do suporte deixarão todos os explantes à mesma distância da lâmpada (59,3 cm).



Figura 9 – Caixa escura contendo uma lâmpada UV (125 W) de vapor de mercúrio, imagem à esquerda representa a caixa aberta e a imagem a direita mostra a caixa fechada, sua proporção e sistema de ventoinhas

A lâmpada UV-C (100-280 nm) foi adquirida há 2 anos e de acordo com as anotações de uso, foi utilizada pelo período de 10 meses em cada ano perfazendo aproximadamente 2.000 horas de uso de baixa comutação. A resultante, quanto a eficiência da lâmpada é uma potência nominal igual ou superior a 92%, ou seja, a mesma não atingiu o fluxo luminoso nominal, que se trata da lâmpada que já tenha sido utilizada em 10% de sua vida média (FIORINI,2006). Logo, este não é fator limitante e influenciável no procedimento, visto que a vida útil diz respeito ao tempo necessário para que o fluxo luminoso caia para 70% de seu valor inicial (ETAP, 2015).

O fluxo luminoso, segundo o fornecedor é de 6.300lm, refere-se à potência de radiação emitida pela fonte (FIORINE, 2006), enquanto a eficiência luminosa da lâmpada UV da Empalux é de 50lm/W (FG, 2016), sabendo que a eficiência luminosa trata-se da relação entre o fluxo luminoso e a potência elétrica da lâmpada (FIORINE, 2006). Neste experimento a exposição à radiação UV teve função de induzir brotações (clones potencialmente mutados) (KERBAUY, 2008) e tem o potencial de induzir mutações aleatórias em conjunto.

4.5 ANÁLISES MOLECULARES

4.5.1 Extração e quantificação estimada de DNA

A extração do DNA genômico, ocorreu com a padronização do protocolo disponibilizado pelo Kit Wizard® da Promega (PROMEGA, 2019), com adaptações.

Utilizou-se amostras do tecido das folhas de *Phalaenopsis*, as adaptações foram as seguintes: cerca de 0,5 g de folhas, que foram maceradas diretamente em tubos eppendorfs de 1,5 ml com auxílio de êmbolos de seringas estéreis, sem uso de nitrogênio líquido. Os tubos já continham 300 µl de Cel Lysis Solution, após a maceração adicionou-se mais 500 µl de Cel Lysis Solution. Demais adaptações consistiram na primeira centrifugação a 16.000xg por 5 minutos possibilitando a formação de um pelet e um sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para tubos eppendorfs (1,5 ml) já contendo 600 µl isopropanol gelado. A segunda centrifugação ocorreu por 3 minutos a 16.000xg. Utilizou-se nessa padronização 300 µl de etanol absoluto gelado. No fim do procedimento os tubos eppendorfs, contendo DNA, foram deixados abertos para evaporar o etanol por 1 hora, e por fim adicionou-se 100 µl de DNA Rehydration Solution.

Na quantificação do DNA, foram selecionadas amostras de 4 clones, conforme quadro 3. A realização da quantificação ocorreu com eletroforese, fazendo uso de gel agarose 1%, com tampão TBE 10X (Tris/Borato/EDTA). O gel foi corado com solução de GelRed contendo 0,3 µg/ml. As imagens foram capturadas com *Ultraviolet Transilluminador* utilizando o programa LPix Image STi.

Nº da amostra	Nº do frasco	Tempo UV	Clone	Meio de cultura
1	1	0 minutos	1	Cenoura
2	1	0 minutos	1	Cenoura
3	1	0 minutos	1	Cenoura
4	2	10 minutos	2	Cenoura
5	2	10 minutos	2	Cenoura
6	2	10 minutos	2	Cenoura
7	3	30 minutos	3	Cenoura
8	3	30 minutos	3	Cenoura
9	3	30 minutos	4	Cenoura
10	3	30 minutos	4	Cenoura

Quadro 3 – Amostras selecionadas para realização da quantificação. Três clones do tempo 0 minutos, três clones do tempo 10 minutos e quatro clones do tempo de 30 minutos, proveniente de duas plantas mães, das *Phalaenopsis* cultivadas no meio Cenoura (meio Knudson suplementado com suco de cenoura a 10% (v/v))

A extração foi realizada em triplicata, através da quantificação do DNA extraído, foram selecionadas amostras que demonstraram ter um DNA mais limpo e em maior quantidade, para realização da PCR.

4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para realização da PCR do DNA extraído foi utilizado o marcador SSR, com a padronização do protocolo para 4 primers, sendo eles o ER38, ER45, ER59 e ER94 (Quadro 4) selecionados do SSR conjunto de primer desenvolvido na Universidade de British Columbia (Vancouver, BC, Canadá), para o trabalho de Lu et al (2012), os primers foram desenhados para orquídeas do gênero *Dendrobium*, logo foi necessário realizar a transferência dos primers e dos protocolos e condições de reações para uso em *Phalaenopsis*.

A reação de PCR para o marcador SSR foi padronizada para um volume final de 20 µl contendo 10 ng de DNA genômico, para utilizar-se na reação 1 µl de DNA (quadro 5).

Primers (SSR)	Sequência 5'-3'	Motivo	T (°C)
ER38	F: ATCCGCAACTCTACCACCAT	(CAG)5	55
	R: ACATCCTCATCAGCCTTCAT	(CAG)5	
ER45	F: ACTACGCGATCAGGTCTGTG	(CCT)5	49
	R:CTCTGGTGCTTACTACAATGCT	(CCT)5	
ER59	F: AATCATTTCTGGCATTTCG	(CTT)5	51
	R: GGTACTGCGTTTCTGTACTCC	(CTT)5	
ER94	F: AGGATGTATGGCACTGAGGA	(GAT)4	51
	R: AGGGAGCAGATGATGAACAA	(GAT)4	

Quadro 4 – Primers SSR para amplificação de DNA e observação da indução de mutação da orquídea do gênero *Phalaenopsis híbrida*, com suas respectivas sequências de nucleotídeos e temperatura de anelamento.

Fonte: Adaptado a partir de LU et al. (2012).

Reação PCR	
Componentes	Qtd. (µl)
Água mili-Q	8,4
dNTP	0,9
MgCl ₂	0,9
Tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,8)	1,5
Taq-DNA Polimerase Platinum (Invitrogen)	0,3
Primer F	1
Primer R	1
DNA purificado	1
Volume final da solução	15

Quadro 5 – Composição do Mix para realização da reação de PCR utilizando marcador SSR para a orquídea do gênero *Phalaenopsis híbrida*

Fonte: Adaptado a partir de LU et al. (2012).

A reação foi baseada no procedimento descrito por Pepineli et al (2014) com modificações estabelecidas para a padronização de um protocolo com as exigências da *Phalaenopsis híbrida*.

4.5.2.1 Marcador SSR

A amplificação dos marcadores SSR foi programada em uma etapa extensão inicial por 5 minutos a 94 °C, seguida por 32 ciclos de extensão de 40 segundos a 94 °C, o anelamento por 40 segundos, a temperatura variando de acordo com o primer estabelecido na tabela 1, amplificação por 90 segundos a 72 °C, e uma extensão final de 10 min a 72°C.

A separação das bandas geradas pelo marcador SSR ocorreu em eletroforese, usando um gel de agarose (1,4%) da Bio-Rad® (Lew Range Ultra) de Lot 14170827, combinada com uma agarose da Kasvi (1,4%) de Lot E7013-14 Mod.:K9-9100, para uma concentração final de 2,8% em uma proporção de 1:1 com utilização de 0,2 µl de Gelred (Invitrogen®), 2 µl de azul e 5 µl da amostra de DNA para posterior visualização do DNA amplificado. O ladder utilizado na quantificação das amostras foi o ladder de 100pb. Foi

utilizada a voltagem de 80 V por 2 horas, para separação dos produtos da PCR que foram gravados digitalmente usando um suporte de análise de imagem *Ultraviolet Transilluminador* no programa LPix Image STi.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Considerando distribuição normal dos dados e homogeneidade das variâncias, a análise estatística referente ao número de brotos obtidos foi realizada através da ANOVA, com testes de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott, a nível de 5% significância, teste analítico com intervalos de confiança de mesmo tamanho, pelo programa SASM-Agri. Assim como os parâmetros de número de raízes, comprimento da raiz mais longa, altura da parte aérea e número de folhas.

Em seguida, a análise referente a indução de mutação no procedimento 5.3, após exposição à radiação UV, se deu de modo qualitativo, onde avaliou-se a sobrevivência dos brotos e analisou-se os fenótipos das plântulas jovens após 6 meses de desenvolvimento *in vitro*.

A análise dos marcadores moleculares foi realizada de modo qualitativo, por visualização dos géis, verificando se a amplificação ocorreu ou não com eficiência.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MEIO DE CULTURA

Para verificar qual meio de cultura é o mais indicado para o procedimento, tanto para obtenção de orquídeas do gênero *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro*, quanto para a obtenção de brotações, alguns parâmetros foram avaliados, dentre eles o número de raízes, comprimento da raiz mais longa (cm), altura da parte aérea (cm), número de folhas e número de brotos.

Os resultados obtidos, possivelmente, foram influenciados por altas taxas de contaminação em alguns tratamentos. Alguns tratamentos que não tiveram problemas com contaminação, também não geraram brotos, servindo o meio de cultivo para o desenvolvimento da plântula (figura 10), foi o caso do tratamento em meio suplementado com suco de cenoura, também exposto a 20 minutos de radiação UV.

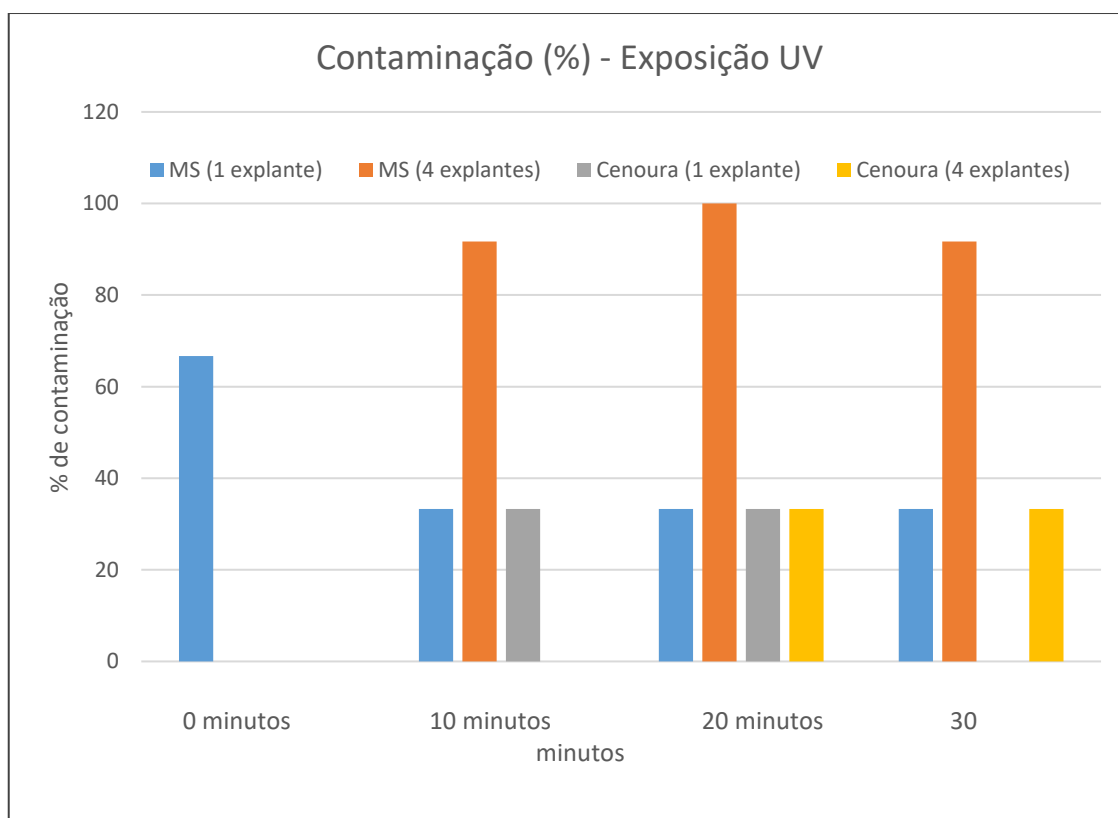


Figura 10 – Tratamento T 4.3, meio de cultivo suplementado com suco de cenoura com exposição de 20 minutos a radiação UV com 4 explantes. Esta repetição não obteve brotos, somente desenvolvimento da plântula inoculada, demais repetições contaminaram

Sugere-se, nesse caso, que mais repetições deveriam ter sido realizadas para obtenção de resultados mais concisos, uma vez que no presente trabalho os tratamentos foram realizados em triplicata somente, em função do número de plantas disponíveis para inoculação.

Neste experimento a exposição à radiação, em caixa fechada e escura, acaba aquecendo o local elevando a temperatura que os frascos são expostos, esse fator contribuiu para que o papel filme (PVC) que veda os frascos estufe permitindo a entrada de agentes contaminantes (ROSA, 2006), o meio MS no tempo de 20 minutos teve 100% de contaminação (gráfico 2).

Gráfico 1 – Grau de contaminação dos tratamentos, após a exposição à radiação UV, em diferentes períodos de tempo com quantidades diferentes de explantes inoculados em dois meios de cultivo, sendo eles o meio Murashige & Skoog (MS) e o meio Knudson suplementado com suco de cenoura (Cenoura)



Os maiores índices de contaminação se encontram nos tratamentos com o meio MS (figura 11), em todos os tempos testados ocorreu a incidência de contaminação, apresentando também problemas com oxidação obtidas nos tratamentos que continham 4 explantes por frasco. A contaminação atingiu 100% dos frascos do tempo de vinte

minutos. Enquanto no meio suplementado com suco de cenoura os índices de contaminação foram baixos, de modo geral.

Quando não diferidos os tratamentos, pelo tempo de exposição a UV, o meio MS teve 58,33% de contaminação, ou seja, mais da metade dos tratamentos foram perdidos após a exposição à radiação, e o meio knudson suplementado com suco de cenoura teve 25% de contaminação somente.



Figura 11 – Contaminação do meio de cultura após a exposição à radiação UV em caixa escura e fechada

Também foram registrados casos de oxidação no meio de cultura MS, exemplos de substâncias antioxidantes utilizadas para reduzir a oxidação são o ácido ascórbico e o ácido cítrico, esse ácido age como agente quelante, ou seja, remove íons de metal inibindo a ativação de enzimas oxidativas, estes ácidos são disponibilizados pela cenoura (PASQUAL et al., 1997). O ácido cítrico já foi utilizado para reduzir a oxidação *in vitro* de banana ‘maçã’, e o trabalho obteve resultados positivos quanto a redução deste fator limitante (CAMOLESI et al., 2007).

Algumas plantas cultivadas em meio MS levaram à oxidação do meio de cultura, assim como no trabalho realizado por Mezzalira e Kuhn (2018), onde o meio MS e o meio com reguladores de crescimento, apresentaram os níveis mais elevados de oxidação do meio de cultura. A oxidação é causada por reações de polifenoxidasas acima de compostos fenólico (SOUZA; CORDEIRO; TRINDADE, 2000), sendo indesejável no cultivo *in vitro*, pois, compromete a qualidade das plantas e pode provocar limitações nas respostas morfogênicas em culturas de tecidos limitando o desempenho na multiplicação celular (JORDAN; ROVERANO; GOUREUX, 1998).

O β -caroteno, composto majoritário da cenoura, age na proteção contra a foto-oxidação (KRINSKY, 1994; NAVES, 1998), e na defesa e proteção da planta (SAMUNIBLANK, 2012) contra predadores microbiológicos e facilitam a interação de plantas entre si, favorecendo o desenvolvimento (SAVITHRAMMA, 2011).

5.1.1 Análise dos tratamentos com inoculação de um explante por frasco

Analisando os resultados referentes ao número de raízes, quando inoculado um explante por frasco, obtemos um valor de quadrado médio da ANOVA (Q.M.) de 4,928 e um $F(0,365) < F_c(2,657)$ à nível de significância de 5% e também $F(0,365) < F_c(13,5)$ à nível de significância de 1%). O resultado da análise não diferiu estatisticamente (tabela 1).

Tabela 1 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de raíz, para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Número de Raíz (Tratamento com 1 explante)				
Tratamento	Média	Tukey (5%)	Duncan (5%)	Scott-Knott (5%)
T 1.1	2	a	a	a
T 1.2	1	a	a	a
T 1.3	4,667	a	a	a
T 1.4	3,667	a	a	a
T 2.1	4,667	a	a	a
T 2.2	2,667	a	a	a
T 2.3	3,667	a	a	a
T 2.4	3,667	a	a	a

Quanto ao comprimento da raiz mais longa, realizando as mesmas análises, para um explante por frasco nenhum resultado foi significativo (tabela 2), sendo o quadrado médio da ANOVA (Q.M.) 3,320, e obtendo valores de F menores que os valores de $F_c(5\%)$ e $F_c(1\%)$, que correspondem respectivamente a $0,396 < 2,657$; e 4,026.

Tabela 2 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro comprimento da raiz mais longa (cm), para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Comprimento da Raiz mais Longa (Tratamento com 1 explante)				
Tratamento	Média (cm)	Tukey (5%)	Duncan (5%)	Scott-Knott (5%)
T 1.1	0,9333	a	a	a
T 1.2	1	a	a	a
T 1.3	2,6	a	a	a
T 1.4	1,333	a	a	a
T 2.1	2,4	a	a	a
T 2.2	1,767	a	a	a
T 2.3	2,467	a	a	a
T 2.4	1,767	a	a	a

Altura da parte aérea, com análise de variância e teste de separação para 1 explante, foram obtidos os valores de ANOVA com Q.M. 1,939, não diferindo estatisticamente (tabela 3), valor de F foi menor que Fc (5%) e Fc (1%), respectivamente estes valores correspondem a $0,531 < 2,657$; e $4,026$.

Tabela 3 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro altura da parte aérea (cm), para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Altura da Parte Aérea (Tratamento com 1 explante)				
Tratamento	Média (cm)	Tukey (5%)	Duncan (5%)	Scott-Knott (5%)
T 1.1	0,667	a	a	a
T 1.2	0,533	a	a	a
T 1.3	1,5	a	a	a
T 1.4	1	a	a	a
T 2.1	1,9	a	a	a
T 2.2	1,5	a	a	a
T 2.3	2,033	a	a	a
T 2.4	1,933	a	a	a

Verificando o número de folhas por planta, nos tratamentos com 1 explante inoculado, obteve-se resultados estatísticos quanto a análise de variância de ANOVA com Q.M. de 6,958, os resultados não diferem estatisticamente uma vez que $F < F_c$ tanto a 5% quanto a 1% (tabela 4), correspondendo aos valores de $1,191 < 2,657$; e $4,026$.

Tabela 4 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de folhas, para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Número de folhas por Planta (Tratamento com 1 explante)				
Tratamento	Média	Tukey (5%)	Duncan (5%)	Scott-Knott (5%)
T 1.1	3,333	a	a	a
T 1.2	6,333	a	a	a
T 1.3	5	a	a	a
T 1.4	2,333	a	a	a
T 2.1	2,667	a	a	a
T 2.2	2	a	a	a
T 2.3	1,667	a	a	a
T 2.4	2	a	a	a

Embora os tratamentos, com um explante por frasco não terem sido significativos, os valores médios de Número de Folhas nos tratamentos T 1.2 e T 1.4 foi superior aos demais tratamentos testados, com valores de 6 por planta (figura 12), tais tratamentos correspondem ao meio MS com exposição de 10 e 20 minutos a luz UV.

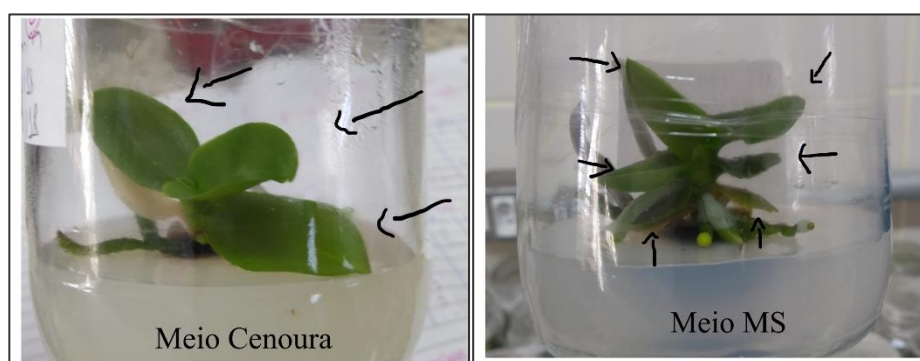


Figura 12 – O meio de cultura MS com média de 6 folhas por planta, resultados similares obtidos nos tratamentos T 1.2 e T 1.4. Meio de cultura suplementado com suco de cenoura apresentou em média 2 a 3 folhas por planta. As flechas na imagem indicam a quantidade de folhas por planta da *Phalaenopsis híbrida* inoculada nos tratamentos após 6 meses de cultivo

A exposição à radiação tem potencial de estressar as plântulas a ponto de induzir brotações, sem o uso de agentes químicos. Portanto, os brotos obtidos a partir do experimento com radiação ultravioleta são clones potencialmente mutados das plantas matrizes. Os explantes inoculados eram uniformidade, para que este não se tornasse um fator interferente no resultado (figura 13), e foram germinados inicialmente em meio MS.

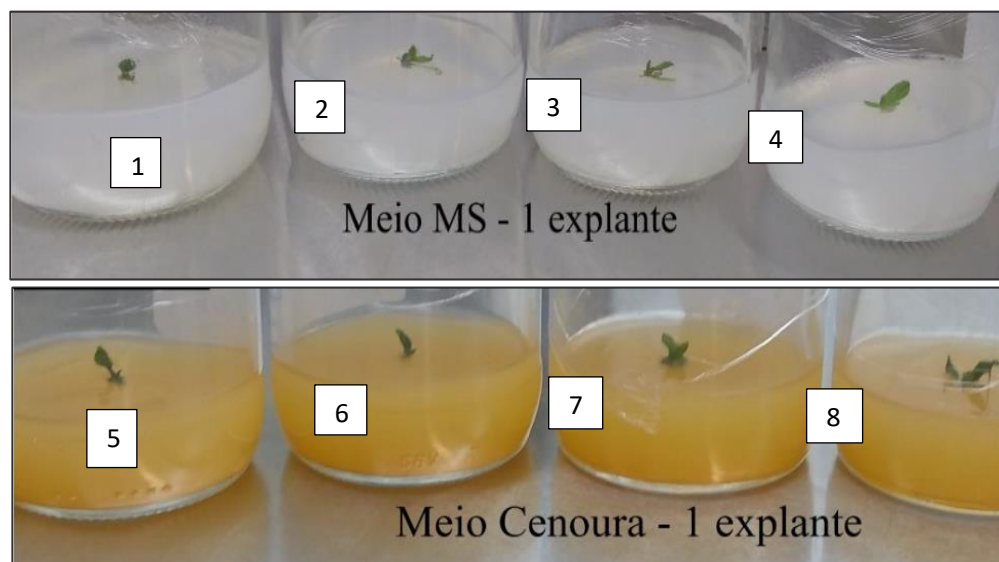


Figura 13 – Tratamentos realizados para obtenção de brotos. Inoculação de 1 explante por frasco com tamanho médio de 0,8 cm. Meios de cultivo MS (Murashige e Skoog) correspondem aos frascos 1 (0 minutos de exposição - T1.1), frasco 2 (10 minutos de exposição a UV - T1.2), frasco 3 (20 minutos de exposição a UV - T1.3) e frasco 4 (30 minutos de exposição a UV - T1.4). No meio Cenoura (Knudson suplementado com 10% v/v de suco de cenoura) os frascos são correspondentes à frasco 5 (0 minutos de exposição - T2.1), frasco 6 (10 minutos de exposição a UV - T2.2), frasco 7 (20 minutos de exposição a UV - T2.3) e frasco 8 (30 minutos de exposição a UV - T2.4), análise após 6 meses de cultivo

Por meio de análise estatística utilizando o programa SASM-Agri obtivemos resultados referentes a análise de variância (ANOVA), para os tratamentos com um explante por frasco, com valor de quadrado médio (Q.M) de 0,208 com resultado não significativo (tabela 5) pois o valor de F foi menor que os valores de Fc a 5% e a 1%, tais valores correspondem a $0,886 < 2,657$; e $4,026$.

Os resultados obtidos, neste trabalho, mostram que os tratamentos com inoculação de um explante por frasco não são estatisticamente significativos, em nenhum dos parâmetros analisados.

Desta maneira, pode-se prever que possivelmente, as plântulas interagem entre si, favorecendo o desenvolvimento das mesmas. As plântulas cultivadas sozinhas não obtiveram bons resultados, após 6 meses de cultivo, uma vez que não há necessidade de competir por nutrientes para sua sobrevivência e desenvolvimento.

Tabela 5 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de brotos, para os tratamentos com um explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Número de Brotos por Planta (Tratamentos com 1 explante)				
Tratamento	Média	Tukey (5%)	Duncan (5%)	Scott-Knott (5%)
T 1.1	0	a	a	a
T 1.2	0	a	a	a
T 1.3	0	a	a	a
T 1.4	0	a	a	a
T 2.1	0,333	a	a	a
T 2.2	0	a	a	a
T 2.3	0	a	a	a
T 2.4	0,667	a	a	a

Segundo a literatura, a interação entre as plântulas ocorre pela competição por nutrientes, luz e oxigênio, desta maneira a competição entre elas resulta no sucesso para desenvolvimento e crescimento em menores períodos de tempo de cultivo, pois, as plântulas tentam absorver a maior quantidade de nutrientes possíveis e manter armazenados para garantir sua energia para sobrevivência (LEMAIRE, 2001).

5.1.2 Análise dos tratamentos com inoculação de quatro explantes por frasco

Em função dos resultados obtidos com a inoculação de um explante por frasco não serem significativos, testou-se a inoculação de quatro explantes. Para estes tratamentos os resultados referentes ao número de raízes, demonstrou resultados de Q.M. 23,786, valor muito superior ao obtido quando inoculado um explante. Com $F(4,722) > F_c(2,115 \text{ a } 5\%); > F_c(2,849 \text{ a } 1\%)$, demonstrando resultados significativos a 1% (tabela 6), segundo a análise estatística disponibilizada pelo programa SASM.

Com quatro explantes inoculados por frascos o resultado demonstrou-se significativo nos tratamentos 4.1; 4.2 e 4.3, onde obtiveram bons resultados através dos três testes de separação analisados, sendo o tratamento 4.2 (meio de Cenoura, 4 explantes, tempo de exposição a UV de 10 minutos) o que obteve maior média de raízes por planta com um valor de 3,5.

Tabela 6 - Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de raiz, para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Número de Raiz (Tratamento com 4 explantes)				
Tratamento	Média	Tukey (5%)	Duncan	Scott-Knott
T 3.1	0	b	c	b
T 3.2	0,9167	ab	bc	ab
T 3.3	0	b	c	b
T 3.4	1,75	ab	abc	ab
T 4.1	3,25	a	a	a
T 4.2	3,5	a	a	a
T 4.3	2,9167	a	a	a
T 4.4	2,25	ab	ab	ab

Quanto ao comprimento da raiz mais longa, realizando as mesmas análises, com a inoculação de 4 explantes por frasco o Q.M foi de 1,906, com F de 7,153 e valores de Fc 2,115 a 5% e Fc 2,85 a 1%, sendo significativo valores a 1% (tabela 7).

Tabela 7 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro comprimento da raiz mais longa (cm), para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Comprimento da Raiz mais Longa (Tratamento com 4 explantes)				
Tratamento	Média (cm)	Tukey (5%)	Duncan (5%)	Scott-Knott (5%)
T 3.1	0	c	c	c
T 3.2	0,575	bc	bc	c
T 3.3	0	c	c	c
T 3.4	1,8	ab	b	b
T 4.1	1,725	abc	b	b
T 4.2	3,192	a	a	a
T 4.3	1,383	bc	b	b
T 4.4	1,5	abc	b	b

O melhor tratamento para obtenção de raízes longas é o T 4.2, que foi estatisticamente significativo, tanto para o teste de Tukey, quanto para os testes de Duncan e Scott-Knott. Obtendo um valor médio de 3,192 cm, e novamente o tratamento 4.2 corresponde ao meio Knudson suplementado com suco de cenoura 10% (v/v) com tempo de exposição a UV de 10 minutos.

Altura da parte aérea, com análise de variância e teste de separação para quatro explantes por frasco, obteve Q.M. 0,573, F 8,890 que foi maior que Fc (5%) 2,115 e maior que Fc (1%) 2,849, obtendo resultado significativo (tabela 8) a 1%, segundo análise do programa SASM-Agri.

Tabela 8 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro altura da parte aérea (cm), para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Altura da Parte Aérea (Tratamento com 4 explantes)				
Tratamento	Média (cm)	Tukey (5%)	Duncan (5%)	Scott-Knott (5%)
T 3.1	0,3	cd	de	c
T 3.2	0,642	bcd	cde	cde
T 3.3	0	d	d	c
T 3.4	1,325	ab	b	b
T 4.1	0,708	bcd	bcd	c
T 4.2	2,1	a	a	a
T 4.3	1,117	bc	bc	b
T 4.4	0,691	bcd	bcd	c

Como resultados obtidos para altura da parte aérea, verifica-se que o tratamento que obteve resultados significativos novamente é o tratamento 4.2, sendo significativo nos três testes de separação realizados. O valor médio obtido no T 4.2 corresponde a 2,1 (cm). Os tratamentos que continham um explante por frasco não apresentaram resultados significativos.

Para os parâmetros número de raíz, comprimento da raíz mais longa e altura da parte aérea o melhor tratamento, com resultados significativos, foi o T4.2, tais resultados podem ser visualizados na figura 14.

Para o desenvolvimento de *Phalaenopsis híbrida* o melhor meio é o Knudson suplementado com suco de cenoura, com 4 explantes por frascos e exposição de 10 minutos a radiação UV. Resultados semelhantes foram obtidos por Zahara (2017), onde a combinação de 10% (v / v) de suco de cenoura teve resultados significativos para o cultivo *in vitro* de orquideas (ZAHARA et al, 2017).



Figura 14 – Corresponde ao meio de cultura cenoura com 4 explantes, com exposição de 10 minutos a luz UV

Verificando o número de folhas por planta. Novamente resultados significativos a 1%, foram obtidos para os tratamentos com 4 explantes por frasco (tabela 9), ANOVA obteve valores de Q.M. 2,209 e o valor de $F > F_c$ tanto a 5% quanto a 1%, correspondendo respectivamente a $6,530 > 2,115$; e 2,849.

Tabela 9 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de folhas, para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Número de Folhas por Planta (Tratamento com 4 explantes)				
Tratamento	Média	Tukey (5%)	Duncan (5%)	Scott-Knott (5%)
T 3.1	1	bc	cd	c
T 3.2	0,8333	bc	cd	c
T 3.3	0	c	d	c
T 3.4	3,5	a	a	a
T 4.1	1,75	abc	bc	b
T 4.2	2,416	ab	ab	b
T 4.3	2,416	ab	ab	b
T 4.4	1,833	abc	bc	b

Para o parâmetro número de folhas analisado, os dados obtidos pelo programa SASM-Agri mostram resultados significativos para obtenção de folhas no tratamento T 3.4, ou seja, no meio MS que passou por exposição de 30 minutos a radiação UV.

Lemes et al. (2016), no trabalho com cultivo *in vitro* de *M. flavescens*, obteve uma média de cerca de 15 folhas no meio MS $\frac{1}{2}$. Fernandes (2014) com o cultivo *In Vitro* de *Bromelia reversacantha* também obteve bons resultados quanto ao número de folhas (10,14) quando cultivadas em meio MS $\frac{1}{2}$ com 15 g.L⁻¹, e quando a concentração de sacarose se elevou para 30 g.L⁻¹ o número de folhas decaiu para 5,6. Altas concentrações de sacarose reduzem o número de folhas Thorpe et al., 2008, pois ocorre aumento do nível de ácido abscísico, além da redução da atividade do metabolismo das plantas. Com *Cattleya violaceae*, cultivadas em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com altas concentrações de sacarose de 26 a 31 g. L⁻¹, verificou-se que o número de raízes, comprimento da maior raiz e o comprimento da parte aérea apresentaram resultados inferiores, quando comparadas aos tratamentos com concentrações menores de sacarose (GALDIANO JUNIOR et al., 2013a).

Uma vez que, segundo dados literários apresentados no referencial bibliográfico, a radiação é eficiente para induzir a multiplicação e crescimento de brotações. Este parâmetro foi uma das análises principais do presente trabalho, pois, é a partir dos resultados sobre brotos que as etapas seguintes foram realizadas.

Para analisar a indução de brotação através da exposição à radiação, os explantes foram inoculados com tamanho uniforme em todos os tratamentos (figura 15).

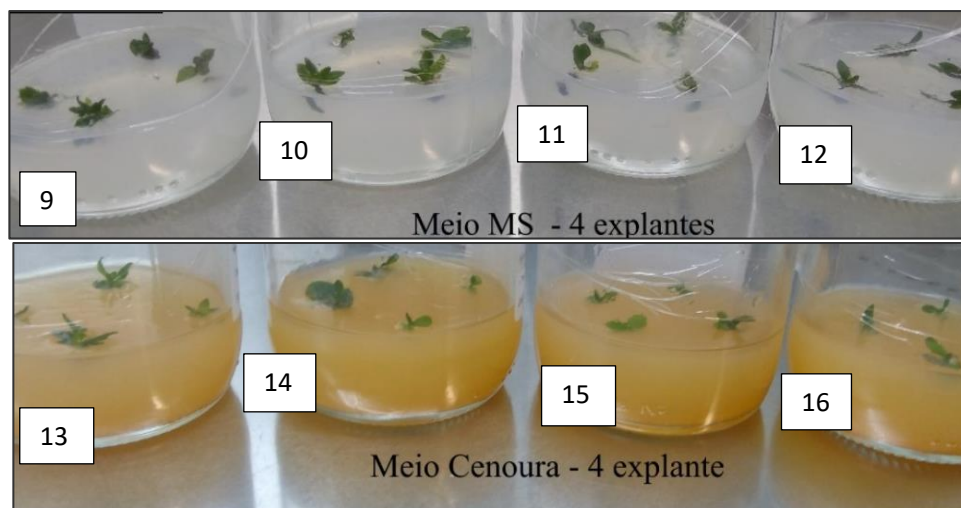


Figura 15 – Tratamentos realizados para obtenção de brotos. Inoculação de 4 explante por frasco com tamanho médio de 0,8 cm. Meios de cultivo MS (Murashige e Skoog) corresponde aos frascos 9 (0 minutos de exposição - T3.1), frasco 10 (10 minutos de exposição a luz UV - T3.2), frasco 11 (20 minutos de exposição a luz UV - T3.3) e frasco 12 (30 minutos de exposição a luz UV - T3.4). O meio Cenoura (Knudson suplementado com 10% v/v de suco de cenoura) é correspondente aos frascos 13 (0 minutos de exposição - T4.1), frasco 14 (10 minutos de exposição a luz UV - T4.2), frasco 15 (20 minutos de exposição a luz UV - T4.3) e frasco

16 (30 minutos de exposição a luz UV - T4.4), análise após 6 meses de cultivo

Para os tratamentos com inoculação de 4 explantes por frasco, os resultados obtidos demonstram resultados significativos a 5% (tabela 10), com ANOVA apresentando valores de Q.M. 0,580 e valor de $F > F_c$ (5%), sendo $2,315 > 2,115$ respectivamente. Para 1% de significância não foram obtidos resultados relevantes, sendo $F(2,315) < F_c$ 1% (2,849).

Para Número de Brotos resultados significativos a 5% foram obtidos no tratamento T 4.4, que corresponde ao meio Knudson suplementado com 10% (v/v) de suco de cenoura que foi exposto a luz UV por 30 minutos.

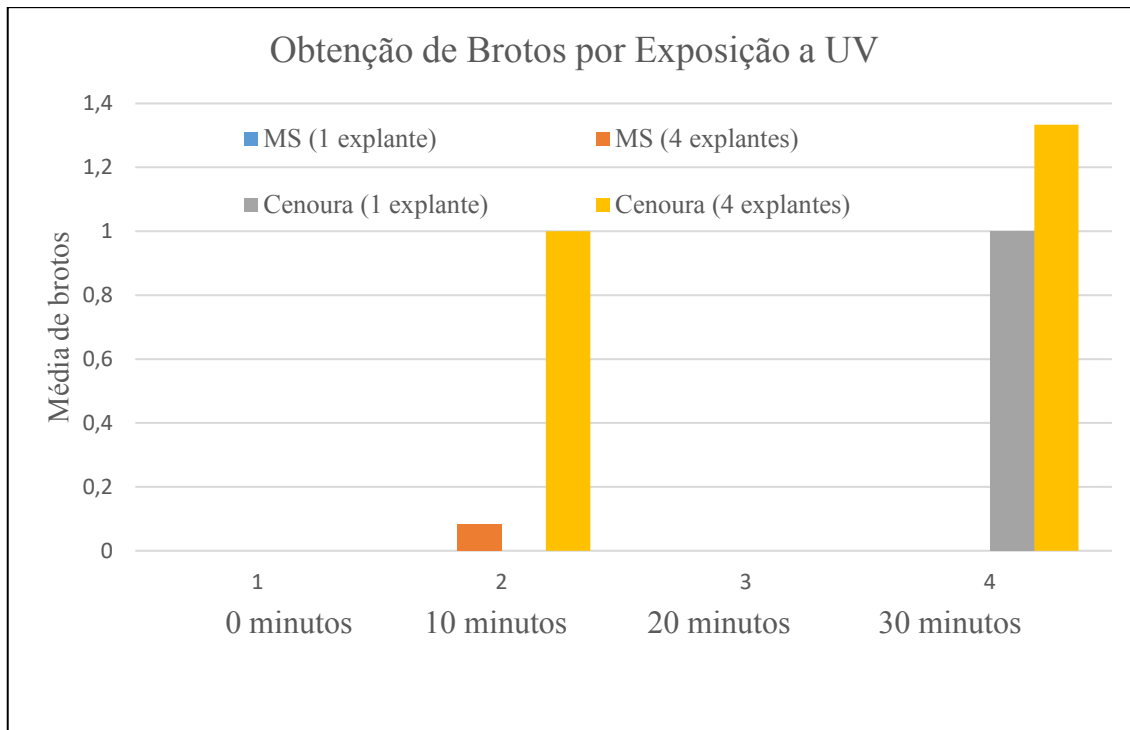
Tabela 10 – Efeito do meio de cultivo no parâmetro número de brotos, para os tratamentos com quatro explante por frasco, para o teste de separação de Tukey, Duncan e Scott-Knott.

Número de Brotos por Planta (Tratamento com 4 explantes)				
Tratamento	Média	Tukey (5%)	Duncan (5%)	Scott-Knott (5%)
T 3.1	0	a	b	b
T 3.2	0,083	a	a	b
T 3.3	0	a	b	b
T 3.4	0,083	a	b	b
T 4.1	0,416	a	ab	a
T 4.2	0,667	a	ab	a
T 4.3	0	a	b	b
T 4.4	0,833	a	a	a

Analisando o conjunto, verificou-se que os frascos que continham mais que um explante por frasco favoreceu a obtenção de brotos por meio da exposição à radiação (gráfico 2).

Analisando os resultados, demonstrados no gráfico 1, podemos concluir que o tempo de exposição à radiação UV, que se demonstrou mais eficiente para induzir a brotação, foi o tempo de 30 minutos.

Gráfico 2 – Obtenção de brotos de *Phalaenopsis híbrida*, após a exposição à radiação UV em diferentes tempos, em quantidades diferentes de explantes inoculados por frascos em dois meios de cultivo, sendo eles o meio MS (Murashige & Skoog) e o meio Cenoura (meio Knudson suplementado com 10% (v/v) de suco de cenoura).



Um desenvolvimento com resultados significativos, como os obtidos nos tratamentos com meio de cultivo com suco de cenoura, ocorre em plantas pela ação dos carotenoides que atuam como facilitadores da fotossíntese e protegendo contra a foto-oxidação (KRINSKY, 1994; NAVES, 1998). Conforme citado por Silva (2013) os carotenoides encontrados na cenoura como o β -caroteno apresenta a coloração laranja e os precursores fotossintéticos são localizados nos cloroplastos (STREIT et al., 2005).

A fotossíntese compõe o metabolismo primário das plantas (SCHAAF et al., 1995) com processos químicos como a glicólise, síntese de proteínas, enzimas e coenzimas, reprodução celular e absorção de nutriente (GROENIGEN et al., 2015).

A presença do β -caroteno é precursor da vitamina A. Essa vitamina influencia beneficemente o processo de proliferação celular, reprodução e diferenciação (WEIL, 2000) o que pode ter sido um fator crucial para obtenção dos brotos neste meio.

5.2 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA

Os brotos utilizados na extração de DNA foram selecionados com base nos resultados apresentados no item 6.2 do presente trabalho, em função dos bons resultados foram utilizados clones de *Phalaenopsis hibrida* cultivada no meio Knudson suplementado com suco de cenoura, com 4 explantes por frasco.

Das plantas cultivadas neste meio de cultura, foram utilizados brotos obtidos nos tratamentos com 0 minutos de exposição à radiação UV (Controle), com 10 e 30 minutos, uma vez que no tempo de 20 minutos não foi obtido clones. A extração foi realizada após seis meses da exposição à radiação. A quantificação fez uso do padrão do ladder de 100pb que se encontra fixo no fotodocumentador. Os números 1, 3 e 4 dizem respeito aos clones do tempo 0 de exposição, ou seja, são o controle do experimento. Os números 7, 8 e 9 são os clones do tempo 10 minutos de exposição a UV e os números 11, 12, 13 e 14 correspondem ao tempo de exposição de 30 minutos.

Foi constatado através da figura 16, que a extração de DNA dos clones da orquídea *Phalaenopsis* foi eficiente para todas as amostras, a partir destas foram selecionadas três amostras de cada tratamento (tabela 11), com base na qualidade apresentada pela banda.

Tabela 11- Seleção das amostras de DNA dos brotos de *Phalaenopsis* para serem utilizadas nas reações de PCR

Amostra DNA	Tempo de UV (minutos)
1 A	0 (controle)
3 B	0 (controle)
4 A	0 (controle)
7 B	10
8 A	10
9 B	10
11 A	30
12 A	30
14 A	30

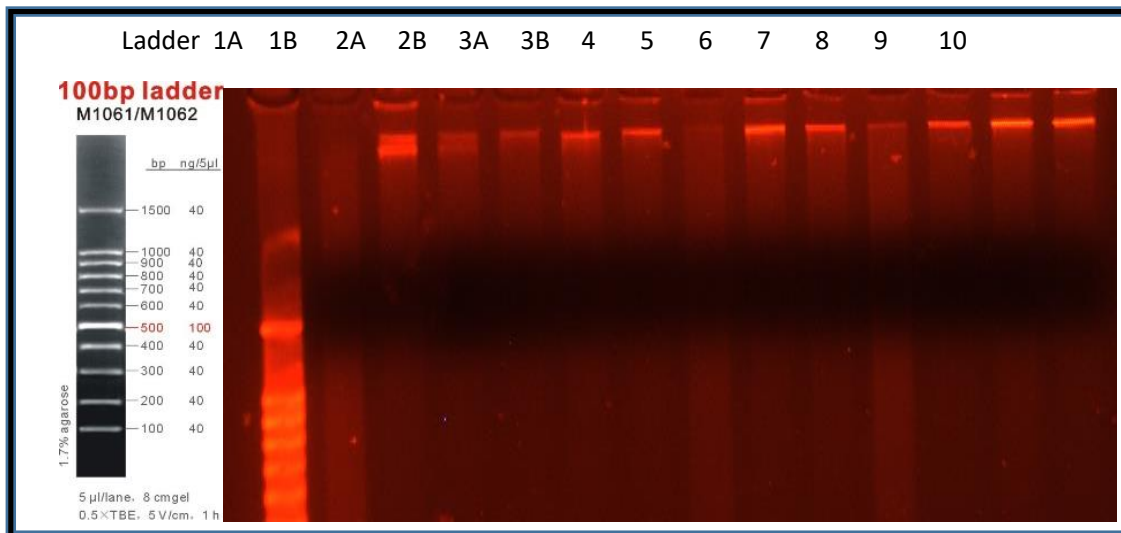


Figura 16 – A imagem registrada do presente gel contempla somente uma parte das amostras, sendo elas as amostras 1, 2 e 3 duplicadas (amostra A e B) e as demais, são amostras únicas, no processo de quantificação das amostras de DNA extraídas dos clones de *Phalaenopsis híbrida* com exposição a 0, 10 e 30 minutos de UV, com uso do padrão de quantificação de DNA com ladder de 100pb

Fonte: New England BioLabs e autor (2019).

Comparando as amostras de DNA extraídas dos clones com o padrão do ladder de 100 pb foi pressuposto a quantidade de DNA existente em cada amostra selecionada de modo aproximado (tabela 12).

Tabela 12 – Quantidade de DNA (aproximadas) em ng das amostras selecionadas, com base no padrão do ladder de 100 pb, onde cada padrão tem uma quantidade específica de DNA, por comparação ao marcador estipulou-se a quantidade de DNA e posteriormente foi realizada um gel de PCR para confirmar as quantidades.

Amostras de DNA Selecionadas	Quantidade de DNA (ng)
1 A	72
3 B	50
4 A	60
7 B	40
8 A	35
9 B	30
11 A	45
12 A	40
14 A	35

5.3 PADRONIZAÇÃO DA PCR

Para a padronização das condições necessárias para realização das reações de PCR, utilizou-se amostras de DNA de orquídeas do gênero *Phalaenopsis híbrida*, em duplicata.

Para os primers selecionados, inicialmente comparando os primers ER30 e ER38, a temperatura de 55°C sugerida por Lu et al. (2012). Nesta reação comparou-se também a quantidade de DNA utilizada nas reações de PCR, sendo utilizado nas quatro primeiras bandas 1µl de DNA e nas quatro últimas 4µl de DNA.

Através da imagem registrada, com o fotodocumentador *Ultraviolet Transilluminador* no programa LPix Image STi, foi estabelecido que o uso de 1 µl de DNA é eficiente para reação de PCR. Para a padronização dos primers é verificado que para o primer ER38 o anelamento do DNA é eficiente a temperatura de 55 °C, porém o resultado não foi eficiente para o primer ER30.

Após algumas tentativas com os demais primers a temperatura de 55.5 °C e 55°C não apresentarão resultados, foi testada a variação da concentração de MgCl₂ na reação de PCR, testando a variação de 0,9; 1,2; e 1,5 µl (figura 17), com os primers ER45 e ER59.

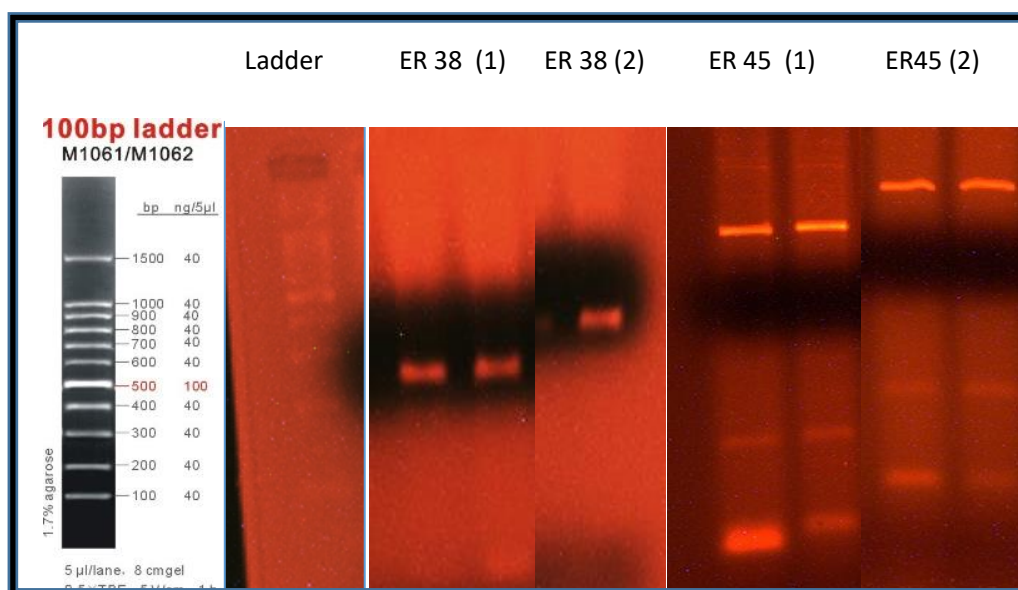


Figura 17 – Padronização do primers ER38 (1) à temperatura de 55°C e ER38 (2) à 55,5°C e do primer ER45 (1) à temperatura de 49°C com concentração de 0,9 e ER 45 (2) com temperatura de 49°C e 1,5 µl de MgCl₂, comparação com uso do padrão

de quantificação de DNA com ladder de 100pb. A figura consiste na junção da imagem de dois géis

Fonte: New England BioLabs e autor (2019).

As quatro primeiras bandas correspondem a uma concentração de 0,9 µl de MgCl₂, as quatro bandas intermediárias possuem concentração de 1,2 µl de MgCl₂ e as últimas quatro bandas uma concentração de 1,5 µl de MgCl₂. Todas as reações foram realizadas a temperatura de 49 °C, utilizando os 2 primers o ER45 e ER59. Com base na figura 20, ficou padronizado o uso da concentração de 0,9 µl de MgCl₂ para todas as reações de PCR que foram realizadas, e que para o primer ER45 a temperatura de 49 °C foi eficiente para o anelamento das amostras de DNA utilizadas. Para o primer ER59 a mesma temperatura não foi eficiente, em nenhuma variação de concentração de MgCl₂.

A última análise para padronização de temperatura e condições de PCR para cada primer foi realizada comparando a temperatura de 49 °C e 51 °C (figura 21), para os primers ER30, ER59 e ER94.

Padronizou-se para o primer ER59 e ER94 a temperatura de anelamento de 51 °C, as bandas aparecem fracamente, mas podem ser visualizadas na figura 21 registrada. Novamente não foi possível estabelecer a padronização para o primer ER30.

Deste modo padronizou-se, como protocolo para reações de PCR da orquídea *Phalaenopsis híbrida*, o uso de uma concentração de MgCl₂ de 0,9 µl, o uso de 1 µl de DNA, as demais concentrações e processos da PCR não foram variados e seguiram conforme metodologia. Para as temperaturas de anelamento dos primers selecionados ficou estabelecido que, para o primer ER38 utiliza-se a temperatura de 55 °C, o primer ER45 a 49 °C e os primers ER59 e ER94 a 51 °C.

A partir das padronizações, da extração de DNA e da PCR com uso de marcador molecular SSR em orquídeas do gênero *Phalaenopsis*, futuras análises podem ser realizadas para avaliar a presença de polimorfismos das plantas que passaram por exposição à radiação ultravioleta, com o objetivo de induzir mutações aleatórias. Uma vez identificados polimorfismos, sugere-se para futuros trabalhos, o sequenciamento da amostra e a aplicação de ferramentas de bioinformática para entendimento dos possíveis efeitos das mutações induzidas.

A partir dos protocolos adaptados para *Phalaenopsis*, as análises referentes a variabilidade genética e a confirmação da indução de mutação, por exposição a radiação UV, podem vir a ser realizadas em trabalhos futuros.

6. CONCLUSÃO

O uso do meio de cultura Knudson suplementado com suco de cenoura é indicado para o cultivo *in vitro* da orquídea *Phalaenopsis híbrida* nas condições deste trabalho, o meio reduz a incidência de oxidação e contaminação das plantas inoculadas. Para a indução de brotações o presente trabalho sugere um tempo de exposição a luz ultravioleta de 30 minutos, com a inoculação de 4 explantes por frasco.

O protocolo estabelecido foi eficiente tanto para a extração de DNA, a partir de folhas jovens, das plântulas de *Phalaenopsis híbrida* quanto para o uso do marcador molecular SSR através da PCR. Os protocolos poderão ser utilizados em análises futuras para avaliação da eficiência de técnicas de induções de mutações, e também para análise de diversidade genética.

As mutações serão avaliadas em trabalhos posteriores, assim como a verificação de fenótipos será analisada futuramente.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. M. A bioinformática e sua importância para a biologia molecular. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 3, n. 4, p. 18–25, 2013.
- AUGUSTO, T. N.; ROCHA, L. R. **Indução de mutação**: ampliação da variabilidade genética para o melhoramento de ornamentais. 16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, Anais, 2007.
- BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. 1 ed. Embrapa, 909 p., 2008.
- BARROS, F. et al. Checklist of the Orchidaceae from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 73, p. 287–296, 2018.
- BARROS, F.; PINHEIRO, F.; LOURENÇO, R.; A. **Orquídeas: Algo mais que belas flores**. 2008. p. 621-649.
- BELARMINO, M. M.; MII, M. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *phalaenopsis* orchid. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 5, p. 435–442, 2000.
- BORÉM A; MIRANDA GV. **Melhoramento de Plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009. p. 529.
- BOSCOLO, O. H.; FERNANDES, L. R. R. M. V.; VALLE, L. S. An ethnobotanical survey as subsidy for the generation of researches related to biotechnology. **International Research Journal Biotechnology**, v.1, p.1-6, 2010.
- BROWSE, J.; XIN, Z. Temperature sensing and cold acclimation. **Curr Opin Plant Biol**, v. 4, n. 3, p. 241–246, 2001.
- CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.
- CAMPOS, D. M. **Orquídeas: manual prático de cultura**. 3. ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. p. 140-141.
- CAMELOSI, M. R.; et al. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira maçã. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007.
- CARDOSO, J. C. *Laeliocattleya* ‘Brazilian Girl Rosa’: cultivar de orquídea para cultivo em vaso. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, 2010.
- CARVALHO, A. C. P. P.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. E. P.; SOUZA, F. V. D.; PETERS, J. A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 7, p. 30–60, 2011.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores Inerentes À Micropropagação**. 1. ed.: Campina Grande – PB: Embrapa Algodão, 2006. p. 1–30.

COSTA, M. A. P. C.; et. al. Micropropagação de orquídea. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2. ed. Brasília - DF: Embrapa. 2013. p. 373-392.

COTTRELL, A. **História De Las Civilizaciones Antiguas I**. 1. Ed. Editora: CRITICA, Barcelona, 2000.

CHANDLER, S. F.; SANCHEZ, C. Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 8, p. 891–903, 2012.

CHEN, S. S.; et al. The RING finger ATPase Rad5p of *Saccharomyces cerevisiae* contributes to DNA double-strand break repair in a ubiquitin-independent manner. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 18, p. 5878–5886, 2005.

CHEN, W. H.; et al. Downregulation of putative UDP-glucose: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 6, p. 1007–1017, 2011.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, U. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulture**, v.122, n.4, p.507-520, 2009.

CRUZ, C. D. **Programa GENES - versão windows. Aplicativo computacional em Genética e Estatística**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. v. 1. 648 p.

COLOMBO, R. C.; FAVETTA, V.; FARIA, R. T. DE. Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo in vitro de um híbrido de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 6, p. 873–876, 2012.

DEBENER, T.; WINKELMANN, T. Ornamentals. **Biotechnology in Agriculture and Forestry** 64, p. 369–391, 2010.

DEMATTÊ, J. B. I; DEMATTÊ, M. E. S. P. Estudos hídricos com substratos vegetais para cultivo de orquídeas epífitas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 803-813, 1996.

DIXON, K.; BRUNDRETT, M. C.; SIVASITHAMPARAM, K. Orchid Conservation Ation and Mycorrhizal Associations. In: SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K. W.; BARRETT, R. L. **Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity**. Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 195-226.

DHOOGHE, E.; LAERE, K. V.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. V. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.359-373, 2011.

DRONK, A. G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para cultivo in vitro de Cattleya Amethystoglossa Linden & Rchb.F.** 2004. 33 f. Dissertação (Mestrado) –

Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

EMBL-EBI. **Clustal Omega – Multiple Sequence Alignment**. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. Acesso em: 09/12/18.

EMBL-EBI. **InterPro – Protein sequence analysis & classification**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/sequencesearch/iprscan5-S20190422-190214-0689-28017487-p2m>>. Acesso em 22/04/19.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Development Biology — Plant**, 2011.

ETAP. **Iluminação com uma nova fonte de luz**. Dossier Led, 6 ed., 2015.

FARIA R. T.; TAKAHASHI L. S. A.; LONE A. B. UEL 6: nova cultivar de *Dendrobium*. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.1, p. 114-115, Jul/Set 2011.

FAN, C.; WANG, W.; WANG, Y.; QIN, G.; ZHAO, W. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. **Phytochemistry**, v.57, n.8, p.1255–1258, 2001.

FERNANDES, F. P. R. **Conservação in vitro de *Bromelia reversacantha* mez e *Aechmea tocartina baker* (bromeliaceae) sob regime de crescimento mínimo**. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação da Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2014.

FERRÃO, L. F. V.; et al. Estudo comparativo do nível de polimorfismo e informatividade acessado pelos marcadores RAPD, AFLP e SSR, no estabelecimento de relações genéticas em *coffea canephora*. **VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Araxá-MG, 2011.

FERREIRA, M. A. M. **Bioinformática Como Ferramenta No Melhoramento Genético de Plantas**. 2017. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Espírito Santos. Vitória, 2017.

FILLIETTAZ, A. Melhoramento Genético De Plantas Ornamentais. **Biológico**, v. 69, n. São Paulo, p. 95, 2007.

FILHO, N. D.; CASCARDO, J.C. M.; FONTES, E. P. B. Clonagem molecular e isolamento de genes de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. p. 653-672.

FIORINI, T. M. S. **Projeto de iluminação de ambientes internos especiais**. 2006. 128 f. Tese (Conclusão de Curso) – Engenharia Elétrica, Universidade Federal Do Espírito Santo. Vitória, 2006.

FUTUYMA, D.J. **Evolutionary biology**. 3. Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2013. p. 763.

FG. **Ferramentas Gerais:** Lâmpada Mercúrio. 2016. Disponível em:<<https://www.fg.com.br/lampada-mercurio-125w-6300lm-e27/p>>. Acesso: 05/12/18.

GALDIANO JUNIOR, R.F. et al. Concentrações de sacarose no desenvolvimento in vitro e na aclimatização de *Cattleya loddigesii Lindley*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.583-592, 2013^a.

GRIESBACH, R. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. **Trends in New Crops and Uses**, v. 2000, p. 458–465, 2002.

GROENIGEN, J. W.; et. al. The soil N cycle: new insights and key challenges. **Soil**, v. 1, p. 235-256, 2015.

GUIMARÃES, C. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 2, p. 167–184, 2006.

HARTEN, A. M. V. **Mutation Breeding: Theory and Practical Applications**. Cambridge University Press, 1988. p. 367.

HOSSAIN, M. M. et al. The Application of Biotechnology to Orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, n. 2, p. 69–139, 2013.

HSU, S.; CHUANG, H.-T.; SHEN, T.-M. Breeding Barriers in Red *Phalaenopsis* Orchids. **Acta Horticulturae**, v. 878, n. 29, p. 145–152, 2010.

JORDAN, M.I.; ROVERANO, L.; GOUREUX, A. Promotion of *Annona cherimoya* in vitro shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v. 56, n. 5, p. 224-227, 1998.

JUNGHANS, T. G.; ALBERTO, A.; OLIVEIRA, R. **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2. Ed. 2^a edição revista e ampliada - Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 407.

JUNIOR, R. F. G. **Criopreservação, indução de poliploidia e avaliação da estabilidade genética de orquídeas**. 2013. 125 f. Dissertação (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal, 2013.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. D. S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n. 2, p. 115, 2014a.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, S. 2013: Balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. **Hortica**, v. 1, n. 11, p. 1–8, 2014b.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008. 431 p.

KIM, S. J. et al. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of

chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 101, n. 1–2, p. 143–151, 2004.

KNUDSON L. Non-symbiotic germination of orchid seed. **Botanical Gazette**, v. p. 73:1-25, 1922.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure & Applied Chemistry**, Great Britain, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

LEMAIRE, G. Ecophysiological of Grasslands: Dynamics aspects of forage plant population in grazed swards. **Proceedings of the XIX International Grassland Congress**, São Pedro, São Paulo (Brasil), 10 - 21 février 2001, 29-37, 2001.

LEMES, C. S. R. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v.46, n.3, p.499-505, 2016.

LAM, M. W.; YOUNG, C. J.; MABURY, S. A. Aqueous photochemical reaction kinetics and transformations of fluoxetine. **Environmental Science and Technology**, v. 39, pp. 513-522, 2005.

LATADO, R. R. et al. Mutantes De Laranja - “Pêra” Com Número Reduzido De Sementes, Obtidos Através De Mutações Induzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 339–344, 2001.

LIMA, M. Todos iguais , todos diferentes a variabilidade genética humana. **Biologia**, p. 2010, 2010.

LOPES, F. M. A Bioinformática Aplicada no Melhoramento de Plantas. **2º Encontro Paranaense de Melhoramento de Plantas**, p. 1–5, 2012.

LU, J.; et al. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale* based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, v. 137, p. 1-10, 2012.

MACHADO, A. T. Construção histórica do melhoramento genético de plantas: do convencional ao participativo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 9, n. 1, p. 35–50, 2014.

MACHADO, G.; et al. Organogenesis *in vitro* a partir de yemas apicales y axilares de plantas adultas de orquídeas del grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, v. 49, n. 284, p. 613-628, 2002.

MEZZALIRA, F. K.; KUHN, B. C. Cultivo de *Phalaenopsis híbrida*. In: SICITE – seminário de iniciação científica e tecnológica, Apucarana. **Anais do XXIII SICITE**, 2018.

MILIAUSKAS, L. **Tipos de orquídeas**: + 35 espécies de orquídeas para decorar sua casa. Flores e Plantas. Disponível em: <<https://www.vivadecora.com.br/revista/tipos-de-orquideas/>>. Acesso em: 01/12/18.

MINAMIGUCHI, J. Y.; MACHADO NETO, N. B. Embriogênese Somática Direta Em Folhas De *Phalaenopsis*: Orchidaceae. **Colloquium Agrariae**, v. 3, n. 1, p. 07-13, 2007.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Revista Ciências Básicas**, v. 2, n. 2, p. 139–142, 2004.

MOLLO, L. **Efeito da temperatura no crescimento , no conteúdo e na composição de carboidratos não-estruturais de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro***. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Natural e Meio Ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente . São Paulo, 2009.

MORAES, M. C. et al. Molecular Study on Endemic *Cattleya* Species from Brazilian Flora. **American International Journal of Biology**, v. 2, n. 3, p. 77–84, 2014.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of Light Quality on Micropropagation of Woody Species. **Published by Kluwer Academic Publishers**, n. March, p. 3–35, 2003.

MULLIS, K. B.; JOLLA, L.; SMITH, M. Decisive progress in gene technology through two new methods : the polymerase chain reaction (PCR) method and site-directed mutagenesis. **Prize in Chemistry**, v. 3, p. 2–4, 1993.

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

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. D. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Rbm**, v. 67, n. November 2010, p. 7–19, 2010.

NAVES, M. M. V. Beta - Caroteno E Câncer. **Rev. Nutr.** Vol. 11. Nº2. Pág. 99-115. Campinas, 1998.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**, New York, W. H. Freeman and Company, 2002.

NONOHAY, J. S.; HEPP, D. Técnicas e análises de biologia molecular. **Biotecnologia II**, v. 1, p. 1–23, 2017.

NUSSBAUM, E. D. et al. Prospective evaluation of syndesmotic ankle sprains without diastasis. **American Journal of Sports Medicine**, v. 29, n. 1, p. 31–35, 2001.

NCBI. **NCBI BLAST – tBLASTn**. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome>. Acesso em: 09/12/18.

OLSSON, M. L.; IRSHAID, B. . M.-H. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: Identification of 15 novel A and B subgroup alleles. M.L. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 3, n. 98, p. 1585–1593, 2001.

OPPENLÄNDER, T. **Photochemical Purification of Water and Air**, Wiley - VCH, pp.

368, 2003.

ORQUÍDAS. Como fazer muda de orquídea. Disponível em: <<https://comocuidardeorquideas.com/como-fazer-muda-de-orquidea/>>. Acesso em: 20/10/2018.

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos**. 2008. p. 98.

PAULA, C. C.; SILVA, H. L. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 3 ed. Editora: UFV, 2013. p.106.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, p. 159, 1997.

PESTANA, R. K. N. **Indução de mutação por meio de irradiação gama em cultivares de bananeira**. 111 f. 2010. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

PILLING, S.; MORAIS, A.; BONFIM, V. S. Árvore da vida e conceitos básicos de biologia evolutiva. **P&D**, p. 1–30.

PRAKASH, L. C. L.; GOH, C. J. *In vitro* propagation of commercial orchids: an assessment of current methodologies and development of a novel approach thin section culture. **Jornal of the Orchid Society of India**, Bangalore, v. 10, p. 31-41, 1996.

PROSDOCIMI, F.; SANTOS, F. S. Sobre bioinformática, genoma e ciência. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 209, p. 54-57, 2004.

PROMEGA. **Wizard® Genomic DNA Purification Kit Instructions for Use of Products: Isolating Genomic DNA from Plant Tissue**. Pág. 12. Disponível em: <<https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?la=en>>. Acesso em: 20/06/19.

RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F. **Biologia Vegetal**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 452-474.

RENATO, L. **Listagem de híbridos intergenéricos**. Orquídeas.eco.br. Disponível em: <<https://www.orquideas.eco.br/listagem-de-hibridos-intergenericos/>>. Acesso em: 01/12/18.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, p. 100, 2008.

ROSA, C. R. E. **Identificação de marcadores snp (Single Nucleotide Polymorphism) associados ao gene de resistência RPP4 da soja (*Glycine max l. merr.*) a ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi sidow*)**. 2015. 116 f. Dissertação (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília. Brasília, 2015.

ROSA, F. A. F. **Síntese E Avaliação Da Atividade Reguladora De Crescimento Vegetal De Novos Compostos Indólicos Derivados Do Safrol E Relacionados Ao Ácido Indol-3-Acético**. 2002. 100f. Dissertação (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

ROSA, J. O. M. **Um Estudo de Compactação de Dados para Biosseqüências**. 2006. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Informática, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

ROSA, F. C.; et al. **Micropropagação de Erva Mate**: Efeito de Diferentes Épocas do Ano no Estabelecimento *in vitro* de Segmentos Nodais. Comunicado Técnico 163 – Embrapa Colombo-PR, 2006.

SAMUNI-BLANK, M.; et. al. Intraspecific directed deterrence by the mustard oil bomb in a desert plant. **Current Biol.**, v. 13, n. 22, p. 1218-1220, 2012.

SANTOS, E. A.; et al. Influência Da Temperatura Ambiente Na Análise Do Termociclador. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB**, p. 1522–1525, 2014.

SANTOS-SEREJO, J. A.; et. al. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.79-98.

SARTORI, P. H. S.; SEPEL, L. M.N.; LORETO, E. L. S. **Radiações Moléculas e Genes**: Atividades didático-experimentais. 1. Ed. – Ribeirão Preto, SP: SBG, 2008. p. 124.

SAVITHRAMMA, N.; et. al. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. **Middle-East J. Sci. Res.**, n. 8, p. 579-584, 2011.

SCHOENMAKER, K. **Boletim Informativo Ibraflor**. v. 81, 2017.

SILVA, A. R.; et al. **Extração de pigmentos fotossintéticos em folhas das espécies de café (*coffea arábica*), acálifa (*acalypha hispida*) e urucum (*bixa orellana*) por meio de cromatografia em papel**. VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 25 a 28 de novembro de 2013, Salvador - BA.

SILVA, C. P. **Variabilidade genética induzida por radiação gama em pereira cultivada *in vitro***. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, 2009.

SILVEIRA, N. J. F. **Bioinformática Estrutural Aplicada ao Estudo de Proteínas Alvo do Genoma do do Genoma do *Mycobacterium tuberculosis***. 2005. 117 f. Dissertação (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2005.

SOCCOL, J. J.; VENTURIERI, G. A. Evolução do mercado interno de orquídeas baseado na importação de mudas (Resumo). **Anais do I Simpósio Brasileiro de Cultivo de Orquídeas**, 2013. Fortaleza, Ceará.

SOCOL, J. J. **Rosas, orquídeas, hortênsias e campânula – pesquisas e possibilidades de inovação avaliadas em Lages-SC e em Arujá – SP.** 2013. Relatório de Estágio (Centro de Ciências Agrárias). Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

SOUZA, A. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. **Produção de mudas.** In: CORDEIRO, Z. J. M. Banana: produção. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 39-46.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas.** 2 ed. revista e ampliada – Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 407.

SCHAAF, J.; et. al. Primary metabolism in plant defense. **Plant Physiol.**, n. 108, p. 949-960, 1995.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows (Computer program manual).** Tulsa: StatSoft, 1995.

STULP, S.; CARVALHO, L. Aplicação de fotólise em alimentos. **Revista Virtual de Química**, v.7, n. 1, p. 278-291, 2015.

STREIT, M. N.; et al. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 3, n. 35, p.748-755, 2005.

SU, V.; HSU, B. D.; CHEN, W. H. The photosynthetic activities of bare rooted *Phalaenopsis* during storage. **Scientia Horticulturae**, v. 87, n. 4, p. 311–318, 2001.

TANG, C. Y.; CHEN, W. H. Breeding and development of new varieties in *Phalaenopsis*. In: CHEN, W. H.; CHEN, H. H. (Eds.). **Orchid Biotechnology.** Singapore: World Scientific, 2007. p. 1–22.

TIRADO, J. M.; NARANJO, E. J.; ATEHORTÚA, L. Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA. **Rev. Colomb. Biotecnol.** v. 7, n. 1, p. 25-31, 2005.

TEIXEIRA, R. DE A. Melhoramento genético vegetal no Brasil: formação de recursos humanos, evolução da base técnico-científica e cenários futuros. **Parcerias Estratégicas**, v. 14, n. 28, p. 153–193, 2010.

THORPE, T. et al. **The components of plant tissue culture media II:** organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: GEORGE, E.F. et al. Plant propagation by tissue culture. 3.ed. Netherland: Springer, 2008. V.1, 501p.

UNIPROT. **UniProtKB – A0A164WWP2-Daucus.** Disponível em:< <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A164WWP2>>. Acesso 22/04/19.

VEASEY, E. A. et al. Processos evolutivos e a origem das plantas cultivadas. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1218–1228, 2011.

VENCOVSKY, R.; RAMALHO, M. A. P. Contribuição do melhoramento genético de plantas no Brasil. In: PATERNIANI, E. **Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária.** Brasília: Embrapa, p.57-89, 2000.

WANG, H. Z. et al. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 3, p. 440–447, 2009.

WEIL, J. H. **Bioquímica geral**. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2^a ed., p. 316, 2000.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-Based Methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. **Molecular Systematics of Plants II**, p. 43–86, 1998.

ZAHARA, M. et al. The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* hybrid “pink”. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, n. December, p. 1–15, 2017.