

JAQUELINE RIBEIRO BOM REGHIN

**CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE TRÊS
ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MAIO – 2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JAQUELINE RIBEIRO BOM REGHIN

**CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE TRÊS
ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MAIO – 2008**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B695 Bom Reghin, Jaqueline Ribeiro
Cultivo *in vitro* e aclimatização de três espécies de orquídeas / Jaqueline Ribeiro Bom Reghin. -- Maringá: [s.n.], 2008.
67 f. : il.

Orientador : Profº Drº Ismar Sebastião Moscheta.
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2008.

1. BIFRENARIA. 2. CATTLEYA. 3. CATASETUM. 4. CULTIVO ASSIMBIÓTICO. 5. ACLIMATIZAÇÃO. 6. SUBSTRATO ALTERNATIVO. 7. ORQUÍDEAS. I. TÍTULO

CDD 584.4

JAQUELINE RIBEIRO BOM REGHIN

**CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE TRÊS
ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em: 30 de maio de 2008.

Prof. Dr. Orlando Seiko Takemura

Profª Drª Maria de Fátima Pires da Silva Machado

Profª Drª Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre

Prof. Dr. Bruno Luiz Domingos de Angelis

Prof. Dr. Ismar Sebastião Moscheta
(Orientador)

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.

A meus pais, João Darci Bom e Nadir Ribeiro Bom, por suas histórias de sucesso na educação dos filhos, diante de todas as adversidades.

Ao meu esposo, José Ricardo Reghin, pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

A meus filhos, José Ricardo Reghin Filho e José Renato Reghin, motivo de entusiasmo e paixão pela vida.

Aos meus sogros, Luiz Reghin e Carmem Jovelina Reghin, pelo incentivo e carinho.

Aos meus irmãos Jaques Ribeiro Bom e Jaclin Collis Ribeiro Bom Bulgarelli; cunhados Carmensita Aparecida Gaievski Bom, Altieris Bulgarelli, Renata Graziela Reghin e aos meus queridos sobrinhos Marcus Vinicius Gaievski Bom e Henrique Bom Bulgarelli que, mesmo não estando sempre perto, foram tão importantes.

Aos meus tios e aos meus amigos pelo estímulo, otimismo e atenção durante minha permanência em Maringá.

Dedico, ainda, este trabalho a todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

AGRADECIMENTOS

Acima de todas as coisas, meu imenso agradecimento a Deus, que a cada instante deu-me forças para que eu conseguisse vencer mais uma etapa tão sonhada em minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Universidade Paranaense pelo apoio e estímulo na realização do doutorado.

Ao Prof. Dr. Ismar Sebastião Moscheta, pela sua orientação, paciência, e disposição para me ajudar sempre que precisei e, ainda mais, pela oportunidade de conhecer alguém tão especial, uma pessoa que faz a diferença por onde passa, um exemplo a ser seguido; o verdadeiro cristão.

À Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre, pela oportunidade, compreensão, carinho, disposição e alegria, além do grande incentivo durante a realização da pesquisa com as orquídeas.

Ao Prof. Dr. Gilberto Alves Ferreira, Professor da disciplina de Estatística da Universidade Paranaense – UNIPAR, pela orientação na análise estatística.

À Bibliotecária Inês Gemelli pelo auxílio e incentivo.

Aos funcionários do PGA, Érika Cristina Takamizawa Sato e Ruy Carlos Schneider que sempre estiveram nos orientando.

Aos meus amigos, pastores e irmãos que estiveram o tempo todo ao meu lado, dividindo os problemas e angústias; orando comigo quando eu precisei.

À irmã Angelina pelas orações especiais e pelo imenso amor demonstrado a mim e a minha família.

Agradeço ainda, às pessoas que marcaram a minha vida para sempre, umas porque me ajudaram na construção, outras porque me apresentaram projetos de sonhos e outras porque me desafiaram a construí-los.

BIOGRAFIA

JAQUELINE RIBEIRO BOM REGHIN, filha de João Darci Bom e Nadir Ribeiro Bom, nasceu em Dracena, Estado de São Paulo, em 1º de setembro de 1970.

Em dezembro de 1988, graduou-se em Ciências Licenciatura Curta, pela Universidade Paranaense, no Estado do Paraná.

Em 1991, terminou a Licenciatura Plena em Biologia, pela Universidade do Oeste Paulista, no Estado de São Paulo.

No ano de 1997, especializou-se em Metodologia do Ensino, pela Universidade Paranaense, no Estado do Paraná.

Em 2002, obteve o título de Mestre em Engenharia da Produção pela Universidade Federal de Santa Catarina, no Estado de Santa Catarina.

No ano de 2004, especializou-se em Plantas Ornamentais e Paisagismo pela Universidade Federal de Lavras, no Estado de Minas Gerais.

Em março de 2004, ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia, nível Doutorado, na área Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá, no Estado do Paraná.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos gerais da cultura	4
2.2 Descrição das espécies estudadas	6
2.2.1 <i>Bifrenaria tyrianthina</i>	6
2.2.2 <i>Catasetum fimbriatum</i>	7
2.2.3 <i>Cattleya bicolor</i>	9
2.3 Meios de cultura	10
2.3.1 Carvão ativado	12
2.3.2 Micronutrientes	14
2.3.3 Peptona	16
2.3.4 Água de coco	17
2.3.5 Banana	18
2.4 Iluminação e temperatura	20
2.5 Aclimatização de plantas obtidas por reprodução <i>in vitro</i>	22
2.6 Substratos	23
2.6.1 Xaxim desfibrado	24
2.6.2 Fibra e pó-de-coco	25
2.6.3 Carvão	26
2.6.4 Bagaço de cana-de-açúcar	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.2 Condução do experimento com <i>Bifrenaria tyrianthina</i> e coleta de dados	28
3.3 Condução dos experimentos com <i>Catasetum fimbriatum</i> , <i>Cattleya bicolor</i> e coleta de dados	31

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Efeito de diferentes aditivos no desenvolvimento de plântulas de <i>Bifrenaria tyrianthina</i>	34
4.2 Efeito de diferentes aditivos no desenvolvimento de plântulas de <i>Catasetum fimbriatum</i> e <i>Cattleya bicolor</i>	45
4.3 Efeito dos substratos bagaço de cana-de-açúcar e pó-de-coco na aclimatização de <i>Bifrenaria tyrianthina</i>	47
4.4 Efeito dos substratos xaxim desfibrado, carvão vegetal e pó-de-coco na aclimatização de <i>Catasetum fimbriatum</i> e <i>Cattleya bicolor</i>	48
5 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cálculo do índice de crescimento	32
Tabela 2	Análise da cultura assimbiótica de <i>Bifrenaria tyrianthina</i> quanto à percentagem média de germinação das sementes e formação de protocormos em resposta ao meio de cultura e das condições de iluminação	34
Tabela 3	Número mediano de raízes de <i>Bifrenaria tyrianthina</i> em resposta ao meio de cultura e condições de iluminação	37
Tabela 4	Número mediano de folhas de plântulas de <i>Bifrenaria tyrianthina</i> em resposta ao meio de cultura e condições de iluminação	40
Tabela 5	Número mediano de gemas nas plântulas de <i>Bifrenaria tyrianthina</i> em resposta ao meio de cultura em condições de iluminação	42
Tabela 6	Análise do índice de crescimento de <i>Cattleya bicolor</i> em resposta ao meio de cultura e iluminação	45
Tabela 7	Análise do índice de crescimento de <i>Catasetum fimbriatum</i> (Morren) Lindl. em resposta ao meio de cultura e iluminação	46
Tabela 8	Número mediano de gemas de plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> em resposta ao meio de cultura e substrato após aclimação	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Bifrenaria tyrianthina</i>	6
Figura 2	<i>Catasetum fimbriatum</i> – flor masculina	8
Figura 3	<i>Catasetum fimbriatum</i> – flor feminina	8
Figura 4	<i>Cattleya bicolor</i>	9
Figura 5	Pó Eco Vegetal – bagaço de cana-de-açúcar	30
Figura 6	Vitaplan® – pó-de-coco	30
Figura 7	Disposição das bandejas para aclimatização de <i>Bifrenaria tyrianthina</i>	31
Figura 8	Bandejas utilizadas na aclimatização de <i>Catasetum fimbriatum</i> e <i>Cattleya bicolor</i>	33
Figura 9	Plântulas de <i>Bifrenaria tyrianthina</i> , consideradas de tamanho grande, submetidas aos tratamentos: a – Knudson, b – Knudson mais carvão, c – Knudson mais peptona, d – Knudson mais micronutrientes	44

RESUMO

REGHIN, Jaqueline R. B., D.S., Universidade Estadual de Maringá, maio de 2008. **Cultivo *in vitro* e aclimatização de plântulas de três espécies de orquídeas.** Orientador: Prof. Dr. Ismar Sebastião Moscheta.

A maioria das orquídeas tropicais pode ser cultivada assimbioticamente na presença de sais minerais e sacarose. Dependendo da espécie e da fase de desenvolvimento dos embriões e plântulas, alguns suplementos podem ser adicionados às formulações nutritivas originais, incrementando o desenvolvimento dos indivíduos. Esse trabalho justifica-se por otimizar métodos de produção para obtenção de mudas vigorosas e saudáveis de *Bifrenaria tyrianthina*, *Catasetum fimbriatum* e *Cattleya bicolor*, visando redução do tempo de cultivo e dos custos de produção para o mercado consumidor; tendo como objetivos: estabelecer meios de cultura, suplementados com aditivos indeterminados (água de coco, polpa de banana e carvão ativado) ou determinados (peptona e micronutrientes) para o crescimento *in vitro* e avaliar o uso de substratos alternativos ao pó-de-xaxim, tais como o bagaço de cana-de-açúcar, pó-de-coco e carvão vegetal, para aclimatização das plântulas, na tentativa de diminuir os custos com a produção das mesmas. Assim, para a espécie *Bifrenaria tyrianthina*, foram analisados os efeitos de alguns suplementos (carvão ativado, micronutrientes e peptona de carne) sobre a organogênese das plântulas, de modo a compor quatro tratamentos distintos, incluindo as culturas-controle. As culturas permaneceram por nove meses sob iluminação fluorescente branca e Grolux, em exposição contínua e com fotoperíodo de 14h, em temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Também se propôs verificar a aclimatização da mesma no substrato composto de bagaço de cana triturado e carbonizado juntamente com casca de coco moída. As análises revelaram que, para a germinação de *B. tyrianthina*, a ausência de iluminação foi ideal em todos os tipos de tratamentos. Quanto ao desenvolvimento das plântulas, o meio Knudson adicionado de carvão sob iluminação contínua branca mostrou-se o melhor. A aclimatização com bagaço de cana-de-açúcar e pó-de-coco não surtiu resultado, uma vez que as plântulas não sobreviveram nas condições do

experimento. Quanto às espécies *Cattleya bicolor* e *Catasetum fimbriatum*, a formulação original C de Knudson foi acrescentada água de coco, carvão ativado, polpa de banana, micronutrientes ou peptona de carne, de modo a compor seis tratamentos distintos, incluindo as culturas-controle. Foram usadas plântulas com 1 cm de altura, permanecendo as culturas por oito meses sob iluminação fluorescente branca contínua e temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. As análises revelaram que para *Cattleya bicolor*, o tratamento Knudson básico promoveu a melhor mediana, quanto ao índice de crescimento, o que significa maior número de folhas e raízes em relação aos demais meios. Para aclimatização, os substratos pó-de-xaxim e pó-de-coco são recomendados por produzirem melhores resultados quando as plântulas forem provenientes do meio Knudson suplementado com polpa de banana. Para o crescimento de *Catasetum fimbriatum*, a adição de banana ao meio de cultura Knudson tornou-se mais eficiente e na aclimatização não foi constatado formação de brotos laterais em relação aos substratos pó-de-coco e pó-de-xaxim.

Palavras-chave: *Bifrenaria*, *Cattleya*, *Catasetum*, cultivo assimbiótico, aclimação, substrato alternativo.

ABSTRACT

REGHIN, Jaqueline R. B., D.S., Universidade Estadual de Maringá, May 2008.
Culture and in vitro acclimatization of seedlings of three species of orchids. Adviser: Dr. Ismar Sebastião Moscheta.

Most tropical orchids may be cultivated a-symbiotically in the presence of minerals and sucrose. Although depending on the species and development stage of embryos and plantlets, supplements may be added to the original nutritional formulations to increase specimen development. Current research is justified due to optimization production methods to obtain vigorous and healthy seedlings of *Bifrenaria tyrianthina*, *Catasetum fimbriatum* and *Cattleya bicolor* and aims to reduce the time of cultivation and production costs for the consumer market. Research aims to establish methods for a culture supplemented with indeterminate additives (water, coconut, banana pulp and activated charcoal) or others (peptone and micronutrients) for in vitro growth. It also evaluates alternative substrates to “xaxim” powder by sugar-cane bagasse, coconut powder and vegetal charcoal for plantlets’ acclimatization and thus decreasing costs in their production. In the case of the species *Bifrenaria tyrianthina*, the effects of supplements (activated charcoal, micronutrients and peptone) on the organogenesis of the plantlets were analyzed to compose 4 distinct treatments, including control. Crops were left for 9 months under white fluorescent light and GroLux, in continual exposure, with a 14h-photoperiod, at $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Current research also verified the acclimatization of the same substrate composed of crushed sugar cane bagasse, and carbonized ground coconut. Analysis revealed that lack of light was ideal in all types of treatments for the germination of *B. tyrianthina*. In the case of plantlets’ development, Knudson treatment with coal, under continuous white light, proved to be the best. The acclimatization with bagasse of sugar cane and coconut powder failed since plantlets did not survive the experiment. In the case of species *Cattleya bicolor* and *Catasetum fimbriatum*, coconut water, activated charcoal, pulp of banana, micronutrients or peptone meat were added to the original Knudson’s C formula to compose 6 distinct treatments, including control. One cm-high

plantlets were used and were left for 8 months under continuous white fluorescent light, at $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Analyses showed that in the case of *Cattleya bicolor* Knudson basic treatment yielded the best mean growth rate, or rather, a greater number of leaves and roots when compared to other treatments. “xaxim” and coconut powder substrates are recommended for acclimatization since they produce the better results when the seedlings are derived from Knudson medium banana pulp. Whereas the addition of banana to Knudson medium for the growth of *Catasetum fimbriatum* produces more efficiency, the formation of lateral shoots in acclimatization was lacking when compared to coconut and “xaxim” powder substrates.

Key words: *Bifrenaria*, *Cattleya*, *Catasetum*, a-symbiotic cultivation, acclimatization, alternative substrate.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a floricultura é considerada uma atividade econômica de grande importância no Agronegócio nacional e internacional; pela razão do seu grande valor de produção e comercialização, contribuir para a promoção de elevado número de empregos (STEGANI, 2006). Existem espécies de orquídeas que, pela sua raridade, atingem preços acima de US\$ 500,00 a unidade; outras mais comuns têm preços aproximados a US\$ 10,00 ou menos nas floriculturas (ALTAFIN et al., 2005).

Em países como a Argentina, o consumo per capita chega a US\$ 25,00 anuais, na Noruega (US\$ 137,00), na Alemanha (US\$ 98,00), no Japão (US\$ 45,00) e nos Estados Unidos (US\$ 50,00) demonstrando assim, boas perspectivas para a inserção do produto brasileiro no exterior. Além disso, há expectativa de expansão no mercado brasileiro, visto que o consumo médio per capita, ainda é baixo (ANEFALOS; GUILHOTO, 2003).

Para Anefalos e Guilhoto (2003), as principais espécies de flores de corte cultivadas em estufa são as orquídeas, os crisântemos, as rosas e as gipsofilas, que ocupam a maior área cultivada no Brasil. Dentre as espécies cultivadas em telado, as orquídeas, os antúrios, os crisântemos e os lírios têm maior expressão, em área.

As orquídeas são consideradas as mais antigas entre as espécies ornamentais. Dentre as angiospermas, elas certamente compõem o maior agrupamento. São monocotiledôneas, herbáceas e perenes, podendo ser, quanto ao hábito de crescimento, epífitas, terrestres, rupícolas ou saprofítas, não existindo espécies parasitas (ARAÚJO, 2004).

As orquídeas podem ser propagadas tanto vegetativamente quanto por meio de sementes. Naturalmente, as sementes das orquídeas germinam próximo às plantas adultas, tendo cada fruto (cápsula carnosa), milhares de pequenas sementes (SILVA, 1976). Embora produzidas em grande quantidade, não possuem endosperma funcional, sendo incapazes de germinar apenas na presença de água (ARAÚJO, 2004).

Rao (1977) estima que aproximadamente 5% das sementes de orquídeas possam germinar em ambiente natural. Arditti et al. (1982) salientam que as espécies de Orchidaceae se associam a fungos micorrízicos, o que possibilita a germinação das sementes.

Durante o processo de germinação das sementes, os embriões das orquídeas se desenvolvem em protocormos que, ao desenvolverem folhas, passam a ser denominados de plântulas (MORALES, 2004).

As técnicas de cultura *in vitro* vêm sendo amplamente empregadas na propagação de grande número de espécies no setor de floricultura (ORI, 2006). Altafin et al. (2005) relatam que as plantas produzidas em laboratório podem possuir alto vigor fisiológico, pelos meios de cultura que proporcionam nutrição balanceada nas fases iniciais de desenvolvimento, ocasionando, assim, o crescimento acelerado, maior tolerância às condições adversas de meio ambiente, bem como ao ataque de doenças e pragas. O cultivo *in vitro* se realiza em condições ambientais de iluminação e temperatura controladas (CARVALHO; VIDAL, 2003).

Em 1922, Lewis Knudson realizou a germinação das sementes de orquídeas com um método de cultura asséptica, *in vitro*, utilizando diversos sais minerais. A tradicional fórmula C de Knudson, para tais culturas assimbióticas em laboratório, é utilizada ainda hoje (CAMPOS, 2000).

Os meios de cultura são constituídos de vários componentes químicos (macronutrientes e micronutrientes), em diferentes concentrações (DIXON, 1985), ao qual podem ser adicionadas: vitaminas, carboidratos (como fonte de carbono), reguladores de crescimento, peptona e, empiricamente, os elementos conhecidos como “suplementos indeterminados”. Estes são aditivos diversos, tais como a água de coco (endosperma líquido de *Cocus nucifera*); carvão ativado; polpa de frutas, em especial, a banana, dentre outros de baixo custo e de fácil obtenção para os produtores de mudas. A adição de suplementos indeterminados ao meio de cultura é um fator polêmico no que diz respeito ao aspecto fisiológico, pela indeterminação de sua composição química (GONÇALVES, 2006), sendo usados em quantidades e interações aleatórias, mas com evidências de resultados positivos (MORALES, 2004; FREITAS; GONÇALVES; MILANEZE-GUTIERRE, 2006; GONÇALVES, 2006; GONÇALVES et al., 2006; MORALES; MILANEZE; MACHADO, 2006; PRIZÃO, 2006; PRIZÃO et al., 2006).

Considerando que o Brasil é um país rico em biodiversidade, portador de um invejável banco de germoplasma de espécies de orquídeas (SILVA et al., 2005) e analisando a constante destruição da flora nativa; esse trabalho justifica-se à medida que busca avaliar alguns métodos de produção em larga escala para obtenção de mudas vigorosas e sadias de *Bifrenaria tyrianthina*, *Catasetum fimbriatum* e *Cattleya bicolor*, visando redução do tempo de cultivo e dos custos de produção para o mercado consumidor.

Os objetivos do presente estudo foram:

1º - estabelecer meios de cultura suplementados com aditivos indeterminados (água de coco, polpa de banana e carvão ativado) ou determinados (peptona e micronutrientes) para o crescimento *in vitro* de *Bifrenaria tyrianthina*, *Catasetum fimbriatum* e *Cattleya bicolor*;

2º - avaliar substratos alternativos ao pó-de-xaxim, tais como o bagaço de cana-de-açúcar, pó-de-coco e carvão vegetal, para aclimatização das plântulas, na tentativa de diminuir os custos com a produção das mesmas.

Para tanto, consideram-se as seguintes hipóteses, a saber:

a) a adição de carvão ativado, peptona e micronutrientes ao meio básico, fórmula C de Knudson (1946), podem favorecer o desenvolvimento de folhas, raízes e gemas em plântulas de *Bifrenaria tyrianthina*;

b) os diferentes tipos de iluminação promovem o maior desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Bifrenaria tyrianthina*;

c) o uso do carvão ativado, peptona, micronutrientes, polpa de banana e água de coco, como suplementos adicionados ao meio básico (Knudson) podem interferir positivamente no desenvolvimento de raízes, folhas e gemas das plântulas de *Catasetum fimbriatum* e *Cattleya bicolor*, quando submetidas à iluminação fluorescente contínua;

d) substratos alternativos poderão substituir adequadamente o pó-de-xaxim na fase de aclimatização das plântulas de orquídeas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais das orquídeas

As orquídeas são consideradas as mais antigas entre as espécies ornamentais e a maior família entre as monocotiledôneas (ARAÚJO, 2004). Erroneamente conhecidas como “parasitas”, as orquídeas podem habitar os mais diversos ambientes, desde o solo até troncos, galhos ou ramos, sendo essa última condição a mais comum nas florestas tropicais. Portanto, são plantas de hábito epifítico, com diversos graus de tolerância à iluminação solar. As plantas que as sustentam são denominadas forófitos (DRESSLER, 1981; BENZING; OTT; FRIEDMAN, 1982; DISLICH, 1996).

Há mais de 25 mil espécies descritas (VAZ; KERBAUY, 2000; CRESCENTI, 2002). Para os autores, o elevado número de espécies e híbridos possibilita a ocorrência de grande variabilidade de formas, tamanhos e cores de folhas e flores. Tal fator faz com que as orquídeas se tornem uma espécie de grande interesse econômico e botânico, sendo apreciadas nos mercados brasileiro e internacional, evidenciando, assim, a potencialidade do Brasil no cultivo de orquídeas (FRAGUAS et al., 2005).

Segundo Pabst e Dungs (1975), as orquídeas nativas do Brasil somam 2.300 espécies reunidas em 191 gêneros, algumas com distribuição geográfica bastante restrita.

Em relação à morfologia, as flores das orquídeas possuem três sépalas, uma dorsal e duas laterais; três pétalas, duas laterais e uma modificada, chamada labelo. A coluna é a estrutura resultante da fusão dos órgãos masculinos (estames) e femininos (pistilos). Logo abaixo da antera única, na maioria das espécies, está a cavidade estigmática, o órgão receptivo feminino, de superfície viscosa, onde são depositadas as políneas, no momento da polinização. Na porção distal da coluna, encontra-se o ovário que, após a fecundação se desenvolve numa cápsula carnosa, com dezenas de milhares de minúsculas sementes (CAMPOS, 1996; PAULA; SILVA, 2002). Todavia, há espécies que produzem por floração, somente flores masculinas ou femininas e, raramente, de

ambos os sexos na mesma inflorescência, ou flores hermafroditas, como nas espécies de *Catasetum* e gêneros afins (ALTAFIN et al., 2005).

As raízes apresentam epiderme multisseriada, o velame que é capaz de absorver água e sais minerais, oferecer proteção mecânica e também reduzir a transpiração (BENZING, 1987), que são características singulares da família Orchidaceae. A presença de córtex parenquimatoso com exoderme e endoderme, com variados graus de espessamentos nas paredes celulares, completam o padrão anatômico básico desse órgão (MORALES; CARVALHO; MILANEZE, 2002).

Na maioria das orquídeas, as folhas se dispõem disticamente no caule, apresentando venação paralela. Em muitas espécies, a única folha é sustentada pelo caule aéreo ou pseudobulbo (DRESSLER, 1981), que auxiliam na manutenção do balanço hídrico da planta em situações nas quais há escassez de água (BRAGA, 1987). As folhas, de diferentes formas, podem ser membranosas, coriáceas ou carnosas (BRAGA, 1987).

Apesar de variadas, as formas de crescimento em Orchidaceae se originam, fundamentalmente, de ramificação monopodial (ereto) ou simpodial (prostrado) (ARAÚJO, 2004).

Os frutos são cápsulas tricarpelares com período variável de amadurecimento, podendo ocorrer em até 12 meses ou mais (CAMPOS, 1996). A deiscência da cápsula madura das orquídeas ocorre a partir de duas ou três valvas, permitindo, assim, a liberação das sementes (ARDITTI et al., 1982).

Uma das características comuns a todas as espécies de orquídeas é a produção de dezenas de milhares de pequenas sementes, em cada fruto estando entre as de menor tamanho com relação às fanerógamas (BENZING, 1981). A maioria possui dimensões inferiores a 0,3 mm, sendo raras aquelas com mais de 2 mm (STOUTAMIRE, 1974), mas todas apresentam padrão constante e são estruturalmente simples (ARDITTI, 1979; CRUZ, 2006).

Adaptações fisiológicas também são observadas na família, sendo comum a ocorrência de metabolismo fotossintético do tipo CAM, que aumenta a eficiência na utilização de água, por meio da abertura de estômatos apenas à noite. Aponta-se a existência de um processo fotossintético do tipo C₄ entre as epífitas, já que esse também economiza água (BRAGA 1987; OLIVEIRA; SAJO, 1999; DISLICH, 1996).

As orquídeas são também conhecidas por sua importância industrial, em função da extração de essência de baunilha do fruto das espécies de *Vanilla* (JOLY, 1977).

Atualmente, muitas orquídeas, em estado silvestre, encontram-se em extinção, tendo-se, portanto, a importância de seu cultivo (MOURA, 1979; RUSCHI, 1986; LEME; MARIGO, 1993). As espécies escolhidas, para o desenvolvimento desse trabalho, são algumas das mais belas orquídeas nativas do Brasil; em vista disso, apresentam grande interesse sob os aspectos: ecológico e comercial.

2.2 Descrição das espécies estudadas

A morfologia das orquídeas epífitas, em geral, é basicamente constituída de um rizoma com gemas laterais e frontais, de pseudobulbos, folhas, frutos, raízes e sementes (MORAES, 2002).

2.2.1 *Bifrenaria tyrianthina*

O gênero *Bifrenaria* é formado por plantas epífitas ou rupícolas, sendo a maior parte delas robustas e, em regra, apresentando rizoma curto, exceto algumas poucas espécies, com ocorrência na Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. *Bifrenaria tyrianthina* (Loudon) Rchb.f. (Figura 1) é uma planta rupícola, de crescimento cespitoso, que habita os campos rupestres de altitude, tanto na Mata Atlântica quanto nos cerrados (CAMPACCI, 2003).



Figura 1 – *Bifrenaria tyrianthina*.

Esta espécie enraíza-se em substrato de terra humosa, sendo trazida pelos ventos e misturada com a vegetação decomposta, diretamente sobre a pedra bruta e em pleno sol. Apresenta-se com porte médio, pseudobulbos grossos, em forma de pirâmide quadrangular (tetragonados), amarelados com 8 a 10 cm de altura por 4 cm de diâmetro e encimados por uma única folha larga (MACHADO, 2000).

As folhas coriáceas apresentam, em média, 30 cm de comprimento por 10 cm de largura, verdes ou amareladas, no dorso com nervuras mais destacadas entre outras secundárias. A haste floral é ereta, de tamanho variável, algumas vezes, mais alta que as folhas, ostentando duas ou três flores. As flores estão entre as maiores do gênero apresentando até 8 cm de diâmetro, mais comuns as formas púrpuras. A *Bifrenaria* apresenta sépala dorsal côncava, oboval; sépalas laterais em parte oblongas, na base com longos prolongamentos que as inserem no pé da coluna, formando um calcar muito comprido. As pétalas são romboidais ou elípticas, de cor mais clara que a dos outros segmentos, apresentando, ainda, um labelo com unguículo na base, piloso, de cor mais forte e brilhante que os outros segmentos, trilobado, e calosidade alta no seu centro. A floração ocorre durante o verão e outono no Brasil (CAMPACCI, 2003).

2.2.2 *Catasetum fimbriatum*

O gênero *Catasetum* foi descrito por Kunth em 1822, comportando mais de 130 espécies distribuídas, desde a América Central até o Sul do Brasil e Norte da Argentina, em áreas tropicais quentes (MAJEROWICZ et al., 2000; CATASETUM, 2006).

Catasetum fimbriatum (E. Morren) Lindl. & Paxton é uma planta epífita que habita principalmente em troncos de palmeiras, podendo ser encontrado em bosques, ao longo de rios, ou até mesmo em áreas desmatadas para pastagem (THIAGO, 2008).

Para Hoehne (1940), Scaglia (1998), Machado (1998), Oliveira e Sajo (2001), o *C. fimbriatum* é uma planta com folhas finas, elípticas, geralmente de cor verde clara, sempre se apresentando em número de dois a sete por pseudobulbo e com uma variação de 15 a 35 cm de comprimento, sendo a

nervura central proeminente na face dorsal; os pseudobulbos são carnosos espessados na região basal. A inflorescência surge na base do pseudobulbo, podendo ser ereta ou pendente, tendo flores de aparência cerosa, masculinas, femininas ou eventualmente hermafroditas (Figuras 2 e 3), podem ser variáveis no comprimento, apresentando de duas a 28 flores e também possuem sépalas e pétalas (em número de três) verde-amareladas com o labelo no mesmo tom apresentando muitas fimbrias, as quais dão nome à espécie. Esta espécie tem o hábito de arremessar as polínias sobre os polinizadores até 2 m de distância. Normalmente, sob alta luminosidade produz flores femininas, e habitando em locais com sombra dão origem a flores masculinas (CATASETUM, 2006).



Figura 2 – *Catasetum fimbriatum* – flor masculina.



Figura 3 – *Catasetum fimbriatum* – flor feminina.

Essas plantas vegetam em segmentos de troncos de árvores velhas, onde há presença de acúmulo de material orgânico em decomposição, expostos, geralmente, à grande radiação solar (MACHADO, 1998).

2.2.3 *Cattleya bicolor*

As espécies de *Cattleya* e outros gêneros da família são muito utilizadas no mundo inteiro como plantas ornamentais, pela beleza de suas flores, que lhes conferem considerável valor econômico (ZANENGA-GODOY; COSTA, 2003).

O gênero *Cattleya* apresenta cerca de 60 espécies de epífitas (PABST; DUNGS, 1975). A *Cattleya bicolor* Lindl. (Figura 4) é uma espécie bifoliada que vegeta em regiões de altitude entre 600 e 1.200 m, nativa de Minas Gerais e Rio de Janeiro; apresenta pseudobulbos, em geral muito delgados e cilíndricos alcançando, às vezes, 1,30 m de altura (CARVALHO, 2006).



Figura 4 – *Cattleya bicolor*.

A *C. bicolor* apresenta floração no ápice dos pseudobulbos, contando com duas a dez flores de aproximadamente 8 cm de diâmetro (CATTLEYA, 2006). As sépalas e pétalas exibem colorido verde pálido banhado de castanho – cobre ou amarelado, e o labelo sem lóbulos laterais na cor púrpura – carmesim (CARVALHO, 2006).

2.3 Meios de cultura para orquídeas

As plantas são organismos autotróficos que, para seu crescimento e desenvolvimento, necessitam da energia da luz solar para sintetizar todos os seus componentes orgânicos, a partir de dióxido de carbono, água e elementos minerais dissolvidos na solução do solo (TAIZ; ZEIGER, 2006). No entendimento de Torres et al. (2001), tais exigências são aplicáveis à cultura *in vitro*.

A propagação *in vitro* apresenta vantagens relativas à produção de um grande número de mudas em curto espaço de tempo, quando comparada com métodos tradicionais, sendo estas com alta qualidade fitossanitária (McKENDRICK, 2000). Uma produção massal de mudas também é muito interessante, uma vez que, naturalmente, as sementes de orquídeas apenas germinam quando ocorre a interação simbiótica com certos gêneros de fungos. Na propagação, *in vitro*, as sementes são colocadas em condições ideais para germinar, não sendo necessária a simbiose com o fungo (ALTAFIN et al., 2005).

Em 1922, Lewis Knudson relatou que o fungo não era necessário para a germinação das sementes de orquídeas, caso as mesmas sejam semeadas em meio de cultura que contenha ágar, sais apropriados e açúcares. Isto posto, por meio da tecnologia da germinação assimbiótica, milhares de plântulas poderiam chegar à maturidade, a partir de um único fruto. Das várias fórmulas nutritivas propostas por Knudson, a mais conhecida é a fórmula C (Kc), de 1946, que passou a ser utilizada para a germinação de sementes e cultivo de plântulas de várias espécies de orquídeas (GRIESBACH, 2002). Foi evidenciado anteriormente por Arditti et al. (1982) que, para a maioria das orquídeas como as *Cattleya*, *Cymbidium*, *Oncidium*, *Laelia*, *Vanda*, entre outros gêneros com espécies apreciadas por colecionadores e comerciantes, o meio Knudson C pode ser utilizado (na fórmula original ou com algumas modificações).

O meio de cultivo desempenha várias funções, pois, ao mesmo tempo em que serve de suporte físico para o explante, propicia os nutrientes necessários à sobrevivência da planta (CARVALHO; VIDAL, 2003). Os meios de cultura são classificados quanto ao estado físico, podendo ser líquidos ou

geleificados, sendo estes os que contêm agentes solidificantes, principalmente ágar (cerca de 0,6 a 1%), sendo esse utilizado para a semeadura assimbiótica de orquídeas (TORRES et al., 2001).

Os métodos de cultivo *in vitro*, embora apresentem alto custo, têm capacidade produtiva elevada, com resultado seguro, sendo portanto, preferidos pelos estabelecimentos comerciais (BACH; CASTRO, 2004).

Os meios de cultura para o desenvolvimento de orquídeas *in vitro*, além dos macronutrientes, micronutrientes e suplementos, podem ser acrescidos de reguladores do crescimento vegetal pertencentes aos grupos da auxina, citocinina e da giberelina (ALTAFIN et al., 2005; SOARES et al., 2008a).

Torres et al. (2001) relatam que o meio de cultura é constituído de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono, as vitaminas e os fitorreguladores.

No cultivo *in vitro* de orquídeas, os compostos orgânicos, como a água de coco e extratos de frutas são muito utilizados para estimular o crescimento de plântulas *in vitro* (ARDITTI; ERNST, 1993). Esses extratos vegetais podem afetar o desenvolvimento das plantas pela presença de várias substâncias como os hormônios vegetais, aminoácidos, peptonas e vitaminas, que se apresentam de forma indeterminada, podendo alterar a composição química do meio de cultura (ORI, 2006).

Aos constituintes básicos dos meios de cultura podem ser adicionados, empiricamente, os elementos conhecidos como “suplementos indeterminados” (GONÇALVES, 2006), visando à otimização de determinada resposta do padrão de crescimento (TORRES et al., 2001).

Para Gonçalves (2006), os suplementos indeterminados, tais como a água de coco (endosperma líquido de *Cocus nucifera*), o carvão ativado, a polpa de frutas, em especial, a banana, dentre outros, são considerados de baixo custo e de fácil obtenção para os produtores de mudas. Entretanto, tem-se aspecto polêmico em relação ao fator fisiológico, pela indeterminação de sua composição química. Em adição, são usados em quantidades e interações aleatórias, mas com evidências de resultados positivos (MORALES, 2004; FREITAS; GONÇALVES; MILANEZE-GUTIERRE, 2006; GONÇALVES, 2006; GONÇALVES et al., 2006; MORALES; MILANEZE; MACHADO, 2006; PRIZÃO, 2006; PRIZÃO et al., 2006). Em seu experimento com 25 espécies de orquídeas, Szendrak

(1997) revela que os meios complementados com compostos orgânicos elevam a taxa de proliferação e formação dos protocormos mais do que os meios suplementados com glicose.

2.3.1 Carvão ativado

O carvão ativado é o produto resultante da moagem da madeira após carbonização em alta temperatura, na presença de vapor, caracterizando-se por aumentar a área de adsorção das partículas sólidas ou gasosas (TORRES et al., 2001). Embora não consista num regulador de crescimento, tem a capacidade de modificar o meio nutritivo e, em algumas circunstâncias, melhorar ou regular o crescimento das plântulas *in vitro* (PAN; STADEN, 1998; CORRÊA et al., 2003; SILVA, 2003; ARAUJO, 2004; MORALES, 2004).

O carvão ativado apresenta cargas residuais que são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas comumente utilizadas em cultura de tecido; a dosagem de carvão ativado varia de 0,2 a 3,0% (ERNST, 1975; PIERIK et al., 1988; YAM; WEATHERHEAD, 1988; HINNEN; PIERIK; BRONSEMA, 1989; MANTOVANI; FRANCO; VESTENA, 2001; TORRES et al., 2001; MORAES, 2003; ARAUJO, 2004; MORALES, 2004).

No cultivo *in vitro*, pode ser utilizado tanto o carbono animal quanto o carbono vegetal, sendo este último, o mais empregado em meios de cultura (ARDITTI et al., 1982; ARDITTI; ERNST, 1993). O tamanho dos poros do carvão pode variar. O carvão vegetal ou carbono ativado é caracterizado pela grande relação entre área-peso (até 2000 m²g⁻¹) (ARDITTI; ERNST, 1993).

A utilização de carvão de boa qualidade é essencial, conforme ressaltado por Arditti et al. (1982) e Hinnen, Pierik e Bronsema (1989). Ao analisarem diferentes graus de pureza do carvão, os últimos autores citados obtiveram aumento significativo no peso fresco de raízes (14%) e folhas (7%), fazendo uso de carvão com maior grau de pureza. Tais dados evidenciam a importância do grau de pureza do carvão ativado.

Fisicamente, o carvão simula a condição de escuro, no qual as raízes, normalmente, se desenvolvem mais (CORRÊA et al., 2003; MORAES, 2003; SILVA, 2003; GUERRA; NODARI, 2006).

A adição de carvão ativado, nos meios de cultura, tem sido um procedimento adotado por diversos laboratórios (EBERT; TAYLOR; BLAKE, 1993). Conforme Arditti e Ernst (1993), a primeira tentativa de escurecer o meio de cultura foi realizada por Curtis (1943), para a germinação de sementes de uma orquídea americana do gênero *Cypripedium*. Por sua vez, Ernst (1975) adicionou carvão ativado ao meio Knudson, durante o cultivo de uma espécie e de uma cultivar de *Phalaenopsis*, resultando, assim, no aumento substancial na biomassa. Esse autor sugere que o carvão adsorve o etileno, gás que pode causar a inibição do crescimento e diferenciação dos tecidos vegetais.

Segundo Moraes, Faria e Cuquel (2005), o carvão contribui para a melhoria da qualidade das plântulas de orquídea *in vitro* e aumenta a sobrevivência após o transplante; para *Miltonia flavescens* e *Laelia flava*, resultados expressivos foram obtidos com metade da concentração do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 2 g L⁻¹ de carvão ativado e para a espécie *Oncidium trulliferum*, o mesmo meio suplementado com 1 g L⁻¹ de carvão ativado.

Ao cultivar microinflorescências de *Oncidium varicosum in vitro*, Kerbauy (1984) verificou o desenvolvimento de PLBs (*protocorm-like body* – pequenos protocormos axilares), em meios nutritivos, contendo 1 g L⁻¹ de carvão ativado e outros aditivos. Silva (2003), em seu estudo com *Brassiocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow, constatou que o carvão ativado promove a formação de maior número de brotos até a concentração de 137,5 mgL⁻¹ e que crescentes concentrações de carvão ativado incorporados ao meio Knudson influenciaram negativamente a morfogênese de folhas.

Outra função atribuída ao carvão ativado está relacionada à sua atuação como antioxidante (UTINO; CARNEIRO, 2001).

Morales (2004) verificou o efeito das concentrações do carvão ativado sobre a formação de folhas nas plântulas de *Catasetum fimbriatum*, indicando que o desenvolvimento foi significativamente maior naquelas mantidas em meio de cultura contendo 5,0 g L⁻¹ deste suplemento. Além disso, Prizão (2006) verificou que além de promover o escurecimento do meio de cultura, o carvão ativado esteve relacionado com resultados significativos quanto ao crescimento das raízes das plântulas de *Cattleya bicolor* e de um híbrido secundário obtido

do cruzamento de espécies de *Brassavola*, *Cattleya*, *Laelia* (BLC) de nome fantasia 'Pastoral Innocence' – 'BLC Pastoral Innocence', na concentração de 3,0 g L⁻¹ e 4,5 g L⁻¹, respectivamente.

2.3.2 Micronutrientes

Os elementos minerais essenciais são comumente classificados como macronutrientes e micronutrientes, dependendo da quantidade relativa exigida (MORAES, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2006). Os meios de cultura incluem na sua composição, os elementos essenciais para o crescimento da planta *in vivo*, os quais têm papel fisiológico distinto no metabolismo da planta (TORRES et al., 2001; EMBRAPA, 2006).

Os micronutrientes também são exigidos em algumas etapas do ciclo vegetativo e reprodutivo das plantas, sendo necessários para o seu completo desenvolvimento (TORRES et al., 2001; MORAES, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2006; BORTONE, 2006).

Os micronutrientes são elementos químicos essenciais para o crescimento, com exigência em quantidades reduzidas na planta. Os micronutrientes essenciais nas plantas estão relacionados ao manganês, ferro, boro, molibdênio, cobre, cloro e zinco (YAM; WEATHERHEAD, 1988; TORRES et al., 2001; BORTONE, 2006).

Pasqual (2001) ressalta que o crescimento de células e a morfogênese de algumas espécies podem ser promovidos pelo aumento do nível de micronutrientes, além do recomendado na formulação MS.

O manganês (Mn) é considerado um dos mais importantes micronutrientes do meio e cultura e frequentemente utilizado (ARDITTI; ERNST, 1993). Adicionado como sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O), tem a função de definir a estrutura das proteínas envolvidas na respiração e fotossíntese (TORRES et al., 2001). O manganês atua como parte do sistema enzimático, agindo diretamente na fotossíntese e contribuindo para a síntese de clorofila; aumentando, assim, a disponibilidade de cálcio e fósforo, acelerando a germinação das sementes, a maturação dos tecidos vegetais e a ativação de várias reações metabólicas (BORTONE, 2006).

Um dos micronutrientes mais exigidos pelas orquídeas é o ferro (Fe), principalmente por espécies de *Laelia* das regiões ferríferas de Minas Gerais; as orquídeas se desenvolvem muito bem em substrato rico em ferro, razão do sucesso do xaxim no seu cultivo (BORTONE, 2006). Para este autor, o ferro é absorvido pela planta na forma de cátion bivalente, constituindo-se num elemento pouco translocável dentro da planta, razão pela qual os sintomas da falta de Fe surgem, primeiramente, nas folhas mais novas. No meio de cultura, o ferro é adicionado na forma de Fe-EDTA, quelato constituído pelo complexo de FeSO_4 e Na_2EDTA . Nas plantas, participa das reações de oxirredução nos cloroplastos, nas mitocôndrias e nos peroxisomos, sendo efetivo na síntese de clorofila, na fixação do nitrogênio e respiração celular (TORRES et al., 2001). A presença de ferro é particularmente importante para a formação de brotação e raízes (PASQUAL, 2001).

O boro (B), por sua vez, é um micronutriente aplicado na forma de ácido bórico (H_3BO_3), conforme encontrado no solo, sendo utilizado como fonte do elemento em cultura de tecidos com concentrações variáveis (PASQUAL, 2001). Esse elemento está envolvido na biossíntese de lignina e giberelinas, no metabolismo de carboidratos e ácidos nucléicos, sendo considerado de suma importância na germinação de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico; importante na multiplicação e no crescimento das células (FAVARIN, 2004; GUIRRA, 2004; BORTONE, 2006). A deficiência de boro resulta em redução na síntese de citocinina, devendo ser requerido somente em pequenas quantias, uma vez que pode ser extremamente tóxico para a maioria das plantas, quando em altos níveis (ARDITTI; ERNST, 1993). Pasqual (2001) salienta, ainda, que as plantas com deficiência de B apresentam o sistema radicular reduzido.

Já o molibdênio é adicionado aos meios de cultura na forma de molibdato de sódio (Na_2MoO_4), sendo um componente de várias enzimas e co-fator da redutase do nitrato e da nitrogenase (TORRES et al., 2001; PASQUAL, 2001). A elevação do pH provoca, pela dessorção do molibdato, aumento na disponibilidade de molibdênio às plantas. O molibdênio tem média mobilidade no floema, e sua absorção se dá, predominantemente, na forma de MoO_4^{-2} , sendo favorecida pelo aumento de H_2PO_4 na solução do solo (MOREIRA, 2004).

De acordo com Pasqual (2001) e Arditti e Ernst (1993), a maioria dos meios de cultura inclui cobre (Cu^{2+}), o qual é adicionado na forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), embora, ocasionalmente, sejam empregados cloreto de cobre ou nitrato de cobre. Normalmente, é utilizado pela planta como catalisador de várias reações vitais, além de ser importante no processo de formação da molécula de clorofila (BORTONE, 2006). É constituinte da enzima plastocianina que é um componente necessário para o transporte eletrônico. Várias enzimas que participam da oxidação e hidroxidação de compostos fenólicos são dependentes de cobre (TORRES et al., 2001)

Outro micronutriente essencial, segundo Pasqual (2001) e Torres et al. (2001) é o zinco (Zn); há estreita relação entre o teor de zinco da planta e seu conteúdo de auxina, constituindo-se num fator relevante para a biossíntese das auxinas. O zinco é utilizado como sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) participando de reações de oxirredução das plantas (BORTONE, 2006).

Em estudo desenvolvido por Stancato e Faria (1996), constatou-se a importância dos micronutrientes no cultivo *in vitro* de *Laelia cinnabarina*, pois a diminuição dos mesmos acarreta numa redução do crescimento da plântula, o que minimiza o acúmulo de massa seca.

Pasqual (2001) evidenciou que o crescimento de células e a morfogênese de algumas espécies podem ser promovidos pelo aumento do nível de micronutrientes, além do recomendado pelo meio MS. Por exemplo, a indução e manutenção de calos e crescimento de células em suspensão, de espécies florestais, foram maiores com a concentração cinco vezes maior que a solicitada na solução do meio MS; já em soja, houve maior indução de brotação adventícias, a partir de calos, na presença de quatro vezes a concentração do meio MS; e a embriogênese em calos de anteras de *Hevea brasiliensis* foi induzida mais efetivamente dobrando a concentração de micronutrientes do meio MS.

2.3.3 Peptona

A peptona é um produto à base de proteína parcialmente hidrolisada, constituindo-se numa importante fonte de aminoácidos, sendo muito aproveitada em ensaios microbiológicos (TORRES et al., 2001; MORALES,

2004). Proteínas hidrolisadas por ácidos ou enzimas e desdobradas em moléculas menores apresentam mais baixo custo que os aminoácidos; embora se constituam em fonte de substâncias capazes de promover o crescimento (PASQUAL, 2001). Entretanto, Guerra e Nodari (2006) destacam o fato de que o uso da peptona em meios de cultura para vegetais tem sido pouco difundido.

Segundo Arditti et al. (1982), a peptona é um suplemento orgânico que contém significativas concentrações de diversos tipos de aminoácidos, tais como a arginina, o ácido aspártico e glutâmico, a leucina, a lisina e glicina; este último aminoácido está presente na formulação do meio de cultura, que para Murashige e Skoog (1962) é indispensável ao desenvolvimento dos tecidos vegetais *in vitro*.

A concentração de 1 g L⁻¹ de peptona foi utilizada, apresentando resultados significativos, como suplemento para o cultivo de orquídeas, na germinação de sementes e desenvolvimento das plântulas nos meios de cultura por Kerbauy (1984), Kraus e Monteiro (1989), Kerbauy e Estelita (1996), Chen e Chang (2000), Chen, Chen e Chang (2002), Morales (2004) e Gonçalves (2006), tendo o primeiro autor relatado que, nos meios nutritivos com peptona, os ápices de raízes de um híbrido de *Catasetum* formaram calos verdes-escuros e alguns formaram PLBs.

Já Mathews e Rao (1980) utilizaram 1,2 g L⁻¹, enquanto que Park, Murthy e Paek (2003) e Hinnen, Pierik e Bronsema (1989) adicionaram apenas 0,3 g L⁻¹ de peptona aos meios nutritivos, Roy e Banerjee (2002) adicionaram 2 g L⁻¹ em seus experimentos.

2.3.4 Água de coco

A água de coco é o endosperma extraído de frutos de *Cocos nucifera*. Arditti et al. (1982) afirmam que a água de coco (às vezes chamada de leite de coco), proveniente de frutos verdes pode contribuir para incrementar o desenvolvimento de células, tecidos e órgãos de plântulas *in vitro*. O efeito estimulante da água de coco pode ser explicado pelo fato de este aditivo ser rico em glicose e frutose, sais minerais, mio-inositol, citocininas, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (LEDO; LAMEIRA; BENBADIS, 2002), evidenciado anteriormente por Arditti e Ernst (1993). A água de coco

tem proporcionado inúmeros resultados positivos nas concentrações de 10 a 20% (PASQUAL, 2001) e muitos laboratórios o empregam para estimular o crescimento dos explantes (TORRES et al., 2001).

Em 1948, Capplin e Steward constataram o potencial significativo da água de coco, na indução da divisão celular em tecidos diferenciados. Isso se deve, provavelmente, à composição deste endosperma líquido, que contém ampla gama de compostos orgânicos e inorgânicos (KRIKORIAN, 1991).

Kerbaui (1984) e Morales (2004) ressaltam que a água de coco se constitui num suplemento que vem sendo utilizado em muitas espécies *in vitro*. Entre os compostos importantes encontrados na água de coco, encontra-se o mio-inositol e citocininas, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Segundo Morales (2004), a água de coco influenciou positivamente a formação de folhas de *Encyclia randii*, quando adicionada ao meio Kc.

Estudos feitos por Lakshmanan, Loh e Goh (1995) revelam que a adição de 20% de água de coco, à formulação nutritiva Vacin e Went – VW (1949) proporcionou a formação de cinco vezes mais grupos de PLBs, nas plântulas do híbrido *Aranda deborah*.

Para estimular a organogênese, na germinação assimbiótica de culturas *in vitro* de *Encyclia randii*, foi recomendada a adição de água de coco ao meio de cultura Kc; pois nas culturas mantidas com luz contínua reduz a mortalidade dos protocormos, induz também a formação de maior número de plântulas com maior número de folhas; somente a indução de raízes nas plântulas de *E. randii* não foi estimulada no meio KC contendo água de coco; nas culturas mantidas com fotoperíodo de 14h, o efeito positivo da adição de água de coco foi verificado apenas na redução da mortalidade de protocormos (GONÇALVES, 2006).

2.3.5 Banana

A polpa de banana é muito utilizada para suplementar as formulações nutritivas para o cultivo de orquídeas *in vitro*, podendo ser feita de frutos de banana verdes ou maduros, com diferentes efeitos, dependendo do cultivo e da quantidade utilizada (TORRES et al., 2001).

Há relatos da utilização da polpa da banana na germinação de sementes *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilum* e *Phalaenopsis* (ARDITTI; ERNST, 1993). Em 1975, Ernst adicionou 10% de banana madura ao meio Knudson C e obteve, como resultado, o aumento triplicado do peso fresco e seco de uma cultivar de *Phalaenopsis*.

Experimentos subsequentes confirmam que a adição da polpa de banana no meio de cultura aumenta o número de plântulas obtidas, a partir de explantes *in vitro* (ARDITTI; ERNST, 1993). De acordo com Arditti (1982) e Caldas, Haridasan e Ferreira (1998), experimentos desenvolvidos *in vitro* têm demonstrado que a polpa da banana é o melhor suplemento para a diferenciação de órgãos e promotor do crescimento de raízes e folhas; além disso, em algumas espécies de orquídeas epífitas, o crescimento das raízes foi superior ao crescimento da parte aérea; como verificado por Stancato, Abreu e Furlani (2008) para a espécie *Laelia tenebrosa*.

Arditti e Ernst (1993) confirmaram que a adição de polpa de banana aumentou o número de brotos no cultivo de plântula de orquídea *in vitro*. Torres et al. (2001) afirmam que a adição de polpa de banana promove diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, tais como espessamento do sistema radicular, desenvolvimento da parte aérea, emissão de brotos adventícios. Silva (2003) e Silva et al. (2005) comprovam que as concentrações de polpa de banana incorporadas ao meio Knudson influenciaram o desenvolvimento da orquídea *Brassiocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow de maneira significativa, ocorrendo maior número de brotos com a adição de 75 g L⁻¹ de polpa de banana e na concentração de 100 g L⁻¹ promoveu maior comprimento médio do sistema radicular e peso da matéria fresca da plântula, provavelmente, pelos elementos existentes na composição da polpa de banana que estimularam a multiplicação *in vitro* da plântula. Após essa concentração, observa-se efeito negativo, pois a polpa passa a inibir os brotos.

Entretanto, nas culturas de *Paphiopedilum ciliolare*, observou-se redução significativa da germinação das sementes (PIERIK et al., 1988). Yam e Weatherhead (1988) também observaram a ocorrência de inibição da germinação de várias espécies de orquídeas de Hong Kong, após a utilização do meio Knudson C suplementado com 10% de banana. Todavia, este suplemento incrementou o desenvolvimento das plântulas.

A adição de polpa de banana (90 g L^{-1}) ao meio Kc foi eficiente para a organogênese de *Encyclia randii*, enquanto que para *Laelia purpurata* determinou significativa mortalidade dos explantes, podendo, assim, ser considerado como aditivo que inibe a organogênese em *L. purpurata* (GONÇALVES, 2006).

2.4 Iluminação e temperatura

De acordo com as definições de Pasqual (2001) e Torres et al. (2001), a luz é uma forma de radiação eletromagnética, da qual o crescimento e desenvolvimento das plantas são dependentes para processos como a fotossíntese (conversão de energia luminosa em energia química), fotomorfogênese (desenvolvimento de estruturas ou de formas, induzidas pela luz) e fototropismo (resposta de crescimento das plantas, induzidas pela luz).

São várias as pesquisas referentes às diferenciações estruturais e fisiológicas (plasticidades fenotípicas) entre plantas desenvolvidas em ambientes com luz abundante, seja ela natural ou artificial, e aquelas expostas a ambientes sombreados (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Segundo Arditti e Ernst (1993), diversos aspectos da luz são de extrema relevância para a micropropagação de orquídeas: presença ou ausência de luz, duração (fotoperíodo), intensidade (níveis de energia), qualidade (cor) e fonte (natural, fluorescente, incandescente).

Conforme Pasqual (2001), a influência da luz pode ser direta ou indireta: a influência direta constitui-se pela ação das ondas eletromagnéticas sobre o tecido que já está crescendo *in vitro*; a indireta se dá por meio da influência da luz sobre a planta-mãe de onde os explantes foram retirados. Algumas vezes, as divisões iniciais das células de explantes e o crescimento de calos podem ser inibidos pela luz, embora geralmente a luz seja requerida para obtenção de ótimos resultados quanto ao crescimento *in vitro* de tecidos diferenciados.

Ainda, de acordo com Pasqual (2001), as lâmpadas fluorescentes são utilizadas quase universalmente para fornecer iluminação para as culturas *in vitro*, tendo a vantagem de proporcionar iluminação sem gerar muito calor. As lâmpadas incandescentes são, às vezes, utilizadas para complementar a luz

fluorescente, em relação ao espectro do vermelho, mas isso nem sempre é desejável. As salas de crescimento para micropropagação são equipadas com lâmpadas de luz branca fria, Grolux, ou ambas.

O período de exposição diária à luz, ou fotoperíodo, é necessário para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*. As condições de luminosidade podem variar desde o escuro total, especialmente no início do cultivo, até uma faixa de 100 a 110 mmol m⁻² s⁻¹, com um fotoperíodo de 12 a 16h (WILLADINO; CAMARA, 2006).

Torres et al. (2001) e Erig e Schuch (2005) buscaram determinar um possível tipo mais ativo de luz que a luz branca, de forma a aumentar a eficiência da multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus*) 'Batum'. Assim, testaram cinco diferentes tipos de luz: branca (controle), vermelha, amarela, azul e verde e observaram que a multiplicação é aumentada com a luz verde, embora, a luz branca seja a mais utilizada na cultura de tecidos. Entretanto, no desenvolvimento *in vitro* de *Chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT, o tratamento com luz vermelha proporcionou maior desenvolvimento das plantas quando comparado com a luz verde, azul e branca (AFONSO et al., 2003).

Zeigler, Sheehan e Poole (1967), ao testar três tipos de fotoperíodos, ou seja, 12, 16 e 20h em plantas de *Cattleya 'Enid' alba x Laelia anceps* var. *veitchiana*, constataram aumento no crescimento das plântulas de acordo com o aumento do comprimento do fotoperíodo.

Embora a condição padrão para a maioria dos cultivos realizados em laboratório seja em fotoperíodo de 16h, Pasqual et al. (2003) observaram que embriões imaturos oriundos de tangerineira Poncã x laranjeira Pêra, cultivados em regime de 16h de luz contínua, não proporcionaram bons resultados em termos de altura e peso da matéria fresca da parte aérea das plântulas, e peso da matéria fresca de raízes; enquanto que os fotoperíodos de 8, 10, 12, 14, 18 e 24h proporcionaram melhor desenvolvimento dos embriões.

Com relação à temperatura nas salas de incubação ou crescimento, em geral, pode-se dizer que esta deve ser mantida na faixa dos 25 ± 2°C. A maioria das culturas desenvolve-se bem na faixa de 20 a 27°C (WILLADINO; CAMARA, 2006). Espécies tropicais e subtropicais, em muitos laboratórios, são mantidas em temperatura pouco mais elevadas (em torno de 27°C e 29°C), que

as de clima temperado, que são mantidas a 20°C e 22°C (TORRES et al., 2001). O estudo realizado por Rännbäck (2007) aponta a temperatura ideal para crescimento *in vitro* de plântulas de *Cypripedium* spp, espécie de clima temperado, como sendo ao redor de 20°C, confirmando os estudos já realizados.

2.5 Aclimatização de plantas obtidas por reprodução *in vitro*

A aclimatização ou aclimatação é definida como a adaptação climática de um organismo, especialmente, uma planta, quando transferida para um novo ambiente, sendo esse processo realizado artificialmente (MORAES, CAVALCANTE; FARIA, 2002).

O processo de aclimatização consiste em retirar as plântulas da condição *in vitro* (solução nutritiva rica em nutrientes, em ambiente parcialmente controlado, isento de microrganismos e com alta disponibilidade de água) e transferi-las para a condição *ex vitro* (casa-de-vegetação, onde há alterações de temperatura e umidade, baixa disponibilidade de água e nutrientes, ambiente com a presença de vários microrganismos), sendo necessário o desenvolvimento de novas folhas com o processo fotossintético e estômatos funcionais, e novas raízes para fixação e absorção de nutrientes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990; PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001; HAZARICA, 2003; CARVALHO; ROCHA, 2006).

As mudas propagadas *in vitro* devem ser adaptadas às condições onde estarão no futuro, e para isto se torna necessária a utilização de ambientes semiclimatizados, buscando fornecer umidade e luminosidade adequadas para que se desenvolvam com vigor (DEBERGH, 1991; ALTAFIN et al., 2005); esses autores sugerem que quando as mudas saem do laboratório e são levadas para as estufas semiclimatizadas, devem ser protegidas da luz solar direta, fazendo uso de sombrites que deixam passar entre 80-50% da irradiação solar, devendo ter alta umidade relativa do ar (mínimo de 85%), e temperaturas amenas, entre 15 a 25°C.

A baixa luminosidade e alta umidade relativa nos frascos de cultura *in vitro* dificultam o estabelecimento de condições autotróficas normais para

algumas espécies, quando transferidas para aclimatização (PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001).

Segundo Pio et al. (2002), a obtenção de uma plântula com um sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento em novas condições ambientais, como as proporcionadas na aclimatização.

2.6 Substratos

A utilização de substratos que propiciem boas condições para o desenvolvimento vegetativo de orquídeas faz-se necessário, frente à proibição dos produtos derivados do xaxim – *Dicksonia sellowiana* (MORAES, CAVALCANTE; FARIA, 2002; LIMA et al., 2007); um substrato de boa qualidade deve ser estéril, inodoro, rico em nutrientes, com baixa densidade, elevado CTC (capacidade de troca de cátions do solo), boa capacidade de retenção hídrica, boa aeração e drenagem (GONÇALVES, 1992).

A escolha adequada de um substrato deve levar em conta fatores de ordem econômica, química e física do material (MAYER, 2006).

Durante a fase de aclimatização das orquídeas, torna-se necessária a utilização de substratos que permitam o estabelecimento vegetativo das plântulas obtidas *in vitro* (COLOMBO et al., 2005). Araújo (2004) aponta a utilização de diferentes tipos de substrato, dependendo da espécie a ser cultivada. No cultivo de plantas ornamentais, incluindo as orquídeas, o substrato ideal deve estar disponível em grande quantidade, ser de fácil manuseio e de custo reduzido.

As orquídeas necessitam de água e umidade, mas nunca em excesso. Assim sendo, devem ser plantadas em material poroso que receba a água da rega, mas que horas depois, não esteja ainda encharcado (SILVA, 1976). Ainda, para o autor, existem substratos alternativos ao xaxim que podem ser empregados para o cultivo de orquídeas: raízes de *Polypodium* (espécie de samambaia), *Osmunda regalis* (samambaia-real), casca de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Mart.), casca de pinheiro (*Araucaria angustifolia*) e argila expandida.

Para *Oncidium baueri*, o substrato alternativo mais adequado foi a vermiculita, promovendo 22,34 cm de altura com um bulbo de 6,11 cm de altura por 1,8 cm de largura e para *Maxillaria picta* foram a vermiculita + carvão vegetal (1:1 v v⁻¹) promoveu 18,66 cm no comprimento da folha com 1,84 cm de largura, sendo os bulbos de 4,43 cm de altura por 3,15 cm de largura e vermiculita + casca de arroz carbonizada(1:1 v v⁻¹), em que as plantas obtiveram 17,45 cm de comprimento de folha por 1,84 cm de largura, os bulbos com 4,81 cm de altura por 3,45 cm de largura (FARIA et al., 2001).

Segundo Assis et al. (2005), a eficácia dos diversos substratos estudados como alternativos ao xaxim devem levar em consideração a espécie, o ambiente e o manejo, onde a orquídea esteja sendo cultivada.

2.6.1 Xaxim desfibrado

O xaxim é o substrato preferido pela maioria dos orquidófilos brasileiros. Segundo Colombo et al. (2005), o xaxim é formado pelas raízes adventícias de algumas espécies de samambaias das famílias Dicksoniaceae e Cyatheaceae, sendo frequentemente utilizado após o processo de desfibramento. Quando empregado como substrato, tem duração de três a quatro anos, aproximadamente (ARAÚJO, 2004).

De acordo com Silva (1976), o xaxim deve ser usado bem desfibrado e nunca em pequenas placas utilizadas em vasos, com a preocupação de que estas possam reter água ou umidade em demasia, e por tempo além do conveniente.

Conforme Stegani (2006), o xaxim apresenta baixo valor de pH, boa aeração e baixa densidade, constituindo-se num substrato adequado para as orquídeas epífitas.

No Brasil, as plantas fornecedoras de xaxim encontram-se em processo de extinção, pelo extrativismo desenfreado, apesar da legislação ambiental em vigor. Por essa razão, a pesquisa de diferentes substratos para uso na aclimatização e cultivo, que venha substituir o xaxim, torna-se necessária para protegê-lo da extinção (ARAÚJO, 2004).

2.6.2 Fibra e pó-de-coco

Há poucos anos, por aproveitamento dos resíduos das indústrias de coco (água e polpa) ocorreu a industrialização e comercialização das fibras deste fruto. A fibra da casca de coco é adequada para o uso como substrato para plantas por sua facilidade de produção, baixo custo e alta disponibilidade (CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002).

O mesocarpo desfibrado (fibra-de-coco) e o moído (pó-de-coco) são materiais resultantes do processamento industrial, do fruto do *coco da Bahia*, contendo macronutrientes e micronutrientes importantes para o crescimento e desenvolvimento da planta, podendo ser obtido na forma de vasos e placas. O aspecto negativo da utilização deste material é que retêm muita umidade, contém pouco adubo e é carente em nitrogênio (STEGANI, 2006).

Dentre os inúmeros substratos que têm sido testados no cultivo de orquídeas, a utilização da fibra e do pó-de-coco vem se destacando como sendo um dos mais promissores substratos alternativos ao xaxim (TORTATO, 1998; ASSIS et al., 2005; COLOMBO et al., 2005; YAMAKAMI et al., 2006).

Yamakami et al. (2006) apontam que o substrato fibra de coco pode ser considerado substituto ao xaxim no cultivo do híbrido da orquídea *Cattleya labiata* x *Cattleya forbesii*, sendo a média de 86,31 g massa fresca total.

O substrato pó-de-coco (padrão 11 - Amafibra®) e o sistema de irrigação intermitente (10 min por 5 segundos) são os mais indicados para o cultivo da orquídea *Cattleya* 'Chocolate Drops' x (*Cattleya guttata* x *Laelia tenebrosa*) durante a fase de aclimatização, onde esse substrato promoveu as médias de: altura da parte aérea com 0,58 cm, número de raízes 1,48, peso fresco da planta 0,76 g e 2,78 referente ao número de plantas com brotos (COLOMBO et al., 2005).

Na aclimatização de *Cymbidium* 'Joy Polis', a mistura de pó-de-coco + fibra de coco (proporção 1:1) foi o substrato mais indicado, por apresentar maior ganho de massa fresca (aproximadamente 110%), promover a formação média de três novas raízes por planta e pelo seu baixo custo (MAYER, 2006).

2.6.3 Carvão vegetal

Certos substratos para o cultivo de vegetais, como o cascalhinho, isopor, cortiça, carvão vegetal, espuma de *nylon* e a piaçava são inertes, pois não apresentam valor nutricional para a planta, podendo ser considerados como meros suportes (SILVA; COUTO, 2007).

Souza (2006) evidenciou que muitos orquidários estão utilizando carvão vegetal misturado com casca de madeira moída, e obtendo resultados positivos na aclimatização de orquídeas. O carvão vegetal é muito útil para plantas que não gostam de água acumulada nas raízes, como as espécies de *Vanda*, *Ascocenda*, *Rhynchostylis* e *Renanthera* (SENAI, 2006; SILVA; COUTO, 2007).

O carvão vegetal oferece resultados positivos no que se refere ao crescimento vegetal de orquídeas, em lugares ombrófilos, pois não se decompõe e não encharca. Todavia, por ser muito leve, não fixa a planta. Um outro fator relevante está relacionado ao fato de que, em razão de sua porosidade, tende a acumular sais minerais, devendo, desta forma, ser frequentemente regado com água pura. Misturado ao xaxim, o carvão vegetal controla a acidez do primeiro, conservando-o por mais tempo, uma vez que o carvão funciona como um filtro (SILVA; COUTO, 2007).

Moraes, Cavalcante e Faria (2002) apontaram a existência de maior desenvolvimento vegetativo das plantas de *Dendrobium nobile* com a utilização do xaxim. Contudo, o tratamento à base de vermiculita + plantimax® (T1) (proporção 2:1) ou plantimax® + carvão vegetal + isopor moído (T2) na proporção de 1:1:1, também demonstraram bons resultados na taxa de sobrevivência; sendo T1 com 87,5% e T2 com 83,3% e no que se refere às variáveis altura da parte aérea T1 com a média de 2,04cm e T2 com 2,26 cm; peso fresco T1 com a média de 0,13 g e T2 com 0,14 g e número médio de raízes para T1 foi de 2,04 e para T2 a média de raízes por planta foi 2,39; podendo, assim, serem utilizados como substratos alternativos ao xaxim.

2.6.4 Bagaço de cana-de-açúcar

A agroindústria açucareira é uma das mais importantes do mundo, sendo o Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Esse tipo de

agroindústria gera vários subprodutos e o aproveitamento racional dos mesmos é de extrema importância para o setor produtivo brasileiro (MOHAN, 2005).

De acordo com Souza et al. (2003), a produção de cana-de-açúcar no Brasil foi de mais de 310 milhões de t ano⁻¹, cultivadas em cerca de quatro milhões de hectares. A Única (2008) – União da Indústria de Cana-de-Açúcar – anunciou as estimativas para a nova safra na região Centro-Sul, onde se concentram 86% da produção nacional. A cana moída deverá atingir 498,1 milhões de toneladas, um crescimento de 16% em relação à safra 2007/08, quando foram moídas 431,2 milhões de toneladas de cana. Numa previsão de 579,18 t ano⁻¹ no Brasil em 2008, o que representa a produção de 186,83 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar.

O bagaço de cana-de-açúcar tem vasto potencial de aproveitamento, podendo ser utilizado na alimentação animal, adubação, fabricação de vários tipos de papéis, produtos com grande número de aplicações na indústria química e farmacêutica, podendo, ainda, ser utilizado para a obtenção de plástico biodegradável e geração de energia (NEGRÃO; URBAN, 2005).

Barroso et al. (1998) salientam que entre os resíduos agroindustriais com alto potencial de utilização na produção de mudas de espécies vegetais, encontra-se o bagaço de cana-de-açúcar que consiste no resíduo obtido após a extração do caldo da cana.

Blocos preparados com bagaço de cana-de-açúcar e torta de filtro, misturados, respectivamente, nas proporções de 70 e 30%, v v⁻¹, foram considerados os mais adequados para a produção de mudas de cana-de-açúcar (MORGADO et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do experimento com *Bifrenaria tyrianthina* e coleta de dados

O exemplar utilizado como fonte de sementes, neste estudo, encontra-se em cultivo em vaso, em condições de orquidário no município de Maringá, Paraná.

Para a preparação desse ensaio, sementes de *B. tyrianthina* foram semeadas assimbioticamente sobre o meio de cultura Knudson C (**Kc**) (1946), suplementado com micronutrientes (ARDITTI et al., 1982), carvão ativado (YAM; WEATHERHEAD, 1990) e peptona (KERBAUY, 1984). As condições de iluminação foram à luz contínua (**lc**), o fotoperíodo de 14h (**14h**) e a ausência total de iluminação (**esc**). Nos tratamentos com iluminação, a intensidade luminosa manteve-se em aproximadamente 3.000 lux, obtidos com lâmpadas fluorescentes tipo “luz do dia” e “Grolux” ambas de 40 W. A temperatura ambiente da sala de cultivo permaneceu em $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Foram preparadas oito réplicas por tratamento (meio x iluminação), sendo quatro delas utilizadas para a obtenção das porcentagens de germinação das sementes, ao término do 2º mês de cultivo, e quatro para a análise do desenvolvimento das plântulas, ao término do 9º mês de cultivo. Foi utilizado o meio de cultura básico Kc de Knudson (1946), cuja composição contou com 1.0 g de Nitrato de cálcio – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de Fosfato monobásico de potássio – KH_2PO_4 ; 0,25 g de Sulfato de magnésio – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,50 g de Sulfato de amônio – $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 0,025 g de Sulfato ferroso – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0075 g de Sulfato de manganês – $\text{Mn}(\text{SO}_4) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 20,0 g de sacarose; a este meio foi adicionando 4,5 g de ágar (Merck) por litro de solução.

O meio de cultura básico C de Knudson adicionado de micronutrientes, como proposto por ARDITTI et al. (1982a), tem sua concentração suplementada com 0,056 mg de Ácido bórico – H_3BO_3 ; 0,016 mg de Óxido de molibdênio – MoO_3 ; 0,040 mg de Sulfato de cobre – CuSO_4 e 0,331 mg de Sulfato de zinco – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Para o meio de cultura básico C de Knudson

com peptona, foi acrescido ao mesmo 1 g L⁻¹ de peptona, como proposto por Kerbaux (1984).

O meio de cultura básico C de Knudson com carvão ativado, foi preparado conforme sugerido por Yam e Weatherhead (1990), sendo constituído pelo meio básico suplementado com 0,3% de carvão ativado.

Para cada nutriente, foram preparadas soluções estoques individuais.

Todos os meios de cultura foram preparados a quente, com ajuste prévio de pH com KOH a 1%, ajustado para 5,3 antes da autoclavagem por 15 min a 0,1 atm. A quantidade de meio de cultura por réplica foi de 30 mL, com a utilização de frascos com capacidade de 100 mL.

A interação entre os tipos de meios nutritivos e as condições de iluminação resultou em 12 tratamentos aplicados às culturas assimbióticas das sementes de *B. tyrianthina*.

Com o objetivo de estabelecer a qualidade do lote de sementes a ser ensaiado e a quantidade de sementes a ser inoculadas por frasco de cultura, foram realizados testes de viabilidade de seus embriões como proposto por Singh (1981). Tal teste constituiu em embeber as sementes em água e algumas gotas de detergente e, a seguir, mantê-las por 18 a 20h em 30°C, em uma solução de cloreto de trifênil tetrazólio a 1%.

O processo de inoculação das sementes sobre meio nutritivo incluíram a embebição em água destilada e desinfecção das mesmas com hipoclorito de sódio (solução comercial a 15% diluída em água) e lavagem, por quatro vezes, com água destilada autoclavada, como sugerido por Milaneze (1992). Tais procedimentos foram realizados em fluxo laminar e a inoculação realizada com auxílio de seringas descartáveis.

Após 70 dias, quatro réplicas de cada tratamento foram retiradas dos frascos e incubadas com cloreto de tetrazólio a 1% e analisadas ao microscópio óptico, para a obtenção do percentual de germinação, mortalidade dos protocormos e ocorrência de gemas.

Decorridos nove meses, as plântulas foram retiradas da condição *in vitro* e mensuradas com auxílio de régua, sendo separadas, de acordo com a altura, por tamanho pequeno (0,4 a 2,0 cm), médio (2,3 a 3,5 cm) e grande (3,8 a 10,2 cm).

As plântulas de *B. tyrianthina* foram plantadas em bandeja de plástico transparente (17 cm de largura x 24 cm de comprimento x 5 cm de altura, com

oito furos na parte inferior), contendo o substrato pó de bagaço de cana-de-açúcar (Pó Eco Vegetal-Santa Rita, patente nº 0.403.527-5, Figura 5), na mistura com o pó-de-coco (Vitaplan®, Figura 6) na proporção de 1:1 v v⁻¹, conforme sugerido por Stegani (2006) para a aclimatização de *Miltonia regnellii* x *Oncidium concolor*. Cada bandeja recebeu, em média, 35 plântulas.



Figura 5: Pó Eco Vegetal – bagaço de cana-de-açúcar.



Figura 6 – Vitaplan® – pó-de-coco.

Após o transplântio, as bandejas (Figuras 7) foram mantidas sobre bancadas em casa-de-vegetação com 70% de sombreamento. A temperatura oscilou entre 6,8°C a 34,2°C no período de aclimatização e a umidade relativa do ar esteve entre 20,7 a 95,3% (SIMEPAR, 2006).

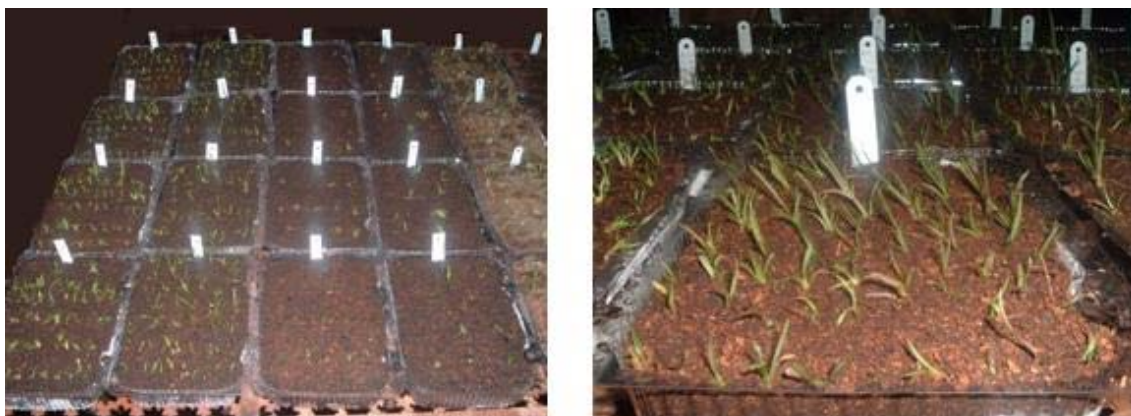


Figura 7 – Disposição das bandejas para aclimatização de *B. tyrianthina*.

Nos seis meses seguintes, os vasos coletivos receberam diariamente irrigação, por aspersão com água da Sanepar (Companhia de Saneamento do Paraná) e adubação com 1 g L⁻¹ de Yogen® nº2, uma vez por semana, sendo então retiradas e analisadas quanto à percentagem de sobrevivência e número de brotações laterais.

Os dados foram submetidos à análise estatística realizada por meio do software InStat, aplicando-se o teste de Kruskal-wallis, seguido de comparações múltiplas de mediana por intermédio de Teste Dunn, com nível de probabilidade de 5%.

3.2 Condução dos experimentos com *Catasetum fimbriatum*, *Cattleya bicolor* e coleta de dados

Na preparação desses ensaios, foram utilizadas sementes de *Catasetum fimbriatum* e *Cattleya bicolor*, provenientes de orquidários particulares da região de Maringá, Paraná.

Para o cultivo assimbiótico, foram preparadas as seguintes formulações nutritivas (meios de cultura): Meio básico – formulação C de Knudson (1946); Meio básico + polpa de banana (ARDITTI et al., 1982) sendo 90 g L⁻¹ de polpa de banana “nanica” na etapa de maturação dos frutos, cujas cascas estão amarelas, ainda sem pintas marrons; Meio básico + carvão ativado (YAM; WEATHERHEAD, 1988) 3 g L⁻¹ de carvão ativado; Meio básico + água de coco (KERBAUY, 1984), sendo 15% da água destilada da fórmula básica substituída por endosperma líquido de *Cocos nucifera* (alíquota proveniente de três frutos

verdes); Meio básico + micronutrientes (ARDITTI et al., 1982); Meio básico + peptona (KERBAUY, 1984) 1 g L⁻¹ de peptona de carne.

Todos os seis tipos de meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,3 antes do processo de autoclavagem de 15 min a 1 atm.

Para a obtenção das plântulas, as sementes de ambas as espécies foram inoculadas assimbioticamente sobre os meios nutritivos citados acima e, após seis meses, ao atingirem a fase de plântulas (aproximadamente 1 cm de altura), mais ou menos 25 plântulas foram transferidas para os meios de cultura acima propostos (100 mL por réplica), permanecendo por mais oito meses em temperatura de 25 ± 3°C, e iluminação contínua (15 µmol m⁻² s⁻¹, com lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo “luz do dia”).

Ao término dos oito meses, a fim de mensurar o desenvolvimento alcançado pelas plântulas; o Índice de Crescimento (IC) foi calculado, como proposto por Spoerl (1948) e modificado por Milaneze (1997), que considera o número de raízes e folhas formadas em cada plântula da cultura.

Na Tabela 1, consta um exemplo de como foi calculado o Índice de Crescimento (IC), o valor para cada réplica foi feito com base na percentual do total multiplicado pela classe. Assim, encontrou-se o valor total do IC por meio da soma dos resultados de cada classe.

Tabela 1 – Cálculo do Índice de Crescimento (IC).

	1f e1r	2f e1r	...	6f e1r	1f e2r	2f e2r	...	6f e2r	...	5f e4r	6f e4r	Total
Classe	1	2	...	6	7	8		12		23	24	24
Número de plântulas	3	4		5	7	2		1		1	2	25
% do total	12	26		20	28	8		4		4	8	100
IC = % do total x classe	12	52		120	196	64		48		92	192	776

f = folha e r = raiz.

As mudas provenientes da propagação *in vitro* foram retiradas dos frascos de cultura e lavadas em água corrente, para remoção do meio de cultura aderido nas raízes. As plântulas utilizadas no experimento apresentaram altura média da parte aérea de 1,5 cm ± 0,3 cm.

Após a análise do cálculo do IC, as plântulas foram plantadas em bandeja de poliestireno expansível (18 cm de largura x 23 cm de comprimento

x 5 cm de altura (Figura 8), com oito furos na parte inferior), contendo os seguintes substratos: xaxim desfibrado (controle), carvão vegetal com cinza (fragmentos com aproximadamente 1,5 cm²) ou pó-de-coco (Vitaplan®), sendo preparadas quatro réplicas para cada uma das espécies e, com os referidos tipos de substrato, observando-se a procedência das mudas (seis tipos de meios de cultura), cada bandeja continha dez mudas cada espécie.



Figura 8 – Bandejas utilizadas na aclimatização de *C. fimbriatum* e *C. bicolor*.

Após o transplântio, as bandejas foram mantidas sobre bancadas em estufa coberta com plástico agrícola e sombrite com 70% de sombreamento. A temperatura oscilou entre 6,6°C a 33,2°C no período de aclimatização e umidade relativa do ar esteve entre 20,7 a 95,3% (SIMEPAR, 2006).

Nos oito meses seguintes, os vasos coletivos receberam diariamente irrigação, por aspersão com água da Sanepar e sem qualquer tipo de adubação, sendo então retiradas e analisadas quanto ao percentual de sobrevivência e número de brotações laterais.

Os dados foram submetidos à análise estatística, realizada utilizando o software InStat, aplicando-se o teste de Kruskal-wallis, seguido de comparações múltiplas de mediana por intermédio de Teste Dunn, com nível de probabilidade de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de diferentes aditivos no desenvolvimento de plântulas de *Bifrenaria tyrianthina*

Em *Bifrenaria tyrianthina* (Loudon) Rchb.f. (Tabela 2), foi possível constatar que o fotoperíodo e a ausência de iluminação determinaram a maior porcentagem média de sementes germinadas, independente da composição do meio nutritivo. De acordo com Waes e Debergh (1986), foram estudados vários fatores de germinação em 23 orquídeas européias, podendo-se destacar que a germinação aconteceu no escuro em uma temperatura de 23°C. Pierik et al. (1988) mostram, em seu trabalho com *Paphiopedium ciliolare*, que a ausência de iluminação nas primeiras fases de seu desenvolvimento, induz à organogênese de protocormos, aumentando o vigor de suas plântulas ao serem transferidas para a luz.

Tabela 2 – Análise da cultura assimbiótica de *Bifrenaria tyrianthina* quanto à porcentagem média de germinação das sementes e formação de protocormos em resposta ao meio de cultura e das condições de iluminação.

Parâmetros analisados	Meios de cultura	Condições de iluminação				
		Luz Branca		Luz Grolux		Escuro
		Luz contínua	Fotoperíodo 14h	Luz contínua	Fotoperíodo 14h	
sementes germinadas	Kc	30,37%	79,75%	43,05%	81,77%	96,50%
	Kc + carv	37,10%	97,17%	5,45%	95,10%	98,95%
	Kc + pep	79,97%	94,62%	40,72%	92,32%	97,92%
	Kc + micro	59,97%	82,47%	82,65%	94,62%	97,22%
protocormos vivos	Kc	28,51%	22,92%	32,94%	27,73%	52,50%
	Kc + carv	63,10%	60,91%	4,86%	56,26%	54,08%
	Kc + pep	43,95%	65,02%	28,25%	72,21%	58,17%
	Kc + micro	28,33%	10,14%	42,24%	28,23%	51,26%
protocormos vivos "com gemas"	Kc	0,17%	0,00%	0,09%	0,00%	0,00%
	Kc + carv	0,09%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Kc + pep	0,01%	0,00%	0,15%	0,00%	0,00%
	Kc + micro	0,03%	0,00%	0,04%	0,00%	0,00%

Meio Knudson = (Kc), meio Knudson adicionado de carvão vegetal = (Kc + carv), meio Knudson adicionado de peptona = (Kc + pep) e meio Knudson adicionado de micronutrientes = (Kc + micro).

O meio nutritivo Knudson com a presença de carvão ativado é superior em relação aos outros meios, uma vez que sua utilização apontou uma média de germinação equivalente a 99%, seguido do meio Knudson adicionado de peptona em que 98% das sementes germinaram.

Buyun et al. (2004) realizaram experimento com *Cattleya aclandiae*, *Cattleya bowringiana*, *Cattleya granulosa*, *Cattleya percivaliana* "O'Brien", *Cattleyopsis lindenii* e *Dendrobium parishii* no qual obtiveram a maior porcentagem de germinação (100%), com o meio Knudson suplemento com 2 g L⁻¹ de peptona e 1 g L⁻¹ de carvão ativado. Contudo, esse mesmo meio, em presença de luz contínua do tipo Grolux, propiciou menor percentual de germinação de *B. tyrianthina*, com média de 5%.

As condições de iluminação variam na quantidade (extensão do fotoperíodo) e na qualidade do espectro luminoso e intensidade luminosa utilizada (ARDITTI, 1967, 1979; ARDITTI; ERNST, 1984); o meio Knudson adicionado de carvão ativado sob luz branca e fotoperíodo de 14 h, também proporcionou resultado positivo, em que cerca de 97% das sementes germinaram.

Quanto aos resultados relativos à sobrevivência dos protocormos, o meio nutritivo com adição de carvão ativado proporcionou menor média equivalente a 5% na presença de luz contínua do tipo Grolux. Nesse contexto, Arditti e Krikorian (1996) salientam que a germinação das sementes de orquídeas é favorecida com a presença do carvão ativado. Por sua vez, Rodrigues et al. (2003) analisaram que dentre diferentes concentrações de carvão ativado testadas, a concentração de 0,5 g L⁻¹ viabiliza a germinação das sementes, independente do pH do meio de cultura. Segundo Groll, Gray e Mycock (2002), os efeitos do carvão ativado podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta.

Constatou-se que o meio nutritivo básico Knudson (0,17%) promoveu o maior número de formação de gemas no polo meristemático (com duas gemas) na presença de luz contínua do tipo branca, seguido do meio Knudson adicionado peptona sob luz contínua do tipo Grolux (0,15%).

A adição de 1 g L⁻¹ de peptona ao meio nutritivo básico Knudson sob luz Grolux com fotoperíodo foi mais eficiente na formação de protocormos, com uma média de 75%, conforme sugerido por Kerbaudy (1984), Kraus e Monteiro

(1989), Kerbauy e Estelita (1996), Chen e Chang (2000) e Chen, Chen e Chang (2002) no cultivo de orquídeas.

A germinação e capacidade de regeneração das sementes de orquídeas da espécie *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr foram testadas em meio Knudson, suplementado com leite de coco 15% (v v⁻¹), peptona (2 g L⁻¹), BAP (6-benzilaminopurina) (2 mg L⁻¹), e 1 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético) tendo como resultado 88% de sementes germinadas.

Após o 9º mês de cultivo, as plântulas de *B. tyrianthina* foram separadas por tamanho pequeno (P), médio (M) e grande (G) para a análise verificado o número de raízes, de folhas e de gemas. Posteriormente, foram colocadas em bandejas para a aclimatização. Sendo 1.256 plântulas de tamanho pequeno, 660 plântulas de tamanho médio e 284 plântulas de tamanho grande, num total de 2.200 plântulas.

Para a formação de raízes de tamanho P de *B. tyrianthina*, o fotoperíodo de 14 h proporcionou aos meios nutritivos: básico com adição de carvão ativado ou micronutrientes, a mediana de uma raiz por plântula; contudo o carvão ativado estabeleceu a mesma medida sob qualquer tipo de iluminação (Tabela 3). O carvão ativado tem sido bastante utilizado no cultivo *in vitro* para estimular o enraizamento, principalmente, pela sua alta capacidade em excluir a luz do meio (PASQUAL, 2001).

Em seus trabalhos, Coelho et al. (2001) e Mantovani, Franco e Vestena (2001) observaram efeitos positivos do carvão ativado quanto ao enraizamento, alongação e engrossamento das raízes. Para Shi et al. (2000), a adição de carvão ativado ao meio de cultura MS determina maior crescimento das plântulas de *Dendrobium officinale*. George e Ravishanker (1997) destacam que o meio de cultivo MS modificado com a metade da concentração dos macronutrientes, contendo 0,2% de carvão ativado induz raízes em *Vanilla planifolia*. O carvão ativado beneficia a qualidade da plântula *in vitro* e aumenta a taxa de sobrevivência dos explantes, para *Miltonia flavescens* e *Laelia flava*. Resultados significativos também foram obtidos com a metade dos suplementos do meio do MS adicionado com 2 g L⁻¹ de carvão ativado para *M. flavescens* e *L. flava*, e para *Oncidium trulliferum* o meio MS suplementado com o 1 g L⁻¹ do carvão ativado (MORAES; FARIA; CUQUEL, 2005).

Tabela 3 – Número mediano de raízes de *Bifrenaria tyrianthina* em resposta ao meio de cultura e condições de iluminação.

Tamanho das plântulas	Meios de cultura	Condições de iluminação			
		Luz Branca		Luz Grolux	
		Luz contínua	Fotoperíodo 14 h	Luz contínua	Fotoperíodo 14 h
Pequeno (0,4 a 2,0 cm) Mínimo	Kc	0,00	0,00	0,00	0,00
	Kc + carv	0,00	0,00	0,00	0,00
	Kc + pep	0,00	0,00	0,00	0,00
	Kc + micro	0,00	0,00	0,00	0,00
Pequeno (0,4 a 2,0 cm) Mediana	Kc	0,00	1,00	0,00	1,00
	Kc + carv	1,00	1,00	1,00	1,00
	Kc + pep	0,00	0,00	0,00	0,00
	Kc + micro	0,00	1,00	1,00	1,00
Pequeno (0,4 a 2,0 cm) Máximo	Kc	4,00	5,00	7,00	4,00
	Kc + carv	4,00	2,00	3,00	3,00
	Kc + pep	2,00	2,00	1,00	1,00
	Kc + micro	3,00	2,00	4,00	3,00
Médio (2,3 a 3,5 cm) Mínimo	Kc	0,00	0,00	0,00	0,00
	Kc + carv	2,00	0,00	0,00	1,00
	Kc + pep	0,00	0,00	0,00	0,00
	Kc + micro	0,00	0,00	0,00	1,00
Médio (2,3 a 3,5cm) Mediana	Kc	1,00	1,00	1,00	1,00
	Kc + carv	3,00	1,00	1,00	2,00
	Kc + pep	0,00	0,00	0,00	1,00
	Kc + micro	1,00	1,00	1,50	3,00
Médio (2,3 a 3,5 cm) Máximo	Kc	3,00	5,00	8,00	4,00
	Kc + carv	5,00	3,00	5,00	4,00
	Kc + pep	1,00	1,00	1,00	2,00
	Kc + micro	5,00	3,00	4,00	4,00
Grande (3,8 a 10,2 cm) Mínimo	Kc	1,00	0,00	1,00	1,00
	Kc + carv	1,00	1,00	1,00	2,00
	Kc+ pep	0,00	0,00	0,00	0,00
	Kc+micro	0,00	1,00	1,00	2,00
Grande (3,8 a 10,2 cm) Mediana	Kc	2,00	2,00	2,50	3,00
	Kc + carv	3,00	2,00	2,00	5,00
	Kc + pep	0,50	0,00	1,00	1,00
	Kc + micro	2,00	1,50	2,50	3,00
Grande (3,8 a 10,2 cm) Máximo	Kc	3,00	4,00	6,00	6,00
	Kc + carv	6,00	4,00	7,00	7,00
	Kc + pep	2,00	3,00	4,00	2,00
	Kc + micro	5,00	4,00	7,00	7,00

Meio Knudson = (Kc), meio Knudson adicionado de carvão vegetal = (Kc+ carv), meio Knudson adicionado de peptona = (Kc + pep) e meio Knudson adicionado de micronutrientes = (Kc + micro). A análise estatística foi realizada através do software InStat, aplicando-se o teste de Kruskal-wallis, seguido de comparações múltiplas de mediana por intermédio de Teste Dunn, com nível de probabilidade de 5%

Morales (2004) ressalta que meio de cultura kC, contendo 5,0 g L⁻¹ de carvão ativado provoca diminuição no número de raízes de *C. fimbriatum*.

Em relação à Tabela 3, observa-se que o meio Kc + carvão ativado sob luz branca contínua contribuiu para a maior mediana de raízes de tamanho M,

com um total de três raízes; Arditti e Ernst (1984) relataram que o fator luminosidade é indispensável para a indução e crescimento de gemas e raízes sobre os protocormos e plântulas *in vitro* e como verificaram experimentalmente Ueda e Torikata (1972) para espécies de *Cymbidium* e Milaneze, Thomaz e Takaki (1990) para *Cattleya guttata*. Quanto à adição de carvão em promover resultado positivo, no desenvolvimento de *B. tyrianthina*; o mesmo foi verificado por Ernst (1975), Hinnen, Pierik e Bronsema (1989) e Moraes, Faria e Cuquel (2005) quando adicionaram carvão ativado no meio de cultura e também obtiveram resultados positivos no crescimento e desenvolvimento de diversas espécies de orquídeas. Faria et al. (2002) utilizaram o meio MS modificado com a metade da concentração dos macronutrientes, suplementado com a adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura, obteve efeitos benéficos no desenvolvimento vegetativo das plântulas de *Cattleya walkeriana*.

Nesse estudo, observou-se que o meio Knudson adicionado de micronutrientes sob a luz do tipo Grolux e fotoperíodo, também promoveu a mediana de três raízes por plântulas de tamanho M (Tabela 3). Confirmando o que Soares et al. (2008a) verificaram com plântulas de *Cattleya loddgesii*, quando propagadas *in vitro* em meio de cultura Knudson C, modificado com a adição de micronutriente (0,045 mg L⁻¹ de cloreto de cobalto), o cobalto ou o cloro presente no CoCl₂.6H₂O contribuíram para o aumento do número de raízes, influenciando no comprimento médio do sistema radicular. Indicando, assim, que para promover o comprimento médio do sistema radicular, a adição de fontes de cobalto no meio Knudson é benéfica. Ainda, em relação às plântulas de *C. loddgesii*, Soares et al. (2008b) realizaram outro experimento com suplementação de micronutriente (silicato de sódio e Supa Potássio®) em meio Knudson C, constatando a ação benéfica que o silício possui associada a diversos efeitos indiretos, como o aumento da eficiência da capacidade fotossintética, redução da transpiração e aumento da resistência mecânica das células, resultados expressivos para o número de raízes e comprimento médio de raízes dessa orquídea foram verificados com 5 mg L⁻¹ de Supa Potássio® associada a altas concentrações de silicato de sódio (entre 10 e 20 mg L⁻¹).

Para *B. tyrianthina*, o meio Knudson suplementado com 1,0 g L⁻¹ peptona ofereceu o menor índice de mediana para raízes de tamanho M; Gonçalves (2006), utilizando também 1 g L⁻¹ de peptona em seu experimento

com *E. randii* e *Laelia purpurata*, salientou que a peptona adicionada ao meio Knudson C não apresenta resultados positivos. Já Kerbauy (1984a) observou que nos meios nutritivos com peptona, os ápices de raízes de um híbrido de *Catasetum* formaram calos verdes-escuros e alguns formaram PLBs; o que não foi verificado por Morales (2004) com *Enciclia randii*.

A análise das plântulas de *B. tyrianthina* revelou amplas variações quanto à raízes de tamanho G (Tabela 3). O meio básico com adição de carvão ativado sob iluminação de fotoperíodo e luz do tipo Grolux demonstrou o maior número de mediana com cinco raízes por plântulas, sendo a mínima de duas e a máxima de sete raízes, seguido do meio Knudson suplementado com carvão ativado sob iluminação contínua branca com a mediana de três raízes. Para esse padrão, também se destaca a peptona como o suplemento menos eficiente, apresentando uma mediana mínima de zero e máxima de quatro raízes.

Conclui-se que o carvão adicionado ao meio Knudson promoveu as maiores medianas de tamanho G para raízes de *B. tyrianthina*, independente da iluminação. Corrêa et al. em 2003 já haviam salientado que fisicamente, o carvão ativado simula a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem de forma mais satisfatória; tendo o carvão ativado efeito adicional, ao de promover o escurecimento do meio de cultura (PRIZÃO, 2006). As concentrações em torno de 0,3% são usadas quando se deseja enraizamento *in vitro*, pois auxiliam na ação das auxinas, e promovem a fixação dos compostos fenólicos produzidos pelo explante (GUERRA; NODARI, 2006).

Araújo (2004) verificou, em *Laelia tenebrosa*, um aumento no número e crescimento de raízes, quando adicionados 4 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura. Conforme Prizão (2006), o emprego de carvão ativado é efetivo para promover o crescimento das raízes das plântulas de *C. bicolor* (3,0 g L⁻¹) e do híbrido 'BLC Pastoral Innocence' (4,5 g L⁻¹).

O carvão ativado também tem sido utilizado na cultura *in vitro* de várias espécies de epífitas, com resultados satisfatórios, como confirmado no desenvolvimento de brotos e na formação de raízes em *Vriesea gigantea* e *Vriesea philippocoburgii*; nesse experimento, foram adicionados 0,5% de carvão ativado ao meio Knudson básico e ao meio MS com a metade da concentração, tendo o segundo meio promovido resultados expressivos para o desenvolvimento de *V. gigantea* (DROSTE et al., 2005).

Para a formação de folhas de tamanho P em *B. tyrianthina*, o meio Kc suplementado, com peptona sob luz contínua branca, foi o que proporcionou a maior mediana, com oito folhas por plântulas (Tabela 4), sendo a mediana mínima de duas folhas e a mediana máxima de 20 folhas.

Tabela 4 – Número mediano de folhas de plântulas de *Bifrenaria tyrianthina* em resposta ao meio de cultura e condições de iluminação.

Tamanho das plântulas	Meios de cultura	Condições de iluminação			
		Luz Branca		Luz GroLux	
		Luz contínua	Fotoperíodo 14 h	Luz contínua	Fotoperíodo 14 h
Pequeno (0,4 a 2,0 cm) Mínimo	Kc	2,00	2,00	2,00	2,00
	Kc + carv	2,00	1,00	1,00	3,00
	Kc + pep	2,00	2,00	3,00	2,00
	Kc +micro	2,00	1,00	2,00	1,00
Pequeno (0,4 a 2,0 cm) Mediana	Kc	4,00	4,00	4,00	4,00
	Kc + carv	5,50	3,00	4,00	6,00
	Kc + pep	8,00	4,00	5,00	6,00
	Kc +micro	4,00	4,00	3,00	3,00
Pequeno (0,4 a 2,0cm) Máximo	Kc	21,00	10,00	29,00	6,00
	Kc + carv	24,00	7,00	20,00	12,00
	Kc + pep	20,00	16,00	15,00	12,00
	Kc +micro	8,00	12,00	8,00	5,00
Médio (2,3 a 3,5 cm) Mínimo	Kc	3,00	3,00	2,00	3,00
	Kc + carv	2,00	2,00	2,00	4,00
	Kc + pep	2,00	2,00	2,00	2,00
	Kc +micro	2,00	2,00	2,00	1,00
Médio (2,3 a 3,5 cm) Mediana	Kc	5,00	5,00	5,00	4,00
	Kc + carv	7,50	4,00	5,00	6,50
	Kc + pep	5,50	6,00	4,50	4,50
	Kc + micro	4,00	5,00	4,00	2,00
Médio (2,3 a 3,5 cm) Máximo	Kc	14,00	10,00	12,00	12,00
	Kc + carv	16,00	7,00	24,00	8,00
	Kc + pep	30,00	12,00	9,00	18,00
	Kc + micro	30,00	8,00	10,00	4,00
Grande (3,8 a 10,2cm) Mínimo	Kc	4,00	2,00	3,00	1,00
	Kc + carv	2,00	3,00	3,00	1,00
	Kc + pep	3,00	3,00	2,00	3,00
	Kc + micro	2,00	4,00	2,00	3,00
Grande (3,8 a 10,2 cm) Mediana	Kc	6,00	4,00	5,00	4,50
	Kc + carv	6,00	5,50	5,00	4,00
	Kc + pep	7,00	5,00	5,50	4,00
	Kc +micro	4,00	5,00	3,00	4,00
Grande (3,8 a 10,2 cm) Máximo	Kc	12,00	15,00	9,00	10,00
	Kc + carv	12,00	8,00	20,00	9,00
	Kc + pep	8,00	8,00	12,00	12,00
	Kc + micro	12,00	7,00	14,00	5,00

Meio Knudson = (Kc), meio Knudson adicionado de carvão vegetal = (Kc + carv), meio Knudson adicionado de peptona = (Kc + pep) e meio Knudson adicionado de micronutrientes = (Kc + micro). A análise estatística foi realizada através do software InStat, aplicando-se o teste de Kruskal-wallis, seguido de comparações múltiplas de mediana por intermédio de Teste Dunn, com nível de probabilidade de 5%.

Sendo confirmado por Arditti et al. (1982), quando eles salientam que a peptona é um suplemento orgânico que contém significativas concentrações de diversos tipos de aminoácidos, tais como arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, lisina, e glicina. Este último aminoácido está presente na formulação do meio de cultura de Murashige e Skoog (1962), sendo considerado como indispensável para o desenvolvimento dos tecidos vegetais *in vitro*.

A adição de peptona ao meio nutritivo (BM), para Mitra (1971), suplementado com auxinas acelera o processo de organogênese em orquídeas da espécie *Rhynchostylis retusa* (VIJ et al., 1984); e quando esse meio é suplementado com 2 g L⁻¹ de peptona promove o aparecimento de brotos em *Renanthera imschootiana* (SEENI; LATHA, 1992). Em geral, a peptona promove resultados expressivos no desenvolvimento e proliferação de protocormos, variando de espécie para espécie (SZENDRAK, 1997).

O meio básico com carvão ativado em condição de luz contínua branca proporcionou o maior número de mediana para folhas médias (7,5) em *B. tyrianthina*, em que a mínima foi de duas folhas e o máximo de 16 folhas por plântulas; seguido do mesmo meio em fotoperíodo de 14h e luz do tipo Grolux, com a mediana de 6,5. O que confirma os resultados de Morales (2004), em que o efeito das concentrações do carvão ativado sobre a formação de folhas nas plântulas de *C. fimbriatum* foi estudado e concluído que um desenvolvimento significativamente maior acontece quando as plântulas são mantidas em meio de cultura contendo 5,0 g L⁻¹. O carvão ativado adicionado ao meio MS também induziu a multiplicação de PLBs em *Cymbidium pendulum* (KANIKI, 2003).

Silva (2003), em seu estudo com *Brassiocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow, constatou que o carvão ativado na concentração de 200 mg L⁻¹ inibe a formação de folhas. Já para outras espécies de orquídeas, como a *C. bicolor*, o número de folhas formadas não é diferente nas plântulas mantidas em meio de cultura Kc contendo diferentes concentrações de carvão ativado (1,5; 3,0; 4,5; 6,0 e 7,5 g L⁻¹), indicando que a adição das diversas concentrações do carvão ativado não afetam o desenvolvimento das folhas nesta espécie (PRIZÃO, 2006).

Em relação à formação de folhas de tamanho médio de *B. tyrianthina* (Tabela 4), pode-se destacar que a adição de micronutrientes ao meio Knudson sob fotoperíodo com luz do tipo Grolux foi inferior aos demais meios e iluminação.

Para a formação de folhas com tamanho mediano grande de *B. tyrianthina*, a luz branca contínua destacou-se, conforme ressaltado por Gonçalves (2006) com *E. randii*, em que a manutenção em iluminação contínua aumentou a produção inicial de mudas. Ainda, observa-se, nesse estudo, que o maior número mediano de folhas formadas, ocorreu sob a iluminação branca contínua, independente do tamanho das plântulas de *B. tyrianthina*.

O meio básico que contém peptona foi o mais significativo para formação de folhas grandes em *B. tyrianthina* sob luz branca contínua, apresentando uma mediana de sete folhas por plântulas, com mínima de três e máxima de oito folhas. O que confirma o resultado obtido no estudo de *E. randii*, realizado por Morales (2004), em que o uso de fontes protéicas, como a peptona (1000 mg L^{-1}), influenciou positivamente na formação de folhas.

Observa-se que, para formação de gemas em *B. tyrianthina*, a luz contínua foi a ideal (Tabela 5). Em 1997, Milaneze verificou que a quantidade diária de iluminação recebida pelas plântulas aumentou o número de folhas e raízes formadas.

Tabela 5 – Número mediano de gemas nas plântulas de *Bifrenaria tyrianthina* em resposta ao meio de cultura em condições de iluminação.

Gemas	Meios de cultura	Condições de iluminação			
		Luz Branca		Luz Grolux	
		Luz contínua	Fotoperíodo 14 h	Luz contínua	Fotoperíodo 14 h
Mínimo	Kc	1,00	1,00	1,00	0,00
	Kc + carv	1,00	1,00	1,00	0,00
	Kc + pep	1,00	1,00	1,00	0,00
	Kc + micro	1,00	0,00	1,00	0,00
Mediana	Kc	1,00	1,00	2,00	1,00
	Kc + carv	2,00	1,00	2,00	0,00
	Kc + pep	2,00	1,50	1,00	0,50
	Kc + micro	1,00	0,00	1,00	0,00
Máximo	Kc	7,00	3,00	7,00	2,00
	Kc + carv	6,00	3,00	6,00	3,00
	Kc + pep	8,00	5,00	3,00	5,00
	Kc + micro	6,00	2,00	2,00	2,00

Meio Knudson= (Kc), meio Knudson adicionado de carvão vegetal = (Kc+ carv), meio Knudson adicionado de peptona = (Kc + pep) e meio Knudson adicionado de micronutrientes = (Kc + micro).

A análise estatística foi realizada através do software InStat, aplicando-se o teste de Kruskal-wallis, seguido de comparações múltiplas de mediana por intermédio de teste Dunn, com nível de probabilidade de 5%.

Para *B. tyrianthina* os meios: básico, básico contendo carvão ativado e meio básico com peptona, sob luz contínua proporcionaram a maior mediana de gemas, sendo duas por plântulas. O meio básico acrescido de carvão ativado promoveu o mesmo resultado tanto em luz branca ou Grolux.

Kerbaux (1984), ao cultivar microinflorescências de *Oncidium varicosum in vitro*, verificou o desenvolvimento de PLBs, que quando cultivadas por um período de oito a nove meses, desenvolveram-se em plântulas; assim, 30% dessas formaram uma pequena flor em meios nutritivos, contendo 1 g L⁻¹ de carvão ativado.

Silva (2003), em seu estudo com BC Pastoral x LC Amber Glow, constatou que o carvão ativado na concentração de 200 mg L⁻¹ promove a formação de maior número de brotos. A adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio MS com a metade da concentração de macronutrientes é benéfico para a propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* (FARIA et al., 2002), confirmando os resultados encontrados para a formação de gemas de *B. tyrianthina* com a adição de carvão ao meio Knudson.

O meio básico adicionado de peptona sob luz branca contínua proporcionou a mediana máxima de oito gemas por plântulas de *B. tyrianthina*, o que reforça os estudos de Morales (2004) com plântulas de *E. randii*, em que a biomassa fresca da parte aérea e das raízes das plântulas mantidas sob a influência da peptona, foi relativamente maior.

O fotoperíodo não proporcionou resultados recomendáveis para formação de gemas de *B. tyrianthina*, principalmente para o meio Knudson adicionado de micronutrientes e também para o meio Knudson adicionado de carvão sob luz Grolux (Tabela 5). Portanto, a adição de carvão ativado ao meio de cultivo nem sempre tem se mostrado vantajoso (MOURA; MENEZES; LEMOS, 2008).

Ao observar a Figura 9Ab, verifica-se que o meio Knudson adicionado de carvão sob a luz Grolux e fotoperíodo de 14h promoveu as maiores plântulas de tamanho grande, porém em menor quantidade (somente seis plântulas, correspondendo a 2,11% das plântulas tamanho grande) e sem a formação (mediana) de gemas.



Figura 9 – Plântulas de *Bifrenaria tyrianthina*, consideradas de tamanho grande, submetidas aos tratamentos: a – Knudson, b – Knudson mais carvão, c – Knudson mais peptona, d – Knudson mais micronutrientes. Barra = 2 cm.

Já o meio Knudson adicionado de micronutrientes sob a luz Grolux e iluminação contínua (Figura 9Cd), também promoveu bom desenvolvimento de plântulas consideradas de tamanho grande, mas o número mediano de raízes, folhas e gemas foi inferior ao meio Knudson adicionado de carvão ativado sob a luz branca com iluminação contínua (Figura 9Db), meio esse que

proporcionou o maior número mediano de raízes (3), folhas (7,5) e gemas (2) por plântulas.

4.2 Efeito de diferentes aditivos no desenvolvimento de plântulas de *Catasetum fimbriatum* e *Cattleya bicolor*

Os dados da Tabela 6 ilustram a análise do Índice de Crescimento de *Cattleya bicolor* Lindl. em função do meio de cultura.

Tabela 6 – Análise do índice de crescimento de *Cattleya bicolor* em resposta ao meio de cultura.

Tratamentos	Mediana	Mínimo	Máximo
Knudson	2621,00 ^b	1663,00	3346,00
Banana	1443,50 ^a	1170,00	1600,00
Carvão ativado	1963,00 ^{ab}	1121,00	2257,00
Coco	2152,50 ^{ab}	1795,00	2455,00
Micronutrientes	2126,00 ^{ab}	934,00	2671,00
Peptona	2448,50 ^b	2012,00	3614,00

A análise estatística foi realizada pelo software InStat, aplicando-se o teste de Kruskal-wallis, seguido de comparações múltiplas de mediana por intermédio de teste Dunn, com nível de probabilidade de 5%.

O tratamento Knudson básico promoveu a maior mediana no índice de crescimento de *Cattleya bicolor*, seguido desse meio adicionado peptona, o que significa maior número de folhas e raízes em relação aos demais meios, para o cultivo de orquídeas. Comprovando os resultados já diagnosticados por Morales (2004) com o uso de peptona, influenciando positivamente a formação de folhas de *E. randii*. Mas a eficiência da utilização de peptona na cultura assimbiótica de orquídeas não deve ser generalizada (GONÇALVES, 2006).

A adição de banana ao meio Knudson produziu o menor índice de crescimento em *C. bicolor* (Tabela 6). Tais dados contradizem as afirmações de: Torres et al. (2001) ao mencionarem que a polpa de banana produz diferentes efeitos, tais como espessamento do sistema radicular, desenvolvimento da parte aérea, emissão de brotos adventícios; Arditti e Ernst (1993) confirmaram que a adição de polpa de banana aumenta o número de brotos no cultivo de plântula de orquídea *in vitro* e, Silva (2003) ao afirmar que as concentrações de polpa de banana incorporadas ao meio Knudson

influenciaram o desenvolvimento da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow* de maneira significativa, com ocorrência de maior número de brotos, quando adicionadas 75 gL⁻¹ de polpa; provavelmente, pelos elementos existentes na composição da polpa de banana que estimularam a multiplicação *in vitro* da plântula. Já para Arditti et al. (1982), o uso da polpa de banana no cultivo *in vitro* de orquídeas também tem sido relacionado com processos de inibição da germinação de sementes.

Gonçalves (2006) evidenciou que a utilização de aditivos indeterminados (água de coco, polpa de banana e carvão ativado) tem efeitos mais pronunciados que a adição de suplementos determinados, como micronutrientes ao meio de cultura Kc para o cultivo *in vitro* das espécies *E. randii* e *L. purpurata*.

Para o crescimento de *Catasetum fimbriatum* (E. Morren) Lind. & Paxton, a adição de banana ao meio de cultura Knudson tornou-se mais eficiente (Tabela 7). Os dados condizem com as afirmações de Arditti e Ernst (1993) ao sugerirem que a adição de polpa de banana aumenta o número de brotos no cultivo de plântula de orquídea *in vitro*.

Tabela 7 – Análise do índice de crescimento de *Catasetum fimbriatum* em resposta ao meio de cultura.

Tratamentos	Mediana	Mínimo	Máximo
Knudson	958,00 ^{ab}	442,00	1708,00
Banana	1441,00 ^b	1371,00	1576,00
Carvão ativado	1282,50 ^{ab}	1034,00	1458,00
Coco	640,50 ^a	521,00	708,00
Micronutrientes	606,50 ^a	494,00	805,00
Peptona	1121,50 ^{ab}	929,00	1376,00

A análise estatística foi realizada pelo software InStat, aplicando-se o teste de Kruskal-wallis, seguido de comparações múltiplas de mediana por intermédio de teste Dunn, com nível de probabilidade de 5%.

Para o gênero *Paphiopedilum*, a adição de polpa de banana ao meio MS determina o desenvolvimento de gemas caulinares e não de raízes (HUANG et al., 2001). De acordo com Seeni e Latha (1992), o meio nutritivo (BM) enriquecido com 10% água de coco e 35 g L⁻¹ de polpa de banana madura resulta na produção de um número maior brotos em *Renanthera*

imschootiana. Em *L.purpurata*, foi possível evidenciar um marcante efeito da adição de polpa de banana ao meio Kc, determinando a morte dos explantes, e nenhum efeito negativo na formação das plântulas (GONÇALVES, 2006).

A adição de polpa de banana tem sido recomendada apenas na fase de plântulas para o desenvolvimento de partes aéreas e radiculares (SHIAU et al., 2002). Desta forma, o efeito da adição de polpa de banana poderá ser diferente, dependendo da composição básica do meio, da espécie de planta, e do explante cultivado *in vitro* (GONÇALVES, 2006).

O meio Knudson adicionado de micronutriente proporcionou menor índice de crescimento em *C. fimbriatum*; Diniz et al. (1999) salientam que o Fe (micronutriente) e o Cu são os nutrientes absorvidos em maior e menor quantidade pelos explantes, respectivamente, as quantidades de micronutrientes totais absorvidas pelos explantes, tomando como base o Fe, seguem a ordem: Fe > Mn > Zn > B > Cu; no preparo do meio de cultivo, é necessário verificar o teor de Cu nos reagentes, principalmente, no ágar, na tentativa de evitar problemas de excesso e toxicidade.

Para o desenvolvimento *C. fimbriatum*, o meio Knudson adicionado água de coco, também não proporcionou resultados positivos. Em relação à eficiência da água de coco para a manutenção de explantes vivos no cultivo assimbiótico de *L. purpurata*, o efeito positivo deste composto não foi evidente para a formação de plântulas e/ou desenvolvimento de partes aéreas e radiculares (GONÇALVES, 2006); confirmando os resultados obtidos no estudo com *C. fimbriatum*. Cabe ressaltar que, em geral, a água de coco resultou em desenvolvimento e proliferação de protocormos em 25 espécies de orquídeas estudadas por Szendrak (1997) variando de espécie para espécie.

4.3 Efeito dos substratos bagaço de cana-de-açúcar e pó-de-coco na aclimatização de *Bifrenaria tyrianthina*

A aclimatização com bagaço de cana-de-açúcar e pó-de-coco não surtiu resultado nas circunstâncias desse experimento, uma vez que as plântulas não sobreviveram; conseqüentemente, esse substrato, nessa condição, não pode ser indicado na aclimatização de *Bifrenaria tyrianthina*, independente do tamanho das plântulas utilizadas. Esse resultado contraria a

pesquisa realizada por Stegani (2006) em que o substrato bagaço de cana-de-açúcar e pó-de-coco (1:1 v v⁻¹) pode ser indicado para substituir o xaxim na aclimatização da orquídea *Miltonia regnellii* x *Oncidium concolor*.

4.4 Efeito dos substratos xaxim desfibrado e pó-de-coco na aclimatização de *Catasetum fimbriatum* e *Cattleya bicolor*

A Tabela 8 mostra que, na aclimatização de *C. bicolor*, o substrato xaxim e pó-de-coco são mais indicados quando as plântulas advierem do meio Knudson adicionado à banana. Segundo Gonçalves (2006), a adição de polpa de banana pode produzir efeitos diversos, dependendo da cultivar e da quantidade utilizada; desta forma, o efeito da adição de polpa de banana será diferente e deve depender da composição básica do meio, da espécie de planta e do explante cultivado *in vitro*.

Tabela 8 – Número mediano de gemas de plântulas de *Cattleya bicolor* em resposta ao meio de cultura e substrato após aclimação.

Tratamentos	Mediana	Mínimo	Máximo
Xaxim banana	2,00 ^a	1,00	4,00
Xaxim Micronutrientes	1,00 ^a	1,00	2,00
Xaxim peptona	1,50 ^a	1,00	3,00
Xaxim coco	1,00 ^a	1,00	4,00
Xaxim carvão vegetal	1,00 ^a	1,00	2,00
Xaxim Knudson	1,00 ^a	1,00	3,00
Pó coco banana	2,00 ^a	1,00	4,00
Pó coco micronutrientes	1,00 ^a	1,00	1,00
Pó coco peptona	1,00 ^a	1,00	1,00
Pó coco coco	1,00 ^a	1,00	1,00
Pó coco carvão vegetal	1,00 ^b	1,00	2,00
Pó coco Knudson	1,00 ^a	1,00	4,00

A análise estatística foi realizada pelo software InStat, aplicando-se o teste de Kruskal-wallis, seguido de comparações múltiplas de mediana por intermédio de teste Dunn, com nível de probabilidade de 5%.

Assis et al. (2005) ressaltam que a utilização do coco como substrato consiste numa alternativa para a preservação da samambaiçu, além disso, ajuda a diminuir o volume de resíduos gerados; sugere-se, ainda, a substituição do xaxim por coco desfibrado e pela mistura de coco em pó com coco em cubos no cultivo da orquídea *Dendrobium nobile*. A fibra de coco pode ser considerada um substituto ao xaxim no cultivo do híbrido da orquídea

Cattleya labiata X *Cattleya forbesii* (YAMAKAMI et al., 2006). Stegani (2006) afirma que o pó-de-cocopuro também pode ser indicado para substituir o xaxim na aclimatização da orquídea *Miltonia regnellii* x *Oncidium concolor*.

A aclimatização com fragmentos de carvão vegetal não surtiu resultado, uma vez que nenhuma das plântulas sobreviveu. O carvão vegetal traz bons resultados em lugares de muita chuva, pois o mesmo não se decompõe e não encharca; contudo, por ser muito leve, não segura a planta e, em razão de sua porosidade, tende a acumular sais minerais; portanto, esta é uma das razões pelas quais, o carvão vegetal deve ser regado com água pura frequentemente; e quando misturado ao xaxim, controla um pouco sua acidez, conservando-o por mais tempo, uma vez que ele funciona como um filtro (SENAI, 2006).

Quanto ao *C. fimbriatum*, não houve formação de brotos laterais em relação aos substratos pó-de-coco e xaxim; Assis et al. (2005) argumentam que o número de brotos é uma variável muito importante para os comerciantes de orquídeas, visto que na maioria das espécies, as flores são produzidas apenas nos ramos novos. Como é o caso da *C. bicolor* que no carvão vegetal não houve plântulas sobreviventes após o período de aclimatização. O substrato carvão vegetal com cinzas não foi adequado para a manutenção das plântulas, uma vez que o mesmo não retém água, mostrando-se seco poucas horas após a irrigação. Pode-se dizer que tais dados estão diretamente relacionados com a baixa capacidade de resistência ao estresse hídrico das plântulas advindas do cultivo *in vitro*. Grattapaglia e Machado (1990) apontam que a manutenção de uma alta umidade relativa no ambiente, durante a fase de aclimatização de mudas, é de suma importância para a sua sobrevivência.

Foi possível observar grande variação entre aos parâmetros observados nas espécies estudadas, e isso se deve ao fato da variabilidade genética das orquídeas. Nesse sentido, Cardim et al. (2001) enfatizam que os caracteres florais e agentes polinizadores das orquídeas são muito variados, e isso se deve quase que exclusivamente à variabilidade genética, sendo pouco influenciados pelo ambiente. O mesmo autor salienta que ao estudar a espécie de *Oncidium varicosum*, a partir de morfometria, é possível detectar a existência de variabilidade entre populações geograficamente próximas.

Pansarin (2003) concluiu que em *Epidendrum paniculatum* há a polinização cruzada, o que pode ter como consequência maior variabilidade genética para as populações. Tais dados são semelhantes aos constatados por Bernardi et al. (2004) ao estudar o gênero *Dendrobium*. Os gêneros *Brassavola*, *Catasetum*, *Cattleya*, *Eulophidium*, *Epidendrum*, *Ionopsis*, *Microlaelia*, *Oncidium*, *Pleurothallis*, *Polystachya* e *Rodriguezia* têm demonstrando grande variabilidade genética e também por motivos econômicos, estas espécies vêm sofrendo com a constante depredação e destruição de seus *habitats* (CARDOSO; ISRAEL, 2005).

No que se refere aos altos índices de coeficientes de variação encontrados no presente estudo, reflexo da variabilidade genética, recomenda-se que mais estudos sejam realizados considerando, para tanto, o meio de cultura x espécie como salientado por Gonçalves (2006) e Moraes (2003). Também, são necessários estudos relativos à ação dos complementos utilizados nos meios nutritivos, seus efeitos na fisiologia da plântula, a mensuração de pH como proposto por Colombo et al. (2005), assim como a espécie x substrato de aclimatização.

5. CONCLUSÕES

Para a germinação de *Bifrenaria tyrianthina* pode-se verificar que a ausência de iluminação foi adequada em todos os tipos de tratamentos. Quanto ao desenvolvimento das plântulas, pode-se indicar o meio Knudson adicionado de carvão ativado sob iluminação contínua e luz do tipo branca, pois o mesmo promoveu o crescimento mediano.

Quanto à *Cattleya bicolor*, o tratamento Knudson básico, sob luz branca contínua, promoveu a maior mediana quanto ao índice de crescimento, o que significa maior número de folhas e raízes em relação aos demais meios.

Para o crescimento de *Catasetum fimbriatum*, a adição de banana ao meio de cultura Knudson, sob luz branca contínua, mostrou-se mais eficiente.

A aclimatização de *B. tyrianthina* com bagaço de cana-de-açúcar e pó-de-coco não surtiu resultado nas circunstâncias desse experimento, uma vez que as plântulas não sobreviveram; conseqüentemente, esse substrato, nessa condição, não pode ser indicado na aclimatização dessa espécie.

Na aclimatização de *C. bicolor*, os substratos xaxim e pó-de-coco são recomendados por produzirem resultados significativos quando as plântulas forem provenientes do meio Knudson adicionado à banana. Analisando que o xaxim é uma planta em extinção, recomenda-se o pó-de-coco na aclimatização.

Quanto ao *C. fimbriatum*, não foi constatado formação de brotos laterais em relação aos substratos pó-de-coco e xaxim. Considerando que o número de brotos é uma variável muito importante para os comerciantes de orquídeas, novos experimentos devem ser realizados com outros tipos de substratos, que possam ser avaliados como ideais para essa espécie.

Salienta-se, ainda, que a manutenção de uma alta umidade relativa do ar no ambiente durante a fase de aclimatização de mudas, é muito importante para a sobrevivência das plântulas e a variação brusca de temperatura também pode interferir nesse processo, sendo assim, sugere-se que nos primeiros meses de aclimatização as plântulas fiquem em ambientes onde a temperatura e a umidade relativa do ar possam ser controladas.

A grande variabilidade genética justifica a necessidade de continuadas pesquisas para que se estabeleçam as condições apropriadas para o cultivo *in vitro* e aclimatização das espécies de orquídeas.

Sugere-se, ainda, estudo detalhado de modelos estatísticos, para que se possa encontrar o mais adequado aos experimentos realizados com Orchidaceae.

REFERÊNCIAS

AFFONSO, V. R.; LIMA, S. S.; SATO, A.; LAGE, C. L. S.; ESQUIBEL, M. A. Análise do desenvolvimento de *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert em diferentes espectros luminosos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 14., 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 107.

ALTAFIN, V. L.; MENEZES, M. O.; LIMA FILHO, R. R.; PITOMBO, L. M. **Semeadura in vitro de orquídeas para propagação massal**. São Paulo: Fundação Pinhalense de Ensino. Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, 2005. (Boletim Técnico, 7).

ANEFALOS, L. C.; GUILHOTO, J. J. M. Estrutura do mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais. **Agric.**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 41-63, 2003.

ARAUJO, A. G. **Crescimento in vitro e aclimatização de plântulas de orquídea**. 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

ARAÚJO, D. **Ecossistemas, habitats e orquídeas brasileiras**: orquídeas. Disponível em: <<http://members.xoom.virgilio.it/orchidnews/on19/pages/eco01.htm>>. Acesso em: 22 jan. 2004.

ARDITTI, J. Aspects of the physiology of orchid. **Adv. Bot. Res.**, London, v. 7, p. 421-655, 1979.

ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. **Bot. Rev.**, Bronx, v. 33, n. 1, p. 1-97, 1967.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley, 1993.

ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: ARDITTI, J. (Ed.). **Orchid biology**: reviews and perspectives II. New York: Cornell University Press, 1984. p. 178-222.

ARDITTI, J.; ERNST, R. Orchid seed germination and seedling culture: a manual. In: ARDITTI, J. (Ed.). **Orchid biology**: reviews and perspectives II. New York: Cornell University Press, 1982. p. 243-270.

ARDITTI, J.; KRIKORIAN, A. D. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. **Bot. J. Linn. Soc.**, London, v. 122, p. 183-241, 1996.

ASSIS, A. M.; FARIA, R. T.; COLOMBO, L. A.; CARVALHO, J. F. R. P. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Sci., Agron.**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 255-260, 2005.

BACH, E. E.; CASTRO, O. L. Germinação de sementes de *Cattleya* Sp. (Orchidaceae) em cultura de tecido visando produção de mudas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 71, p.1-749, 2004. Supl.

BARROSO, D. G. Efeitos da adubação em mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth) e aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) produzidas em substrato constituído por resíduos agroindustriais. **Rev. Arvore**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 433-441, 1998.

BENZING, D. H. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedling mycotrophic? **Selbyana**, Sarasota, v. 5, n. 3-4, p. 241-242, 1981.

BENZING, D. H. Vascular epiphytism: taxonomy participation and adaptative diversity. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, Saint Louis, v. 74, p.183-204, 1987.

BENZING, D. H.; OTT, D. W.; FRIEDMAN, W. E. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. **Am. J. Bot.**, Columbus, v. 69, n. 4, p. 608-614, 1982.

BERNARDI, A. C.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; UNEMOTO, L. K.; ASSIS, A. M. Desenvolvimento vegetativo de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. fertirrigadas com diferentes concentrações da solução nutritiva de sarruge. **Semin., Cienc. Agrar.**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 13-20, jan./mar. 2004.

BORTONE, J. E. **Adubação de orquídeas**. São José da Varginha: EMATER/MG. Disponível em: <<http://www.sobh.arvore.com.br/artigos/adubacao.htm>>. Acesso em: nov. 2006.

BRAGA, P. I. S. Orquídeas: biologia floral. **Ciênc. Hoje**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 53-55, 1987.

BUYUN, L.; LAVRENTYEVA, A.; KOVALSKA, L.; IVANNIKOV, R. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. **Acta Universitatis Latviensis - Biology**, Latvia, v. 676, p. 159-162, 2004.

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

CAMPACCI, M. A. **Coletânea de orquídeas brasileiras 2: Bifrenaria**. São Paulo: CAOB, 2003. p. 33-64.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas**: manual prático de reprodução. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2000. 127 p.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas**: manual prático da cultura. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1996. 143 p.

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

CARDOSO, J. C.; ISRAEL, M. A survey of the Orchidaceae family species to evaluate the biodiversity and their cultivation in the district of Águas de Santa Bárbara. **Hortic. Bras.**, Brasília, DF, v. 23, n. 2, p. 169-173, 2005.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Hortic. Bras.**, Brasília, DF, v. 20, n. 4, p. 533-535, dez. 2002.

CARVALHO, A. A. L. R. *Cattleya Bicolor*. **Associação Orquidófila de Contagem**. 2006. Disponível em: <http://aocmg.org.br/index2.php?option=com_contentedo_pdf=1&id=31>. Acesso em: 05 fev. 2008.

CARVALHO, J. M. F. C.; ROCHA, R. W. C. **Curso de cultivos de tecidos vegetais**. Campina Grande: EMBRAPA, 2006. (Documentos, 157). 23 p.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: Embrapa, 2003. (Documentos, 116). 39 p.

CATARINA, C. S.; VIANA, A. M.; RANDI, A. M. **Efeito do sorbitol e do carvão ativado no crescimento *In Vitro* e nos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis e amido em culturas embriogênicas de *Ocotea Catharinensis* Mez.** (Lauraceae). UFSC. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/01_143.htm>. Acesso em: 15 jul. 2007.

CATASETUM. **Orchidaceae Brasiliensis**. Disponível em: <<http://www.dalhoff.hpg.ig.com.br/generos/Catasetum/Catasetum.html>>. Acesso em: 15 nov. 2006.

CATTLEYA. ***Bicolor* Lindley**. Disponível em: <<http://www.orkideas.com.br/especies/cattleya/bicolor/tipo.html>>. Acesso em: 15 nov. 2006.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus of *Oncidium* (Orchidaceae). **Plant Sci.**, v. 160, n. 1, p. 87-93, 2000.

- CHEN, L. R.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. **In vitro Cell. Dev. Biol.**, Gaithersburg, v. 38, p. 441-445, 2002.
- COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (BENTH.) BENTH.] *in vitro* e *ex vitro*. **Cienc. Agrotec.**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 38-48, 2001.
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Sci. Agron.**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-150, jan./mar. 2005.
- CRESCENTI, R. De onde vem as orquídeas ? **Casadois - Revista como Cultivar Orquídeas**, São Paulo, p. 50, ago. 2002.
- CRUZ, R. **Raízes e micorriza na família Orchidaceae**. Disponível em: <<http://www.damianus.bmd.br/Raises%20e%20Micorriza.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2006.
- CURTIS, J. T. Germination and seedling development in five species of *Cypripedium*. **Am. J. Bot.**, Columbus, v. 30, p. 199-206, 1943.
- DEBERGH, P. C. Aclimatization Techniques of Plants from *in vitro*. **Acta Hortic.**, The Hague, n. 289, p. 291-300, 1991.
- DINIZ, J. D. N.; HERNANDEZ, F. F. F.; GONÇALVES, A. N.; TORRES, A. C. Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, Brasília, DF, v. 34, n. 8, p.1385-1391, ago. 1999.
- DISLICH, R. **Florística e estrutura do componente epifítico vascular na mata da reserva da cidade universitária: Armando de Salles Oliveira**. 1996.183 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Geral)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- DIXON, R. A. **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: England, 1985.
- DRESSLER, R. L. **The orchids and classification**. London: Harvard University Press, 1981. 332 p.
- DROSTE, A.; SILVA, A. M.; MATOS, A. V.; ALMEIDA, J. W. In vitro culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v. 48, n. 5, 2005.

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 33, p. 157-162, 1993.

EMBRAPA. **Recursos genéticos e biotecnologia**. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-20Jo%E3o%20Batista%20Teixeira.pdf> Acesso em: 8 nov. 2006.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação in vitro de framboeseira (*Rubus idaeus*) BATUM. **Rev. Bras. Frutic.**, Cruz das Almas, v. 27, n. 3, p. 488-490, 2005.

ERNST, R. Studies in asymbiotic culture of orchids. **Am. Orchid Soc. Bull.**, West Palm Beach, v. 1, p. 12-18, 1975.

FARIA, R. T.; REGO, L. V.; BERNARDI, A.; MOLINARI, H. Performance of different genotypes on Brazilian orchid cultivation in alternative substrates. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 337-342, 2001.

FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAÚJO, R. Preservation of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, n. 3, p. 489-492, 2002.

FAVARIN, J. L. **Importância dos micronutrientes para a produção de grãos**. Disponível em: <<http://www.snagricultura.org.br/artigos/artitec-micronutrientes.htm>>. Acesso em: 18 out. 2004.

FRÁGUAS, C. B.; PEREIRA, A. R.; RODRIGUES, V. A.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M. **Propagação in vitro de espécies ornamentais**. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol_99.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2005.

FREITAS, A.; GONÇALVES, L. M.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Efeito do meio de cultura no desenvolvimento das plântulas de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae) provenientes de sementes estocadas. In: SEMANA DA BIOLOGIA, 21., 2006, Maringá; ENCONTRO MARINGAENSE DE BIOLOGIA, 8., 2006, Maringá. **Resumos...** Maringá: UEM, 2006.

GEORGE, P. S.; RAVISHANKAR, G. A. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. **Plant Cell Rep.**, Berlin, v. 16, n. 7, p. 490-494, 1997.

GONÇALVES, A. L. Características de substratos. In: CASTRO, C. E. F. (Ed.). **Manual de floricultura**. Maringá: SBFPO, 1992. p. 44-52.

GONÇALVES, L. M. **Efeito de diferentes suplementos adicionados ao meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídeas**. 2006. 34 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

GONÇALVES, L. M.; PRIZÃO, E. C.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Influência da composição do meio de cultura sobre a germinação das sementes de duas espécies de orquídeas brasileiras mantidas estocadas por 4 anos. In: SEMANA DA BIOLOGIA, 21., 2006, Maringá; ENCONTRO MARINGAENSE DE BIOLOGIA, 8., 2006, Maringá. **Resumos...** Maringá: UEM, 2006. 55 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa, 1990. p. 99-170.

GRIESBACH, R. J. Development of *Phalaenopsis* orchids for the massmarket: trends in new crops and new uses. 2002. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/griesbach.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2007.

GROLL, J.; GRAY.; V. M.; MYCOCK, D. J. Development of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) somatic embryos during culture with abscisic acid and activated charcoal. **Plant Physiol.**, Minneapolis, v. 159, p. 437-443, 2002.

GUERRA, M. P.; NODARI. R. O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2006. Edição da Steinmacher. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2006.

GUIRRA AGRITUR. **Funções dos nutrientes**. Disponível em: <http://www.guirra.com.br/guirranet/adubosfuncnutrientes.htm>>. Acesso em: 03 out. 2004.

HAZARICA, B. N. Acclimatization of tissue culture plants. **Curr. Sci.**, Bangalore, v. 85, n. 12, 2003.

HINNEN, M. G. J.; PIERIK, R. L. M.; BRONSEMA, F. B. F. The influencia of macronutrientes and some other factores on groeth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro*. **Sci. Hortic.**, Kent, v. 41, n. 1-2, p. 105-116, 1989.

HOEHNE, F. C. **Flora brasílica**. 1940. Disponível em: <<http://www.orkideas.com.br/especies/catasetum/fimbriatum.html>>. Acesso em: 20 jan. 2008.

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

- JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 4. ed. São Paulo: Nacional, 1977.
- KANIKA, V. J. S. P. Root-segment culture of *Cymbidium pendulum* (sw.). **Haryana J. Hortic. Sci.**, v. 32, n. 3-4, p. 234-235, 2003.
- KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warscewiczii*. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, Londrina, v. 8, n. 2, p.157-159, 1996.
- KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. **Plant Cell Rep.**, Berlin, v. 3, p. 27-39, 1984.
- KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. Regeneration of protocorm-like bodies through in vitro culture of root tips of *Catasetum* (Orchidaceae). **Z. Pflanzenphysiol.**, Stuttgart, v. 113, n. 4, p. 287-291, 1984a.
- KNUDSON, L. A. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **Am. Orchid Soc. Bull.**, Miami, v. 15, p. 214-217, 1946.
- KRAUS, J. E.; MONTEIRO, W. R. Formation of protocorm-like bodies from root apices of *Catasetum pileatum* (Orchidaceae) cultivated *in vitro*. I. Morphological aspects. **Ann. Bot.**, Roma, v. 64, p. 491-498, 1989.
- LAKSHMANAN, P.; LOH, C. S.; GOH, C. J. An in vitro method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda Deborah* using thin section culture. **Plant Cell Rep.**, Berlin, v. 14, p. 510-514, 1995.
- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, 2002.
- LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromélias na natureza**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicações Visual, 1993.
- LIMA, G. V. M.; ANDRADE, G. R.; ULISSES, C.; MELO, G. M.; PAULINO, P. M. S.; WILLADINO, L. **Aclimatização de híbrido de orquídea (*Cattleya labiata* x *Cattleya granulosa*) em substratos de origem industrial e vegetal**. Disponível em: <<http://sec.adaltech.com.br/jepex/2006/resumos/R0591-1.doc>>. Acesso em: 15 fev. 2007.
- MACHADO, E. F. ***Bifrenaria tyrianthina*** (Lodd) Rchb. f. São Paulo: CAOB, 2000.
- MACHADO, E. F. *Catasetum*, uma orquídea diferente. **O Mundo das Orquídeas**, v. 4, p. 5-6, 1998. 32 p.

MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G. B.; NIEVOLA, C. C.; SUZUKI, R. M. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (orchidaceae) grown with different nitrogen sources. **Environ. Exp. Bot.**, Elmsford, v. 44, n. 3, p. 195-206, nov. 2000.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração in vitro de Louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Cienc. Florest.**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MATHEWS, V. H.; RAO, P. S. *In vitro* multiplication of *Vanda* hybrids through tissue culture technique. **Plant Sci.**, London, v. 17, n. 3, p. 383-398, 1980.

MAYER, J. L. S. **Anatomia e morfogenese in vitro de *Cymbidium* 'Joy Polis' (Orchidaceae).** 2006. 124 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Curitiba, 2006.

McKENDRICK, S. **In vitro germination of orchids:** a manual. Quito: Ceiba Foundation for Tropical Conservation, 2000. Disponível em: <<http://www.orchideenvermehrung.at/downloads/seed%20sowing%20manual.pdf>>. Acesso em: 05 Feb. 2008.

MILANEZE, M. A., THOMAZ, L. D., TAKAKI, M. A. Influência da intensidade luminosa no desenvolvimento inicial de *Cattleya guttata* Lindl. (Orchidaceae). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 9., 1990, Campinas. **Anais...** Campinas: SBSP, 1990. p. 143.

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

MILANEZE, M. A. **Influência da intensidade luminosa e do fotoperíodo no desenvolvimento inicial de *Pseudolaelia velozicolla* (Hoehne) Pôrto e Brade, a partir de sementes selecionadas por densidade.** 1992. 223 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1992.

MITRA, G. C. Studies on seeds, shoot-tips e sten-discs of the an orchid grown in aseptic culture. **Indian J. Exp. Biol.**, New Delhi, v. 9, p. 79-85, 1971.

MOHAN, R. **Desenvolvimento de bioprocessos: bagaço de cana-de-açúcar como suporte alternativo na fase de enraizamento e aclimação de plântulas de macieira, morangueiro e cafeeiro.** 2005. 129 f. Tese (Doutorado Setor de Tecnologia em Processos Biotecnológicos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MORAES, C. P. **Fenologia e antomia dos órgãos reprodutivos de *Catasetum fimbriatum* L. cultivados sob diferentes intensidades luminosas**. 2002. 91 f. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MORAES, L. M. **Carvão ativado em meios de cultura para o desenvolvimento *in vitro* de espécies de orquídeas**. 2003. Resumo da Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003. Disponível em: <http://www.sistemasweb.uel.br/index.php?contents=system/pes/pes_pdf_pesquisascadastradas.php?link=4>. Acesso em: 12 jul. 2007.

MORAES, L. M.; FARIA, R. T.; CUQUEL, F. L. Activated charcoal for *in vitro* propagation of brazilian orchids. **Acta Hortic.**, The Hague, n. 683, p. 383-390, 2005.

MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C.; FARIA, R.T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Sci. Agron.**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1397-1400, 2002.

MORALES, S. **Efeito de Aditivos no Cultivo *In Vitro* de Plântulas de *Catasetum Fimbriatum* (E. Morren) Lindl. e Paxton, *Encyclia Randii* (Barb. Rodr.) Porto e Brade e de um Híbrido de *Laelia* Lindl. X *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae)**. 2004. 38 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual Maringá, Maringá, 2004.

MORALES, S.; CARVALHO, V. M.; MILANEZE, M. A. G. Anatomia das raízes de sessenta e cinco espécies de orquídeas nativas do Brasil. **Arq-Apadec**, v. 6, n. 6, 2002.

MORALES, S.; MILANEZE, M. A. G.; MACHADO, M. F. P. S. Effect of Activated Charcoal for Seedling Development of *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). **Plant Sci.**, London, v. 1, n. 4, p. 388-391, 2006.

MOREIRA, L. M. **Curso de fertilidade e manejo do solo**. Brasília, DF: ABEAS. Disponível em: <http://www.sbz.org.br/scripts/comunidade/postform.asp%3FID%3D134%26GroupID%3D55+ph+micronutrientehl=pt-BRelr=lang_pt>. Acesso em: 22 out. 2004.

MORGADO, I. F.; CARNEIRO, J. G. A.; LELES, P. S. S.; BARROSO, D. G. Pressed industrial residues as substrate for sugar cane seedling production. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 57, n. 4, 2000.

MOURA, V. **Natureza violentada: flora e fauna agredidas**. Porto Alegre: Leal, 1979.

MOURA, E. F.; MENEZES, I. C.; LEMOS, O. F. Cytokinin concentrations and activated charcoal on black pepper micropropagation. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and ioassays with tabaco tissue culture. **Physiol. Plant.**, Riverside, v. 15, p. 473-497, 1962.
NEGRÃO, L. C. P.; URBAN, M. L. P. Álcool como commodity Internacional. **Economia e Energia**, ano 8, n. 47, jan. 2005. Disponível em: <http://www.ecen.com/eee47/eee47p/ecen_47p.htm>. Acesso em: 28 dez. 2005.

OLIVEIRA, V. D. C.; SAJO, M. G. Morfo-anatomia caulinear de nove espécies de Orchidaceae. **Acta Bot. Bras.**, Porto Alegre, v. 15, n. 2, 2001.

OLIVEIRA, V. D. C.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v. 22, n. 3, 1999.

ORI, S. S. **Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* (Lineu) Blume (Orchidaceae) Cultivada *in vitro***. 2006. 133 f. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2006.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasiliensis**. Hildeshein: Brucke-Verlag, 1975. 408 p.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. **The use of charcoal in in vitro culture**: a review. **Plant Growth Regul.**, Dordrecht, v. 26, n. 3, Dec. 1998. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/n3q6uhrwr745rp25/>>. Acesso em: 18 Feb. 2008.

PANSARIN, E. R. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz e Pavón (Orchidaceae). **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v. 26, n. 2, 2003.

PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant. Sci.**, v. 164, n. 6, p. 919-923, 2003.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. O. Desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos oriundos de tangerineira 'Poncã' x Laranjeira 'Pera' em diferentes fotoperíodos. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 535-540, maio/jun. 2003.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2002. 63 p.

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 234-239, 2001.

PIERIK, R. L. M. et al. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz *in vitro*. **Sci. Hortic.**, Kent, v. 34, n. 112, p. 139-153, 1988.

PIO, R.; RAMOS, J. D.; PIO, L. A. S.; MENDONÇA, V.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta enxerto de citros *Tangerina sunki* x *Trifoliata* English 63-256 com o uso de sacarose e ácido indol-butírico. **Ciencia Agrotec.**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 66-70, 2002.

PRIZÃO, E. C. **Efeito do carvão e grafite no crescimento in vitro de Cattleya bicolor Lindl. e um híbrido de ('BLC Pastoral Inocence') (ORCHIDACEAE)**. 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

PRIZÃO, E. C.; GONCALVES, L. M.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A.; MACHADO, M. F. P. S. Influencia de diferentes concentrações de carvão ativado e de grafite sobre o desenvolvimento inicial de *Cattleya bicolor* Lindl. e do híbrido 'BLC Pastoral Inocence' (Orchidaceae). In: SEMANA DA BIOLOGIA, 21., 2006, Maringá; ENCONTRO MARINGAENSE DE BIOLOGIA, 8., 2006, Maringá. **Resumos...** Maringá: UEM, 2006. p. 55-56.

RÄNNBÄCK, L. M. **Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium* spp**: bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture programme 2007:01. Disponível em: <[http://ex-epsilon.slu.se/archive/00001453/01/Cypripedium, R% C3%A4nnb%C3%A4ck_070126.pdf](http://ex-epsilon.slu.se/archive/00001453/01/Cypripedium_R%C3%A4nnb%C3%A4ck_070126.pdf)>. Acesso em: 23 Feb. 2008.

RAO, A. N. Tissu culture in the orchid industry. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 44-69.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830 p.

RODRIGUES, T. M.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Efeito de carvão ativado no meio de cultura para germinação de sementes de bromélia imperial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1., 2003, Lavras; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 14., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 253.

ROY, J.; BANERJEE, N. Rhizome and shoot development during *in vitro* propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. **Sci. Hortic.**, Kent, v. 94, n. 1-2, p. 181-192, 2002.

RUSCHI, A. **Orquídeas do Estado do Espírito Santo**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1986. 278 p.

SCAGLIA, J.A.P. Como classificar corretamente um *Catasetum*. **O mundo das Orquídeas**, São Paulo, v. 4, p. 7-8, 1998.

SEENI, S.; LATHA, P. G. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, The Hague, v. 29, n. 3, p. 167-172, 1992.

SENAI. Resposta Técnica: **Substrato para orquidário**. Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br>>. Acesso em: 09 dez. 2006.

SHI, Y. Z.; PAN, R. C.; WANG, X. J.; YE, Q. S.; GUO, L. R. *In vitro* conservation of *Dendrobium officinale* at low temperature. **Chin. J. Appl. Environ. Biol.**, Peijing, v. 6, n. 4, p. 326-330, 2000.

SHIAU, Y.-J.; SAGARE, A. P.; HEN, U.-C.; YANG, S.-R.; TSAY, H.-S. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, Taipei, v. 43, p. 123-130, 2002.

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow***. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia- área de concentração Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVA, E. F.; PASQUAL, M.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, A. B.; ALVES, D. Polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de orquídea. **Plant Cell Cult. Micropropag**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 8-12, 2005.

SILVA, L. R.; COUTO, M. F. **Substrato para orquidário**: resposta técnica produzida pelo Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Disponível em: <<http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt3899.pdf?PHPSESSID=7cb21266123eaadbd4fac43750ee2851>>. Acesso em: 3 fev. 2007.

SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1976.
SINGH, F. Differential staining of orchid seeds for viability testing. **Am. Orchid Soc. Bull.**, West Palm Beach, v. 50, p. 416-418, 1981.

SIMEPAR. **Tecnologia e informações ambientais**. Disponível em: <<http://www.simepar.br/>>. Acesso em: 11 mar. 2006.

SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G. **Propagação in vitro de orquídea**: iodeto de potássio e cloreto de cobalto. Disponível em: <http://www.maa.gba.gov.ar/gricultura_ganaderia/floricultura/MACRO%20MICRO%20PROPAG/71_Propagacao_in_vitro_de_orquidea_iodeto_de_K.doc>. Acesso em: 22 fev. 2008a.

SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G. **Fontes de silício na propagação in vitro de orquídea**. Disponível em: <http://www.maa.gba.gov.ar/agricultura_ganaderia/floricultura/MACRO%20MICRO%20PROPAG/70%5B1%5D.Fontes_de_silicio_na_propagacao_de_orquidea.doc>. Acesso em: 02 fev. 2008b.

SOUZA, M. de. **Muito além do xaxim**. Disponível em: <http://www.europnetcom.br/euro2003/index.php?cat_id=372>. Acesso em: 08 nov. 2006.

SOUZA, O.; SOUZA, M. T. C.; SANTOS, I. E. **Importância da utilização de resíduos agropecuários na produção de pequenos ruminantes para famílias de baixa renda no Nordeste do Brasil**. Disponível em: <<http://www.ruralsoft.com.br/manejo/manejoExibe.asp?id=71>>. Acesso em: 11 fev. 2008.

SPOERL, E. Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. **Am. J. Bot.**, Columbus, v. 35, p. 88-95, 1948.

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

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. The pulps of fruits in the growth of epiphytic orchids. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, 2008.

STEGANI, V. **Aclimatização de orquídea utilizando com substrato o pó de bagaço de cana**. 2006. 22 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual Maringá, Maringá, 2006.

STOUTAMIRE, W. P. Terrestrial orchid seedling. In: WITHNER, C. L. (Ed.). **The orchid: a scientific studies**. New York: Wiley-Interscience, 1974. p. 101-127.

SZENDRAK, E. **Asymbiotic in vitro seed germination, micropropagation and scanning electron microscopy of several temperate terrestrial orchids (Orchidaceae)**. Lincoln: The University of Nebraska, 1997. Abstract. Disponível em: <<http://proquest.umi.com/pqdlink?Ver=1eExp=02-13-2013eFMT=7eDID=736622481eRQT=309eattempt=1ecfc=1>>. Acesso em: 15 fev. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução Eliane Romanoto Santarem. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

THIAGO, P. S. S. **Influência de fatores ambientais na determinação do sexo**. Disponível em:< http://www.ufv.br/dbg/BIO240/Influencia_De_Fatores_Ambientais_Na_Determina%E7%E3o_do_Sexo.htm>. Acesso em: 17 fev 2008.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2001. 19 p. (Circular técnica, 24).

TORTATO, M. A. Cultivo de orquídeas em nó de pinho. **Boletim da Coordenadoria das Associações Orquidófilas do Brasil (CAOB)**, Porto Ferreira, n. 34, p. 118-122, 1998.

ÚNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **ÚNICA**: Safra de cana-de-açúcar 2008/09. Disponível em:< <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=21696>>. Acesso em: 18 jul. 2008.

UTINO, S.; CARNEIRO, I. F. crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa aab*) *in vitro* e concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, 2001.

VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. **Bot. Gaz.**, Chicago, v. 110, p. 605-613, 1949.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B. Effects of Mineral Nutrients on *in vitro* Growth and Flower Formation of *Psychomorphis Pusilla* (Orchidaceae). **Acta Hortic.**, The Hague, v. 520, p.149-156, 2000. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/520/520_15.htm>. Acesso em: 28 Jun. 2006.

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

WILLADINO, L.; CAMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais-cultivo *in vitro* de vegetais-UFRPE**. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em : 08 nov. 2006.

YAM, T. W.; WEATHERHEAD, M. A. Early growth of *Hetaria cristata* seedling and plantlet initiation from rhizome nodes. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 5, n. 3, p.199-203, 1990.

YAM, T. W.; WEATHERHEAD, M. A. Germination and seedling development of some Hong Kong orchid I. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 3, n. 3, p. 156-160, 1988.

YAMAKAMI, J. K.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; REGO-OLIVEIRA, L. V. Cultivo de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Acta Sci. Agron.**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 523-526, oct./dec. 2006.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Bot. Bras.**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, 2003.

ZEIGLER, A. R.; SHEEHAN, T. J.; POOLE, R.T. Influence of various media and photoperiod on growth and amino acid content of orchid seedling. **Am. Orchid Soc. Bull.**, West Palm Beach, v. 36, n. 2369, p. 195-202, mar. 1967.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)