



**CRESCIMENTO *IN VITRO* E
ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE
ORQUÍDEA**

APARECIDA GOMES DE ARAUJO

2004

57483

049208

APARECIDA GOMES DE ARAUJO

CRESCEMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE
ORQUÍDEA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador:

Prof. Dr. Moacir Pasqual

~~LAVRAS~~

MINAS GERAIS – BRASIL

2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Araujo, Aparecida Gomes de
Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídeas /
Aparecida Gomes de Araujo. – Lavras : UFLA, 2004.
73 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Orquídeas. 2. Aclimatização. 3. Crescimento *in vitro*. 4. Regulador de
crescimento. 5. Meio de cultura. 6. Substrato. 7. Carvão ativado.
8. Adubação.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.93415

APARECIDA GOMES DE ARAUJO

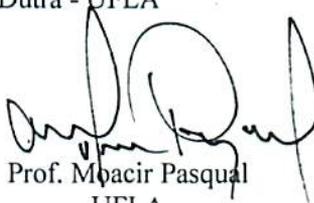
CRESCIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE
ORQUÍDEA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 16 de fevereiro de 2004

Profª. Dra. Janice Guedes de Carvalho - UFLA

Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra - UFLA



Prof. M. Pacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

No caso de traçar qualquer plano, a pessoa deve refletir muito bem sobre si mesma e analisar profundamente se os objetivos são bons ou não e se eles serão úteis à sociedade.

Mokiti Okada

Aos meus pais, Antônio e Maria Telma, pelo apoio e incentivo à minha formação. Aos meus irmãos, Ruy, Edilson, tios e primos, pela força, confiança e carinho a mim dedicados.

Dedico

Aos meus sobrinhos Felipe, Brenda, Lucas,
Fernando e Lara ...

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ser toda minha inspiração, fonte de vida, força, energia, e principal razão de toda minha existência.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Moacir Pasqual, pela amizade, orientação e ensinamentos importantes para a minha formação profissional e pessoal.

À Professora Janice Guedes de Carvalho, pela co-orientação.

Aos demais professores desta universidade, especialmente ao Prof. Mário Lúcio, pela convivência e contribuição profissional.

Ao Pesquisador Leonardo Dutra, pela colaboração e amizade.

Ao Júnior e família, pelo apoio, incentivo e carinho.

A todos os colegas (mestrandos e doutorandos) do curso de Fitotecnia e alunos da graduação, em especial a Alba, Chrystiane, Fabíola, Leila, Ester, Fernanda, Mívia, Marcelo, Cibelle, Milene, Flávia, Keize, Luzia, Alysson, Adriano, Gustavo, Luciano, Márcia, Zacarias, Flávia Dionísio e Ronaldo, pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos meus amigos Vantuil, Antônio Clarete e Evaldo, funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, pelo convívio e ensinamentos.

À minha família, pelo incentivo e confiança.

Às minhas amigas Maria Rosa, Mariele, Marina, Sandra, Gabriela e família.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Aspectos gerais da cultura	3
2.2 Micropropagação de plantas ornamentais	4
2.3 Micropropagação de orquídeas	6
2.3.1 Meios de cultura	8
2.3.2 Reguladores de crescimento	9
2.3.3 Carvão ativado	11
2.3.4 Aclimatização de plantas obtidas por micropropagação	12
2.3.4.1 Substratos	15
a) Casca de arroz carbonizada	16
b) Pedra britada.....	17
c) Fibra de piaçava	18
d) Xaxim desfibrado	18
2.3.4.2 Adubação	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Fase de desenvolvimento <i>in vitro</i>	23
3.1.1 Espécies e KNO ₃ e NH ₄ NO ₃ no crescimento <i>in vitro</i>	24
3.1.2 Meios de cultura e BAP na multiplicação <i>in vitro</i>	24
3.1.3 Concentrações do meio de cultura KC e carvão ativado no crescimento <i>in vitro</i>	28
3.2 Fase de aclimatização	28
3.2.1 Adubações e substratos na aclimatização de plântulas de orquídeas.....	29

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Espécies e KNO ₃ e NH ₄ NO ₃ no crescimento <i>in vitro</i>	32
4.2 Meios de cultura e BAP na multiplicação <i>in vitro</i>	38
4.3 Meio de cultura e carvão ativado no crescimento <i>in vitro</i>	43
4.4 Substratos e adubações na aclimatização de orquídea	55
5 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

RESUMO

ARAÚJO, Aparecida Gomes de. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea**. 2004. 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A taxa de multiplicação de orquídeas a partir de métodos convencionais é bastante baixa, não atendendo às necessidades comerciais. A técnica de cultura de tecidos é uma alternativa viável para a obtenção de grande número de plantas com alta qualidade genética e fitossanitária, em curto espaço de tempo. Este trabalho teve como objetivo estudar o crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea. Para o crescimento *in vitro* foram realizados três experimentos avaliando a influência de fontes de nitrogênio (0%, 25%, 50%, 75% e 100% de KNO_3 e NH_4NO_3) x espécies (*C. nobilior* x *C. nobilior*, *C. leopoldii*, *L. purpurata* 'Cárnea' e *L. crispa*), meios de cultura (MS, KC e WPM) x BAP (0; 0,5; 1; 2 e 4 mg L^{-1}) e concentrações do meio KC (0%, 50%, 100%, 150% e 200%) x carvão ativado (0; 0,5; 1; 2 e 4 g L^{-1}). Os explantes utilizados foram plântulas oriundas da germinação *in vitro*, com tamanho médio de 1 a 1,5 cm. Os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de $32 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Para a aclimatização, testaram-se diferentes adubações (testemunha, Biofert Plus®, Dyna-Grow® e formulação elaborada) x substratos (pedra britada, fibra de piaçava, casca de arroz carbonizada e xaxim desfibrado). As plantas permaneceram em casa de vegetação por um período de 12 meses. Na multiplicação, verificou-se que a adição de 50% da formulação original de KNO_3 e NH_4NO_3 ao meio KC proporciona melhor crescimento *in vitro* em *C. nobilior* x *C. nobilior* e *C. leopoldii*. Com a utilização do meio WPM acrescido de 1 mg L^{-1} de BAP obtêm-se brotos maiores e bem formados em plântulas de *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow'. A adição de 2 g L^{-1} de carvão ativado ao meio de cultura promove melhor crescimento em *Laelia tenebrosa*. Para orquídeas da espécie *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia', os melhores substratos para aclimatização de plântulas são casca de arroz carbonizada e fibra de piaçava. Melhores respostas à adubação de plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' são obtidas com o adubo foliar Biofert Plus®.

* Comitê Orientador: Moacir Pasqual - UFLA (Orientador); Janice Guedes de Carvalho - UFLA

ABSTRACT

ARAUJO, Aparecida Gomes de. *In vitro* growth and acclimatization of orchid plantlets. 2004. 73 p. Dissertation (Master Program in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Multiplication rate of orchids from conventional methods is quite poor, not meeting the commercial needs. Tissue culture technique is a viable alternative for obtaining a great number of high genetic and phytosanitary quality plants in a short period of time. For the *in vitro* growth, three experiments were accomplished evaluating the influence of sources of nitrogen (0%, 25%, 50%, 75% and 100% of KNO_3 and NH_4NO_3) x species (*C. nobilior* x *C. nobilior*, *C. leopoldii*, *L. purpurata* 'Cárnea' and *L. crispa*), culture media (MS, KC and WPM) x BAP (0; 0.5; 1; 2 and 4 mg L^{-1}) and concentrations of the KC medium (0%, 50%, 100%, 150% and 200%) x activated charcoal (0; 0.5; 1; 2 and 4 g L^{-1}). The explants utilized were plantlets coming from *in vitro* germination, averaging in size from 1 to 1.5 cm. The flasks containing the explants were kept in growth room with irradiance of around 32 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 16-hour photoperiod. For acclimatization, different fertilizations (control, Biofert Plus®, Dyna-Grow® and elaborated formulation) x substrates (broken stone, piassava fiber, carbonized rice hull and defibered xaxim) were tested. The plants stayed in greenhouse for a 12-month period. In multiplication, it was found that addition of 50% of the original formulation of KNO_3 and NH_4NO_3 to KC medium provides better *in vitro* growth in *C. nobilior* x *C. nobilior* and *C. leopoldii*. From the use of the WPM medium added of 1 mg L^{-1} of BAP, larger and well formed shoots on plantlets of *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow' are obtained. The addition of 2 g L^{-1} de activated charcoal into the culture medium enables better growth in *Laelia tenebrosa*. For orchids of the species *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia', the best substrates for acclimatization of plantlets are carbonized rice hulls and piassava fiber. Best responses to the fertilization of *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' plantlets are obtained from the foliar fertilizer Biofert Plus®.

* Guidance Committee: Moacir Pasqual - UFPA (Major Professor); Janice Guedes de Carvalho - UFPA

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção de plantas ornamentais evoluíram muito, por constituírem atividades extremamente competitivas, exigentes em tecnologias avançadas, conhecimentos técnicos e comercialização eficiente. Avanços técnicos, a exemplo da utilização de estufas, cultivares melhoradas e mais produtivas, manejo de adubações e irrigação, permitiram melhor controle dos fatores de produção.

A propagação *in vitro* de plantas ornamentais é uma realidade em inúmeros países, como Holanda, França, Espanha, Japão e, mais recentemente, no Brasil. Dentre as principais plantas ornamentais micropropagadas destacam-se rosas, crisântemos, begônias, gérberras, orquídeas, bromélias, samambaias e antúrios.

Dentre essas, as orquídeas se destacam devido à beleza e exotividade de suas flores, o que torna essas plantas de grande importância econômica e faz com que sejam produzidas em todo o mundo.

Com a descoberta do método assimbiótico de propagação por sementes e da cultura de meristemas em orquídeas, foi possível produzir grande quantidade de inúmeras espécies e híbridos, flores homogêneas e precoces, em curto espaço de tempo, popularizando-as ainda mais e refletindo em preços mais acessíveis.

A cultura assimbiótica ou sementeira *in vitro* de orquídeas constitui-se em técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas desta forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes muitas vezes espécie-específicos.

Neste contexto, a produção de orquídeas a partir de técnicas de cultura de tecidos é uma alternativa viável para a obtenção de um grande número de plantas com alta qualidade genética e fitossanitária, em curto espaço de tempo, suprimindo assim a necessidade dos produtores de orquídeas na aquisição de mudas com qualidade comprovada.

(O xaxim (*Dicksonia sellowiana*), planta cujo tronco dá origem a um excelente substrato para orquídeas, na forma de pó, fibra ou placas, está há dez anos na lista de plantas ameaçadas de extinção do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Por isso deve-se buscar substratos alternativos, com propriedades próximas às do xaxim e que promovam um bom desenvolvimento das plantas.)

Este trabalho teve como objetivo verificar efeitos de fontes de nitrogênio, meios de cultura, BAP e carvão ativado sobre o crescimento *in vitro* e adubação e substrato na aclimatização de plântulas de orquídea.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cultura

As orquídeas são consideradas as mais antigas entre as espécies ornamentais. Pertencem à família Orchidaceae, a maior entre as monocotiledôneas e também entre as plantas ornamentais, com 600 a 800 gêneros e 25.000 a 35.000 espécies (Sheehan, 1983) e mais de 100.000 híbridos (Sheehan & Sheehan, 1994), totalizando 7% das plantas ornamentais do mundo (Van Der Pijl & Dodson, 1966).

O elevado número de espécies e híbridos possibilita a ocorrência de grande variabilidade de formas, tamanhos e cores de folhas e flores. Graças à beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas destacam-se como importante planta ornamental, de grande interesse econômico e botânico.

São monocotiledôneas, herbáceas e perenes, podendo ser, quanto ao hábito de crescimento, epífitas, terrestres, rupícolas ou saprofíticas, não existindo espécies parasitas (Black, 1973). O crescimento pode ser do tipo monopodial (ereto) ou simpodial (prostrado). A descrição detalhada das características botânicas das plantas desta família é encontrada em Black (1973), Sheehan (1992) e Dressler (1993). Segundo Paula & Silva (2001), morfológicamente, as orquídeas são constituídas de raiz, caule, folha, inflorescência, flor, fruto e semente.

O fruto, denominado cápsula, encerra seu desenvolvimento cerca de nove meses após a fecundação dos óvulos no ovário, quando então se rompe em três fendas longitudinais, liberando as sementes. Uma cápsula pode conter 500.000 sementes ou mais. Apesar desta quantidade, na natureza, poucas ou nenhuma germinam, uma vez que elas não possuem, como as outras plantas, reserva nutritiva necessária para iniciar a germinação (Paula & Silva, 2001).

As orquídeas podem ser propagadas tanto vegetativamente quanto por meio de sementes. Essas, embora produzidas em grande quantidade, não possuem endosperma funcional, sendo incapazes de germinar na natureza. Dessa forma, torna-se necessária associação simbiótica da orquídea com fungos micorrízicos (Sheehan, 1983; Pierik, 1987).

A hibridação natural entre gêneros e/ou espécies é freqüentemente baixa e, similarmente ao que ocorre com a propagação sexuada, baixa taxa de multiplicação é obtida por meio dos métodos convencionais, como divisão de bulbos, brotações e 'keikis' (estruturas de propagação), não atendendo às necessidades comerciais. Assim, a clonagem *in vivo* de orquídeas é um processo muito lento, exigindo, às vezes, 10 anos para se obter um novo clone (Pierik, 1987).

O cultivo assimbiótico de orquídeas passa por dois estádios de desenvolvimento em meio de cultura *in vitro*: germinação e subcultivo e posterior aclimatização. O estágio de subcultivo é o mais prolongado, variando de 9 a 12 meses, dependendo da espécie cultivada, sendo, por isso, a etapa mais dispendiosa.

2.2 Micropropagação de plantas ornamentais

A micropropagação de plantas ornamentais é a técnica de cultura de tecidos mais amplamente utilizada. Mais de 500 milhões de plantas são propagadas anualmente e a maioria é constituída por espécies ornamentais (Debergh, 1994).

Segundo Kerbauy (1997), algumas das vantagens da técnica da multiplicação clonal *in vitro* são: produção de plantas mais uniformes em curto período de tempo, controle efetivo de doenças, facilidade no manuseio e transporte, independência da sazonalidade e espaço físico reduzido.

Líbano & Witmer (1987), estudando diferenças entre plantas de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) propagadas *in vitro* e *ex vitro*, constataram que o material propagado *in vitro* é mais precoce e homogêneo, apresentando expressiva superioridade na produção e qualidade das flores. Trabalho semelhante foi conduzido com begônia (*Begonia hiemalis*) por Takayama & Misawa (1982), que obtiveram plantas mais homogêneas e com maior valor comercial.

Segundo Debergh (1994) e George (1996), a utilização de cultura de tecidos para fins de propagação de plantas é normalmente dividida em 5 estágios: estágio 0, seleção e preparo da planta matriz; estágio 1, estabelecimento de cultura asséptica; estágio 2, multiplicação rápida; estágio 3, preparação para o crescimento em meio natural e estágio 4, aclimatização.

No estágio 0, as plantas matrizes devem ser típicas da espécie e livres de doenças. O estágio 1 é caracterizado pelo início da micropropagação e os explantes mais utilizados são gemas, brotos e brotos apicais. Entretanto, explantes foliares ou pedúnculo floral têm sido empregados, especialmente naqueles casos em que não há necessidade de que as plantas sejam livres de viroses.

Nos estágios 1 e 2, os meios de cultura mais utilizados são os solidificados e derivados dos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), Knudson (Knudson, 1922) ou WPM- Wood Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980). Com balanço hormonal auxina/citocinina em favor das citocininas, há a quebra da dominância apical, estimulando a emissão de brotações axilares. A alta concentração de citocininas no meio de cultura nem sempre é benéfica, podendo provocar aberrações fisiológicas durante a cultura *in vitro* e na subsequente fase de desenvolvimento da planta em casa de vegetação.

O estágio 3 visa o enraizamento, que pode ser obtido *in vitro* ou *in vivo*, em meio com baixa concentração de sais e suplementado com auxinas. O

enraizamento pode também ser obtido em meio de cultura livre de reguladores de crescimento. Para a maioria das plantas ornamentais ambas as técnicas são apropriadas para promover o alongamento e/ou enraizamento.

A qualidade do material micropropagado é fundamental para o sucesso da aclimatização (estágio 4). Pode-se definir aclimatização como a transferência das mudas da condição *in vitro* para *ex vitro*, em que fatores, como hiperhidricidade (aspecto de vidro) ou distúrbios fisiológicos podem ser extremamente limitantes.

A cultura de tecidos, além de permitir a propagação de espécies com problemas de propagação sexuada, possibilita a obtenção de plantas isentas de viroses e clones mais produtivos, preservação e intercâmbio de germoplasma e a realização de estudos envolvendo biologia molecular (George, 1996).

2.3 Micropropagação de orquídeas

Para satisfazer às necessidades de mercado, preservar as espécies, manter a biodiversidade e recuperar áreas já despovoadas, é importante dispor de métodos adequados de propagação, de modo a permitir a clonagem rápida e massiva dessas plantas.

As técnicas de cultura de células e tecidos *in vitro* para orquídeas têm sido utilizadas para estudos de anatomia vegetal (Esau, 1976), fisiologia vegetal (Arditti & Ernst, 1992), nutrição mineral (Arditti & Ernst, 1992; Caldas et al., 1998), fitopatologia e limpeza clonal (Duval et al., 1998), produção de metabólitos secundários (Dörmenburg & Knorr, 1996), criopreservação, propagação clonal e melhoramento genético (Arditti & Ernst, 1992).

Como discutido anteriormente, os métodos de propagação seminífera convencional e propagação vegetativa natural por divisão de touceiras têm se mostrado inadequados ou ineficientes e antieconômicos, para plantas desta

família. O cultivo *in vitro* de células e tecidos tem sido, portanto, excelente alternativa a ser empregada para a propagação das orquídeas, apesar de ser um processo lento em relação a outras espécies e demandar mão-de-obra especializada. Segundo Prakash et al. (1996), as orquídeas foram as primeiras plantas de importância econômica clonadas pelo método de cultivo *in vitro* em escala comercial.

O desenvolvimento do método de germinação assimbiótica de sementes *in vitro*, por Knudson, em 1922, possibilitou estudos posteriores visando a propagação vegetativa *in vitro*. Rotor (1949), Morel (1960, 1964, 1969) e Reinert & Mohr (1967) são exemplos dos primeiros pesquisadores que lograram êxito com a propagação de orquídeas (Read & Szendrak, 1998).

Os cultivos *in vitro* apresentam as vantagens de serem, em alguns casos, muito eficientes, proporcionarem altos rendimentos e manterem nos descendentes as características da planta-matriz (Pierik, 1990). Apresentam ainda vantagens únicas sobre os métodos convencionais de propagação, como multiplicação rápida e obtenção de populações homogêneas de genótipos oriundos de programas de melhoramento genético. As células competentes e especializadas são manipuladas para proporcionar elevada multiplicação de plantas-matrizes, sob estímulos apropriados e ótimas condições de incubação (Govil & Gupta, 1997).

É, porém, reduzido o número de trabalhos publicados que envolvem cultura de células e tecidos vegetais de espécies de orquídeas. Além disso, ainda é necessário otimizar protocolos eficientes de propagação em larga escala (Arditti & Ernst, 1992), para que as técnicas não convencionais sejam aplicáveis ao fitomelhoramento genético.

2.3.1 Meios de cultura

Os meios nutritivos utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas et al., 1998).

Na cultura de tecidos, os meios de cultura geralmente são compostos de uma fonte de carboidratos, macro e micronutrientes e outras substâncias como vitaminas, aminoácidos, açúcares, agente solidificante, reguladores de crescimento (George & Sherrington, 1984) e, eventualmente, aditivos, como antibióticos, carvão ativado e componentes complexos.

Knudson (1922) observou que era possível o cultivo de sementes em meio artificial, contendo minerais e açúcar, sem a presença de fungos. Posteriormente, em 1946, ele aperfeiçoou esse meio de cultura, sendo, atualmente, o mais utilizado comercialmente na germinação e desenvolvimento de orquídeas (Arditti & Ernst, 1992). No entanto, são necessários estudos, pois são descritos vários meios de cultura para muitos gêneros e espécies diferentes.

Existe grande variedade de meios para micropropagação. Entretanto, a maioria das descrições de preparos de meios de cultura alternativos não demonstra de maneira comparativa se o novo meio é ou não melhor que o outro do qual ele foi originado. Esse deve ser selecionado em função da espécie e tipo de cultivo ou do estágio cultural que está sendo efetivado (Pasqual et al., 1997).

Várias mudanças de padrão foram propostas na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro*. Essas modificações visam principalmente a redução ou incremento de alguns componentes que podem promover melhor crescimento em tecidos de orquídeas (Hoffmann et al., 1998).

A alta proporção de nitrogênio (N) na forma de amônio no meio MS e a quantidade total de N são muito maiores do que na maioria dos outros meios,

tornando-se inadequados para algumas espécies. Meios que apresentam menor proporção, como o Knudson C (Knudson, 1946) ou WPM, são mais indicados para otimizar o crescimento e a morfogênese em algumas espécies (Pasqual et al., 1997).

No cultivo e subcultivo de plântulas do gênero *Cattleya*, George et al. (1987) sugerem o meio Knudson C ou Reinert & Mohr (Reinert & Mohr, 1967). Segundo Arditti & Ernst (1992), o meio de propagação para *Cattleya*, *Laelia*, *Laeliocattleya* e *Brassocattleya* podem ser os mesmos citados anteriormente.

Villalobos et al. (1994) sugerem o meio Vacin & Went (Vacin & Went, 1949) para *Cattleya*, *Encyclia* e *Oncidium*, suplementado com 25% de água de coco e o meio Knudson C suplementado com 60 g L⁻¹ de polpa de banana para orquídeas do gênero *Stanhopea*.

2.3.2 Reguladores de crescimento

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por substâncias orgânicas naturais denominadas fito-hormônios, os quais são sintetizados em pequenas concentrações e em determinadas regiões das plantas, sendo distribuídos em diferentes órgãos, nos quais exercem suas funções, inibindo ou estimulando processos fisiológicos e ou bioquímicos vitais. Esses fito-hormônios podem ser sintetizados em laboratório e denominados de substâncias reguladoras de crescimento ou fitorreguladores (Taiz & Zeiger, 1991a, citado por Fráguas, 2003).

Embora as auxinas não sejam necessárias no cultivo *in vitro* de algumas espécies, as citocininas são indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. Além disso, promovem divisão, alongamento e diferenciação celular e retardam a senescência das plantas (Taiz & Zeiger, 1991b, citado por Fráguas, 2003).

A composição e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (Caldas et al., 1998). Os reguladores de crescimento são substâncias que atuam em baixas concentrações, em vários processos do desenvolvimento das plantas (George & Sherrington, 1984).

As citocininas, substâncias sintetizadas principalmente nos pontos de crescimento do sistema radicular, como o BAP (6-benzilaminopurina), induzem a formação de grande número de brotos, aumentando a taxa de multiplicação (Hu & Wang, 1983; Pierik, 1987).

Na maioria dos casos, uma relação auxina/citocinina tendendo para maior concentração de citocininas é necessária para indução de brotações nos explantes (George & Sherrington, 1984). O tipo de citocinina e a sua concentração são os principais fatores que influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Experimentos testando diversas combinações de citocinina com outros reguladores de crescimento são muito comuns para o ajustamento dos meios de cultura (Grattapaglia & Machado, 1998).

O BAP tem sido eficiente na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (Hu & Wang, 1983) e é a citocinina mais utilizada, seguida pela cinetina e 2iP (isopenteniladenina).

Apesar da utilização de citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, por excessivo número de brotos, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação (Leshem et al., 1988). Qi-Guang et al. (1986) observaram que altas concentrações de BAP inibiram a brotação das gemas e, conseqüentemente, o número de partes aéreas, promovendo a formação de calo em *Castanea mollissima*.



Start & Cumming (1976), trabalhando com violeta africana obtiveram ótimos resultados na multiplicação *in vitro* com o emprego de 1 mg L^{-1} de BAP e fizeram referência a que, possivelmente, as técnicas de cultura de tecidos poderiam produzir milhões de mudas bem formadas, por meio de brotações axilares e laterais de gérbera, gloxínia e morango, em um espaço mínimo e de forma econômica. Raman (1977) obteve grande número de brotos de gloxínia utilizando meio MS suplementado com 1 mg L^{-1} de BAP e 1 mg L^{-1} de ANA. Segundo Paiva et al. (1997), maior número de brotos de gloxínia pode ser obtido com o emprego de 2 mg L^{-1} de BAP na ausência de ANA.

2.3.3 Carvão ativado

O carvão ativado (CA) é preparado pela carbonização controlada da madeira em vapor ou ar, utilizado comumente para adsorver gases e dissolver sólidos (George, 1993). É um pó de carvão finamente moído para aumentar a área de adsorção das partículas. Não é um regulador de crescimento, mas tem a capacidade de modificar o meio e, em algumas circunstâncias, melhorar ou regular o crescimento de plântulas *in vitro*. Entretanto, pode induzir androgenia, alterar o pH, remover nutrientes orgânicos e reguladores de crescimento, inibir o crescimento e a morfogenia (George, 1993).

Entre os efeitos proporcionados pela adição do carvão ativado ao meio de cultura, principalmente à organogênese e à embriogênese estão: promoção de ambiente escuro, favorecendo o enraizamento; adsorção de substâncias inibitórias produzidas pelo próprio meio ou explante; adsorção de reguladores de crescimento e outros compostos orgânicos e liberação de substâncias naturalmente presentes no carvão que beneficiam o crescimento *in vitro* das culturas (Pan & Staden, 1998, citado por Fráguas, 2003).

O carvão ativado normalmente é adicionado ao meio de cultura em



concentrações que variam de 0,2% a 3% (Beyl, 2000; Guerra & Handro, 1988). O seu efeito não-seletivo pode proporcionar resultados negativos na micropropagação. Pesquisas relatam a adsorção de tiamina, ácido nicotínico (Weatherhead et al., 1978), piridoxina, ácido fólico, reguladores de crescimento e quelatos de ferro (Johansson et al., 1990).

Trabalhando com explantes de milho, Mohamed-Yasseen (2001) percebeu que o carvão ativado adsorvia o ácido giberélico (GA₄), com efeito benéfico, promovendo crescimento de raízes e número de brotos.

Damiano (1978), Anderson (1980), Amin & Jaiswal (1987), citados por Fráguas (2003), relataram o efeito favorável do carvão, quando utilizado em baixas concentrações, no enraizamento de brotações de morangueiro, framboeseira e goiabeira, respectivamente. Arena & Pastur (2001) citam que a adição de carvão ativado ao meio de cultura promoveu alongamento das brotações de *Berberis buxifolia*, mas reduziu o índice de multiplicação. Hazra et al. (2002) relataram o efeito sinérgico do carvão ativado na multiplicação e enraizamento de brotações de algodoeiro.

A diversidade de resultados obtidos com a utilização de carvão ativado se deve, principalmente, ao genótipo da espécie em questão, à adsorção de algumas substâncias químicas e compostos orgânicos, além de metabólitos tóxicos liberados no cultivo *in vitro* (Wang & Huang, 1976) e, possivelmente à sua interferência na ação das auxinas e citocininas (Constantin et al., 1977).

2.3.4 Aclimatização de plantas obtidas por micropropagação

A aclimatização pode ser definida como a transferência da planta da condição *in vitro* para o ambiente natural ou para um ambiente intermediário, como casa de vegetação ou telado (Debergh & Maene, 1981). Há controvérsias no uso do termo aclimação e aclimatização. Segundo Preece & Sutter (1991), a

palavra aclimação denota o processo durante o qual plantas ou outros organismos ajustam-se ou acostumam-se a uma nova condição de clima ou situação, como um resultado de um processo natural. George (1993) define aclimação como um processo de adaptação regulado pela natureza e aclimatização como sendo aquele controlado pelo homem. Alguns pesquisadores consideram esses termos sinônimos. Para Sluis & Walker (1985) e Crócomo (1988), a aclimatização é uma fase crítica na micropropagação de plantas e, em alguns casos, pode ser um fator limitante nesse processo (Grattapaglia & Machado, 1998).

Um grande número de plantas micropropagadas pode não sobreviver à transferência das condições *in vitro* para casa de vegetação. A maioria das espécies que crescem *in vitro* requer um processo de aclimatização para sobreviver e crescer quando transferida para o solo (Preece & Sutter, 1991). Segundo Dunstan & Turner (1984), a aclimatização é constituída de duas fases: enraizamento (*in vitro* ou *ex vitro*) e transferência das mudas para condições não estéreis com temperatura e umidade controladas.

A principal causa da baixa sobrevivência é a excessiva perda de água pelas plantas durante a aclimatização (Sutter & Langhans, 1982). A quantidade reduzida de cera epicuticular está diretamente relacionada com o aumento da perda de água em brotos cultivados. Taxas de transpiração foram mais altas em folhas de plantas com baixa quantidade de cera epicuticular quando comparadas com as plantas que cresceram em casa de vegetação ou que já estavam aclimatizadas (Wardle et al., 1983; Sutter & Langhans, 1982). O mecanismo de abertura e fechamento de estômatos das plantas que foram cultivadas *in vitro* e estão em processo de aclimatização é mais lento do que em plantas mantidas em casa de vegetação ou aclimatizadas e isto pode levar à rápida perda de água, causando colapso nas folhas e resultando em clorose. A baixa integridade da cutícula e da membrana celular também contribui para a degradação dos

estômatos (Sutter, 1988). As plantas mantidas *in vitro* também requerem baixa luminosidade relativa e, quando submetidas ao aumento de luz, sofrem um processo de destruição de clorofila, tornando-se cloróticas e queimadas (Costa, 1998).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), vários fatores são limitantes durante a fase de aclimatização: 1) passagem de um baixo fluxo respiratório (*in vitro*) para um ambiente que demanda incremento na taxa de respiração, podendo causar estresse hídrico; 2) a planta passa de um meio heterotrófico com grande suprimento de energia (sacarose) para o autotrófico, com a necessidade de realizar fotossíntese para sobreviver; 3) a planta passa a ter que incrementar a absorção de sais rapidamente e 4) a planta passa de um ambiente asséptico para outro, onde fica sujeita ao ataque de microorganismos.

O alto custo da produção de mudas pelo processo de cultura de tecidos ocorre principalmente, pela alta porcentagem de perdas na fase de aclimatização (Sluis & Walker, 1985). A carência de informações ou ausência de técnicas ligadas a essa etapa, como controle de umidade, luminosidade, temperatura e substratos, pode quebrar a continuidade do processo de produção (Wardle et al., 1979).

Visando reduzir as perdas durante a fase de aclimatização, vários estudos vêm sendo desenvolvidos para favorecer o crescimento das mudas nesta fase limitante da cultura de tecidos. Segundo Gribaudo & Fronda (1993), a técnica convencional de aclimatização consiste basicamente no enraizamento *in vitro* em substrato com ágar, com subsequente repicagem para o substrato sob nebulização intermitente, para manter alta a umidade relativa do ar, reduzindo-a posteriormente de forma gradativa. A utilização de sombreamento para evitar o estresse pela luz (George, 1993), a inoculação de micorrizas (Corsato, 1993) e a escolha de substratos adequados (Normah et al., 1995) são importantes no processo de aclimatização.

2.3.4.1 Substratos

O uso de substratos industriais tem crescido muito nos últimos anos, pelo fato da produção hortícola estar cada vez mais baseada em substratos artificiais (Bellé & Kämpf, 1993). Atualmente, são usados diferentes tipos, dependendo da espécie a ser cultivada, existindo aqueles já preparados, com diferentes composições. Infelizmente, no Brasil, ainda não há uma legislação que regulamente o seu comércio (Gonçalves, 1992).

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. No Brasil, não existem tantas opções de substrato, como ocorre em países que se especializaram em comercializar os mais exóticos insumos para cultivo de plantas ornamentais, tais como cascas de diversas árvores, folhas secas de pinus, pedriscos de tamanhos diferentes e tipos raros de pedra e musgo importados da Nova Zelândia (Ortega et al., 1996).

O xaxim, substrato preferido pela maioria dos orquidófilos brasileiros, é formado pelas raízes adventícias de algumas samambaias das famílias Dicksoniaceae e Cyatheaceae. Geralmente, é utilizado na forma de fibras e, quando usado como substrato, dura cerca de três a quatro anos. O xaxim desfibrado é obtido mediante o desfibramento do caule da "samambaiçu" (samambaia gigante). Já o xaxim em pó é retirado por meio de peneiramento, lavagem com água corrente ou até "batido" em peneira de poros largos. Esse substrato é considerado excelente para o cultivo de orquídeas, pois retém grande quantidade de água, conservando-se úmido por longo tempo. Na ausência de precipitações pluviais ou irrigações, pode ceder água ao velame, por contato, ou provocar elevação da umidade relativa no ambiente próximo ao vaso, mantendo o teor de umidade (Silva, 1986).

No Brasil, as plantas fornecedoras de xaxim, como a samambaiçu (*Dicksonia sellowiana* Hook), encontram-se em processo de extinção, devido ao extrativismo desenfreado, apesar da legislação do meio ambiente em vigor. Essas plantas levam de 15 a 18 anos para atingir o estágio ideal para a extração e, na atualidade, não existe plantio visando à produção comercial (Lorenzi & Sousa, 1996). Em vista desse extrativismo, foi promulgada, em 21 de janeiro de 1992, no Rio Grande do Sul, a Lei 9.519, que proíbe a extração do xaxim de florestas nativas (Kämpf, 2000b). Essa lei beneficia as florestas nativas dos territórios do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, onde ocorre larga extração ilegal (Silva, 1986).

O uso de substratos alternativos para o cultivo de orquídeas deverá trazer uma série de benefícios à natureza, preservando a "samambaiçu" que, há muitos anos, vem sendo utilizada no cultivo de várias espécies de orquídeas (Lorenzi & Sousa, 1996). Segundo Silva (1986), existem substratos que podem ser utilizados para o cultivo de orquídeas: raízes de *Polypodium* (também uma espécie de samambaia), fibra e raízes de *Osmunda regalis* (samambaia-real), casca de barbatimão, casca de pínus, fibra de coco e argila expandida.

No Brasil, há vários materiais com potencial de uso como substratos, entretanto, a falta de testes e informações limitam sua exploração (Backes & Kämpf, 1991).

a) Casca de arroz carbonizada

A casca de arroz carbonizada é um material de baixa densidade e capacidade de retenção de água, sendo a CTC também baixa, mas superior ao da areia, oferecendo boa aeração, drenagem rápida, eficiente e apresentando pH em torno da neutralidade. É rica em minerais, principalmente Ca, K e Si (Minami, 1995 e Kämpf, 2000a). Possui características semelhantes à fibra de xaxim,

podendo tornar-se um substituto dele, pois as reservas de xaxim naturais são limitadas (Backes, 1989, citado por Rocha, 2000).

Em crisântemo, Souza et al. (1995) verificaram que a mistura contendo solo, areia e casca de arroz carbonizada (2:1:4) proporcionou melhor crescimento e florescimento dessa espécie, além do aumento da retenção de água, bem como a quantidade e qualidade da produção em vaso.

A casca de arroz é utilizada na constituição de substratos para aclimatização de algumas espécies, como crisântemo (*Dendranthema grandiflorum*), amor-perfeito, cravo-de-defunto e flor-de-mel (Takeyoshi et al., 1984).

Na produção de mudas de calanchoe (*Kalanchoe blossfeldiana* cv. Singapur), Gonçalves (1992) constatou que substratos contendo casca de arroz carbonizada apresentaram bons resultados.

Em trabalho realizado com mudas de gipsofila (*Gypsophila unguiculata*), a casca de arroz carbonizada proporcionou grande aeração e os resultados decorrentes do seu uso superaram os demais tratamentos (Bosa, 2002).

b) Pedra britada

Provenientes de granito, em pedaços de 1,5 cm de diâmetro, a pedra britada nº 1 ou 2 é recomendada para o cultivo de *Cattleya nobilior*, *Rodriguezia* sp. e espécies rupícolas, que não precisam de muita água.

A brita sofre pouca ou nenhuma alteração de pH, podendo a planta viver por muito mais tempo em um mesmo substrato sem que haja necessidade do estressante transplante (Rodrigues, 2001).

c) Fibra de piaçava

Utilizada na fabricação de vassouras, a fibra de piaçava deixa sobras que são descartadas pelas fábricas e podem ser utilizadas como substrato. Tem boa durabilidade e, ao mesmo tempo, baixo nível de desintegração, pouco fornecimento de nutrientes e baixa capacidade de retenção de água. É recomendada para orquídeas, que não requerem muita umidade.

d) Xaxim desfibrado

Um dos componentes do substrato para orquídeas mais utilizado na atualidade é o xaxim, na forma de pó (partículas pequenas) ou de fibras, pois apresenta boa aeração e baixa densidade. O xaxim ou samambaiaçu, extraído do tronco da samambaia arbórea *Dicksonia sellowiana*, está em extinção e sua coleta, industrialização, comércio e transporte são ilegais no Rio Grande do Sul (IBAMA). Por essa razão, a pesquisa de diferentes substratos para uso na aclimatização e cultivo, que venham a substituir, ou pelo menos, diminuir o emprego do xaxim, torna-se necessária para protegê-lo da extinção. Sua substituição pode também dar outra finalidade a resíduos ou materiais de pouca utilização, de fácil obtenção e que, ao mesmo tempo, permitam bom desenvolvimento de plantas.

O xaxim está há dez anos na lista de plantas ameaçadas de extinção do IBAMA. A extração e exploração comercial do xaxim foram proibidas em 2001 em todo o território nacional, de acordo com a resolução do Conama 278/ 1, de 24 de maio do mesmo ano.

2.3.4.2 Adubação

As orquídeas devem ser adubadas preferencialmente nos meses mais quentes (de agosto a abril), quando as plantas estão em pleno desenvolvimento vegetativo. Como esse desenvolvimento é lento, a aplicação do adubo deverá ser a mais parcelada possível. Após a floração, as orquídeas entram em repouso vegetativo e, nessa fase, não se deve adubá-las, o que deve ser feito tão logo inicie a brotação, com adubos químicos ou orgânicos (Approbato Filho, 2001).

Segundo Campos (1996), pode-se adubar as orquídeas com esterco de ave bem seco, desinfetado com fungicida e peneirado. O esterco de ave é um adubo rico em nitrogênio e que pode ser usado em mistura com o xaxim, quando se planta a orquídea ou, então, levemente espalhado sobre o substrato. A quantidade de 40 g é o suficiente para cada planta, repetindo a adubação a cada dois meses.

Os adubos inorgânicos são facilmente encontrados em casas especializadas em plantas ou produtos agropecuários e fortalecem as plantas contra doenças e pragas, auxiliando na produção de flores. No mercado já existem diversos produtos com formulações NPK para orquídeas (Quadro 1), sendo facilmente encontrados em floriculturas e similares (Campos, 1996).

A aplicação deve ser feita por meio de pulverização foliar. Assim que iniciar a abertura das flores, deve-se suspender a adubação, pois as flores poderão ficar manchadas (Paula & Silva, 2001).

Erickson (1957), citado por Carlucci et al. (1980), analisou folhas de *Cattleya* com idades de 1 até 7 anos, cultivadas em substrato esfagno e verificou que a concentração em K decresce com a idade das folhas; por outro lado, observou um aumento considerável na concentração de Ca que aumenta com a idade da folha. A concentração em Mg mostrou-se estável durante os sete anos,

enquanto as concentrações em N e P decresceram com o aumento da idade das folhas.

QUADRO 1 Formulações NPK para as diferentes fases de plantas de orquídeas e época de aplicação do produto.

Planta nova (planta que ainda não floresce anualmente)		30-10-10, 10-05-05, ou similar	Aplicação de 15 em 15 dias
Planta adulta (planta que já floresce anualmente)	Fase I (do início da brotação até o crescimento máximo do broto)	30-10-10, 30-15-15, 10-05-05 ou similar	Aplicação de 15 em 15 dias
	Fase II pré-floração (antes da emissão da inflorescência até a formação completa dos botões florais)	00-30-20, 10-30-20, ou similar	

Fonte: Paula & Silva, 2001.

Carlucci et al. (1980) realizaram trabalho com *Cattleyas* e *Laelias* cultivadas em substrato de xaxim (*Dicksonia sellowiana*) e constataram que a concentração em N, P, K, Ca, Mg e S nas orquídeas de ambos os gêneros é ligeiramente inferior à encontrada comumente em plantas de outras espécies. Já a concentração de B, Cu, Fe, Mn e Zn foi elevada e bem superior à encontrada usualmente em outras espécies (Tabela 1). A extração total de macronutrientes pela planta inteira obedeceu à seguinte escala: *Laelia crispilabia*, 364,36 mg; *Laelia cinnabarina*, 486,26 mg; *Cattleya loddigesii*, 606,99 mg; *Cattleya intermédia*, 816,21 mg e *Laelia flava*, 826,36 mg. De acordo com Haag et al. (1991), para micronutrientes, os valores de extração total pela planta inteira

foram: *Laelia crispoilabia*, 384,10 mg; *Laelia cinnabarina*, 522,90 mg; *Cattleya loddigesii*, 654,20 mg; *Laelia flava*, 875,10 mg e *Cattleya intermedia*, 888,30 mg.

TABELA 1 Composição química de macro e micronutrientes em *Cattleya*.

	Folhas novas 1-2 anos	Folhas maduras 3 anos	Pseudobulbos 3 anos	Raízes
N %	1,5-2,5	1,0-2,0	1,0-2,0	1,0-2,0
P %	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,3	0,2-0,4
K %	2,0-3,0	1,0-2,5	1,0-2,0	0,5-1,5
Ca %	0,4-1,0	1,5-3,0	0,5-1,0	0,1-0,4
Mg %	0,3-0,6	0,3-0,6	0,2-0,6	0,2-0,4
Fe g kg ⁻¹	50-100	100-500	60-100	125-250
Mn g kg ⁻¹	40-80	200-400	20-60	20-60
Zn g kg ⁻¹	60-100	100-150	100-150	250-7150
Cu g kg ⁻¹	30-50	30-60	30-60	30-60

Fonte: adaptado de Carlucci et al. (1980)

A exportação média de nutrientes pela flor apresentou os seguintes valores: P – 1,30 mg; K – 19,7 mg; Ca – 7,40 mg; Mg – 1,60 mg; Cu – 9,5 µg; Fe – 366,5 µg; Mn – 216 µg e Zn – 75,4 µg.

Para Malavolta et al. (1997), os teores de macronutrientes considerados adequados (análise foliar) para orquídeas, em g/kg, são: N– (15-25); P– (1,3-7,5); K– (20-35); Ca– (5,0-20); Mg– (3,0-7,0); S– (1,5-7,5), e para micronutrientes em mg/kg, são: B– (25-75); Cu– (5-20); Fe– (50-200); Mn– (40-200) e Zn– (25-200).

Apesar de serem escassas as pesquisas com nutrição mineral em orquídeas, os autores citados acima observaram que elas são plantas que necessitam dos mesmos nutrientes que as demais espécies botânicas para o seu desenvolvimento normal.



3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi constituído de experimentos de crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídeas produzidas por cultura de tecidos vegetais. Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

3.1 Fase de crescimento *in vitro*

No preparo dos meios foram utilizadas soluções-estoque armazenadas em frascos de vidro escuro, a temperaturas em torno de 5°C. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$, com NaOH 0,5 e 0,1 N ou HCl 0,1 N, antes da adição de 6 g L⁻¹ de ágar. Os meios foram vertidos em frascos de vidro com capacidade para 250 cm³, vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1,1 atm e à temperatura do 121°C, durante 20 minutos.

Para a instalação dos experimentos foram utilizadas plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com 1 a 1,5 cm de comprimento e contendo raízes. O manuseio do material vegetal ocorreu em câmara de fluxo laminar desinfestada com álcool 70% (etanol) e, após a inoculação, os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 32 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo os dados comparados por meio do teste de médias Scott-Knott ou regressão polinomial empregando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

3.1.1 Espécies e KNO₃ e NH₄NO₃ na crescimento *in vitro*

Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de KNO₃ e NH₄NO₃ (0%, 25%, 50%, 75% e 100 % da formulação 330 mg L⁻¹ de NH₄NO₃ e 380 mg L⁻¹ de KNO₃^{*}) adicionadas ao meio de cultura KC (Tabela 2) e diferentes espécies de orquídea (*Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior*, *Cattleya leopoldii*; *Laelia purpurata* 'Cárnea' e *Laelia crispa*). O meio foi acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de ANA, 3 mg L⁻¹ de GA₃, 25 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado. Os explantes foram inoculados em frascos contendo 50 mL de meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5, com cinco repetições de 10 plântulas cada.

O experimento foi avaliado após 90 dias da instalação, por meio de número de folhas, número de raízes, número de brotos, comprimento da parte aérea e peso da matéria fresca de plântulas.

3.1.2 Meios de cultura e BAP na multiplicação *in vitro*

Plântulas da espécie *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow' foram inoculadas em frascos contendo 40 mL do tratamento contendo diferentes meios de cultura (KC, MS e WPM – Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente) e concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), acrescidos de 2 g L⁻¹ de carvão ativado.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x5, com quatro repetições de cinco plântulas cada.

* 1/5 da concentração de KNO₃ e NH₄NO₃ utilizada na solução nutritiva de Murashige & Skoog (MS), 1962.

O experimento foi avaliado após 90 dias da instalação, por meio de comprimento da parte aérea, número de brotos, número de raízes, número de folhas e peso da matéria fresca das plântulas.

TABELA 2 Solução nutritiva KC (Knudson C, 1946).

Solução estoque (SE)	Compostos	Concentração da SE (mg L ⁻¹)	Volume da SE adicionada ao meio (mL)	Concentração final (mg L ⁻¹)
1	Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	40000	25	1000,00
2	(NH ₄) ₂ SO ₄	25000	20	500,00
3	MgSO ₄ . 7H ₂ O	50000	5	250,00
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	1500		7,5
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	12,4		0,062
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	66,2		0,331
4	H ₃ BO ₃	11,2	5	0,056
	KH ₂ PO ₄	50000		250,00
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	5,2		0,026
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	1250	20	25,00
AÇUCAR	Sacarose (2%)	--	--	20000,00
AGAR	0,6%			6000

Fonte: Pierik (1987).

3.1.3 Concentrações do meio de cultura KC e carvão ativado no crescimento *in vitro*

Plântulas da espécie *Laelia tenebrosa* foram inoculadas em frascos contendo 40 mL do meio de cultura KC (Tabela 2), nas concentrações de 0%, 50%, 100%, 150% e 200% de sais minerais e sacarose (20 g L⁻¹), combinado com cinco concentrações de carvão ativado (0; 0,5; 1; 2 e 4 mg L⁻¹).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x5, com quatro repetições de cinco plântulas cada.

O experimento foi avaliado após 150 dias da instalação, por meio de comprimento da parte aérea, número de brotos, número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas e peso da matéria fresca das plântulas.

TABELA 3 Solução nutritiva MS (Murashige & Skoog, 1962).

Solução estoque (SE)	Compostos	Concentração da SE (mg L ⁻¹)	Volume da SE adicionada ao meio (mL)	Concentração final (mg L ⁻¹)
A	NH ₄ NO ₃	82500	20	1650,00
B	KNO ₃	95000	20	1900,00
C	H ₃ BO ₃	1240	5	6,20
	KH ₂ PO ₄	34000		170,00
	KI	166		0,83
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	50		0,25
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	5		0,025
D	CaCl ₂ . 2H ₂ O	8800	50	440,00
E	MgSO ₄ . 7H ₂ O	74000	5	370,00
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	4460		22,30
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1720		8,60
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	5		0,025
F	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	7450	5	37,25
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	5570		27,85
HEXITOL	Mio-Inositol	2000	50	100,00
VITAMINAS	Tiamina -HCl	50	10	0,50
	Ác. Nicotínico	50		0,50
	Piridoxina -HCl	50		0,50
Aminoácido	Glicina	80	25	2,00
AÇUCAR	Sacarose (3%)	--	--	30000,00
AGAR	0,6%	--	--	6000,00

3.2 Fase de aclimatização

A aclimatização foi realizada em casa de vegetação com sistema de ventilação realizada por exaustores. Inicialmente, as plântulas foram transplantadas para bandejas coletivas e pó de xaxim como substrato, até sua

completa adaptação. Decorridos seis meses, as plantas (3,0 a 5,0 cm de comprimento) foram transferidas para bandejas de plástico com 24 células de 150 cm³ cada e mantidas em bancada de tela metálica por um período de doze meses. Durante a condução dos experimentos, foram feitas três pulverizações utilizando Benomyl (2 g L⁻¹ do produto comercial Benlate®). A irrigação foi feita de acordo com as condições de umidade do substrato, baseando-se em avaliação visual.

TABELA 4 Solução nutritiva WPM- Wood Plant Medium de Lloyd & McCown, 1980.

Solução estoque (SE)	Compostos	Concentração da SE (mg L ⁻¹)	Volume da SE adicionada ao meio (mL)	Concentração final (mg L ⁻¹)
A do MS	NH ₄ NO ₃	82500	4,85	400,00
D do MS	CaCl ₂ . 2H ₂ O	8800	10,9	96,00
F do MS	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	7450	5	37,25
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	5570		27,85
HEXITOL	Mio-Inositol	2000	50	100,00

Solução do WPM

1	H ₃ BO ₃	310	20	6,20
	KH ₂ PO ₄	8500		170,00
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12,5		0,25
2	Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	40000	13,9	556,00
3	K ₂ SO ₄	19800	50	990,00
4	MgSO ₄ . 7H ₂ O	18500	20	370
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	845		22,3
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	430		8,6
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	12,5		0,25
VITAMINAS	Tiamina - HCl	50	10 mL do MS	1,00
	Piridoxina - HCl	25	+ 5 mL	0,50
	Ác. Nicotínico	25	Tiamina	0,50
AÇUCAR	Sacarose (2%)	--	--	20000,00
AGAR	0,6%	--	--	6000,00

OBS.: Tiamina (solução estoque 100 mg L⁻¹)

3.2.1 Adubações e substratos na aclimatização de plântulas de orquídea

Plântulas da espécie *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' já aclimatizadas foram transplantadas em diferentes substratos (brita nº 0, casca de arroz carbonizada, xaxim desfibrado e fibra de piaçava) e submetidas à diferentes adubações (testemunha, Biofert Plus®, Dyna-Grow® e formulação elaborada (comunicação pessoal)*). As formulações de cada produto constam nas Tabelas 5, 6 e 7.

As adubações foram realizadas semanalmente, sendo a testemunha pulverizada com água pura. O Dyna-Grow® foi aplicado na concentração de 2,5 mL L⁻¹ e o Biofert Plus®, 5,0 mL L⁻¹. A formulação elaborada foi aplicada na seguinte seqüência: solução A, B, A, C, A, D...

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4, com quatro blocos e seis plântulas por parcela, sendo os dados comparados por meio do teste de médias Scott-Knott com o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

O experimento foi avaliado após 12 meses da instalação, por meio de comprimento da parte aérea, número de brotos, número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas e peso da matéria fresca das plântulas.

TABELA 5 Composição do adubo foliar Biofert Plus®.

Nitrogênio (N): 8%	Cobalto (Co): 5 ppm
Fósforo (P ₂ O ₅): 9%	Cobre (Cu): 500 ppm
Potássio (K): 9%	Ferro (Fe): 1000 ppm
Cálcio(Ca): 1000ppm	Manganês (Mn): 200 ppm
Magnésio (Mg): 100 ppm	Molibdênio (Mo): 5 ppm
Enxofre (S): 1000 ppm	Cloro (Cl): 1000 ppm
Boro (B): 200 ppm	Zinco (Zn): 500 ppm

*Janice Guedes de Carvalho - Professora de Nutrição Mineral de Plantas. DCS/UFLA.

TABELA 6 Composição do adubo foliar Dyna-Grow®.

Nitrogênio (N): 10%	Cobalto (Co): 6 ppm
Fósforo (P): 5%	Cobre (Cu): 70 ppm
Potássio (K): 5%	Ferro (Fe): 625 ppm
Cálcio(Ca): 2%	Manganês (Mn): 40 ppm
Magnésio (Mg): 0,51%	Molibdênio (Mo): 5 ppm
Enxofre (S): 300 ppm	Níquel (Ni): 1 ppm
Boro (B): 70 ppm	Sódio (Na): 300 ppm
Cloro (Cl): 60 ppm	Zinco (Zn): 90 ppm

TABELA 7 Formulação elaborada (comunicação pessoal)*, Lavras-MG, 2004.

Solução		g L ⁻¹
A	Sulfato ferroso amoniacal	0,5
B	Melaço	0,5
	Uréia	0,4
	ZnSO ₄	0,2
	H ₃ BO ₃	0,1
	KCl	0,3
	KH ₂ PO ₄	0,5
C	MAP	0,4
	Molibdato de amônio	0,05
	Uréia	0,2
	KCl	0,30
	Melaço	0,5
D	KCl	0,05
	Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0,4
	KH ₂ PO ₄	0,2
	Uréia	0,2
	Melaço	0,3
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,4
	MnSO ₄ 4H ₂ O	0,1
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,1

* Janice Guedes de Carvalho - Professora de Nutrição Mineral de Plantas. DCS/UFLA.

As adubações foram realizadas semanalmente, sendo a testemunha pulverizada com água pura. O Dyna-Grow® foi aplicado na concentração de 2,5 mL L⁻¹ e o Biofert Plus®, 5,0 mL L⁻¹. A formulação elaborada foi aplicada na seguinte seqüência: solução A, B, A, C, A, D...

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4, com quatro blocos e seis plântulas por parcela, sendo os dados comparados por meio do teste de médias Scott-Knott com o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

O experimento foi avaliado após 12 meses da instalação, por meio de comprimento da parte aérea, número de brotos, número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas e peso da matéria fresca das plântulas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espécies e KNO₃ e NH₄NO₃ no crescimento *in vitro*

Para a variável número de folhas não houve interação entre os fatores estudados. Houve significância apenas para o fator espécie. A interação dos fatores foi significativa para as demais variáveis (Tabela 8).

TABELA 8 Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria fresca de plântulas (PMFP). UFLA, Lavras, MG, 2003.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios				
		NF	NR	NB	CPA	PMFP
Meios	4	5,4821 ^{ns}	1,3958 ^{ns}	0,6682 ^{**}	0,2573 ^{ns}	0,0053 ^{ns}
Espécie	3	165,774 ^{**}	14,1576 ^{**}	6,4580 ^{**}	16,0606 ^{**}	0,3409 ^{**}
Meio x espécie	12	12,8669 ^{ns}	8,0208 ^{**}	0,2916 [*]	0,3533 ^{**}	0,0149 [*]
Resíduo	80	5,3267	2,7189	0,1383	0,1096	0,0064
CV (%)		22,71	31,25	20,78	10,91	22,75

^{**}, ^{*} significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Número de folhas

Analisando-se a Tabela 9 verifica-se que a espécie *C. nobilior* x *C. nobilior* obteve o maior número de folhas (12,59). As espécies *C. leopoldii* e *L. crispa* obtiveram resultados intermediários, enquanto que a espécie *L. purpurata* 'Cárnea' obteve média inferior às demais (6,56).

TABELA 9 Número médio de folhas em plântulas de orquídea de diferentes espécies cultivadas sob diferentes concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 . UFLA, Lavras, MG, 2003.

Espécies	Número médio de folhas
<i>C. nobilior</i> x <i>C. nobilior</i>	12,59 a
<i>C. leopoldii</i>	11,14 b
<i>L. crispa</i>	10,37 b
<i>L. purpurata</i> 'Cárnea'	6,56 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Este comportamento está de acordo com Suttleworth et al. (1994) e (comunicação pessoal)*, que afirmam que as *Cattleyas* apresentam um desenvolvimento bem superior ao das *Laelias*.

Número de brotos

Para a variável número de brotos em plântulas de orquídea, verifica-se que houve interação entre as concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 e as espécies *Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior* e *Cattleya leopoldii* (Tabela 8). Nas duas espécies, maior número de brotos (3,06 e 1,95, respectivamente) foram observados nas concentrações de 59,33% e 44,5% de KNO_3 e NH_4NO_3 , respectivamente, a partir das quais houve redução nessa variável (Figura 1). Essa redução pode ter sido causada por toxidez à medida em que se acrescentou o nitrato de potássio e o nitrato de amônio.

Pode-se observar que, dentro de uma mesma espécie, ocorrem comportamentos distintos. Provavelmente, a *Cattleya leopoldii* requer um meio de cultura mais rico em sais minerais para se desenvolver melhor.

* Vantuil Antônio Rodrigues, Biólogo- Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. DAG/ UFLA.

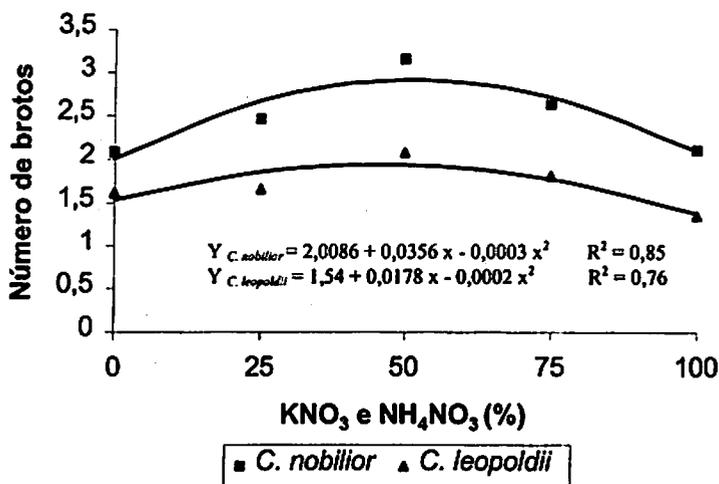


FIGURA 1 Efeito de concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 no número de brotos em plântulas de orquídeas *C. nobilior* x *C. nobilior* e *C. leopoldii*. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Poddar et al. (1997) estudaram altas concentrações de nitrato de amônio, como substituto ao ácido naftaleno acético (ANA) em *Eleusine coracana* e observaram que concentrações de duas a seis vezes maiores que a utilizada no meio MS podem favorecer a regeneração de brotos na ausência do regulador de crescimento. Já em altas concentrações de nitrato de amônio e do ANA, o meio de cultura tornou-se tóxico para a espécie estudada.

De acordo com o mesmo autor, o nitrato pode funcionar como um regulador de crescimento, estimulando brotações. Dessa forma, nas espécies de orquídea *Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior* e *Cattleya leopoldii*, o nitrato estimulou crescimento até um certo ponto, tornando-se tóxico a partir do mesmo, com o aumento das concentrações.

Comprimento da parte aérea

Verifica-se que houve interação entre espécie e concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 . Entretanto, por meio do teste F, apenas a espécie *C. leopoldii* obteve resultado significativo (Tabela 8).

Analisando-se a Figura 2, observa-se que incrementos nas concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 , adicionadas ao meio Knudson C, proporcionaram aumento no comprimento das plântulas de *Cattleya leopoldii* de forma linear. Dessa forma, maior comprimento de plântulas (3,8 cm) foi observado com 100% de KNO_3 e NH_4NO_3 . Quando se utilizaram-se 50% de KNO_3 e NH_4NO_3 , observaram-se plântulas com 3,4 cm e, na ausência de sais, obtiveram-se plântulas com 3,1 cm. Dessa forma, como a diferença é pequena, justifica-se um incremento de 50% de KNO_3 e NH_4NO_3 no meio de cultura, com o objetivo de reduzir os custos.

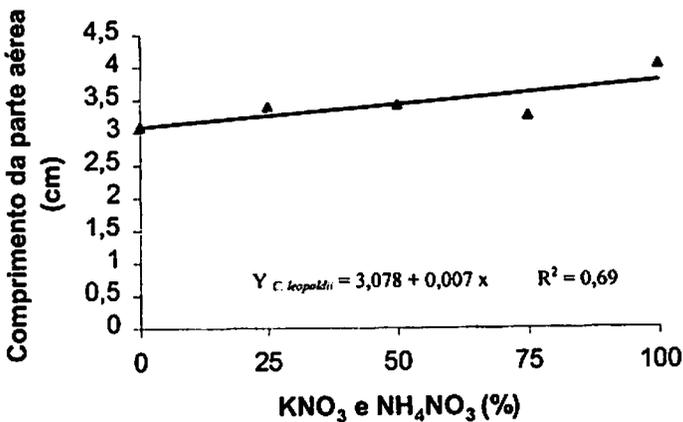


FIGURA 2 Comprimento da parte aérea em plântulas de *C. leopoldii* cultivadas em diferentes concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 . UFLA, Lavras, MG, 2003.

Como a relação foi direta, pode-se inferir que o efeito estimulante do nitrato de potássio e o nitrato de amônio no comprimento da parte aérea continuaria para concentrações superiores a 100%.

Número de raízes

Houve interação entre concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 e espécies (Tabela 8), sendo que, pelo teste F, somente a espécie *Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior* apresentou significância. Maior número de raízes (7,48) foi verificado com 50% da concentração de KNO_3 e NH_4NO_3 , após o qual houve redução, provavelmente causada por distúrbios nutricionais pela adição desses sais (Figura 3).

A adição de KNO_3 e NH_4NO_3 ao meio Knudson C favoreceu o aumento no número de raízes, provavelmente porque o meio Knudson é considerado um meio pobre em sais e apresenta como fontes de nitrogênio o nitrato de cálcio e o sulfato de amônio em quantidades inferiores aos meios MS e WPM.

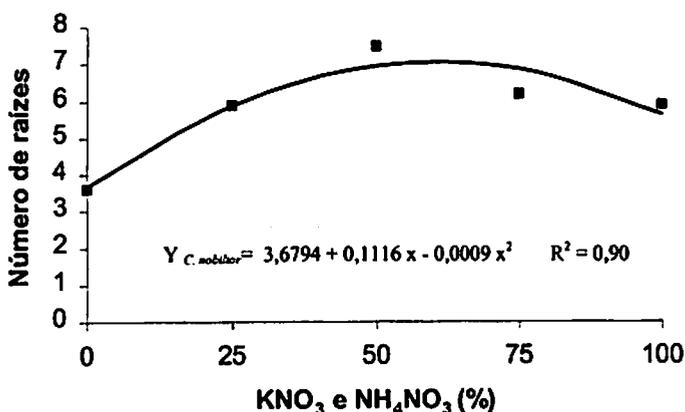


FIGURA 3 Efeito de concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 no número de raízes de plântulas de *Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior*. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Peso da matéria fresca de plântulas

De acordo com o resumo da análise de variância, observa-se que a interação entre os fatores espécie e concentração de KNO_3 e NH_4NO_3 foi significativa (Tabela 8). Pode-se notar que houve significância pelo teste F entre concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 e a espécie *Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior* (Figura 4). O incremento das concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 adicionadas ao meio Knudson C promoveu aumento no peso da matéria fresca das plântulas de forma linear, tendo o maior peso de plântulas (0,551 g) sido obtido com a utilização de 100% de KNO_3 e NH_4NO_3 . Entretanto, com a concentração de 50%, o peso foi de 0,540 g, podendo-se considerá-lo um bom nível, na tentativa de minimizar os custos com o meio de cultura.

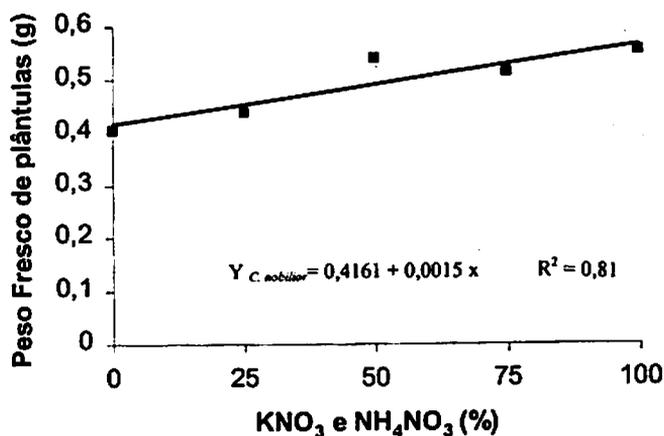


FIGURA 4 Efeito de concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 no peso da matéria fresca em plântulas de *Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior*. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Em concentrações superiores a 100%, provavelmente, o peso fresco de plântulas seria mais estimulado.

Silva et al. (2001), estudando fontes de nitrogênio no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto 'Trifoliata', concluíram que melhores resultados são obtidos com 75% da fonte KNO_3 associada a altas concentrações de NH_4NO_3 para altura e peso das brotações dos explantes.

Segundo Sakuta (1987), altas concentrações de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) podem ser críticas no processo de morfogênese e crescimento dos explantes. Provavelmente, esses resultados podem estar relacionados à própria função metabólica do nitrogênio como constituinte de aminoácidos, enzimas e proteínas.

O nitrogênio suplementado ao meio de cultura, tanto na forma de nitrato de amônio como na forma de nitrato de potássio, é citado como benéficos nos processos de desenvolvimento dos explantes (Gamborg, 1984).

De acordo com George & Sherrington (1984), o desenvolvimento e morfogênese em cultura de tecidos são acentuadamente influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como o mesmo é fornecido.

4.2 Meios de cultura e BAP na multiplicação *in vitro*

Para a variável número de folhas não houve significância dos fatores isolados, nem da interação entre eles. As variáveis número de raízes e peso da matéria fresca de plântulas apresentaram significância apenas para o fator meios de cultura, enquanto que para as variáveis número de brotos e comprimento da parte aérea a interação dos fatores foi significativa (Tabela 10).

TABELA 10 Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria fresca de plântulas (PMFP). UFLA, Lavras, MG, 2003.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios				
		NF	NR	NB	CPA	PMFP
Meios	2	12,5683 ^{ns}	16,2740 ^{**}	0,1483 ^{ns}	5,3139 ^{**}	0,2372 [*]
BAP	4	18,6198 ^{ns}	4,4693 ^{ns}	0,4408 ^{ns}	0,3373 ^{ns}	0,0075 ^{ns}
Meio x BAP	8	24,3984 ^{ns}	1,3417 ^{ns}	1,7417 ^{**}	1,3579 [*]	0,0459 ^{ns}
Resíduo	45	12,4475	2,1329	0,5055	0,5961	0,0662
CV (%)		34,67	30,81	28,01	24,43	51,00

******, ***** significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Número de folhas

A variável número de folhas não apresentou significância para os fatores estudados (Tabela 10) e, dessa forma, para a variável em questão, não houve diferença entre os tratamentos. Isso implica que a utilização de meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento é suficiente para incrementar o número de folhas.

Número de raízes

Para a variável número de raízes houve significância apenas do fator meio de cultura (Tabela 10). Verificou-se que melhores resultados foram obtidos com os meios WPM e MS, enquanto o meio Knudson C mostrou-se inferior (Tabela 11). Isso se explica, pelo fato dos meios WPM e MS possuírem maior quantidade de sais minerais em relação ao meio KC, favorecendo a emissão de maior número de raízes.

TABELA 11 Efeito de diferentes meios de cultura no número de raízes e peso da matéria fresca de plântulas do híbrido *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow'. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Meios de cultura	Número médio de raízes	Peso da matéria fresca de plântulas (g)
WPM	5,57 a	0,524 a
MS	4,87 a	0,503 a
KC	3,78 b	0,326 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na ausência de BAP e GA₃ no meio de cultura com 50% de sais do MS, a gloxínia apresentou maior número de raízes e o aumento das concentrações desses fitorreguladores causou queda significativa no fator estudado (Silva, 2001).

O estímulo ao enraizamento em *Spathoglottis plicata* ocorreu em meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de IBA (Nayak et al., 1999). Oliveira (1994) observou que, em plantas de crisântemo, o aumento das concentrações de BAP provocaram diminuição do número de raízes. Para Pasqual & Hoshika (1992), o enraizamento de cactos é mais freqüente na ausência de BAP, independente da concentração de ANA em *Mammillaria bocassana* L.

O efeito ora inibitório, ora estimulante dos fitorreguladores na formação de brotos e raízes pode estar associado à absorção dos reguladores de crescimento pelo substrato (George, 1996) ou à deficiência de proteína ligante promotora da atuação das citocininas (Taiz & Zeiger, 1998).

Peso da matéria fresca de plântulas

Houve significância apenas para o fator meio de cultura (Tabela 10). Observou-se maior peso da matéria fresca de plântulas nos meios WPM e MS, com pesos de 0,524 e 0,503 g, respectivamente (Tabela 11), enquanto o menor foi obtido em meio Knudson C (0,326 g).

Comprimento da parte aérea

Em função da Tabela 10, verifica-se a significância da interação entre os fatores meio e BAP. Pelo teste F, apenas o meio WPM foi significativo em relação às concentrações de BAP.

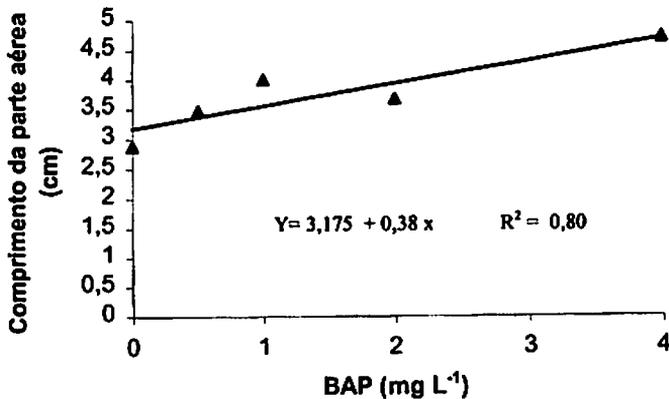


FIGURA 5 Comprimento da parte aérea de orquídea do híbrido *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow' cultivados em meio de cultura WPM e concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2003.

De acordo com a Figura 5, maior comprimento da parte aérea (4,7 cm) foi observado quando se utilizou o meio WPM combinado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP. Como a relação foi direta, pode-se inferir que o efeito estimulante do BAP no comprimento da parte aérea continuaria para concentrações superiores a 4 mg L⁻¹.

Paiva et al. (1997) e Silva (2001), trabalhando com gloxínia, observaram redução no tamanho de brotos com o aumento das concentrações de BAP e alguns autores têm observado os mesmos resultados negativos desse regulador de crescimento no alongamento das brotações em espécies como crisântemo e morangueiro (Oliveira, 1994; Pasqual et al., 1998).

Número de brotos

Houve interação entre os fatores BAP e meio de cultura (Tabela 10). Porém, pelo teste F, verificou-se que apenas o meio MS foi significativo em relação às concentrações de BAP.

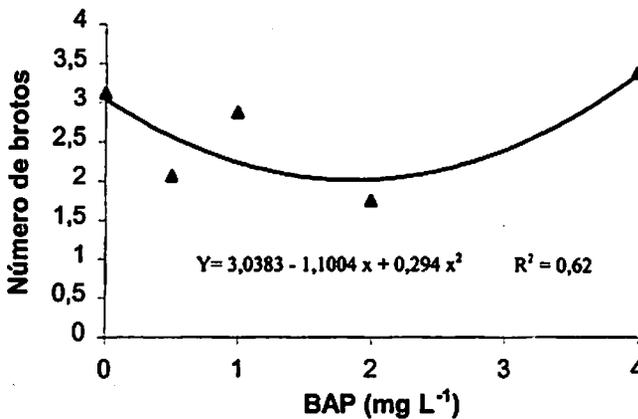


FIGURA 6 Efeito do meio de cultura MS e concentrações de BAP no número de brotos de plântulas do híbrido *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow'. UFLA, Lavras, MG, 2003.

O maior número de brotos (3,4) foi verificado com a utilização do meio MS (Figura 6) combinado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP, enquanto que, na ausência do regulador, foram obtidos 3,1 brotos. Devido à pequena diferença (0,3) entre a maior concentração e o tratamento na ausência de BAP, não se justifica a utilização do regulador de crescimento nesse caso.

Estes resultados concordam com os encontrados por Silva (2003) que, estudando a mesma espécie de orquídea *in vitro* em meio Knudson C, obteve maior número de brotos na ausência de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA.

O estímulo à brotação em *Spathoglottis plicata* ocorreu em meio MS suplementado com 10 mg L⁻¹ de BAP e 2,5 mg L⁻¹ de ANA e o enraizamento com 2,0 mg L⁻¹ de IBA (Nayak et al., 1999); TDZ também é utilizado em

associação com BAP para regeneração de brotos (Li et al., 1999). Concentrações de TDZ acima do nível ótimo inibem a regeneração dos brotos (Nayak et al., 1997).

Melhores resultados para as variáveis analisadas foram observados em meio WPM ou MS, enquanto o meio Knudson C apresentou resultados inferiores. Essa resposta, provavelmente, devem-se ao fato do meio Knudson possuir baixa concentração de sais e, embora seja muito utilizado na germinação de sementes de orquídeas, parece não propiciar condições satisfatórias para o desenvolvimento das plântulas de algumas espécies.

O meio MS é composto por uma grande quantidade de sais, tornando-se caro. Sendo assim, deve-se preferir o de menor custo, o meio WPM.

Sabe-se que existe uma relação entre o número de brotos e seu tamanho e quanto maior for o número de brotos, menor o tamanho dos mesmos (George, 1996). Essa relação fez-se presente até a concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP em *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow'. No entanto, em concentrações superiores, tanto o número quanto o comprimento dos brotos aumentaram. Tal diversidade de resultados está relacionada principalmente ao genótipo da espécie, meio de cultura e, possivelmente, à interferência na ação dos reguladores de crescimento.

Segundo Malaure et al. (1991), diferentes efeitos dos reguladores de crescimento podem ocorrer para diferentes espécies, inclusive variações dentro de uma mesma espécie.

4.3 Meio de cultura e carvão ativado no crescimento *in vitro*

A variável número de folhas apresentou interação significativa. Para número de raízes, os níveis de meio KC e de carvão ativado foram significativos, enquanto que a interação entre os fatores não apresentou

significância. Para a variável número de brotos não houve significância dos fatores isolados, nem da interação entre eles (Tabela 12).

TABELA 12 Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de raízes (NR) e número de brotos (NB) UFLA, Lavras, MG, 2003:

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		NF	NR	NB
[] KC	4	14,2807**	6,1449**	0,0503 ^{ns}
Carvão ativado (CA)	4	4,3786**	6,8456**	0,0106 ^{ns}
KC x CA	16	0,9204*	0,489 ^{ns}	0,0297 ^{ns}
Resíduo	75	0,4799	0,6494	0,0264
CV (%)		15,7	24,9	14,91

** , * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Analisando-se a Tabela 13, observa-se que, para as variáveis comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea e peso da matéria fresca de plântulas, houve significância para o fator concentração do meio KC e carvão ativado. Não houve significância para a interação dos níveis.

TABELA 13 Resumo da análise de variância para as características comprimento da maior raiz (CMR), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria fresca de plântulas (PMFP). UFLA, Lavras, MG, 2003.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		CMR	CPA	PMFP
[] KC	4	9,7233**	2,1032**	0,0201**
Carvão ativado	4	4,6157**	2,0051**	0,0585**
KC x CA	16	0,7082 ^{ns}	0,197 ^{ns}	0,0025 ^{ns}
Resíduo	75	0,4822	0,131	0,0017
CV (%)		24,8	23,3	36,7

** , * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Número de folhas

Apenas para a variável número de folhas houve interação entre os níveis meio e carvão ativado (Tabela 12). Porém, por meio do teste F, somente as concentrações de 50% e 100% do meio KC foram significativas em relação às concentrações de carvão ativado.

Melhores resultados (6,5 e 5,85) foram verificados com 50% do meio KC combinado com 2,75 g L⁻¹ de carvão ativado e 100% de meio KC e 4 g L⁻¹ de carvão, respectivamente (Figura 7).

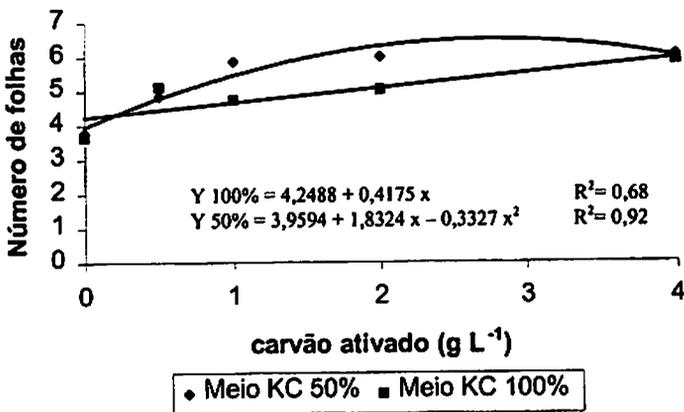


FIGURA 7 Número de folhas de plântulas de *Laelia tenebrosa* cultivadas em diferentes concentrações de meio KC e carvão ativado. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Observa-se que, com o aumento da concentração do meio de cultura, há necessidade de maior concentração de carvão. Sendo assim, o meio com 50% de sais, além de proporcionar melhores resultados, é menos oneroso.

Silva et al. (2003) verificaram que a adição de carvão ativado ao meio de cultura inibe a formação de folhas em plântulas de *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow'.



Número de brotos

A partir da análise de variância observa-se que nenhum dos fatores testados teve significância para esta variável (Tabela 12). Pode-se concluir que o meio KC na concentração normal (100%) sem adição de carvão ativado resulta em maior número de brotos.

A polpa de banana na concentração de 75 g L⁻¹ e o carvão ativado na concentração de 200 mg L⁻¹ promoveram a formação de maior número de brotos em plântulas de *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow' (Silva et al., 2003).

Número de raízes

De acordo com a análise de variância (Tabela 12) houve significância para o fator concentração de meio e carvão ativado. Não houve significância entre a interação dos fatores.

À medida em que aumentaram as concentrações de meio KC, maiores quantidades de raízes foram formadas (Figura 8A). O meio KC, com 50% de sua concentração, apresentou resposta semelhante ao meio KC na concentração de 100%. Observou-se o mesmo número de brotos (3,5) para ambas as concentrações. O maior número de raízes foi observado com 96,5% do meio KC. A partir desse ponto houve uma redução, provavelmente devido a um desbalanço nutricional.

O meio MS com 50% de sais minerais, acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado, promoveu maior quantidade de raízes em plântulas de *Cattleya nobilior* (Reis et al., 2003).

Para muitas espécies, verifica-se efeito favorável no enraizamento quando se adiciona carvão ativado ao meio de cultura. Figueiredo et al. (2001) citam que a indução das raízes foi observada quando as brotações foram pré-tratadas com carvão ativado por sete dias, no escuro, antes de serem inoculadas

em meio contendo AIB. Hazra et al. (2002) relataram o efeito sinérgico do carvão ativado na multiplicação e enraizamento de brotações de algodoeiro.

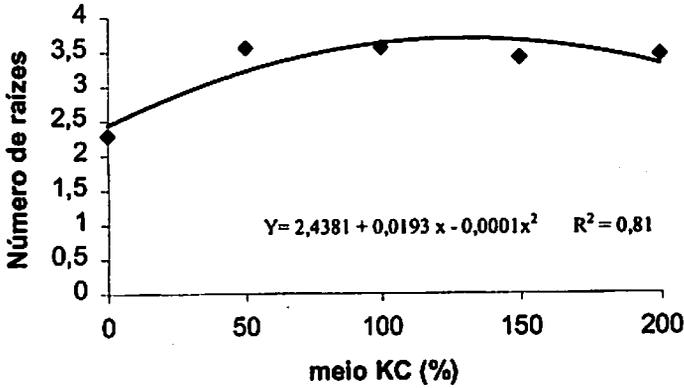


FIGURA 8A Número de raízes em plântulas de *Laelia tenebrosa* cultivadas em diferentes concentrações de meio Knudson C. UFLA, Lavras, MG, 2003.

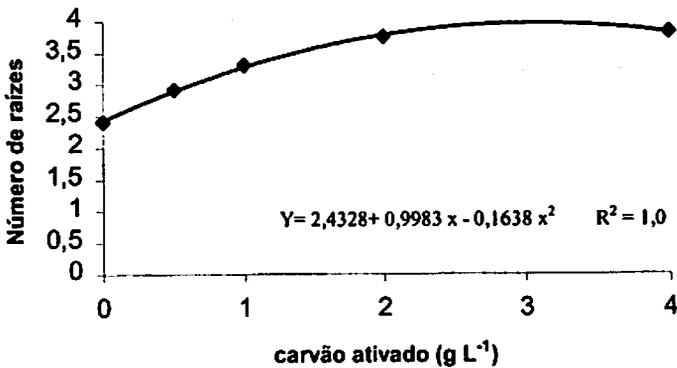


FIGURA 8B Número de raízes em plântulas de *Laelia tenebrosa* cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Takayama & Misawa (1980) verificaram que a formação e o crescimento das raízes de *Lilium* eram inibidos por altas concentrações de BAP, mas essa inibição era completamente revertida pela adição de carvão ativado.

Comprimento da maior raiz

Na Tabela 13, observa-se que houve significância para o fator concentração de meio e carvão ativado, e que não houve significância para a interação dos níveis.

O maior comprimento de raiz (3,3 cm) foi verificado com a utilização de 100% de meio KC. Entretanto, ao utilizar 50% de meio, o comprimento da maior raiz foi de 3,2 cm. A partir do ponto máximo (143%) houve diminuição do comprimento radicular, provavelmente devido ao desbalanço nutricional (Figura 9A).

Com o aumento das concentrações de carvão ativado houve um incremento linear no comprimento de raízes. Melhores resultados foram observados com a utilização de 4 g L^{-1} de carvão ativado (Figura 9B).

A adição de carvão ativado no meio de cultura foi benéfica, promovendo tanto o número quanto o crescimento de raízes. Isso se explica, pois o carvão contém impurezas que podem favorecer o crescimento de raízes já existentes e induzir emissão de novas raízes. Como a relação foi direta, pode-se inferir que o efeito estimulante do carvão ativado no comprimento da maior raiz continuaria para concentrações superiores a 4 g L^{-1} .

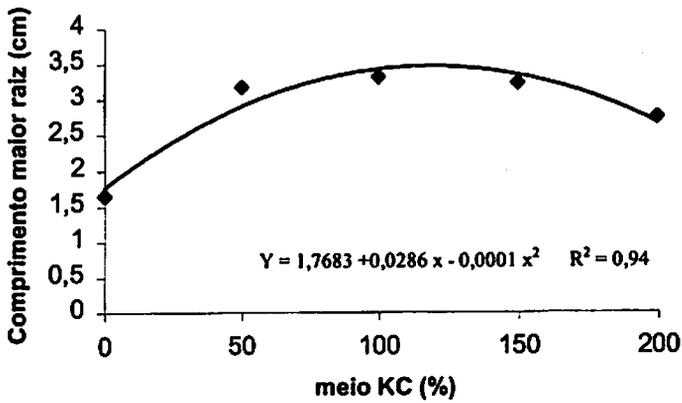


FIGURA 9A Comprimento da maior raiz em plântulas de *Laelia tenebrosa* cultivadas em diferentes concentrações de meio KC. UFLA, Lavras-MG, 2003.

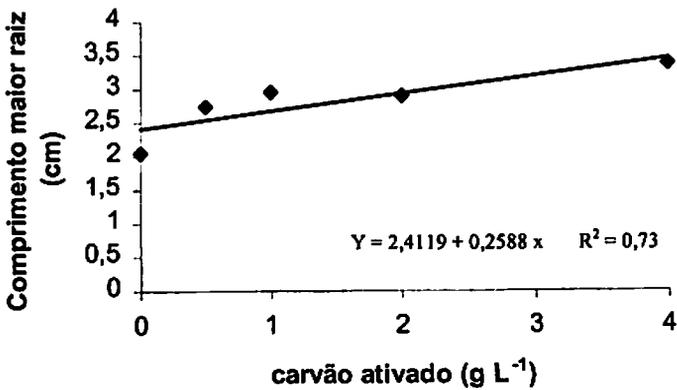


FIGURA 9B Comprimento da maior raiz em plântulas de *Laelia tenebrosa* cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Comprimento da parte aérea

Os fatores meio e carvão ativado foram significativos, enquanto que a interação entre os fatores estudados não foi significativa (Tabela 13).

Melhores resultados (1,8 cm) foram observados quando se utilizou o meio KC na concentração de 121% (Figura 10A), porém, na concentração de 50% de meio KC, obtiveram-se explantes com 1,7 cm de comprimento. Essa diferença observada (0,1 cm) é muito pequena, o que não justifica a utilização de um meio mais concentrado, mas a redução do mesmo à sua metade.

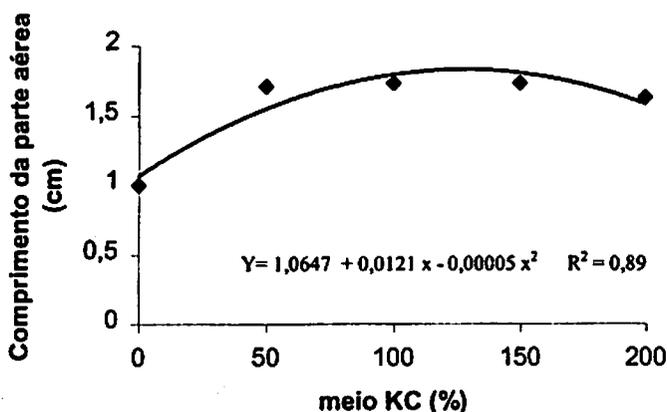


FIGURA 10A Comprimento da parte aérea em plântulas de *L. tenebrosa* cultivadas em diferentes concentrações de meio KC. UFLA, Lavras, MG, 2003.

O maior comprimento da parte aérea (1,9 cm) foi observado quando foram utilizados 4 g L^{-1} de carvão ativado (Figura 10B); a concentração de 2 g L^{-1} proporcionou um comprimento de 1,8 cm. Comparando-se os níveis 4 e 2 g L^{-1} de carvão ativado, nota-se pequena diferença (0,1 cm), o que justifica a utilização de 2 g L^{-1} .

A adição de carvão ativado ao meio de cultura promove a liberação de substâncias naturalmente presentes no carvão que beneficiam o crescimento *in vitro*.

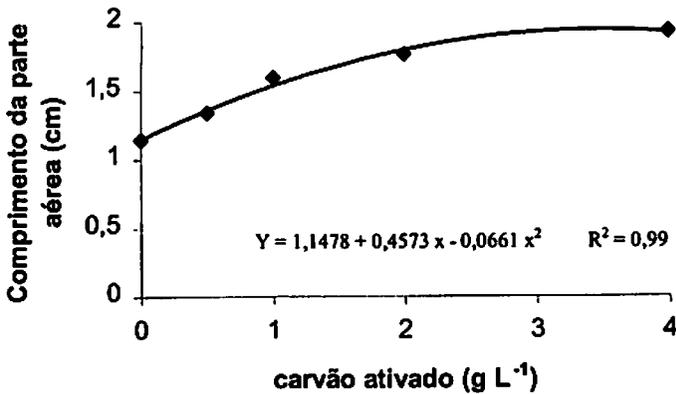


FIGURA 10B Comprimento da parte aérea em plântulas de *L. tenebrosa* cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Simões et al. (1999), estudando meio Knudson C acrescido de carvão ativado, verificaram que a concentração de 1 g L⁻¹ proporciona o melhor desenvolvimento em comprimento de brotos de *Epidendrum* sp. e *Dendrobium* sp.

Peso da matéria fresca de plântulas

Em função da Tabela 13 observa-se que houve significância para o fator concentração de meio e carvão ativado e que não houve significância para a interação dos níveis.

O maior peso da matéria fresca de plântulas (0,144g) foi verificado com a utilização de 50% de meio KC, ponto a partir do qual houve diminuição no

peso dos explantes (Figura 11A). Provavelmente, essa redução ocorre devido à toxicidade.

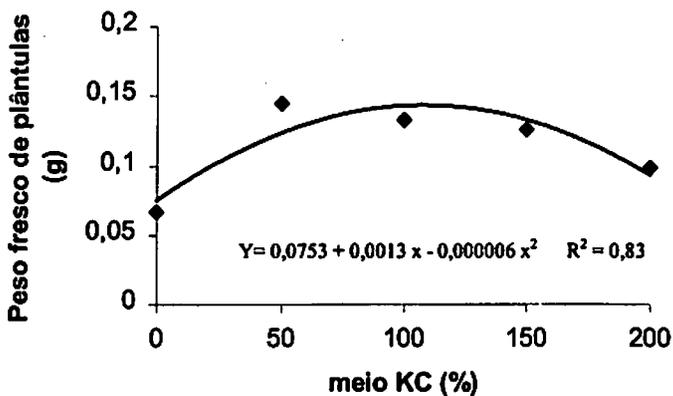


FIGURA 11A Peso fresco de plântulas de *L. tenebrosa* cultivadas em diferentes concentrações de meio KC. UFLA, Lavras, MG, 2003.

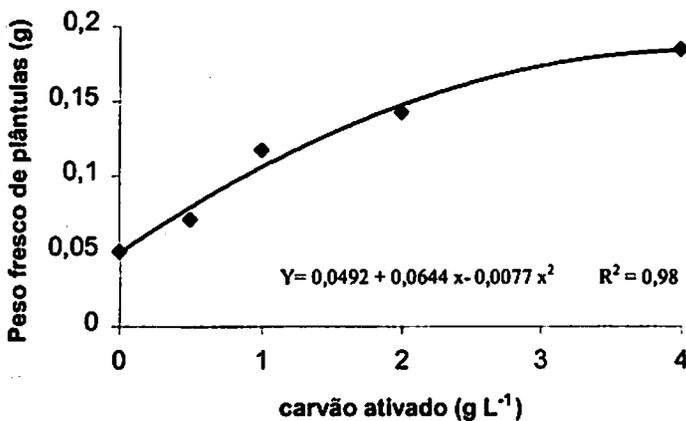


FIGURA 11B Peso fresco de plântulas de *L. tenebrosa* cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado. UFLA, Lavras, MG, 2003.

A utilização de 4 g L⁻¹ de carvão ativado proporcionou um peso de 0,185g dos explantes (Figura 11 B).

O carvão ativado é comumente utilizado na cultura de tecidos de plantas. Seu efeito é atribuído à absorção de substâncias tóxicas produzidas pelas plantas, adsorção de fitorreguladores do meio e escurecimento do meio onde se desenvolvem as raízes das plantas (George, 1993).

Van Waes (1987), citado por Bressan et al. (1999), adicionou 1 g L⁻¹ de carvão ao meio onde “seedlings” de algumas orquídeas foram inoculadas e obteve melhores resultados. No caso de *Phalaenopsis*, quando os “seedlings” foram inoculados em meio sem carvão ativado, observou-se que determinadas substâncias causavam escurecimento do meio; provavelmente são fenóis, que são exsudados das raízes das plantas.

O melhor desenvolvimento de *Phalaenopsis in vitro* ocorreu na presença de carvão ativado na concentração de 2 g L⁻¹, indicando que este possa ser um elemento importante no processo (Bressan et al., 1999).

Rodrigues et al. (2003), estudando efeito de carvão ativado em meio MS na germinação de sementes de bromélia imperial, verificaram que aos 60 dias após a inoculação, o uso de 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado proporcionou melhor germinação de sementes, independente do pH do meio de cultura.

No presente trabalho, a interação entre os fatores não foi significativa para a maioria das variáveis estudadas. Porém, os melhores resultados foram observados com a utilização do carvão ativado.

Apesar do carvão ativado na concentração de 4 g L⁻¹ ter proporcionado melhores resultados, verificou-se que, na concentração de 2 g L⁻¹, os resultados apresentam uma diferença mínima; sendo assim, não se justifica utilizar 4 g L⁻¹. Embora o carvão ativado não seja o componente de maior custo no preparo de meio de cultura, a sua redução é economicamente favorável, especialmente para a produção comercial de mudas.

4.4 Substratos e adubações na aclimatização de orquídea

Em função do resumo da análise de variância, para número de folhas houve interação significativa entre adubação e substrato, constatando-se que os fatores são dependentes. A variável número de raízes apresentou significância apenas para o fator adubação. O número de brotos apresentou não significância para os fatores adubação e substrato e também para a interação desses fatores (Tabela 14).

TABELA 14 Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de raízes (NR) e número de brotos (NB) UFLA, Lavras, MG, 2003.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		NF	NR	NB
Adubação (A)	3	16,8614**	22,9829**	0,6121 ^{ns}
Substrato (S)	3	4,3027**	2,0487 ^{ns}	0,0262 ^{ns}
A x S	9	2,4770**	3,1286 ^{ns}	0,1814 ^{ns}
Bloco	3	2,9756*	7,7887 ^{ns}	0,7621*
Resíduo	45	0,7895	3,0541	0,2450
CV (%)		13,85	18,93	33,70

**, * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

De acordo com a Tabela 15, observa-se que, para o comprimento da maior raiz, houve significância apenas para o fator substrato. Para a variável comprimento da parte aérea foram significativos os fatores substrato e adubação; a interação foi não significativa. O peso da matéria fresca de plântulas foi significativo apenas para o fator adubação.

TABELA 15 Resumo da análise de variância para as características comprimento da maior raiz (CMR), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria fresca de plântulas (PMFP). UFLA, Lavras, MG, 2003.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		CMR	CPA	PMFP
Adubação (A)	3	4,3050 ^{ns}	20,3504**	78,1667 **
Substrato (S)	3	66,2402**	8,6279 **	11,5419 ^{ns}
A x S	9	2,9346 ^{ns}	0,7075 ^{ns}	1,6918 ^{ns}
Bloco	3	4,6998 ^{ns}	0,9362 ^{ns}	8,3602 ^{ns}
Resíduo	45	6,8159	1,4601	4,4027
CV (%)		23,2	19,24	39,77

** , * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Número de Folhas

O maior número de folhas foi observado quando foram utilizadas a brita e a fibra de piaçava como substratos (8,9 e 8,6, respectivamente) e as plantas adubadas com o Biofert®. A adubação com o Dyna-Grow® promoveu um melhor resultado quando se utilizou a fibra de piaçava (7,3) e o xaxim desfibrado (6,65). As plantas adubadas com a formulação elaborada e a testemunha obtiveram as mesmas respostas, independente do substrato utilizado. O Biofert® proporcionou maior número de folhas quando as plantas foram cultivadas em brita, fibra de piaçava e CAC, em relação aos demais adubos foliares. As plantas cultivadas no xaxim desfibrado não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes adubos, assim como a testemunha (Tabela 16).

TABELA 16 Número de folhas em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' cultivadas em diferentes substratos e submetidas a diferentes adubações foliares. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Substrato	Adubação			
	Testemunha	Dyna-Grow®	Formulação elaborada	Biofert®
Brita	4,58 a B	5,35 b B	5,57 a B	8,90 a A
CAC	5,12 a B	5,37 b B	6,17 a B	7,35 b A
Piçava	6,25 a B	7,30 a B	6,45 a B	8,60 a A
Xaxim	5,65 a A	6,65 a A	6,77 a A	6,52 b A

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Lessa et al. (2003), estudando o efeito de diferentes concentrações de Biofert® em planta fantasma (*Graptopetalum paraguayense* E. Walther.), verificaram que, para a variável número de folhas, não houve diferença entre os tratamentos.

Número de raiz

Em função da análise de variância (Tabela 14), houve significância apenas para o fator adubação. Para a variável número de raízes, verificou-se que a adubação com Biofert® proporcionou maior número de raízes (10,77). As outras formulações utilizadas foram inferiores ao Biofert® (Tabela 17).

Estes resultados podem ser explicados pelo fato do Biofert® possuir uma composição balanceada, efeito rápido e imediato, favorecendo o enraizamento das plântulas.

TABELA 17 Número de raízes e peso da matéria fresca em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' submetidas a diferentes adubações foliares. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Adubos	Número de raízes	Peso da matéria fresca de plântulas (g)
Biofert Plus®	10,77 a	8,49 a
Dyna-Grow®	9,38 b	4,91 b
Formulação elaborada	8,87 b	4,13 b
Testemunha	7,90 b	3,58 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Peso da matéria fresca de plântulas

Não houve interação entre os fatores estudados. Apenas o fator adubação foi significativo (Tabela 15).

Para a variável peso da matéria fresca de plântulas, melhores resultados (8,49 g) foram obtidos quando as plantas foram pulverizadas com o adubo foliar Biofert®. As demais formulações Dyna-Grow® (4,91 g) e a formulação elaborada (4,13 g), inclusive a testemunha (3,58 g), tiveram resultados inferiores ao Biofert® (Tabela 17).

Rodrigues (2003) observou que mudas de bromélia imperial com 5,5 cm ou mais de comprimento, provenientes de germinação *in vitro*, quando adubadas com o Biofert®, apresentaram melhor desenvolvimento.

Número de brotos

O número de brotos não foi influenciado quando as plântulas foram cultivadas em diferentes substratos e submetidas a diferentes adubações (Tabela 14). Assim, pode-se utilizar qualquer substrato alternativo ao xaxim e qualquer adubação utilizada neste experimento para esta variável.

Comprimento da maior raiz

A partir da análise de variância (Tabela 15), observa-se que houve significância somente para os diferentes substratos utilizados.

De acordo com a Tabela 18, pode-se verificar que tanto a fibra de piaçava quanto a casca de arroz carbonizada (13,05 e 12,78 cm, respectivamente) proporcionaram maior comprimento de raízes. A brita (10,40 cm) e o xaxim desfibrado (8,78 cm) foram iguais entre si, porém inferiores aos demais substratos.

TABELA 18 Comprimento da maior raiz em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' cultivadas em diferentes substratos. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Substratos	Comprimento da maior raiz (cm)
Piaçava	13,05 a
Casca de arroz carbonizada	12,78 a
Brita	10,40 b
Xaxim desfibrado	8,78 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A baixa retenção de água propiciada pela CAC e pela fibra de piaçava impede o apodrecimento das raízes de plântulas de orquídea.

A CAC possui pH próximo da neutralidade, é rico em minerais, principalmente Ca, K, Si e CTC baixa, possibilitando assim maior quantidade de nutrientes em solução, isto é, disponíveis para as plantas (Minami, 1995 e Kämpf, 2000a).

A brita, apesar de ter baixa retenção de água, não favorece o crescimento radicular, principalmente por ser muito compacta, prejudicando o crescimento e promovendo a formação de raízes anormais (achatadas).

O xaxim desfibrado possui uma capacidade alta em reter água, o que favorece o apodrecimento de raízes.

Comprimento da parte aérea

Em função da análise de variância para o comprimento da parte aérea, verifica-se que não houve interação entre os fatores estudados. Houve significância para os fatores adubação e substrato (Tabela 15).

Melhores resultados para comprimento da parte aérea (7,84 cm) foram observados com a utilização do adubo foliar comercial Biofert®. O Dyna-Grow® (6,04 cm) e a formulação elaborada (6,09 cm) tiveram resultados intermediários. Já a testemunha foi inferior aos demais tratamentos, com comprimento da parte aérea de 5,15 cm (Tabela 19).

Por ter uma composição de nutrientes equilibrada e facilidade de absorção do adubo pelas plantas, o Biofert® se destacou, proporcionando melhores resultados para o comprimento das plantas.

TABELA 19 Comprimento da parte aérea em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' submetidas a diferentes adubações foliares. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Aubos	Comprimento da parte aérea (cm)
Biofert Plus®	7,84 a
Formulação elaborada	6,09 b
Dyna-Grow®	6,04 b
Testemunha	5,15 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Lessa et al. (2003) obtiveram maior altura em planta fantasma com a dose de 10 mL de Biofert® aplicada em intervalos de 7 dias, proporcionando melhor desenvolvimento e plantas com altura média de 9,35 cm.

A utilização de diferentes substratos no cultivo da espécie *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' proporcionou respostas distintas para o comprimento da parte aérea. A fibra de piaçava (6,91 cm) e a casca de arroz carbonizada (6,91 cm) proporcionaram maiores comprimentos, enquanto que o xaxim desfibrado e a brita mostraram-se inferiores com 5,79 e 5,51 cm, respectivamente (Tabela 20).

Os melhores substratos (fibra de Piaçava e CAC) possuem alta porosidade, ou seja, boa relação entre água e ar, permitindo melhor desenvolvimento das plantas.

TABELA 20 Comprimento da parte aérea em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' cultivadas em diferentes substratos. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Substratos	Comprimento da parte aérea (cm)
Piaçava	6,91 a
Casca de arroz carbonizada	6,91 a
Xaxim desfibrado	5,79 b
Brita	5,51 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A casca de arroz carbonizada (CAC) tem sido descrita como excelente condicionador de substratos por vários autores, o que foi comprovado no presente trabalho. Bellé & Kämpf (1991) demonstraram a adequação da CAC para uso em misturas como substrato na produção de tomate e de espécies floríferas anuais, bem como substituto alternativo para a fibra de xaxim na cultura de *Asplenium* (Pteridophyta).

Rego et al. (2000), pesquisando substratos alternativos para duas espécies de orquídeas nativas (*Oncidium sarcodes* e *Schomburgkia crispa*), verificaram que a casca de pinus e casca de pinus + isopor + carvão(1:1:1), com

adição ou não de CAC, tiveram os mesmos resultados quando comparados com o xaxim. Faria et al. (2001), analisando 14 substratos simples e compostos, entre os quais CAC, vermiculita, xaxim, carvão, casca de pínus, cacos de cerâmica e isopor, observaram que os melhores, para a orquídea *Oncidium baueri*, foram os cubos de xaxim e a vermiculita e para a *Maxillaria consanguínea*, os cubos de xaxim, xaxim desfibrado e carvão + vermiculita, seguidos de CAC + vermiculita (1:1). Esses autores mostraram que o xaxim pode ser perfeitamente substituído por outros substratos, com resultados semelhantes para o crescimento e enraizamento dessas orquídeas nativas.

A casca de arroz também vem sendo utilizada com sucesso por alguns pesquisadores para a aclimatização de plantas micropropagadas e/ou para o cultivo *ex vitro* de muitas culturas. Kämpf et al. (1996), citados por Calvete et al. (2000), verificaram que a mistura solo + CAC (1:3) levou a um maior crescimento de raízes e melhor desenvolvimento da parte aérea em lisianto (*Eustoma grandiflorum*) durante a aclimatização. Calvete et al. (2000), aclimatizaram plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa*) em combinações de sete substratos compostos à base de turfa (preta e vermelha), vermiculita, casca de arroz (queimada e carbonizada), casca de acácia e um substrato comercial, verificando que os substratos compostos com turfa preta + casca de arroz queimada (1:1) proporcionaram maior sobrevivência, crescimento e qualidade das mudas *ex vitro*.

No presente trabalho, os melhores resultados foram verificados quando as plantas foram adubadas com o adubo mineral foliar Biofert Plus®. Isso se explica pelo fato deste adubo ter uma composição mais equilibrada em relação às demais formulações. Sua forma líquida e sua composição balanceada permitem a imediata absorção pelas folhas e raízes, resultando em mudanças bioquímicas e fisiológicas (www.bonsaibrasil.com.br/biofert.htm).

Os melhores resultados foram encontrados quando se utilizou a fibra de piaçava e casca de arroz carbonizada (CAC). Isso se explica pelo fato da CAC ter uma baixa densidade e grande porosidade, destacando-se pelo elevado espaço de aeração e baixa retenção de água, otimizando o processo de drenagem. É recomendada como condicionador de substrato e usada em misturas para melhorar a aeração de substâncias deficientes (Puchalski & Kämpf, 2000). Segundo Kämpf & Jung (1991), é um resíduo facilmente disponível e produzido em alta quantidade, cerca de um milhão de toneladas por ano, no Rio Grande do Sul.

A fibra de piaçava tem boa durabilidade e, ao mesmo tempo, baixo nível de desintegração, pouco fornecimento de nutrientes e baixa capacidade de retenção de água. É recomendado para orquídeas que não requerem muita umidade, como as *Cattleyas*.

Em função dos resultados obtidos, visando a substituição do xaxim desfibrado, atualmente em extinção, pode-se recomendar a utilização de casca de arroz carbonizada e fibra de piaçava na aclimatização de orquídeas micropropagadas. A facilidade de aquisição e a redução dos custos são fatores preponderantes na escolha da fibra de piaçava ou CAC como substrato.

5 CONCLUSÕES

A adição de 50% da formulação original de KNO_3 e NH_4NO_3 ao meio KC proporciona melhor crescimento *in vitro* em plântulas de *C. nobilior* x *C. nobilior* e *C. leopoldii*.

Com a utilização do meio WPM acrescido de 1 mg L^{-1} de BAP, obtêm-se brotos maiores e bem formados em plântulas de *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow'.

A adição de 2 g L^{-1} de carvão ativado ao meio de cultura promove melhor crescimento em plântulas de *Laelia tenebrosa*.

Para orquídeas da espécie *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia', os melhores substratos para aclimatização de plântulas são casca de arroz carbonizada e fibra de piaçava.

Melhores respostas à adubação de plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Alba' x *Cattleya loddgesii* 'Atibaia' são obtidas com o adubo foliar Biofert Plus®.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPROBATO FILHO, A. Adubação foliar de orquídeas. **Boletim CAOB**. p. 11-16, 2001.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley, 1992. 682 p.
- ARENA, L. M. E.; PASTUR, G. M. 6-benzylaminopurine and activated charcoal affect *in vitro* shoot morphogenesis of *Berberis buxifolia*. **Revista de la Facultad de Agronomía, Buenos Aires**, v. 21, n. 1, p. 41-47, 2001.
- BACKES, M. A.; KÄMPF, A. N. Substrato à base de composto de lixo urbano para a produção de plantas ornamentais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 5, p. 753-758, maio 1991.
- BELLÉ, S.; KÄMPF, A. N. Produção de mudas de maracujá amarelo em substratos à base de turfa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 385-390, mar. 1993.
- BEYL, C. A. Getting started with tissue culture - media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: TRIGIANO, R. N. : GRAY, D. J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. London: CRC Press, 2000. p. 21-38.
- BIOFERT PLUS Fertilizante mineral foliar. Disponível em: <http://www.bonsaibrasil.com.br/biofert.htm> >. Acesso em: 20 jan. 2004.
- BLACK, P. McK. **Orquídeas**. Hamlyn Publishing Group Limited. Tradução Maria Adelaide Freitas Soares. Rio de Janeiro: Livro Técnico, 1973. 128 p.
- BOSA, N.; CALVETE, E. O.; KLEIN, V. A.; BORDIGNON, L. Influência do substrato no crescimento de mudas de gipsofila. In: ENCONTRO NACIONAL DE SUBSTRATOS PARA PLANTAS, 3., 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônomo, 2002. p. 114. (Documentos IAC 70).
- BRESSAN, E. A.; LEE, L. L.; SEVERO, V. S.; GERALD, L. T. S. Desenvolvimento de orquídeas *Phalaenopsis in vitro*- efeito do carvão. In CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., 1999, Jaboticabal. **Anais....** Jaboticabal, 1999. p. 111.

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: EMBRAPA/ CNPH, 1998. v. 1. p. 87-132.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; DAUDT, R. Efeito do substrato na aclimatização ex vitro de morangueiro cv. Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substrato para plantas - a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 257-264.

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

CARLUCCI, M. V.; HAAG, H. P.; BELLOTE, F. J. Nutrição mineral de plantas ornamentais. IX. Composição química e extração de nutrientes por cinco espécies de Orquidaceae. *O Solo*, Piracicaba, v. 72, n. 1, p. 27-34, jan./jun. 1980.

CONSTANTIN, R.; HENKE, R.; MANSUR, M. A. Effect of actived charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. *In Vitro*, Largo, v. 13, n. 5, p. 293-296, May 1977.

CORSATO, C. E. **Comportamento fisiológico do morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.) micropropagação e aclimatação na presença de fungos endomicorrízicos**. 1993. 48 p. Dissertação – (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

COSTA, A. M. M. Fisiologia da aclimatação. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. (coord). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: IAC, 1998. p. 63-67. (IAC. Boletim técnico, n. 174).

CROCOMO, O. J. Biotecnologia de plantas: Aplicação da engenharia celular. **Biotecnologia**, Piracicaba, n. 17, p. 1-2, 1988.

DEBERGH, P. *In vitro* culture of ornamentals. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 561-573.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Science Horticulture**, Amsterdam, v. 14, n.4, p. 335-345, 1981.

DÖRNENBURG, H.; KNORR, D. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 15, n. 2, p. 141-168, Feb. 1996.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the Orchid family**. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1993. 314 p.

DUNSTAN, D. I.; TURNER, K. E. The acclimatization of micropropagated plants. In VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants - laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v. 1, p. 123-129.

DUVAL, C. M.; CALDAS, L. S.; RESENDE, R. O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1ª ed. Brasília, EMBRAPA/CNPq, v. 1. 1998. p. 45-67.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Tradução: Berta Lange de Morretes. São Paulo: Edgar Blücher, 1976. 293 p.

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

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p. 255-258.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 37, n. 4, p. 471-475, Jul./Aug. 2001.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GAMBORG, O. L. Plant cell culture: nutrition and media. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando: Academic Press, 1984. v. 1, p. 18-26.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 - the technology. 2. ed. Edington Limited, 1993. 786 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 - The Technology. 2. ed. Edington Limited, 1996. 1574 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture** - Handbook and directory of commercial laboratories. Eversley: Exegetics, 1984. 593 p.

GEORGE, E. F.; PUTTOCK, D. J. M.; GEORGE, H. J. **Plant culture media: formulations and uses**. Edington: Exegetics, 1987. v. 1, 567 p.

GONÇALVES, A. L. **Substratos artificiais para a produção de mudas de calanchoe, (*Kalanchoe blossfeldiana*) cv Singapur, Crassulaceae**, 1992. 112 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

GOVIL, S.; GUPTA, S. C. Commercialization of plant tissue culture in India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 65-73, 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. L' ambientamento delle piante frutticole micropropagate. **Rivista de Frutticoltura e di Ortofloricoltura**, Bologna, v. 51, n. 1, p. 75-80, gen. 1993.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart (Palmae). **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, n. 7, p. 550-552, Dec. 1988.

HAAG, H. P.; LIMA, A. M. L. P.; DECHEN, A. R.; CARMELLO, Q. A. de C. Plantas ornamentais. In: **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: Potafos, 1991. p. 640-643.



HAZRA, S.; KULKARNI, A.; BANERJEE, A. K.; DHAGE, A. B.;
AGRAWAL, D. C.; KRISHNAMÜRTTIY, K. V.; NALAWADE, S. M. A rapid
and simple method for *in vitro* plant regeneration from split embryo axes of six
cultivars of cotton. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 45, n. 2, p. 317-319,
2002.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; CHALFUN, N. N. J.;
RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos-Tecnologia e aplicações: aplicação na
propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 130 p.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.
A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of
plant cell culture - techniques for propagation and breeding**. New York:
MacMillan Publishing Company, 1983. v. 1, p. 177-227.

JOHANSSON, L.; CALLEBERG, E.; GEDIN, A. Correlation between activated
charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultures of anthers of
Anemone canadensis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 80, n. 2, p. 243-
249, Oct. 1990.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Porto Alegre:
Ed. Agropecuária. 2000a. p. 45-71.

KÄMPF, A. N. Seleção de materiais para uso como substrato. In: KÄMPF, A.
N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substrato para plantas - a base da produção
vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Genesis, 2000b. p. 139-145.

KÄMPF, A. N.; JUNG, M. The use of carbonized rice hulls as an horticultural
substrate. Belgium: **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 294, p. 271-281, 1991.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e
Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed.
American Orchid Society Bulletin, West Palm Beach, v. 14, p. 214- 217,
1946.

KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**,
Chicago, v. 73, n. 1, p. 1-25, 1922.

LESHEN, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, London, v. 62, n. 3, p. 271-276, Sept. 1988.

LESSA, M. A.; PAIVA, P. D. O.; RODRIGUES, T. M. Estudos dos efeitos de diferentes concentrações de Biofert Plus® (fertilizante mineral foliar) em *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. In CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. *Anais...* Lavras- MG, 2003. p. 392.

LI, Y.; GE, Z.; LI, YQ.; GE, Z. Y. Studies on improvement of the micropropagation technique and transplantation of *Anoectochilus formosanus* Havata. *Journal of Jiangsu Forestry and Technology*, Zazhi, China, v. 26, n. 3, p. 32-34, 1999.

LIBANO, R. A.; WITMER, A. H. M. Comparação entre plantas de crisântemo propagadas *in vitro* e *in vivo*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 6., 1987, Campinas. *Resumos...* Campinas: Cargill, 1987. p. 77.

LORENZI, H.; SOUSA, H. M. *Plantas ornamentais do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 1996. v. 1, p. 650.

LOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MALAURE, R. S.; BARCLAY, G.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. The production of novel plants from florets of *Chrysanthemum morifolium* using tissue culture. 1. Shoot regeneration from ray florets and somaclonal variation exhibited by regenerated plants. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v. 139, n. 1, p. 8-13, 1991.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. *Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações*. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MINAMI, K. Produção de mudas em recipientes. In: MINAMI K. *Produção de mudas de alta qualidade em horticultura*. São Paulo: Fundação Salim Farah Maluf, 1995. cap. 3, p. 85-101.

MOHAMED-YASSEEN, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Largo, v. 37, n. 2, p. 204-205, Mar./Apr. 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 4, p. 473-497, 1962.

NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; PATNAIK, S. N. Propagation of *Spathoglottis plicata* BL. (Orchidaceae) through *in vitro* culture of leaf bases. **Advances in Plant Sciences**, New York, v. 12, n. 2, p. 589-592, 1999.

NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; PATNAIK, S. N. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw, *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fish, and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 71, n. 3/4, p. 243-250, Dec. 1997.

NORMAH, M. N.; NOR-AZZA, A. B.; ALIUDIN, R. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, n. 3, p. 291-294, Dec. 1995.

OLIVEIRA, P. D. Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev.) cv. Orange Reagen. 1994. 116 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

ORTEGA, M. C.; MORENO, M. T.; ORDOVAS, J.; AGUADO, M. T. Behaviour of different horticultural species in phytotoxicity bioassays of bark substrates. **Science Horticulturae**, Amsterdam, v. 66, n. 12, p. 125-132, Sept. 1996.

PAIVA, P. D. O.; MAYER, M. B. D.; CAMPOS, R. J. C.; RODRIGUES, V. A.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.

PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. Efeitos do ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de cactos *Gymnocalycium buldiamur* L. e *Mammillaria bocasana* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 589-593, abr. 1992.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R.
Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações. Meios de cultura. Lavras-
MG : UFLA/FAEPE, 1997. 127 p.

PASQUAL, M.; SILVA, A. B. da; MACIEL, A. L. R.; PEREIRA, A. B.;
ALVES, J. M. C. Efeito da cianamida hidrogenada e benzilamino purina na
proliferação *in vitro* de brotos de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv.
Princesa Isabel. *Revista da Universidade de Alfenas, Alfenas*, v. 4, n. 2, p.
115-119, jul./dez. 1998.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas.** 2. ed. Viçosa:
UFV, 2001. 63 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** 3. ed. Madrid:
Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants.** Dordrecht: Martinus
Nyhoff Publishers, 1987. 344 p.

PODDAR, K.; VISHNOI, R. K.; KOTHARI, S. L. Plant regeneration from
embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher
concentrations of NH_4NO_3 as a replacement of NAA in the medium. *Plant
Science, Clare*, v. 129, n. 1, p. 101-106, Oct. 1997.

PRAKASH, L.; LEE, C. L.; GOH, C. J. *In vitro* propagation of commercial
orchids: An assessment of current methodologies and development of a novel
approach-Thin section culture. *Journal of Orchid Society India, New Delhi*, v.
10, n. 1/2, p. 3141, 1996.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to
the greenhouse. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.).
Micropropagation - tecnology and application. Dodrecht: Kluwer Academic
Publishers, 1991. p. 71-93.

PULCHALSKI, L. E. A.; KÄMPF, A. N. Efeito da altura do recipiente sobre a
produção de mudas de *Hibiscus rosa-sinensis* L. Em plugs. In: KÄMPF, A. N.;
FERMINO, M. H. (Ed.). **Substrato para plantas - a base da produção
vegetal em recipientes.** Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 209-215.

QI-GUANG, Y.; READ, P. E.; FELLMAN, C. D.; HOSIER, M. A. Effect of
cytokinin, IBA and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*.
HortScience, Alexandria, v. 21, n. 1, p. 133-134, Feb. 1986.

RAMAN, K. Rapid multiplication of *Streptocarpus* and *Gloxinia* from in vitro culture pedicel segments. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Jena, v. 83, n. 5, p. 411-418, 1977.

READ, P. E.; SZENDRÁK, E. Micropropagation and biotechnology of tropical and subtropical ornamentals. *Acta Horticulturae*, v. 461, n. 2, p. 93-103, 1998.

REGO, L. V.; BERNARDI, A.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. Desenvolvimento vegetativo de genótipos de orquídeas brasileiras em substratos alternativos ao xaxim. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v. 6, n. 1-2, p. 75-79, 2000.

REINERT, R. A.; MOHR, H. C. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, New York, v. 91, p. 664-671, June 1967.

REIS, G. M. C. L.; MELLO, C. M. C.; MIRANDA, G. H. B. Efeito de diversos fatores em meio de cultura no desenvolvimento de plântulas de *Cattleya nobilior* Rchb. f. (Orchidaceae). In CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. Anais... Lavras- MG, 2003. p. 275.

ROCHA, M. T. **Fertilização orgânica e qualidade do solo: um estudo de alguns indicadores de manejo sustentável.** 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

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

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, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. Anais.... Lavras- MG, 2003. p. 253.

RODRIGUES, V. T. Substratos e cultivo. *Boletim CAOB*. p. 50-54, abr./jun. 2001.

SAKUTA, M. Effects of sucrose source on betacyanin acculation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 71, n. 4, p. 459-463, Dec. 1987.

SHEEHAN, T. J. Orchids. In: LARSON, R. A. (Ed.). **Introduction to floriculture**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1992. p. 13-142.

SHEEHAN, T. J. Recent advances in botany propagation and physiology of orchids. **Horticultural Reviews**, v. 5, p. 279-315, 1983.

SHEEHAN, T. J.; SHEEHAN, M. **An illustred survey of orchid genera**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 221 p.

SILVA, A. B. da. **Multiplicação *in vitro* e aclimatização de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, A. B. da; PIO, R.; RAMOS, J. D.; MENDONÇA, W.; PASQUAL, M.; CALEGARI, M. Influência das fontes de nitrogênio NH_4NO_3 e KNO_3 no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto 'Trifoliata'. **Revista Científica Rural, Bagé**, v. 6, n. 2, p. 147-152, 2001.

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

SILVA, E. F.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B. da **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow'**. In CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais.... Lavras- MG, 2003**. p. 321.

SILVA, W. **O cultivo de orquídeas no Brasil**. São Paulo: Nobel, 1986. 96 p.

SIMÕES, F. C.; PAIVA, P. D. O.; RODRIGUES, T. M. Efeito de diferentes meios de cultura, água de coco e carvão ativado na propagação *in vitro* de meristemas de *Epidendrum* sp. e *Dendrobium* sp. In CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., 1999, Jaboticabal. **Anais... Jaboticabal- SP, 1999**. p. 109.

SLUIS, C. J.; WALKER, K. A. Commercialization of plant culture propagation. *IAPTC News*, v. 47, p. 2-12, 1985.

SOUZA, M. M.; LOPEZ, L. C.; FONTES, L. E. Avaliação de substratos para o cultivo de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat, Compositae) White Polaris em vasos. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v. 1, n. 2, p. 71-74, 1995.

START, N. D.; CUMMING, B. G. In Vitro Propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendel. *HortScience*, Alexandria, v. 11, n. 3, p. 204-206, June 1976.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal *in vitro* culture. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234-238, Mar. 1988.

SUTTER, E.; LANGHANS, R. W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 60, n. 12, p. 2896-2902, Dec. 1982.

SUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S.; DILLON, G. W. *Orquídeas: guia dos Orquidófilos*. Tradução: Joaquim Gonzalez de Lema Filho. 5. ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1994. 158p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. 2. ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998. 792 p.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Differentiation in *Lilium bulbiscales in vitro*. Effect of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 48, n. 1, p. 121-125, Jan. 1980.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Factors affecting differentiation *in vitro*, and a mass propagation scheme for *Begonia x hiemalis*. *Science Horticulturae*, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 65-75, 1982.

TAKEYOSHI, N. I.; ANRAKU, R. N.; MINAMI, K.; LIMA, A. M. L. P. Efeito de diversos substratos no enraizamento de *Chrysanthemum morifolium* cv. Polaris. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 2., 1983, Rio de Janeiro. *Anais....* Rio de Janeiro: EMBRAPA-DDT, 1984. p. 280.

VACIN, E.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solution. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 110, p. 605-613. 1949.

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

VILLALOBOS, A. L.; MUÑOZ, J. M.; SOSA-MOSS, C. Cultivo de tejidos de orquideas: *Cattleya*, *Encyclia*, *Oncidium* y *Stanhopea*. **Revista Chapingo, Serie Horticultura**, Chapingo, v. 1, n. 1, p. 58-62, 1994.

WANG, P. J.; HUANG, L. C. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. **In Vitro**, Largo, v. 12, n. 3, p. 260-262, 1976.

WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. C. *In vitro* acclimatization of aseptically culture plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 386-389, May 1983.

WARDLE, K.; QUINLAN, A.; SIMPKINS, I. Abscisic acid and regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis*, regenerated through apical meristem culture. **Annals of Botany**, London, v. 43, n. 6, p. 745-752, 1979.

WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J.; HENSHAW, G. G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Jena, v. 89, n. 2, p. 141-147, 1978.

T 635 833372

MON /AVA

T 635 83355

MAR 1 inf.