



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**MULTIPLICAÇÃO E CRESCIMENTO *IN*  
VITRO DE ORQUÍDEA *Brassiocattleya*  
PASTORAL x *Laeliocattleya* AMBER GLOW**

**ENOQUE FERNANDES DA SILVA**

**2003**

**ENOQUE FERNANDES DA SILVA**

**MULTIPLICAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE ORQUÍDEA  
*Brassiocattleya* PASTORAL x *Laeliocattleya* AMBER GLOW**

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

2003

Silva, Enoque Fernandes

Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya*  
Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow / Enoque Fernandes da Silva. -  
Lavras: UFLA, 2003.

62 p. : il.

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

1. Orquídea. 2. Cultivo *In Vitro*. 3. Micropropagação. 4.  
Subcultivo. 5. Planta ornamental. I. Universidade Federal de Lavras.  
II. Título.

CDD-635.93415

**ENOQUE FERNANDES DA SILVA**

**MULTIPLICAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DA ORQUÍDEA  
*Brassiocattleya* PASTORAL x *Laeliocattleya* AMBER GLOW**

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 13 de maio de 2003

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva UFLA

Pesquisador Dr. Leonardo Ferreira Dutra UFLA

Prof. Dr. Moacir Pasqual  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Deus,

Por tanto a agradecer e tão pouco a pedir,

**OFEREÇO.**

Aos meus pais, Brivaldo e Alba, *in memoriam*  
À minha esposa Salwa, pelo amor e apoio,  
Ao meu filho Bruno, pelo amor e carinho,

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Ione Gomes Adriano, diretora da Escola Agrotécnica Federal de Colorado do Oeste-RO, pela liberação para o mestrado.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, em especial ao Departamento de Agricultura e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

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

Ao Professor Dr. Moacir Pasqual, pela orientação, esforço e compreensão nos momentos difíceis.

À Professora Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, pelos ensinamentos e entusiasmo com as ornamentais, do qual fui contaminado.

Ao Dr. Leonardo Ferreira Dutra, pela revisão do texto.

Aos professores da UFLA, pelos conhecimentos adquiridos e necessários à elaboração deste documento.

Ao Núcleo de Apoio Didático e Pedagógico (NADP), pelas fotos digitais de orquídeas.

Aos técnicos do Laboratório de Cultura de Tecidos, Claret e Vantuil, sempre prestativos.

Aos meus sogros, Sr. David Lins e Sra. Lindinalva, pelo apoio e por adotar-me como filho.

Aos companheiros doutorandos e mestrandos Maurício Celano e Fabiane, Adriano Bortolotti, Sebastião Elviro e Regina, Ramon, José Inácio e Delma, Tatiana, Nuno Madeira, Edvan Chagas e Francisco Vilasboas, pela colaboração e amizade.

Aos companheiros do Curso de Pós-Graduação, pela convivência.

**AGRADECIDO!**

## BIOGRAFIA

Enoque Fernandes da Silva nasceu em Jacuibe-Porto Calvo, AL, aos vinte dias do mês de maio de 1954. É filho de Brivaldo Fernandes da Silva e Alba Fernandes da Silva. Durante a graduação atuou na Fundação Projeto Rondon como participante e monitor. Formou-se, no ano de 1982, em engenharia agrônoma pela Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. Foi técnico da Fundação Projeto Rondon por quatro anos. Licenciou-se, no ano de 1988, em Ciências Agropecuárias pela Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. Trabalhou como professor na Escola Agrotécnica Estadual Sílvia Gonçalves de Faria-Rondônia-EAESGF/RO (1990-1994) onde acumulou a função de vice-diretor. É professor efetivo da Escola Agrotécnica Federal de Colorado do Oeste-Rondônia-EAF/CO, onde foi diretor do Departamento de Ensino e Apoio Didático. Possui pós-graduação *lato sensu* em Planejamento Educacional pela Universidade Salgado de Oliveira-UNIVERSO e pós-graduação *lato sensu* em Cultura de Tecidos Vegetais: Tecnologia e Aplicações, pela Universidade Federal de Lavras-UFLA, MG. Iniciou o curso de mestrado no ano de 2001 na Universidade Federal de Lavras, MG, na área de Fitotecnia, concluindo no ano de 2003. Atuou na estruturação do orquidário da UFLA. É colecionador de orquídeas, orquidófilo, membro e secretário do Círculo Orquidófilo de Lavras-COL.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Botânica.....	3
2.2 Aplicação de cultura de tecidos.....	8
2.3 Importância econômica.....	8
2.4 Histórico do cultivo de orquídeas.....	10
2.5 Micropropagação.....	12
2.6 Meio de cultura.....	13
2.6.1 Determinação do meio de cultura.....	14
2.6.2 Reguladores de crescimento.....	16
2.6.2.1 Auxinas.....	16
2.6.2.2 Citocininas.....	17
2.6.3 Vitaminas.....	18
2.6.4 Carvão ativado.....	19
2.6.5 Aditivos orgânicos complexos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Efeito de diferentes concentrações do meio Knudson e vitaminas do meio MS no cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Brassiocattleya</i> Pastoral x <i>Laeliocattleya</i> Amber Glow.....	23
3.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA no cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Brassiocattleya</i> Pastoral x <i>Laeliocattleya</i> Amber Glow.....	23
3.3 Efeito de diferentes concentrações de BAP e carvão ativado no cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Brassiocattleya</i> Pastoral x <i>Laeliocattleya</i> Amber Glow.....	23
3.4 Efeito de diferentes concentrações de polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Brassiocattleya</i> Pastoral x <i>Laeliocattleya</i> Amber Glow.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Efeito de diferentes concentrações do meio Knudson e vitaminas do meio MS no cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Brassiocattleya</i> Pastoral x <i>Laeliocattleya</i> Amber Glow.....	25
4.1.1 Número de brotos.....	26
4.1.2 Número de folhas.....	28
4.1.3 Altura da plântula.....	30
4.1.4 Número de raízes.....	31

4.1.5 Comprimento médio do sistema radicular.....	32
4.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA no cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Brassiocattleya</i> Pastoral x <i>Laeliocattleya</i> Amber Glow.....	34
4.2.1 Número de brotos.....	35
4.2.2 Número de raízes.....	36
4.3 Efeito de diferentes concentrações de BAP e carvão ativado no cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Brassiocattleya</i> Pastoral x <i>Laeliocattleya</i> Amber Glow.....	37
4.3.1 Número de brotos.....	38
4.3.2 Número de folhas.....	39
4.3.3 Peso da matéria fresca da plântula.....	40
4.4 Efeito de diferentes concentrações de polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Brassiocattleya</i> Pastoral x <i>Laeliocattleya</i> Amber Glow.....	42
4.4.1 Número de brotos.....	43
4.4.2 Comprimento médio do sistema radicular.....	44
4.4.3 Peso da matéria fresca da plântula.....	45
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
6 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	56

## RESUMO

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow***. 2003. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)\* - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Os gêneros *Cattleya*, *Laelia* e *Brassavola*, de ocorrência natural no Brasil, são muito procurados como planta ornamental. Esta demanda cria a necessidade de desenvolver técnicas mais eficazes de propagação para atender o mercado e contribuir com a reposição de espécies ameaçadas de extinção. Objetivou-se testar concentrações do meio de cultura Knudson, vitaminas do meio MS, benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA), carvão ativado e polpa de banana no subcultivo da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow*. Os explantes utilizados foram plântulas oriundas da germinação *in vitro*, com tamanho médio de 1-1,5cm. Experimentos foram realizados usando-se concentrações do meio Knudson (0%, 50%, 100%, 150% e 200 %) combinadas com concentrações de vitaminas do meio MS (0%, 50%, 100% e 200%); concentrações de BAP (0, 1, 2 e 4 ml L<sup>-1</sup>) combinadas com concentrações de ANA (0,00; 0,01; 0,10 e 1,00 ml L<sup>-1</sup>) adicionadas ao meio Knudson; concentrações de BAP (0, 1, 2 e 4 ml L<sup>-1</sup>) e concentrações de carvão ativado (0, 200, 400 e 600 mg L<sup>-1</sup>), incorporadas ao meio Knudson; concentrações de polpa de banana cv. nanica (0, 25, 50, 75 e 100 g L<sup>-1</sup>) combinadas com concentrações de vitaminas do meio MS (0%, 50%, 100% e 200%). O meio Knudson na concentração de 129% suplementado com vitaminas do meio MS na concentração de 104,8% promove o crescimento geral da plântula. Não há necessidade da adição de BAP e ANA no meio de cultura. A adição de carvão ativado inibe a formação de folhas. A polpa de banana na concentração de 75g L<sup>-1</sup> e carvão ativado na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> promoveram a formação de maior número de brotos. A polpa de banana na concentração de 100g L<sup>-1</sup> promoveu maior comprimento médio do sistema radicular e peso da matéria fresca da plântula.

---

Orientador: Moacir Pasqual - UFLA

## ABSTRACT

SILVA, E. F. **The *in vitro* orchid *Brossocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow* multiplication and growth.** 2003. 60p Dissertation (Master in Crop Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The genera *Cattleya*, *Laelia* and *Brassavola* occur naturally in Brazil and they are world wide wanted as ornate plants and that desire for them creates the necessity to develop better propagation's techniques not only to attend the market needs but also to contribute to the replacement of the endangered species where they could become extinct. The purpose was to test Knudson culture media concentrations, MS media vitamins, benzilaminopurine (BAP), naftalenoacetic acid (ANA), activated charcoal and banana flesh in orchid subcultivo BC Pastoral x LC Amber Glow. The explants used were from plantlets germinated *in vitro* with medium size 1 to 1.5cm. The experiments were made using Knudson media concentrations (0%, 50%, 100% and 200%) combined with vitamins concentrations from MS media (0%, 50%, 100% and 200%), BAP concentrations (0, 1, 2 and 4 ml L<sup>-1</sup>) combined with ANA concentrations (0.00, 0.01, 0.10 and 1.00 ml L<sup>-1</sup>) added to Knudson media; the concentrations of BAP (0, 1, 2 and 4ml L<sup>-1</sup>) and activated charcoal concentrations (0, 200, 400 and 600 mg L<sup>-1</sup>) incorporated to Knudson media; banana cv. nanica flesh concentrations (0, 25, 50, 75 and 100 g L<sup>-1</sup>) combined to MS media vitamins concentrations (0%, 50%, 100% and 200%). Knudson media 129% concentration enriched with vitamins from MS media 104,8% concentration promoted general plantlets growth. There is no need to add BAP and ANA to the culture media. The activated charcoal addition inhibits the leaves formation. The banana flesh 75 g L<sup>-1</sup> concentration and activated charcoal 200mg L<sup>-1</sup> concentration promoted higher number of shoots formation. The banana flesh 100g L<sup>-1</sup> concentration promoted higher medium size lenght on the root system and a higher plantlets fresh matter weight.

---

\* Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Major Professor).

## 1 INTRODUÇÃO

As orquídeas ocorrem em quase todas as regiões da Terra, com exceção dos pólos e desertos, sendo mais freqüentes e exuberantes nos trópicos, entre os quais se localiza o Brasil, portador de um invejável banco de germoplasma dessas plantas, tornando-se também responsável pela sua preservação.

As orquídeas são conhecidas não só pela sua importância ornamental, mas também industrial em função da extração de essência de baunilha (gênero *Vanilla*).

O elevado número de espécies e híbridos tropicais possibilitam a existência de variadas formas, cores e flores, exploradas comercialmente em todo mundo. Os gêneros *Cattleya*, *Laelia* e *Brassavola* de ocorrência natural no Brasil são bastante populares e atingem altos preços no mercado interno e externo, procurados por colecionadores, orquidófilos, decoradores e cidadãos comuns.

Os relatos sobre o cultivo de orquídeas remontam ao período antes de Cristo, época em que já eram denominadas por *Orchis* pelos gregos e *Han* ou *Lan* pelos chineses. Confúcio (551 – 479 a.C.) mencionava em seus escritos que os chineses as utilizavam na decoração do lar como símbolo de pureza, perfume e graça. Os gregos e romanos antigos cultivavam-nas para fins medicinais.

A exótica beleza das orquídeas tropicais atraiu a coleta predatória entre os séculos XVI e XX, liderada principalmente pelos ingleses que enviavam frotas marítimas às regiões tropicais do Novo Mundo, muitas vezes exclusivamente para esse fim.

No século XX surge a consciência ecológica de preservar a biodiversidade do planeta sem abrir mão do direito de usufruir a beleza posta pela natureza. Para equacionar esta dicotomia de interesses, buscou-se nova técnica que atendesse eficazmente a demanda de orquídeas. É neste contexto que

o professor Lewis Knudson, em 1922, cria o cultivo assimbiótico, no qual quase 100% das sementes de orquídeas germinam, sobrevivem e crescem rapidamente, quando comparado com o método natural no qual somente 2 a 3% das sementes germinam por simbiose com o fungo *Micorriza*, além do desenvolvimento lento. Outra forma natural de propagação é através de divisão de touceiras e brotos aéreos produzidos por alguns gêneros, entretanto, a planta-mãe fornece apenas 1 a 2 unidades por ano, em média.

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

Este trabalho teve como objetivo, testar variações no meio de cultura *in vitro* para o estádio de subcultivo de plântulas do híbrido intergenérico *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Botânica

As orquídeas, pertencentes à família *Orchidaceae*, maior família fanerógama, são taxonomicamente, as mais evoluídas entre as monocotiledôneas. Estima-se que representam 7% do total de espécies do mundo, em torno de 35.000 (Singh, 1992), pertencentes a 1.800 gêneros (Watanabe, 2002) e existindo acima de 100.000 híbridos (Sheehan, 1994). São tão especializadas que constituem por si só, uma ordem botânica, a *Microspermae*<sup>1</sup>.

Ocorrem em quase todas as regiões da Terra (Tabela 1A) com exceção dos pólos e desertos, sendo encontradas desde o nível do mar até 4.000m (Suttlewort, 1997), ou até 5.000m (Dematê, [199...]). À medida que se aproxima a linha do Equador, há um aumento de frequência, variabilidade de espécies e exuberância de cores (Hoehne, 1942).

As orquídeas são plantas herbáceas, perenes, podendo ser terrestres, rupículas ou epífitas. A flor (Figura 3), principal característica taxonômica, é composta por seis elementos: três sépalas (que protegem a flor em botão) e três pétalas, destas, duas são idênticas e uma diferenciada denominada labelo, de posição inferior devido a uma torção de 180<sup>0</sup> do ovário ou do pedúnculo (Joly, 1977) e com função de atrair os agentes polinizadores. O labelo é quase sempre maior e mais vistoso (Figura 1 e 2)).

Os órgãos sexuais são fundidos em uma única peça denominada coluna. A antera se posiciona no ápice da coluna e contém os grãos de pólen agrupados na polínea (Figura 4). Esta pode variar em número de 2 a 8, característica utilizada para identificar gêneros aparentemente iguais como *Cattleya* e *Laelia*,

---

<sup>1</sup> A ordem *Microspermae* inclui ainda duas pequenas famílias: *Burmanniaceae* e *Corsiaceae* (Dunsterville, 1962).

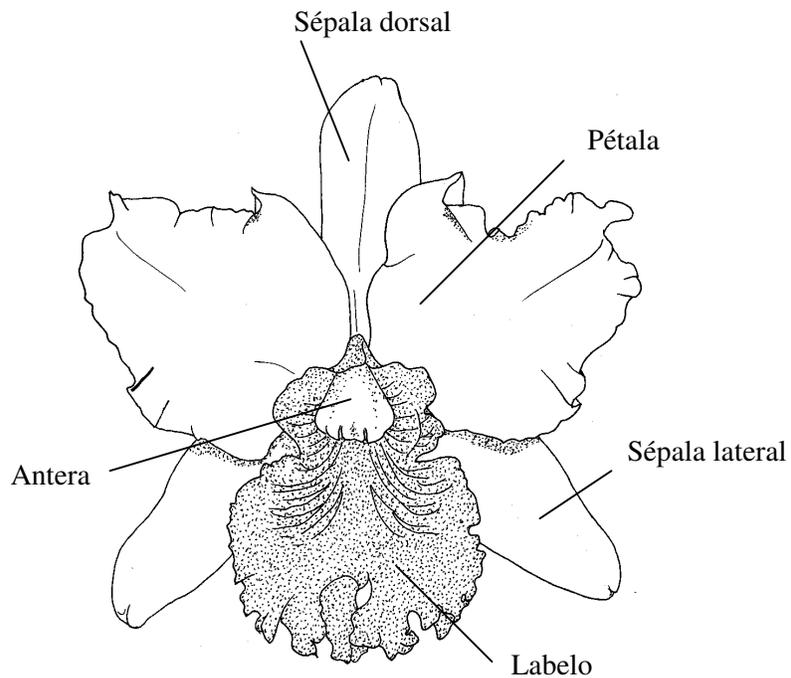


**FIGURA 1. *Brassiocattleya Pastoral*.**  
(Fonte: o autor)

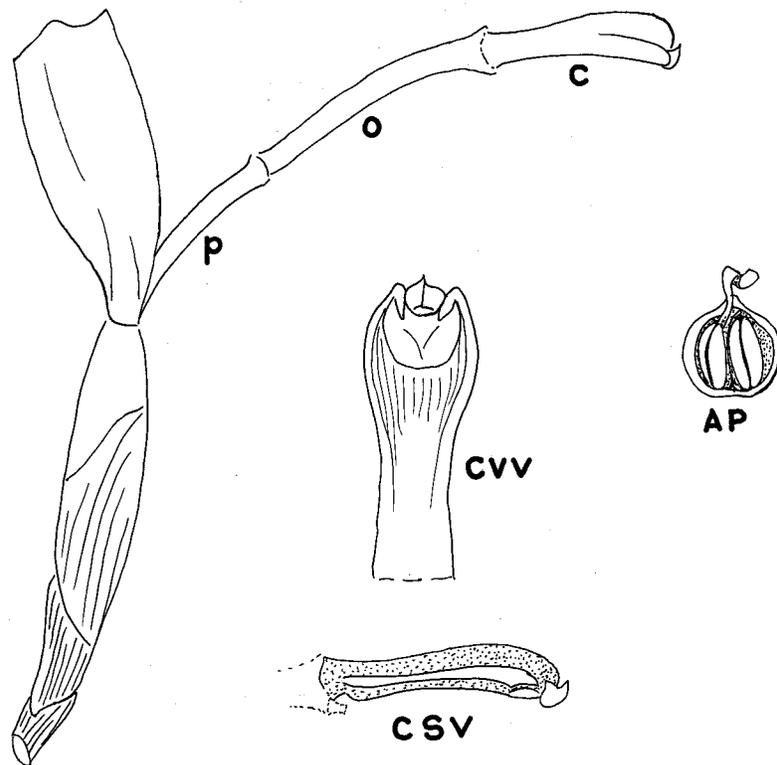


**FIGURA 2.** *Laeliocattleya* Amber Glow.  
(Fonte: o autor)

que diferem em número: quatro e oito, respectivamente. O estigma é um disco de superfície viscosa, situado abaixo da antera onde são depositadas as políneas. Fecundada a flor, desenvolve-se o ovário dando origem ao fruto, mais comumente denominado de cápsula (Figura 4). Esta contém as sementes (em média, 700.000), semelhantes a pó, não possuindo tecidos de reserva (Vanique & Coelho, 1996).



**FIGURA 3.** Elementos florais na família *Orquidaceae*.  
(Fonte: o autor)



**FIGURA 4.** Órgãos sexuais na família *Orquidaceae*: **p**-pedúnculo; **o**-ovário; **c**-coluna; **cvv**-coluna, vista ventral; **csv**-coluna, secção vertical; **ap**-antera, polínea. (Fonte: o autor)

A palavra Orquídea é formada pela junção de dois elementos gregos: *órkhis* (latim: *orchis*) = testículo e *idea* ou *eidós* = forma, aspecto exterior, ficando esta família com o irreverente significado de planta que tem forma ou aspecto de testículo (Raposo, [19...]), como alusão ao formato do par de bulbos subterrâneos de orquídea do gênero *Ophrydineas*. Estas cresciam às margens do Mediterrâneo (Hoehne, 1942), e foram citadas pela primeira vez no livro *Historia Plantarum* do filósofo e naturalista Teofrasto, morto em 287 a. C. (Raposo, [19...]). Os gêneros *Cattleya* e *Laelia* são os mais ornamentais e conhecidos dentre as orquídeas (Encyclopedia Britannica, 1959; Bicalho, 1980; Englert, 2000).

## **2.2 Aplicação de cultura de tecidos**

Várias técnicas de cultura de tecidos já são aplicadas industrialmente, como prova do valor do método científico como alternativa economicamente viável. Anualmente são propagadas 500 milhões de plantas e a maioria é de ornamentais (Debergh, 1994). Os Países Baixos produzem cem milhões de plantas por ano por meio de micropropagação (Hall, 1999). Na Europa Ocidental, esta técnica é amplamente utilizada em plantas ornamentais: 100% de *Gerbera jamesonii*, 90% de *Spathiphyllum* e 75% de várias espécies de *Anthurium* são propagadas dessa maneira (Vasil & Thorpe, 1994).

## **2.3 Importância econômica**

As orquídeas entram no mercado como plantas ornamentais ou flor de corte, além do cultivo industrial do gênero *Vanilla* para extração de essência de baunilha (Joly, 1977).

A comercialização interna e externa é feita de duas maneiras principais: na primeira as plantas são comercializadas envasadas antes do florescimento com altura de 50,8cm, 76,2cm ou 101,6cm, pelos padrões internacionais; na

segunda, as plantas são enviadas dentro dos próprios frascos em que foram semeadas e cultivadas *in vitro*. Esta segunda maneira é preferida pelos exportadores, não só pela quantidade de explantes como também pela facilidade de exames fitossanitários rotineiros necessários à exportação (Matsunaga, 1997).

A partir da segunda metade do século XX, a tecnologia moderna foi incorporada à produção de plantas ornamentais e os viveiros ganharam a conotação de atividade industrial (Kämpf, 2000).

A floricultura nos maiores países produtores e exportadores mundiais possui conotação de **flower industry**, agregando todos os seguimentos da cadeia produtiva. Países como Noruega, Suíça, Suécia, Dinamarca e Itália consomem mais de US\$ 100 *per capita*. Um outro grupo, entre US\$ 40 e 100 *per capita* reúne Alemanha, Austrália, Holanda, Bélgica, França, Japão e Estados Unidos.

No Brasil, o consumo é inferior a US\$ 7 *per capita* (Matsunaga, 1997). A demanda por plantas ornamentais nos países do Primeiro Mundo atinge 21 bilhões de dólares por ano (Matsunaga, 1995). Os Estados Unidos, por exemplo, tradicional exportador de orquídeas do gênero *Cymbidium*, movimentam 14 milhões de dólares anualmente e o Havaí exporta sozinho, 4 milhões de dólares (Larson, 1992).

O Brasil, considerando sua potencialidade agrícola, exporta uma pequena parcela de 30 milhões de dólares com bulbos, mudas e sementes. No mercado interno movimenta no varejo, 800 milhões de dólares, aproximadamente (Motos, 1996; Arruda et al., 1996).

## 2.4 Histórico do cultivo de orquídeas

O hábito de cultivar orquídea não é novo. Confúcio (551 - 479 a.C.) a mencionava em seus escritos com o nome de Han ou Lan e que os chineses a utilizavam na decoração do lar, simbolizando pureza, perfume e graça.

Os gregos e romanos antigos a cultivavam para fins medicinais, como estimulante da fertilidade e da virilidade pelo Princípio das Assinaturas formulado pelos herbários gregos: o uso medicinal era determinado pela forma e aparência das plantas, costume que se difundiu pela Europa e vigorou até meados do século XVI (Alzugaray e Alzugaray, 1983).

O surgimento da imprensa no século XV possibilitou publicações sobre orquídeas, o que popularizou o conhecimento sobre a planta (Paula e Silva, 2001).

No século XIX surgem os grandes viveiristas como James Veitch, que recebiam orquídeas tropicais enviadas por botânicos viajantes ou coletores, provocando excitação no público: pela estranha beleza, todos queriam cultivar estas plantas, raras e exóticas.

Em 1818, o inglês William Cattley recebeu um carregamento de orquídeas coletadas no Brasil, embaladas com outras plantas, dentre as quais se encontrava uma orquídea desconhecida na época. Cattley ficou fascinado com o aspecto dessa orquídea e a cultivou até o florescimento. Como orquidófilo nunca tinha visto flor tão bela e concluiu que se tratava de uma das orquídeas mais belas encontradas até então. Esta planta deu origem a um gênero com o nome de *Cattleya* em homenagem ao Sr. Cattley e, por causa do labelo em forma de trombeta, recebeu o nome de *Cattleya labiata*, considerada até hoje como uma das flores mais belas do mundo (Englert, 2000).

Até o ano de 1853, as orquídeas eram consideradas de difícil hibridação, quando John Dominy, um jardineiro escocês a serviço da firma inglesa James Veitch, conseguiu a proeza, proporcionando grande impulso na seção de

orquídeas da empresa (Alzugaray e Alzugaray, 1983). Por volta de 1900, viveiristas britânicos conseguiram regenerar brotos de *Phalaenopsis* a partir de nós de haste floral, colocados em musgo não esterilizado, método que escapou aos botânicos, mas que pode ser considerado como uma forma empírica de cultura de tecidos desde um explante (Arditti & Ernst, 1993).

No século XX, entre 1900 e 1920, a demanda por plantas adultas, principalmente do gênero *Cattleya* aumentou consideravelmente e a busca nas matas tropicais começou a sofrer restrições, pois o risco de extinção de espécies incitou os governos locais a proibirem a exportação.

Neste período o problema enfrentado pelos viveiristas era estabelecer o cultivo de sementes: a cápsula produz milhões de sementes quase que desprovidas de reserva nutritiva e apenas algumas germinam quando caem sobre as raízes da planta-mãe graças à associação simbiótica com o fungo *Micorriza*. Da germinação até a primeira floração no gênero *Cattleya*, um período aproximado de sete anos é necessário (Northen, 1990).

A revolução na germinação e estabelecimento de plântulas de orquídeas ocorreu no ano de 1922 com o professor Lewis Knudson (1884-1958), da Cornell University, descobrindo o cultivo assimiótico com um experimento em frascos de vidro contendo ágar, nutrientes e sacarose (Campos, 2000). Após esta descoberta, tornou-se rotineiro germinar orquídeas tropicais e subtropicais, *in vitro*, utilizando a formulação do meio Knudson (Anexo A) (Vasil & Thorpe, 1994).

Os estudos com crescimento de células, tecidos e órgãos de planta começaram no século XX com a exploração comercial iniciando na década de 60 (Assis et al., 2000). A propagação *in vitro* de orquídeas conduziu ao desenvolvimento similar para outras plantas. Cultura de tecidos, células e protoplastos são bases da biotecnologia de plantas isentas de moléstias e promessa de melhores colheitas, substâncias químicas mais seguras e talvez um

ambiente melhor (Arditti & Ernst, 1993).

O processo histórico de desenvolvimento dos meios para micropropagação registra, além das substâncias básicas, acréscimo de componentes complexos como água de coco, extrato de carne e polpa de banana. Segundo Graeflinger (1950), citado por Arditti & Ernst (1993), o Brasil foi o primeiro país a utilizar a polpa de banana, em forma de farinha, adicionada ao meio de cultivo para germinação de sementes de orquídeas, tornando-se popular o uso nos laboratórios comerciais de plantas ornamentais do mundo todo.

## **2.5 Micropropagação**

A micropropagação constitui hoje importante ramo da biotecnologia. Atualmente, 200 a 300 milhões de plantas são produzidas por ano na Europa e quantidades similares nos Estados Unidos, representando cerca de cem milhões de dólares em cada local. A micropropagação também vem se expandindo na Ásia e América Latina.

As plantas micropropagadas são diversas, desde frutíferas, florestais e ornamentais como exemplo roseiras, lírios, begônias e orquídeas.

O sucesso desta técnica está associado à multiplicação em massa de indivíduos com características genéticas superiores e livres de vírus e patógenos, além de favorecer a preservação da biodiversidade pela rápida multiplicação de espécies ameaçadas de extinção (Lavato et al., 1996).

A biotecnologia consolidou-se como setor estratégico e de vanguarda do conhecimento científico e tecnológico, contribuindo para a solução de importantes problemas da humanidade (Fontes, 2000).

A micropropagação se baseia na totipotencialidade, que é a propriedade das células reproduzirem uma planta inteira (Torres et al., 1999) e deve ser entendida como reprodução assexuada. Entretanto, também é usada como artifício para germinar sementes de difícil propagação pelos métodos

convencionais (Pasqual et al., 1998) como é o caso das orquídeas.

O desenvolvimento destas técnicas começou com orquídeas, nos trabalhos de Morel em 1960 e posteriormente com outras ornamentais, inicialmente objetivando a eliminação de doenças e a produção rápida e em grande escala de plantas geneticamente idênticas (Torres, 1988).

A micropropagação consiste essencialmente em separar uma porção da planta, o explante, e proporcionar-lhe artificialmente a condição física e química apropriadas para que as células expressem seu potencial intrínseco ou induzido (Torres, 1988; Roca, 1991; Sá et al., 2000).

## **2.6 Meio de cultura**

Em condições naturais de cultivo, a planta sintetiza a partir da luz do sol, todos os componentes orgânicos de que necessita ao processar dióxido de carbono, água e elementos minerais dissolvidos na solução do solo. Essas condições devem ser atendidas na micropropagação, isto é, os fatores físicos de desenvolvimento *in vivo* (luz, fotoperíodo e temperatura) são os mesmos (Torres & Barbosa, 2001).

Os meios nutritivos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* e se baseiam nas proporções exigidas por cada espécie (Caldas et al., 1998). A assepsia e o controle ambiental propiciam a obtenção de plantas mais uniformes, sadias e com rapidez bem maior do que nos métodos convencionais (Sá et al., 2000), facilidade no manuseio e transporte, independência da sazonalidade e espaço físico reduzido para o cultivo (Sagawa & Kunisaki, 1990). O meio nutritivo é composto de água, elementos essenciais, vitaminas, aminoácidos, açúcares, agente solidificante, reguladores de crescimento (George & Sherrington, 1984) e eventualmente aditivos como antibióticos, carvão ativado e componentes complexos.

Misturas complexas foram utilizados no desenvolvimento de meios de cultura como extrato de levedura, água de coco, suco de abacaxi e extrato de folha de fumo (Pasqual et al., 1998).

### **2.6.1 Determinação do meio de cultura**

Os fatores que mais freqüentemente determinam o sucesso da micropropagação são a origem do explante e o meio nutritivo onde são cultivados.

Os primeiros meios não continham íons amônia, mas apenas nitrogênio na forma de nitrato. A incorporação do íon amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) juntamente com maiores teores de  $\text{NO}_3^-$  e potássio promoveu melhorias significativas no processo evolutivo de composição dos meios, possibilitando melhor crescimento de calos, formação de brotos, embriogênese e proliferação de brotações axilares, em maior quantidade. Knudson, em 1922, conseguiu germinar sementes de orquídeas ao incorporar este íon ao meio Knudson (7,6 mM  $\text{NH}_4^+$  além de 8,5 mM de  $\text{NO}_3^-$ ). Posteriormente, vários pesquisadores enfatizaram a importância do íon amônia para o crescimento de plântulas de orquídeas (Pasqual et al., 1997).

Vários meios de cultura têm sido testados e um meio específico é identificado pela composição de sais minerais, enquanto as vitaminas, os reguladores vegetais e outros suplementos orgânicos variam em concentração.

Segundo Hoffmann et al., (1998), as maiores variações nos meios de micropropagação estão nos micronutrientes e nos fito-hormônios. A escolha do meio depende da espécie em questão e do propósito da cultura (meristema, organogênese, embriogênese somática, cultivo ou subcultivo de explantes, etc).

O meio MS é o mais universalmente utilizado na micropropagação, entretanto, sua concentração de nutrientes é alta, podendo ser modificada (George & Sherrington, 1984; Pierik, 1987).

A redução ou incremento de alguns componentes pode promover melhor crescimento de tecidos de orquídeas (Hoffmann et al., 1998).

A alta proporção de nitrogênio (N) na forma  $\text{NH}_4^+$  no meio MS ( $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+ = 66,34$ ) e a quantidade total de N é muito maior do que na maioria dos outros meios, tornando-se inadequado para algumas espécies. Meios que apresentam menor proporção como o Knudson, White ou WPM, são mais indicados para otimizar o crescimento e a morfogênese em algumas espécies (Pasqual et al., 1997).

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

Consultando a literatura experimental e usando o rastro da taxonomia como forma de exclusão, pode-se chegar a um meio mais apropriado para a família, gênero, espécie ou cultivar mais aproximado ao indivíduo objeto de estudo. No cultivo e subcultivo de plântulas do gênero *Cattleya*, George et al., (1987) sugerem o meio Knudson (Tabela 3A) ou Reinert e Mohr.

Segundo Arditti & Ernst (1993), o meio de propagação para *Cattleya*, *Laelia*, *Laeliocattleya* e *Brassocattleya* pode ser o mesmo.

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

## **2.6.2 Reguladores de crescimento**

A composição e concentração hormonal no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de micropropagação (Caldas et al., 1998).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas com ação similar aos fitorreguladores e que atuam em baixas concentrações em vários processos de desenvolvimento (George & Sherrington, 1984).

As auxinas e citocininas regulam o crescimento meristemático e a divisão celular e devem ser combinadas por tipo e concentração na promoção do desenvolvimento *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1990; Malaure et al., 1991). A combinação ótima varia entre espécies diferentes e até mesmo entre cultivares dentro de uma mesma espécie (Malaure et al., 1991). Alta relação citocinina/auxina é necessária para indução direta de brotações nos explantes, enquanto o processo de rizogênese exige uma menor relação (George & Sherrington, 1984; Torpe e Patel, 1984; Taiz & Zeiger, 1998).

A necessidade de ajustar a concentração de citocinina não está só em promover o desenvolvimento da parte aérea, mas também pelo efeito residual nos subcultivos, podendo inibir o alongamento e a fase posterior de enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1990). Segundo Linsmaier-Bednar & Skoog (1967), certos tecidos são totalmente dependentes da presença de fitorreguladores enquanto que outros são auto-suficientes. Para Hoffmann et al., (1998), os fitorreguladores podem ser agentes mutagênicos.

### **2.6.2.1 Auxinas**

O termo auxina é usado para descrever substâncias que promovem modificações plásticas na parede celular, permitindo o alongamento. São utilizadas para induzir calos em raízes, folhas, gemas axilares ou apicais, embriões, cotilédones e hipocótilos. Na década de 90, utilizou-se o 2,4-D na

metilação do DNA, o que representou um passo fundamental na regulação da totipotencialidade. As altas concentrações de 2,4-D favoreciam a hipermetilação do DNA e conseqüentemente a divisão celular. Já em baixas concentrações ocorria hipometilação, favorecendo a diferenciação celular (Hinojosa, 2000).

A biossíntese de auxinas ocorre principalmente em ápices juvenis (Hu & Wang, 1983; Cid, 2000), promovem o alongamento celular em raízes e brotos, induz a formação de raízes, mas, em altas concentrações pode prejudicar o crescimento da plântula (Jacobsen, 1983). Estão envolvidas na abscisão foliar, no desenvolvimento de gemas florais e indução de diferenciação vascular (Taiz & Zaiger, 1998). Auxinas como, por exemplo, o ácido naftalenoacético (ANA), promovem o enraizamento de plântulas *in vitro* (Cid, 2000).

Na micropropagação da orquídea *Aerides maculosum*, Murthy & Pyati (2001), obtiveram boa formação de protocormos com 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA em meio MS, os quais, após seis semanas, regeneraram plântulas.

Os teores de auxinas utilizadas nos meios de cultura variam de 0,01 a 10 mg L<sup>-1</sup>. As mais usadas são: AIA (ácido indolacético), AIB (ácido indolbutírico), ANA (ácido naftalenoacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético), 4-CPA (ácido 4-clorofenoxiacético) e Picloram. As auxinas 2,4-D e ANA são sintéticas e apresentam efeitos semelhantes aos das auxinas naturais (Torres et al., 2001).

### **2.6.2.2 Citocininas**

Essas substâncias são essenciais para o cultivo e desenvolvimento de plântulas, possuindo importância vital para manipulações *in vitro* de células e tecidos. As atividades biológicas e químicas das citocininas são bem definidas, mas pouco se sabe sobre seu modo de ação e, só recentemente o gene que promove a biossíntese da citocinina foi identificado (Mok et al., 2000).

As citocininas têm seu nome derivado da propriedade de promover a

divisão celular ou citocinese (Jacobsen, 1983; George & Sherrington, 1984; Taiz & Zeiger, 1998; Cid, 2000). São fundamentais na etapa de regeneração dos calos ou na multiplicação de gemas axilares ou apicais de plantas lenhosas ou herbáceas. Utilizadas assiduamente em regeneração de plantas *in vitro* (Cid, 2000), desempenham importante papel na indução de brotos (Gamborg, 1984; Pierik, 1987; Blakesley & Constantine, 1992), bem como na quebra de dormência apical e indução de formação de gemas axilares (Grattapaglia & Machado, 1990).

As citocininas mais usadas são: Cinetina, BAP (6-benzilaminopurina), Zeatina e TDZ (Thidiazuron). As concentrações adicionadas aos meios de cultura variam entre 0,03 e 30 mg L<sup>-1</sup> (Torres et al., 2001). O BAP é a citocinina mais potente e menos dispendiosa para promover o desenvolvimento da parte aérea da plântula (Zaerr & Mapes, 1985).

### **2.6.3 Vitaminas**

O crescimento e a morfogenia de plântulas micropropagadas podem ser melhorados com a adição de vitaminas ao meio de cultura. Nos vegetais, estas substâncias são requeridas pelas células como catalisadores metabólicos (George, 1993).

A adição de compostos orgânicos complexos como a polpa de banana pode suplementar o teor de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento ao meio de cultura (George, 1993).

As vitaminas mais freqüentemente usadas em cultura de tecidos de plântulas são: tiamina (Vitamina B<sub>1</sub>) nas concentrações de 0,1 a 10 mg L<sup>-1</sup>, niacina (ácido nicotínico ou Vitamina B<sub>3</sub>), piridoxina (B<sub>6</sub>), ambas nas concentrações de 0,1 a 1mg L<sup>-1</sup> e mio-inositol, utilizadas em proporções variadas para atender as necessidades de diversas espécies vegetais (Torres et al., 2001).

As exigências das células vegetais em vitaminas estão associadas ao tipo

de cultura e à espécie. Segundo alguns autores, na formação de explantes a partir de pecíolos de begônia, foram desnecessárias ou inibitórias, já na formação de brotos de crisântemo a partir de pedicelos, foram estimulantes (George, 1993).

O mio-inositol (ou inositol) é o único dos nove estereoisômeros de inositol que tem importância biológica. Na medicina foi classificado como integrante do complexo B, requerido para crescimento de cabelo e proteção contra dermatite. Em cultura de tecidos vegetais também é classificada como vitamina, apesar de alguns autores sugerir que seja considerada como um carboidrato adicional (George, 1993).

#### **2.6.4 Carvão ativado**

Inicialmente os meios de cultura eram escurecidos com grafite em pó para favorecer o geotropismo positivo das raízes, entretanto observou-se que no sistema radicular das orquídeas ocorria produção de compostos fenólicos tóxicos e que poderiam ser adsorvidos com maior eficácia com o emprego de carvão ativado (Arditti & Ernst, 1993).

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 (Arditti & Ernst 1993; George, 1993).

Trabalhando com explantes de milho, Mohamed-Yasseen (2001), percebeu que o carvão ativado adsorvia o ácido giberélico (GA<sub>4</sub>), com efeito benéfico, promovendo crescimento de raízes e número de brotos. Dependendo do tipo de cultura, quatro vantagens podem ser citadas: adsorver secreções de

tecidos cultivados ou existentes no meio e que inibiriam o crescimento; prevenir crescimento de calos não desejados; promover morfogenia, particularmente a embriogênese e promover formação de raízes, pela exclusão da luz.

No meio de cultura emprega-se as concentrações de 0,2% a 30% de carvão ativado, quando ocorre escurecimento do tecido *in vitro*, descoloração do meio, formação de calo na fase de enraizamento ou quando o crescimento do tecido é inibido (Torres et al., 2001).

É interessante comparar o uso de carvão ativado com resina de polivinilpirrolidone (PVP) e polivinilpolipirrolidone (PVPP) (Arditti & Ernst, 1993) como adsorventes de substâncias tóxicas, nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento e escolher o mais apropriado, isto é, o que estimule melhor os parâmetros número de brotos, altura da plântula e comprimento médio do sistema radicular dos gêneros estudados.

#### **2.6.5 Aditivos orgânicos complexos**

Os aditivos orgânicos complexos são preparações obtidas de produtos naturais, de composição indefinida, mas que atendem o propósito de enriquecimento do meio de cultura. Os aditivos orgânicos complexos podem ser adicionados ao meio visando melhor resposta no padrão de crescimento (Torres et al., 2001).

Vários elementos aditivos complexos como coco (endosperma, água, leite), peptona de carne, polpa de banana (verde ou madura), foram utilizados no meio de cultura de tecidos ou germinação de orquídeas (George, 1993). Há relatos da utilização da polpa de banana na germinação de *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilum* e *Phalaenopsis* (Arditti & Ernst, 1993). Entretanto, os dados comparativos disponíveis não permitem uma discussão razoável sobre o efetivo estímulo ao crescimento promovido por esses elementos (George, 1993).

Alguns cultivadores homogeneízam a polpa da banana com seus meios, tornando-os mais escuros, enquanto outros simplesmente submergem fatias de banana nos frascos contendo o meio. Inicialmente houve dúvidas sobre qual melhor estágio de amadurecimento da banana para uso, se verde ou madura, hoje se sabe que, indiferentemente, ambos têm o mesmo efeito. Experimentos subseqüentes confirmaram que a adição da polpa de banana no meio aumenta o número de plântulas obtidas a partir de explante *in vitro* (Arditti & Ernst, 1993).

A polpa de banana pode ser preparada a partir de frutos verdes ou maduros, promovendo diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, dependendo da cultivar e da quantidade de polpa utilizada (Torres et al., 2001). Com relação à polpa de fruto verde, é provável que durante autoclavagem já ocorra adsorção do tanino existente pelo carvão ativado incorporado ao meio.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras/MG.

Utilizou-se o híbrido intergenérico de orquídea *Brassiocattleya* Pastoral X *Laeliocattleya* Amber Glow (Quadros 1A e 2A), selecionado pelo valor comercial dos progenitores além da abrangência dos gêneros *Cattleya*, *Laelia* e *Brassavola*, na reintrodução do respectivo habitat.

O cruzamento foi obtido inoculando-se o pólen da *Laeliocattleya* Amber Glow (Figura 2) no estigma da *Brassiocattleya* Pastoral (Figura 1).

As sementes resultantes do cruzamento foram colocadas no meio de cultura Knudson 100% (Tabela 3A), acrescido de 40g L<sup>-1</sup> de polpa de banana e 100ml L<sup>-1</sup> de água de coco. Após a germinação, foram repicadas para meio idêntico ao do semeio, obtendo-se as plântulas.

As plântulas com tamanho médio de 1 a 1,5cm, foram submetidas à uniformização em frascos de 250 ml contendo 50 ml de meio Knudson nas concentrações 0%, 50%, 100%, 150% e 200%, durante um período de três meses. Foram colocadas quatro plântulas por frasco com tampa plástica e vedados com parafilme, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

O meio foi solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH ajustado para 5,8; utilizando NaOH ou HCl, antes do processo de autoclavagem a 121<sup>0</sup>C, 1 atm, por 20 minutos. Os experimentos foram conduzidos em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1<sup>0</sup>C e fotoperíodo de 16 horas de luz, com intensidade luminosa de 2500 lux.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro plântulas por parcela e 4 repetições, totalizando 16 plântulas por tratamento.

A avaliação dos experimentos foi efetivada três meses após a instalação, analisando-se as variáveis número de brotos, número de folhas, altura da plântula, número de raízes, comprimento médio do sistema radicular e peso da matéria fresca da plântula, utilizando o sistema SAS INSTITUTE (2003). Os dados foram analisados por meio de teste de regressão polinomial e exponencial.

O trabalho constou de quatro experimentos detalhados a seguir:

### **3. 1 Efeito de diferentes concentrações do meio Knudson e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.**

O meio de cultura utilizado foi o Knudson (Tabela 3A) nas concentrações 0%, 50%, 100%, 150% e 200% em relação à composição original. Combinou-se a essas concentrações, 0%, 50%, 100% e 200% das vitaminas do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (Tabela 2A) em relação à composição original, em todas as combinações possíveis, constituindo-se num fatorial 5X4.

### **3. 2 Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.**

Ao meio de cultura Knudson foram acrescidas as combinações 0; 0,5; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0; 0,01; 0,10 e 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA em todas as combinações possíveis, constituindo-se num fatorial 5X4.

### **3. 3 Efeito de diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.**

Ao meio de cultura Knudson foram acrescidas as concentrações 0; 0,5; 1; 1,5 e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0, 200, 400 e 600 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado em todas

as combinações possíveis, constituindo-se num fatorial de 5X4.

**3. 4 Efeito de diferentes concentrações de polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.**

Ao meio de cultura Knudson foram acrescentados 0, 25, 50, 75 e 100 g L<sup>-1</sup> de polpa madura de banana nanica liquidificada e 0%, 50%, 100% e 200% da concentração de vitaminas do meio MS em relação à composição original, em todas as combinações possíveis, constituindo um fatorial 5X4.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Efeito de diferentes concentrações do meio Knudson e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.

Na Tabela 1 pode-se observar que houve variação para número de brotos, número de folhas e comprimento médio do sistema radicular, tanto em relação às concentrações do meio Knudson como para as concentrações de vitaminas do meio MS, utilizadas no meio de cultura. Não houve interação significativa para o uso destes produtos. Para altura da plântula apenas as concentrações do meio Knudson promoveram efeito significativo, enquanto que em relação ao número de raízes, apenas o uso de diferentes concentrações de vitaminas do meio MS apresentou efeito significativo.

**TABELA 1** Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), altura da plântula (AP), número de raízes (NR), comprimento médio do sistema radicular (CMSR) e peso da matéria fresca da plântula (PMF) da orquídea *BC* “Pastoral” x *LC* “Amber Glow” cultivadas em diferentes concentrações do meio Knudson e vitaminas do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 2002.

Causas da variação	GL	Quadrados médios					
		NB	NF	AP	NR	CMSR	PMF
[ ] Knudson	4	1,18*	1,42*	4,32**	1,57	1,78**	0,0018
[ ] Vitamina	3	1,32*	4,72**	1,40	17,8**	2,93**	0,0032
K X V	12	0,53	0,51	1,12	1,43	0,54	0,0018
Resíduo	57	0,35	0,39	0,61	1,38	0,31	0,0062
CV (%)		32,7	14,9	24,5	27,4	22,9	8,3

\*\* Significativo a 1% de probabilidade \* Significativo a 5% de probabilidade  
[ ] Concentração

#### 4.1.1 Número de brotos

Observa-se na Figura 5(A) que o meio de cultura sem nutrientes pouco estimulou o número de brotos quando comparado com a concentração de 50% onde se obteve um máximo de 1,9 broto por explante cultivado.

O pequeno efeito no número de brotos promovido na ausência dos nutrientes do meio Knudson pode estar associado à contaminação do ágar com sais e resíduo de reguladores de crescimento, induzindo a morfogênese de brotos adventícios (Pierik, 1987) ou devido às reservas existentes no explante, suficientes para iniciar o processo de formação de brotos, ou ainda, esse processo já havia iniciado no momento da inoculação.

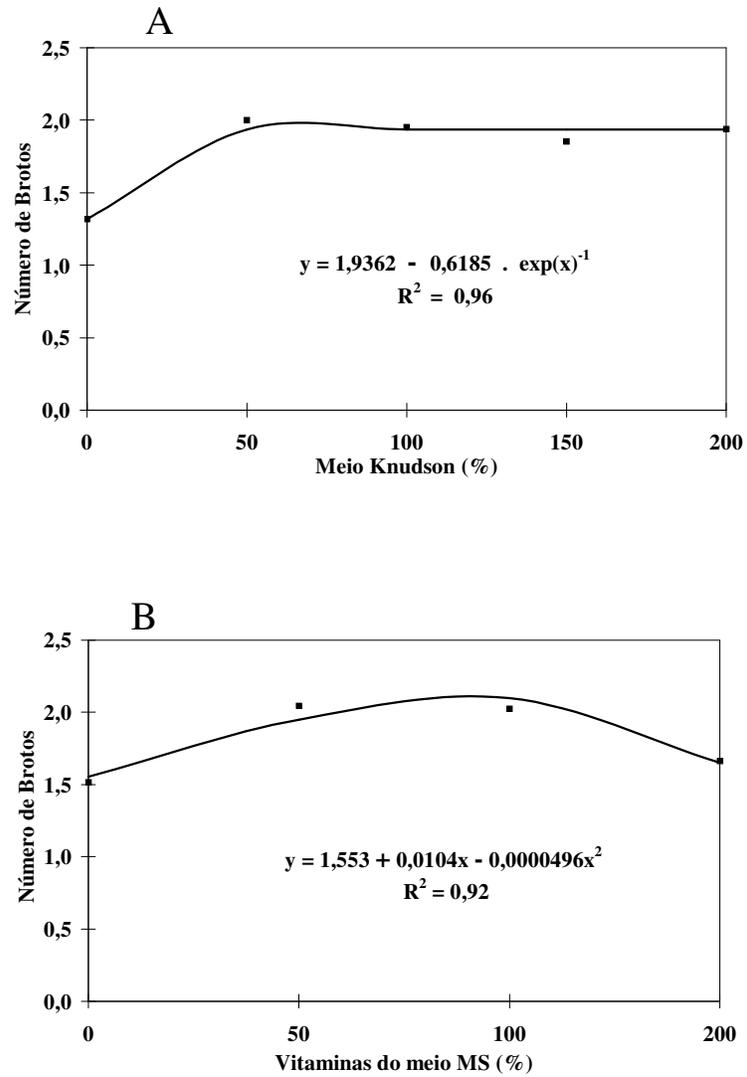
A quantidade de nutrientes do meio Knudson parece influenciar o número de brotos emitidos pelo explante da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow*, quando se aumenta a concentração até 50%, evidenciando a deficiência em nutrientes nas concentrações próximas a 0%, visto que o meio Knudson possui baixos teores em sais nutritivos, quando comparado com outros meios, como o MS (George, 1993).

Houve influência positiva na morfogênese quando se aumentou a concentração para 50% do meio Knudson (Pierik, 1987) nas brotações adventícias. Concentrações maiores que 50% não promoveram o número de brotos, havendo tendência de estabilização na média de 1,9 brotos, parecendo que o estímulo vai para o crescimento do explante ou para o alongamento do sistema radicular.

Na Figura 5(B) observa-se que a concentração de 104,8% de vitaminas do meio MS promoveu a melhor resposta para número de brotos, com média máxima de 2,1 brotos por explante. Concentrações superiores a 104,8% promoveram o crescimento do explante, função principal das vitaminas (George, 1993).

O incremento no número de brotos obtido com a adição das vitaminas

do meio MS foi pequeno, não sendo necessária sua utilização.



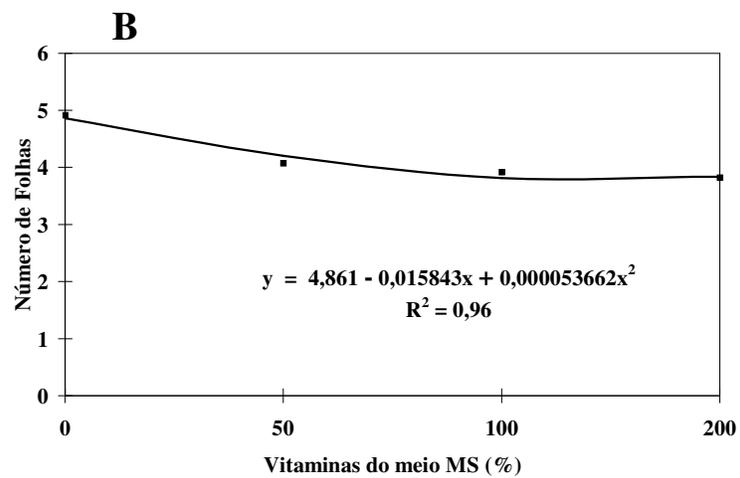
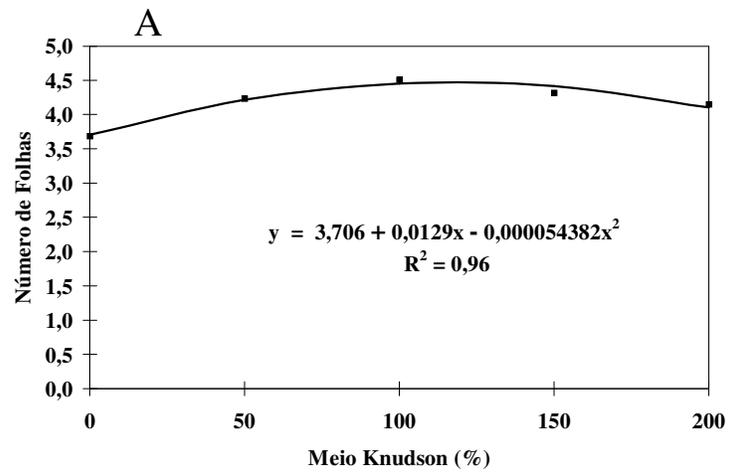
**FIGURA 5.** Efeito do meio Knudson (A), e de vitaminas do meio MS (B), no número de brotos em plântulas da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

#### **4.1.2 Número de folhas**

O número de folhas foi influenciado pelas concentrações do meio Knudson e vitaminas do meio MS de maneira diversa. Na Figura 6(A), pode-se observar que a quantidade de folhas aumenta gradativamente até o ponto de máxima (118,6%; 4,47) da concentração do meio Knudson, provavelmente pelo aumento da disponibilidade de nutrientes. Como o incremento não foi significativo para número de folhas, pode-se utilizar a concentração 100%.

A diminuição no número de folhas em concentrações acima da citada pode estar relacionada com o favorecimento do crescimento de folhas pré-existentes no explante em detrimento da morfogênese (George, 1993), o que pode ser constatado na Figura 3 com o efeito das concentrações do meio Knudson aumentando a altura da plântula gradativamente até a concentração de 129,5%.

Na Figura 6(B) observa-se que o aumento gradativo nas concentrações das vitaminas do meio MS reduziu a emissão de novas folhas. As vitaminas do meio MS influenciaram como catalisadores metabólicos no crescimento de órgãos, confirmando sua função de estimular o crescimento geral da plântula (George, 1993). Pode-se inferir que as vitaminas do meio MS não são necessárias seja para promover número de brotos ou para número de folhas.



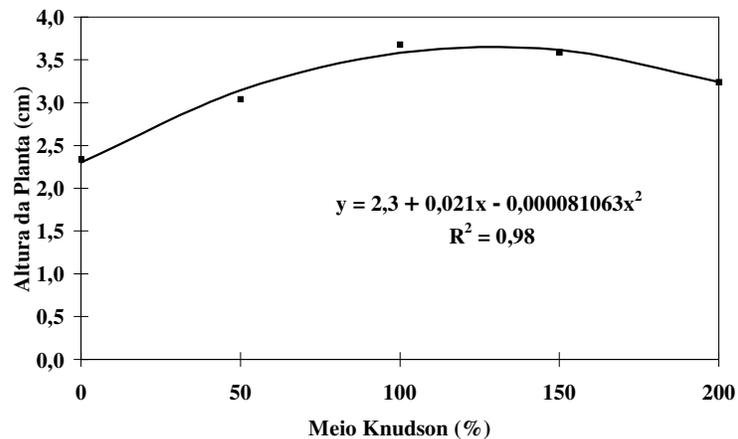
**FIGURA 6.** Efeito do meio Knudson (A), e de vitaminas do meio MS (B), no número de folhas em plântulas da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

#### 4.1.3 Altura da plântula

As proporções do meio Knudson influenciaram positivamente a altura da plântula até o ponto máximo (129,5 %; 3,7), uma influência direta do aumento no teor de nutrientes (Figura 7). Carlucci et al., (1980) afirmam que os gêneros *Cattleya* e *Laelia* são exigentes em zinco. O zinco desempenha importante função no metabolismo de crescimento da plântula.

Após atingir o valor máximo, a altura da plântula decresceu, provavelmente em função da elevação na concentração de nutrientes, causando fitotoxicidade.

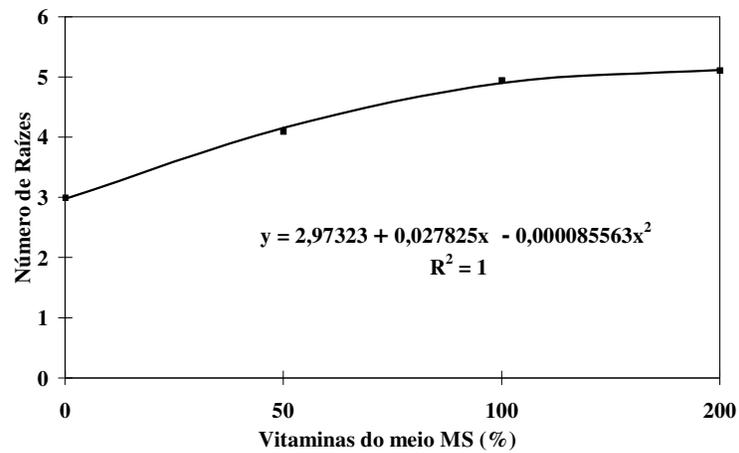
Uma característica marcante das orquídeas epífitas no estágio juvenil é a emissão de poucas raízes, se comparado com o sistema radicular fasciculado das monocotiledôneas terrestres e este fato pode ter agravado a absorção por difusão pela menor área de contato do sistema radicular da orquídea em estudo.



**FIGURA 7.** Efeito do meio Knudson, influenciando na altura de plântulas da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

#### 4.1.4 Número de raízes

À medida que se aumentou as concentrações de vitaminas do meio MS, maior quantidade de raízes foram formadas (Figura 8), aumentando a área de contato raiz/substrato, refletindo em maior absorção dos nutrientes. Desta forma, as vitaminas do meio MS contribuíram no aumento do número de raízes.



**FIGURA 8.** Efeito de vitaminas do meio MS, influenciando o número de raízes em plântulas da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

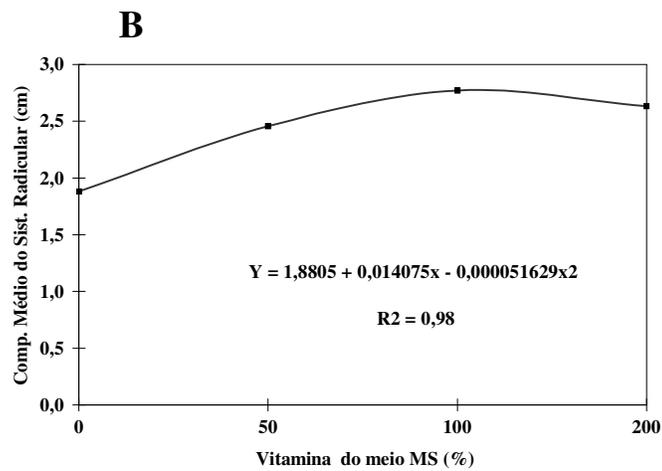
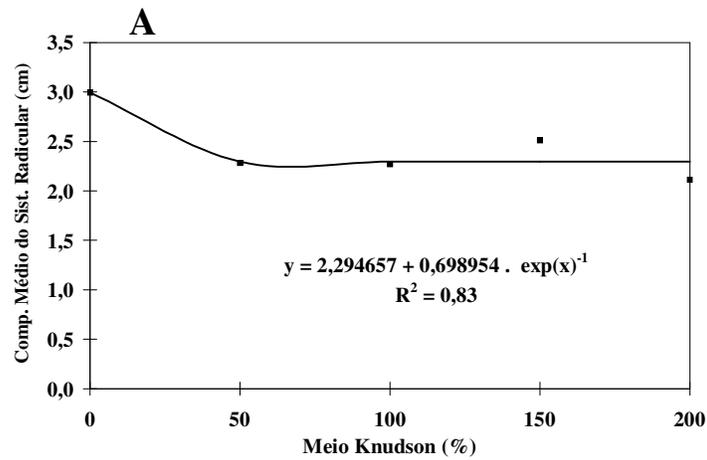
#### **4.1.5 Comprimento médio do sistema radicular**

Num substrato com deficiência de nutrientes, aumentar o comprimento das raízes é uma maneira da plântula buscar os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento mesmo que isto implique em gasto de reservas. Na Figura 9(A) observa-se que a ausência do meio Knudson influenciou o comprimento médio do sistema radicular desta maneira.

À medida que aumenta a concentração até próximo de 50%, diminuiu o comprimento médio do sistema radicular. À concentração de 50% do meio Knudson já se estabilizou um patamar de 2,3 cm para o comprimento médio do sistema radicular, parecendo não mais haver necessidade da busca por nutrientes no meio de cultura, sendo as reservas provavelmente direcionadas para o crescimento da parte aérea.

As concentrações de vitaminas do meio MS influenciaram de maneira positiva o crescimento de raízes, Figura 9(B), até o ponto de máxima (136,3%; 2,8).

Evidencia-se assim que, para promover o comprimento médio do sistema radicular, o meio Knudson é inibitório e as vitaminas do meio MS são benéficas.



**FIGURA 9.** Efeito do meio Knudson (A), e de vitaminas do meio MS (B), influenciando o comprimento médio do sistema radicular em plântulas da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

#### 4. 2 Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.

Dos reguladores de crescimento acrescentados ao meio Knudson, apenas ANA promoveu efeito significativo no número de brotos e número de raízes. O uso de BAP não promoveu nenhum efeito nas variáveis avaliadas.

Martini (2001), trabalhando com a orquídea *Gongora quinquenervis*, encontrou resultados similares, apresentando efeito inibitório na multiplicação de calos e no potencial organogênico atribuído ao BAP.

Barbosa et al. (1993), contrariamente, obtiveram bons resultados na taxa de multiplicação de gérbera.

Diferentes efeitos dos reguladores de crescimento podem ocorrer para diferentes espécies, inclusive variações entre cultivares dentro de uma mesma espécie (Malaure et al., 1991). Assim, para *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*, o uso de BAP não foi significativo.

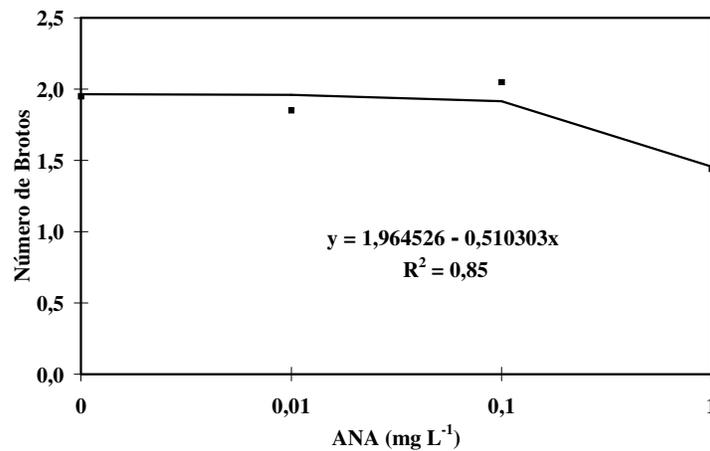
**TABELA 2** Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), altura da plântula (AP), número de raízes (NR), comprimento médio do sistema radicular (CMSR) e peso da matéria fresca da plântula (PMF) da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow* cultivadas em diferentes concentrações de BAP e ANA. UFLA, Lavras/MG, 2002.

Causas da Variação	G L	Quadrados médios					
		NB	NF	AP	NR	CMSR	PMF
BAP	4	0,36	0,01	0,023	0,420	0,27	0,00004
ANA	3	1,32 *	0,13	0,155	3,03 *	0,08	0,0005
BAPxANA	12	0,18	0,087	0,18	0,71	0,24	0,0004
Resíduo	57	0,36	0,24	0,260	0,974	0,21	0,0005
CV (%)		32,8	11,4	14,9	21,2	18,9	4,8

\* Significativo a 5% de probabilidade

#### 4.2.1 Número de brotos

Crescentes níveis de ANA inibem a formação de brotos (Figura 10), concordando com Hu & Wang (1983), de que as auxinas externas não promovem proliferação de brotos. Oliveira (1994), trabalhando com crisântemo, também observaram que ocorrem brotações mesmo na ausência dos reguladores de crescimento e afirmam que a indução de brotações está relacionada com a alteração da relação hormonal induzida por concentrações de reguladores de crescimento adicionados ao meio. No presente experimento, essa alteração foi inibitória para número de brotos, não havendo necessidade da incorporação de ANA como estímulo a brotações laterais.



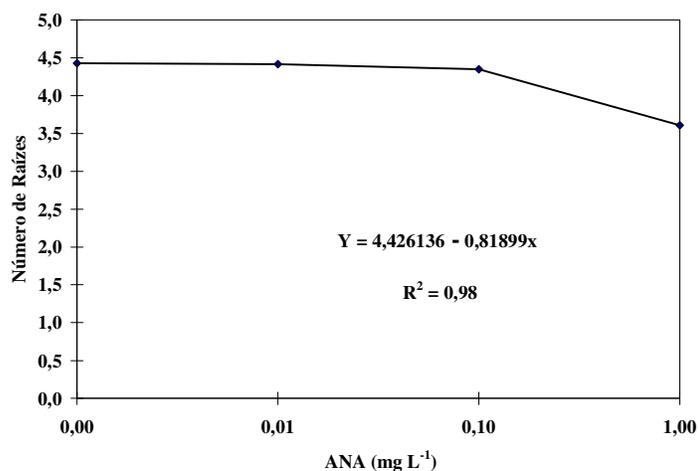
**FIGURA 10.** Efeito de ANA no número de brotos em plântulas da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

#### 4.2.2 Número de raízes

Crescentes concentrações de ANA também inibiram a formação de raízes (Figura 11). Peres et al., (1999), estudando o efeito de ANA em orquídea, concluíram também que a formação de raízes e brotos é mais favorecida pelo balanço interno de ácido indolacético/citocinina e efeito externo citocinina/etileno. Para Pasqual & Hoshika (1992), o enraizamento de cactos é mais freqüente na ausência de BAP, independente da concentração de ANA em *Mammillaria bocassana* L. e com tendência a redução em concentrações mais elevadas de ANA em *Gimnocalicium buldiamur* L. Observa-se que nessa segunda espécie, o efeito de ANA no enraizamento foi similar ao de plântulas de orquídea, fato verificado no presente trabalho.

O efeito ora inibitório, ora estimulante dos fitorreguladores na formação de brotos e raízes pode estar associado a absorção de reguladores de crescimento pelo substrato (George, 1993); à habituação (Santana & Paiva, 2001) ou à deficiência de proteína ligante promotora da atuação de citocininas (Taiz & Zeiger, 1998).

Com esses resultados se pode concluir que o estágio de subcultivo de plântulas da orquídea *Brassiocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow não necessita da participação de BAP e ANA como estímulo ao desenvolvimento geral.



**FIGURA 11. Efeito de ANA no número de raízes em plântulas da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.**

**4. 3 Efeito de diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea *Brassiocattleya Pastoral x Laeliocattleya Amber Glow*.**

As concentrações de BAP suplementadas ao meio Knudson não influenciaram qualquer variável das estudadas (Tabela 3). Para as concentrações de carvão ativado houve efeito significativo no número de brotos, número de folhas e no peso da matéria fresca da plântula.

Com esses resultados pode-se concluir que o estágio de subcultivo de plântulas da orquídea *Brassiocattleya Pastoral x Laeliocattleya Amber Glow* não necessita da participação de BAP como estímulo ao desenvolvimento geral do explante.

**TABELA 3** Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), altura da planta (AP), número de raízes (NR), comprimento médio do sistema radicular (CMSR) e peso da matéria fresca da plântula (PMF) da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow* cultivadas em diferentes concentrações de BAP e Carvão ativado (CA). UFLA, Lavras/MG, 2002.

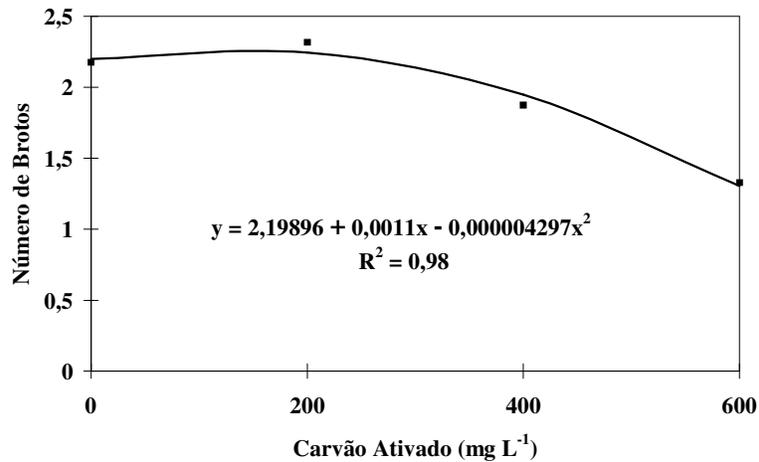
Causas da Variação	G L	Quadrados médios					
		NB	NF	AP	NR	CMSR	PMF
BAP	4	0,96	1,61	0,56	0,21	0,56	0,065
CA	3	3,13**	2,59*	1,64	0,42	0,79	0,157*
BAP X CA	12	0,70	0,35	0,22	0,21	0,43	0,026
Resíduo	57	0,52	0,76	0,65	0,51	1,36	0,050
CV (%)		37,5	32,5	40,3	39,1	51,3	50,8

\*\* Significativo 1% de probabilidade \* Significativo 5% de probabilidade

#### 4.3.1 Número de brotos.

As concentrações de carvão ativado promoveram influência positiva para número de brotos até a concentração de 137,5 mg L<sup>-1</sup> (Figura 12). Esta influência benéfica pode ser explicada pela provável adsorção de substâncias tóxicas produzidas durante a autoclavagem ou pelos tecidos da plântula durante o cultivo (George, 1993). Concentrações acima de 137,5 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado passaram a inibir a formação de brotos, provavelmente porque além de adsorver substâncias tóxicas, passaram a adsorver os nutrientes do meio de cultura, como citado por George (1993).

Pode-se concluir que, quando se objetiva aumentar o número de brotos no cultivo *in vitro*, não se deve utilizar concentrações superiores a 137,5 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado no meio de cultura.

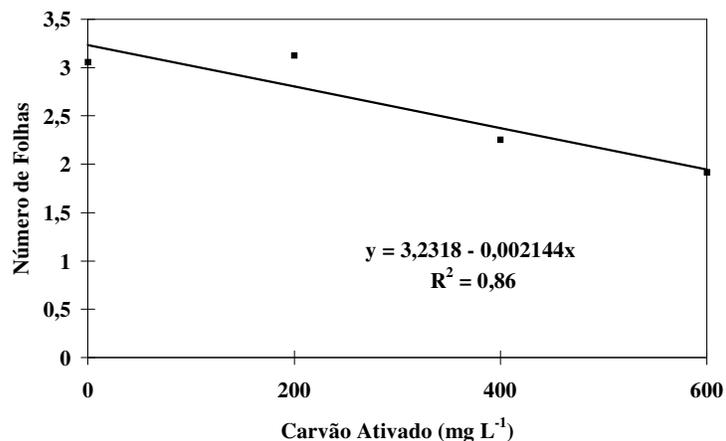


**FIGURA 12.** Efeito de carvão no número de brotos em plântulas da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

#### 4.3.2 Número de folhas

Crescentes concentrações de carvão ativado incorporado ao meio Knudson influenciaram negativamente a morfogênese de folhas (Figura 13).

A associação do uso de meio sólido, que inibe a difusão de fósforo, potássio e zinco, combinada com concentrações mais elevadas de carvão ativado, podem ter inibido a formação de folhas por carência desses elementos que são requeridos na formação de órgãos.



**FIGURA 13. Efeito de carvão no número de folhas em plântulas da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.**

#### 4.3.3 Peso da matéria fresca da plântula

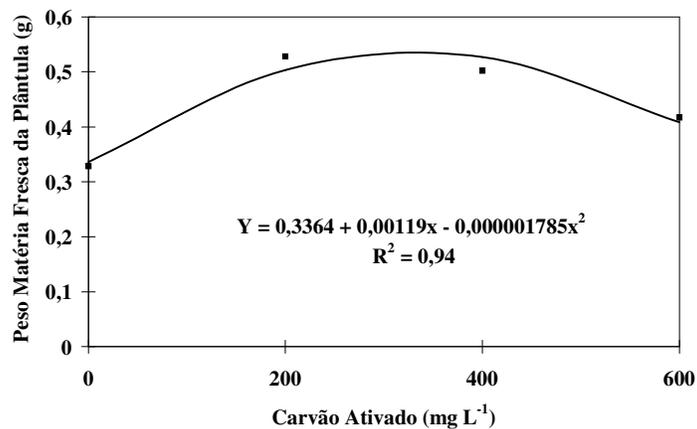
Na concentração de 333,33 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado suplementado ao meio Knudson, obteve-se o máximo de resposta para peso da matéria fresca da plântula (Figura 14). Mohamed-Yasseen (2001), trabalhando com sementes de milho, obteve resultados semelhantes, atribuindo o efeito benéfico do carvão ativado à adsorção do ácido giberélico (GA<sub>4</sub>), fato que ajuda a explicar porque o carvão ativado pode inibir o efeito negativo de substâncias tóxicas produzidas pela própria plântula ou por resultado da autoclavagem.

Concentrações maiores que 333,33 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado passaram a inibir o ganho de peso. Arditti & Ernst (1993) e George (1993) também citam o lado negativo da incorporação do carvão ativado ao meio de cultivo que é a remoção de nutrientes orgânicos, hormônios e inibição do crescimento e da morfogenia.

A influência negativa observada para número de folhas no item anterior,

pode ter sido compensada com maior estímulo ao crescimento das folhas pré-existentes ou sistema radicular, verificada pelo ganho de peso da matéria fresca das plântulas.

Como o peso da matéria fresca da plântula é uma referência de vigor, poderia-se estabelecer o valor máximo de resposta  $333,33 \text{ mg L}^{-1}$  como o melhor a ser incorporado ao meio. Entretanto, como número de brotos e peso fresco da plântula são variáveis diretamente afetadas pelas concentrações de carvão ativado, quando se desejar maior número de brotos no estágio de subcultivo, a concentração recomendada é  $137,5 \text{ mg L}^{-1}$ , que também beneficia o número de folhas.



**FIGURA 14.** Efeito de carvão ativado no peso da matéria fresca de plântulas da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

**4. 4 Efeito de diferentes concentrações de polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.**

Os resultados da análise de variância para concentrações de polpa de banana e vitaminas do meio MS estão descritos na Tabela 4. Pode-se observar que as concentrações de polpa de banana promoveram efeito significativo para número de brotos, comprimento médio do sistema radicular e peso da matéria fresca da plântula.

Não houve efeito significativo nas variáveis avaliadas para as concentrações de vitamina do meio MS como suplemento ao meio Knudson. É provável que os altos teores em nutrientes, aminoácidos, vitaminas e reguladores de crescimento naturalmente existentes na polpa de banana tenham inibido o possível efeito significativo que as vitaminas do meio MS pudessem promover.

**TABELA 4.** Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), altura da plântula (AP), número de raízes (NR), comprimento médio do sistema radicular (CMSR) e peso da matéria fresca da plântula (PMF) da orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow* cultivada em diferentes concentrações de polpa de banana e vitaminas do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 2002.

Causas da Variação	G L	Quadrados médios					
		NB	NF	AP	NR	CMSR	PMF
Polpa Banana	4	1,13**	0,03	0,32	0,37	7,53**	1,19**
Vitamina	3	0,24	0,004	0,70	0,03	1,01	0,13
PB X V	12	0,37	0,03	0,17	0,02	0,83	0,13
Resíduo	29	0,25	0,28	0,82	1,64	1,12	0,10
CV (%)		30,7	17,3	28,6	40,1	25,0	35,3

\*\* Significativo a 1% de probabilidade

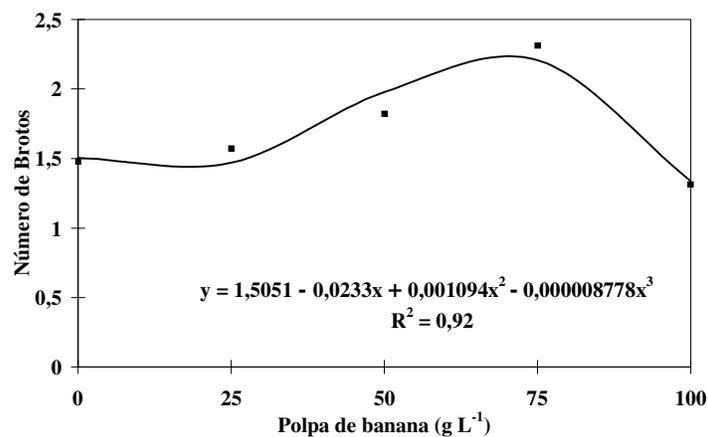
#### 4.4.1 Número de brotos

As concentrações de polpa de banana incorporadas ao meio Knudson influenciaram o desenvolvimento da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* de maneira significativa. Observa-se na Figura 15 que para número de brotos, o ponto de máxima ocorreu no valor  $75 \text{ g L}^{-1}$  de polpa de banana, sendo esta a concentração mais indicada para aumentar o número de brotos adventícios.

Esse efeito benéfico, provavelmente foi devido à composição da polpa de banana, variável em aminoácidos, vitaminas e reguladores de crescimento. Arditti e Ernst (1993) confirmaram que a adição de polpa de banana aumenta o número de brotos no cultivo de plântula de orquídea *in vitro*. Torres et al., (2001) afirmam que adição de polpa de banana promove diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, tais como espessamento do sistema radicular, desenvolvimento da parte aérea, emissão de brotos adventícios.

Para concentrações de polpa de banana até  $75 \text{ g L}^{-1}$ , o número de brotos aumentou de 1,4 para 2,2 por explante, sendo este o intervalo em que se obteve o maior ganho para número de brotos, provavelmente porque as concentrações de reguladores de crescimento existentes na composição da polpa de banana não foram suficientes para desequilibrar a relação auxina/citocinina endógena programada ou habituada para formar brotos. Após o ponto de máxima ( $70,5 \text{ g L}^{-1}$ ; 2,2 brotos por explante), os teores existentes na polpa de banana desequilibraram essa relação, passando a estimular o crescimento geral da plântula e inibindo a formação de brotos.

George (1993) sugere que a adição de compostos orgânicos complexos como polpa de banana pode suplementar o teor de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento do meio de cultura.

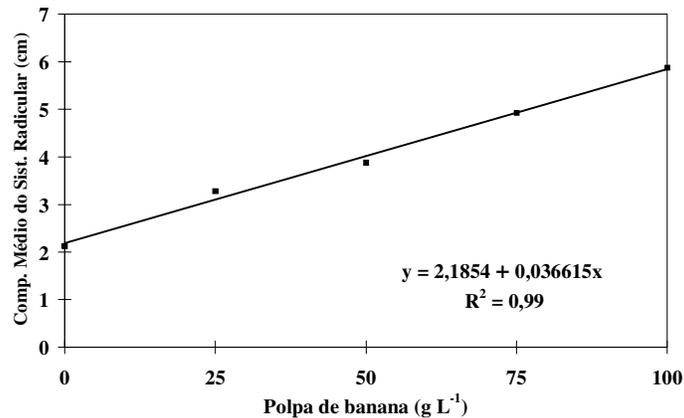


**FIGURA 15.** Efeito de polpa de banana no número de brotos em plântulas da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

#### 4.4.2 Comprimento médio do sistema radicular

Um aumento na concentração de polpa de banana correspondeu a um aumento no comprimento médio do sistema radicular (Figura 16). Como a relação foi direta, pode-se inferir que o efeito estimulante da polpa de banana no crescimento das raízes continuaria para concentrações superiores a 100 g.L<sup>-1</sup>.

Torres et al., (2001) citam que a polpa de banana pode promover diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, tais como espessamento e/ou crescimento das raízes, dependendo da cultivar e da quantidade de polpa utilizada.

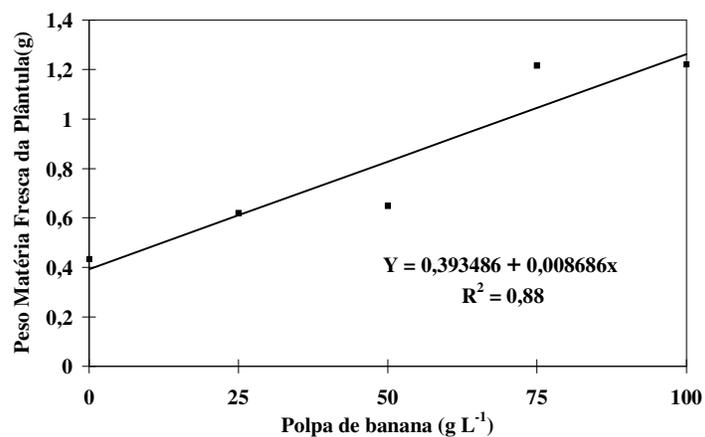


**FIGURA 16.** Efeito de polpa de banana no comprimento médio do sistema radicular em plântulas da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

#### 4.4.3 Peso da matéria fresca da plântula

As concentrações de polpa de banana incorporadas ao meio Knudson influenciaram significativamente o peso da matéria fresca da plântula (Figura 17), principalmente por aumento no comprimento médio do sistema radicular. É provável que em concentrações superiores ao intervalo estudado, o crescimento da parte aérea da plântula fosse mais bem estimulada.

George (1993) afirma que a polpa de banana pode suplementar o teor de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento ao meio de cultura, promovendo o aumento do peso da matéria fresca da plântula.



**FIGURA 17.** Concentrações de polpa de banana suplementadas ao meio Knudson, influenciando o peso da matéria fresca da plântula de orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow*. UFLA, Lavras/MG, 2002.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio de cultura para o estágio de subcultivo da orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* poderia ser composto de polpa de banana em concentrações superiores às estudadas acrescidas de carvão ativado na concentração de 200mg L<sup>-1</sup> ou até mesmo a polpa pura de banana e carvão ativado na concentração de 200mg L<sup>-1</sup>, sem incorporação de ágar, se objetivo principal não for formação de brotos. Segundo Pasqual et al., 1997, o meio de cultura deve ser selecionado em função da espécie, tipo de cultivo e estágio cultural.

Para estudar as comparações de meios alternativos com o meio que lhe deu origem, citada por Pasqual et al., (1997), para o estágio de subcultivo de *BC Pastoral x LC Amber Glow*, pode-se sugerir novas pesquisas testando Knudson suplementado com polpa de banana e vitaminas do meio MS; Vacin-Went suplementado com polpa de banana, todos com acréscimo de carvão ativado.

## 6 CONCLUSÕES

O meio Knudson na concentração de 129% suplementado com vitaminas do meio MS na concentração de 104,8% promove o crescimento geral da plântula.

Não há necessidade da adição de BAP e ANA no meio de cultura.

A adição de carvão ativado inibe a formação de folhas.

A polpa de banana na concentração de  $75\text{g L}^{-1}$  combinada com carvão ativado na concentração de  $200\text{mg L}^{-1}$  promoveu a formação de maior número de brotos, maior comprimento médio do sistema radicular e maior peso da matéria fresca da plântula.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. (Eds.). **Como cultivar orquídeas**. Rio de Janeiro: Três Livros e Fascículos, 1983. 34 p.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley, 1993. 682 p.
- ARRUDA, S. T.; OLIVETTE, M. P. de A.; CASTRO, C. E. F. **Diagnóstico da floricultura no Estado de São Paulo**. Instituto de Economia Agrícola. 1996. 24 p.
- ASSIS, M. de.; PAIVA, M.; ARMANI, O. C. Micropropagação de plantas: histórico de uma empresa comercial. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 124-126, maio/jun. 2000.
- BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; BARROS, I. Efeitos da benzilaminopurina e ácido indole-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus Ex. Hook cv. Appelbloesem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 15-19, jan. 1993.
- BICALHO, H. D. Aspectos ornamentais e taxionômicos das orquídeas do gênero *Cattleya* no continente Sul-Americano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1. 1980, Campinas. **Anais...** Campinas, 1980. p. 19.
- BLAKESLEY, D.; CONSTANTINE, D. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot culture of a range of species. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 28, n. 2, p. 183-186, Feb. 1992.
- 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-SPI/CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.
- CAMPOS, D. M. **Orquídeas: manual prático de reprodução**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2000. 128 p.
- CARLUCCI, M. V.; HAAG, H. P.; BELLOTE, A. F. J. Composição química e extração de nutrientes por cinco espécies de *Orchidaceae*. **O Solo**, Piracicaba, v. 72, n. 1, p. 27-34, jan./jun. 1980.

CID, L. P. B. (Ed.) **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180 p.

DEBERGH, P. *In vitro* culture of ornamentals. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Eds.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 593 p.

DEMATÊ, M. E. S. P. **Orquídeas**: Depoimento [199-]. São Paulo, [199-]. 1 Fita cassete (120min). 3 <sup>3</sup>/<sub>4</sub> pps, estéreo. Entrevista concedida ao Programa Estúdio Rural, Canal Rural.

DUNSTERVILLE, G. C. K. **El mundo de las orquídeas**. Caracas, Venezuela: Editorial Lectura, 1962. 104 p.

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. Chicago: William Benton, 1959. v. 5, p. 53.

ENGLERT, S. I. **Orquídeas e bromélias**: manual prático de cultivo. Guaíba: Agropecuária, 2000. 96 p.

FONTES, R. R. Apresentação. In: TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

GAMBORG, O. L. Plant cell culture: Nutrition and media. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants** – laboratory procedures and their applications. Orlando: Academic Press, 1984. v. 1, p. 18-26.

GEORGE, E. F. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture. Part 1.** – The technology. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.

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

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**: handbook and directory of commercial laboratories. British Library, Great Britain, 1984. 709 p.

GORSKI M. C. B. (Consultoria). **Manual Globo de jardinagem**: conheça melhor suas plantas. São Paulo: Editora Globo, 1991. 64p.

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

HALL, R. D. (Ed.). **Plant cell culture protocols**. Totowa, NJ, 1999. 421 p.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: CID, L. P. B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180 p.

HOEHNE F. C. **Flora brasileira: orchidaceas**. Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, 1942. v. 12. 408p.

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

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

JACOBSEN, H. J. Biochemical mechanisms of plant hormone activity. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture: Technique for propagation and breeding**. New York: Macmillan Publishing Company, 1983. v. 1, p. 672-695.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 4. ed. São Paulo: Nacional, 1977. 730 p.

KÄMPF, A. N. (Coord.). **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2000. 254 p.

LARSON, T. J. Orchids. In: LARSON, R. A. (Ed.). **Introduction to floriculture**. 2. ed. New York: Academic Press, 1992. p. 113-142.

LAVATO, P. E.; TROUVELOT, A.; PEARSON, V. G.; GIANINAZZI, S. Micorrização de plantas micropropagadas. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras-MG: UFLA/DCS/DCF, 1996. p. 175-178.

LINSMAIER-BEDNAR, E. M.; SKOOG, F. Thiamine requirement in relation to cytokinin in "normal" and "mutant" strains of tobacco callus. **Planta**, Berlin, v. 72, n. 2, p. 146-154, 1967.

MALAURE, R. S.; BARCLAY, G.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. The production of novel plants from florets of *Crhysanthemum 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. 08-13, Nov. 1991.

MARTINI, P. C. Propagação de *Gongora quinquenervis* via sementeira *in vitro* e organogênese indireta. **Revista ABCTP**, Recife, n. 40, p. 8, ago. 2001.

MATSUNAGA, M. Potencial da floricultura brasileira. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 9, p. 56, set. 1995.

MATSUNAGA, M. A indústria da flor no Mundo e o comércio internacional do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1997.

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

MOK, M. C.; MARTIN, R. C.; MOK, D. W. S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Largo, v. 36, n. 2, p. 102-107, Mar./Apr. 2000.

MOTOS, J. R. Manejo de doenças fúngicas em plantas ornamentais. **Correio Agrícola**, São Paulo, v. 1, p. 24-27, jan./jun. 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MURTHY, H. N.; PYATI, A. N. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (*Orchidaceae*). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Largo, v. 37, n. 2, p. 223-226, Mar./Apr. 2001.

NORTHEN, R. T. **Home orchid growing**. New York: Simon & Schuster, 1990. 376 p.

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

PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de cactos *Gymnocalycium buldiamur* L. e *Mammillaria bocassana* 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.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Introdução - Fundamentos básicos. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 1998. 159 p.

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

PERES, L. E. P.; AMAR, S.; KERBAUY, G. B.; SALATINO, A.; ZAFFARI, G. R.; MERCIER, H. Effects of auxin cytokinin ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to cytokinins ratio related to direct root tip conversion of *catasetum fimbriatum* Lind (*Orchidaceae*) into buds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 155, n. 4/5, p. 551-555, Oct. 1999.

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

RAPOSO, J. G. **A etimologia a serviço dos orquidófilos**. São Paulo: Editora Ave-Maria, [199-]. 166 p.

ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.) **Cultura de tejidos en la agricultura**. Cali: CIAT, 1991. 970 p.

SÁ, M. E. L.; CANÇADO, G. M. A.; SOUZA, C. M. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 116-123, maio/jun. 2000.

SAGAWA, Y.; KUNISAKI, J. T. Vegetative propagation of floriculture crops. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; BAJAJ, Y. P. S. (Eds.). **Handbook of plant cell culture: ornamental species**, 1990. v. 5, cap. 3, p. 25-26.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R. Habituação. **Revista ABCTP Notícias**, Recife, n. 41, p. 4-10, ago. 2001.

SAS INSTITUTE. **User's guide version 8.1**. Cary, 2003.

SHEEHAN, T. J. orchids. In: LARSON, R. A. **introduction to floriculture**. 2. ed. North Carolina-USA: Academic Press, 1992. p. 113-142.

SHEEHAN, T.; SHEEHAN, M. **An illustrated survey of orchid genera**  
Cambridge-USA: Cambridge University Press, 1994. 421 p

SINGH, F. Micropropagation of orchids: *Spathoglottis plicata* and *Epidendrum radicans*. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. 20. London: Springer-Verlag, 1992. p. 223-245.

SUTTLEWORTH, F. S. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1997. 158 p.

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

THORPE, T. A.; PATEL, K. R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants** – laboratory procedures and their applications. Orlando: Academic Press, 1984. v. 1, p. 49-60.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R. Condições de incubação para cultura *in vitro*. **Revista ABCTP Notícias**, Recife, p. 1-7, 2001.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPH, 2001. (EMBRAPA-CNPH. Circular Técnica). 20p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília,,: EMBRAPA-SPI-CNPH, 1998. v. 1, 509 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília,,: EMBRAPA-SPI-CNPH, 1999. v. 2, 354 p.

TORRES, K. C. **Tissue culture techniques for horticultural crops**. New York: Chapman & Hall, 1988. 285 p.

VANIQUE M. M.; COELHO, S. J. **Cultivo de orquídeas**. Lavras, MG: UFLA, 1996. Boletim Técnico. Série Extensão; Ano 5, n. 12.

VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Eds.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 593 p.

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

WATANABE, D. **Orquídeas: manual de cultivo**. São Paulo: AOSP, 2002. 296p.

ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. Action of growth regulators. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Tissue culture in forestry**. 2. ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p. 231-255.

## ANEXOS

<b>ANEXO A</b>	<b>Página</b>
Tabela 1A - Relação dos gêneros de orquídea mais popularmente conhecidos e sua ocorrência natural.....	58
Tabela 2A - Meio MS-Murashige & Skoog (1962).....	59
Tabela 3A - Meio Knudson(1946) modificado.....	60

<b>ANEXO B</b>	<b>Página</b>
Quadro 1A - Árvore genealógica da <i>Brassiocattleya</i> Pastoral.....	61
Quadro 2A - Árvore genealógica da <i>Laeliocattleya</i> Amber Glow.....	62

**TABELA 1A - Relação dos gêneros de orquídeas mais popularmente conhecidos e sua ocorrência natural.**

<b>Gênero</b>	<b>Ocorrência natural</b>
<i>Brifrenaria</i>	<b>Brasil</b> e Peru
<i>Brassavola</i>	<b>Brasil</b> e América Central
<i>Catasetum</i>	<b>Brasil</b> , Guiana Inglesa, Venezuela, Peru, Colômbia, e América Central.
<i>Cattleya</i>	México, América Central e do Sul
<i>Cymbidium</i>	Burma, Malásia, Himalaia, Índia, Mandagascar, Áustria, Japão
<i>Cyrtopodium</i>	<b>Brasil</b> e Paraguai
<i>Dendrobium</i>	Japão, China, Indochina, Índia, Austrália, Filipinas, Ceilão, Nova Guiné, Sumatra, Burma e Malásia
<i>Epidendrum</i>	<b>Brasil</b> , Equador, Colômbia, Venezuela, Trindade, América Central e México
<i>Gomesa</i>	<b>Brasil</b>
<i>Grobya</i>	<b>Brasil</b>
<i>Laelia</i>	América do Sul, América Central e México
<i>Maxilaria</i>	<b>Brasil</b> , Peru, Equador, Colômbia e América Central
<i>Miltônia</i>	<b>Brasil</b> , Colômbia, e Costa Rica
<i>Octomeria</i>	<b>Brasil</b> e América Central
<i>Oncidium</i>	<b>Brasil</b> , Uruguai, Peru, Equador, Venezuela, Colômbia, América Central e México
<i>Paphiopedilum</i>	Malásia e Ilhas Filipinas
<i>Pleurothallis</i>	<b>Brasil</b> , Colômbia, Venezuela e México
<i>Rodriguesia</i>	<b>Brasil</b> e Trindade
<i>Scuticaria</i>	<b>Brasil</b> e Guiana
<i>Sobralia</i>	<b>Brasil</b> , Guiana, Colômbia, América Central e México
<i>Sophranitis</i>	<b>Brasil</b>
<i>Stelis</i>	<b>Brasil</b> e Jamaica
<i>Vanda</i>	Índia, Burma, Java, Malásia, Filipinas e Indonésia
<i>Vanilla</i>	<b>Brasil</b> , Guianas, Venezuela, América Central, México e Estados Unidos
<i>Zygopetalum</i>	<b>Brasil</b> , Equador, Colômbia, Venezuela e América Central

**Fonte:** Paula e Silva, 2001.

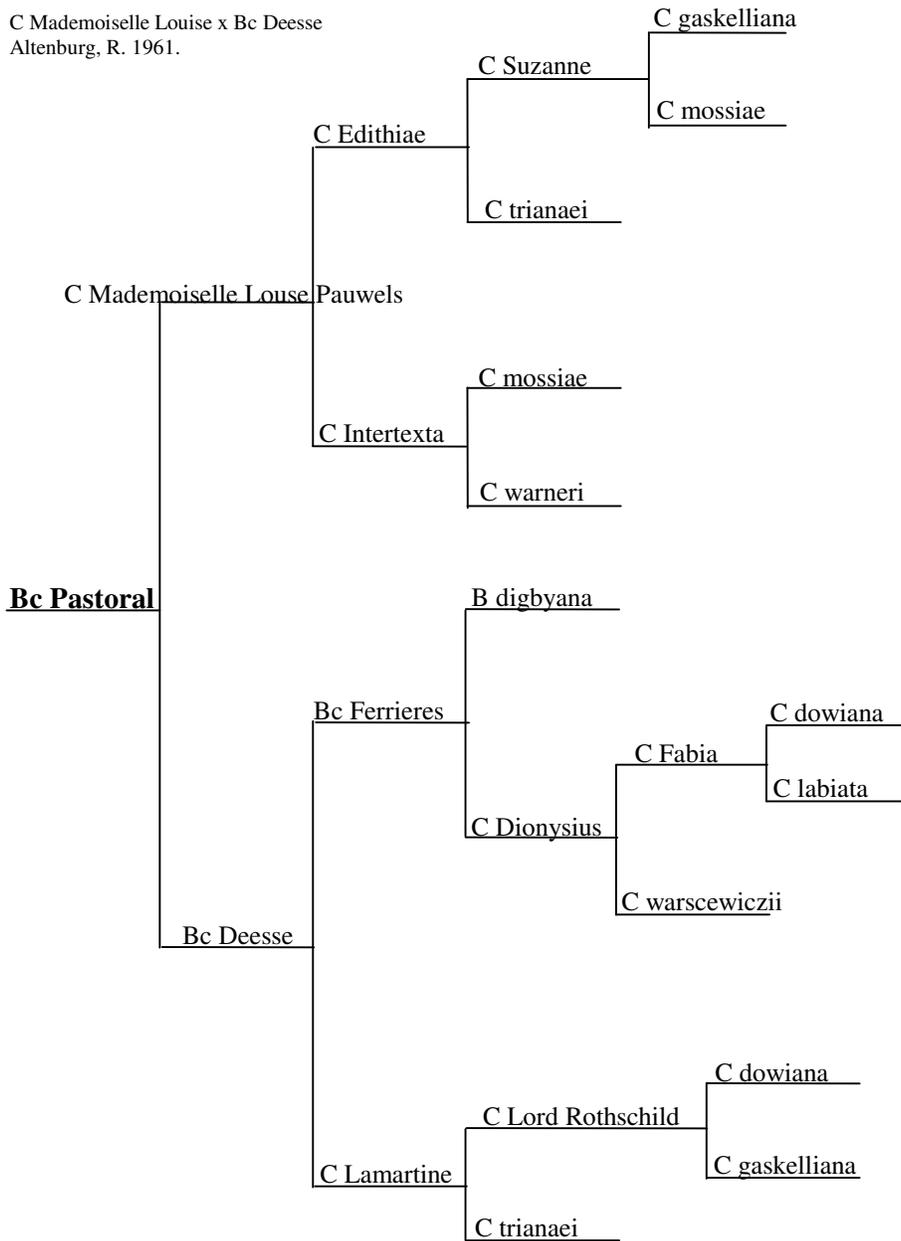
**TABELA 2 A - Meio MS (Murashige & Skoog, 1962).**

<b>Componentes</b>	<b>Concentrações (mmol. L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6
KNO <sub>3</sub>	18,8
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	3,0
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
<b>Micronutrientes</b>	
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0,10
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,030
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,10
KI	0,005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,001
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,0001
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,0001
<b>FeEDTA</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	0,10
<b>Aminoácido</b>	
Glicina	0,0266
<b>Vitaminas</b>	
Ácido nicotínico	0,0040
Piridoxina (HCl)	0,0024
Tiamina (HCl)	0,0003
Mio-inositol	0,55
<b>Açúcar</b>	
Sacarose	87,60

**TABELA 3 A - Meio Knudson (1946) modificado -UFLA/MG (2003).**

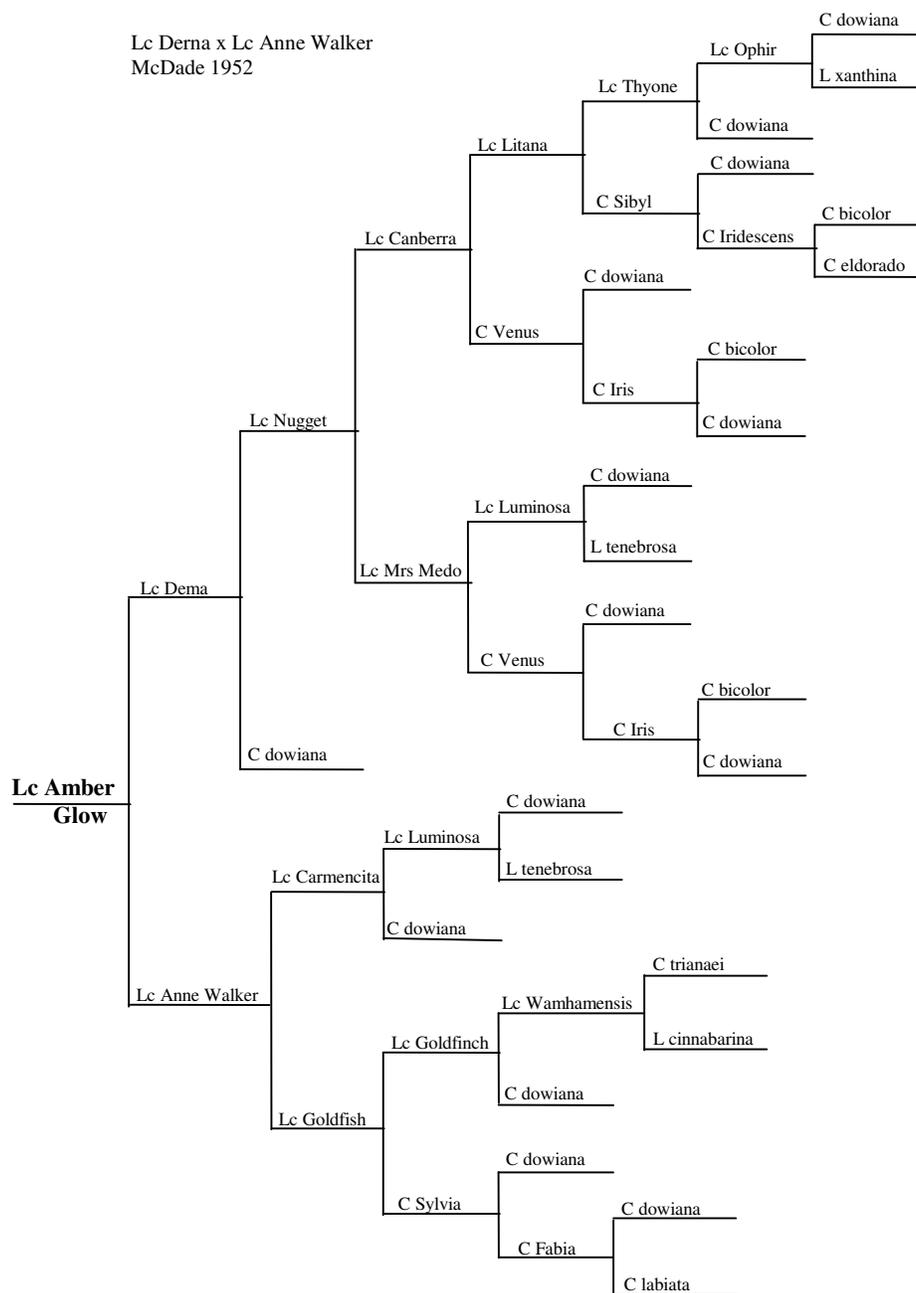
<b>Componentes</b>	<b>Concentração Final (mg. L<sup>-1</sup>)</b>
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	1000,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250,00
Mg SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	250,00
Mn SO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	7,5
Fé SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	25,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,056
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,016
Cu SO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,040
Zn SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,331
Sacarose (2%)	20000,00
Carvão ativado (0,2%)	2000,00
Ágar (0,6%)	6000,00
pH 5,7 ± 1	-

**QUADRO 1 A- Árvore genealogia da *Brassiocattleya* Pastoral**



Modificado de Wildcatt Orchids Database, 2003.

**QUADRO 2 A- Árvore Genealógica da *Laeliocattleya* Amber Glow**



Modificado de Wildcatt Orchids Database, 2003.