

**ADEQUAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA  
CRESCIMENTO *in vitro* DE ORQUÍDEAS DO  
GÊNERO *Cattleya***

**LÍLIAN DE SOUSA RIBEIRO**

**2005**

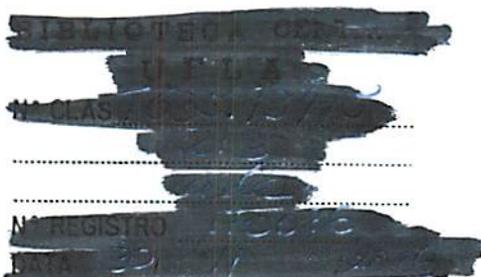
LÍLIAN DE SOUSA RIBEIRO

ADEQUAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO *in vitro*  
DE ORQUÍDEAS DO GÊNERO *Cattleya*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Doutora”.

Orientador:

Prof. Dr. Moacir Pasqual



LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

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

Ribeiro, Lilian de Sousa

Adequação de meio de cultura para crescimento *in vitro* de orquídeas do gênero *Cattleya* / Lilian de Sousa Ribeiro. – Lavras : UFLA, 2005.

59 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual

Tese (Doutorado) – UFLA

Bibliografia

1. Orquídea. 2. Meio de cultura. 3. Micropropagação. 4. Regulador de crescimento. 5. Adubação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.93415



**LÍLIAN DE SOUSA RIBEIRO**

**ADEQUAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO *in vitro*  
DE ORQUÍDEAS DO GÊNERO *Cattleya***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Doutora”.

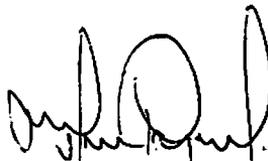
APROVADA em 02 de agosto de 2005.

Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra - EMBRAPA/CNPF

Pesq. Dr. Paulo César Magalhães - EMBRAPA/CNPMS

Profa. Dra. Maria Aparecida Moreira – FESURV

Profa. Dra. Janice Guedes de Carvalho - UFLA



Prof. Moacir Pasqual  
UFLA  
(Orientador)

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Moacir Pasqual, por acreditar em minha capacidade de trabalho, pela orientação e pelas oportunidades oferecidas durante o curso.

A todos os professores da UFLA que contribuíram para a minha formação, estendo meus agradecimentos.

Quero também dedicar este mergulho no amor a todos aqueles que amam: meus pais, meus filhos, minhas irmãs, meus sobrinhos e a mim.

Dedico, em particular, a duas pessoas especiais que cultivei em silêncio, como modelos de vida. Minha avó e a uma pessoa inolvidável que amo sem limites e que ao seu lado vivi um verdadeiro e único amor.

Para minha amiga Andreisa Aparecida Selvati, companheira na aprendizagem dos caminhos do amor.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 Introdução .....	1
2 Referencial Teórico .....	4
2.1 Aspectos gerais da cultura .....	4
2.2 Micropropagação de orquídeas .....	6
2.3 Meios de cultura .....	7
2.3.1 Boro .....	9
2.3.2 Manganês .....	10
2.3.3 Zinco .....	12
2.3.4 Suplemento orgânico ou mistura complexa .....	13
2.3.5 Reguladores de crescimento .....	15
3 Material e Métodos .....	16
3.1 Boro e Zinco no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> .....	18
3.2 Boro e Manganês no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> .....	18
3.3 Polpa de banana nanica e água de coco no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> "Grande" x <i>Cattleya loddigesii</i> "Alba". .....	18
3.4 GA <sub>3</sub> e número de explantes no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Cattleya loddigesii</i> .....	19
4 Resultados e Discussão .....	20
4.1 Boro e Zinco no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> .....	20
4.1.1 Número de folhas .....	20
4.1.2 Número de raízes .....	21
4.1.3 Comprimento das raízes .....	23
4.1.4 Altura da parte aérea .....	25
4.1.5 Massa fresca de plântulas .....	26
4.1.6 Massa seca de plântulas .....	27
4.2 Boro e Manganês no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> .....	29
4.2.1 Número de folhas .....	29
4.2.2 Número de raízes .....	30
4.2.3 Comprimento das raízes .....	31
4.2.4 Altura da parte aérea .....	33
4.2.5 Massa fresca de plântulas .....	34

# SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 Introdução .....	1
2 Referencial Teórico .....	4
2.1 Aspectos gerais da cultura .....	4
2.2 Micropropagação de orquídeas .....	6
2.3 Meios de cultura .....	7
2.3.1 Boro .....	9
2.3.2 Manganês .....	10
2.3.3 Zinco .....	12
2.3.4 Suplemento orgânico ou mistura complexa .....	13
2.3.5 Reguladores de crescimento .....	15
3 Material e Métodos .....	16
3.1 Boro e Zinco no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> .....	18
3.2 Boro e Manganês no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> .....	18
3.3 Polpa de banana nanica e água de coco no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> "Grande" x <i>Cattleya loddigesii</i> "Alba". .....	18
3.4 GA <sub>3</sub> e número de explantes no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Cattleya loddigesii</i> .....	19
4 Resultados e Discussão .....	20
4.1 Boro e Zinco no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> .....	20
4.1.1 Número de folhas .....	20
4.1.2 Número de raízes .....	21
4.1.3 Comprimento das raízes .....	23
4.1.4 Altura da parte aérea .....	25
4.1.5 Massa fresca de plântulas .....	26
4.1.6 Massa seca de plântulas .....	27
4.2 Boro e Manganês no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Cattleya loddigesii</i> .....	29
4.2.1 Número de folhas .....	29
4.2.2 Número de raízes .....	30
4.2.3 Comprimento das raízes .....	31
4.2.4 Altura da parte aérea .....	33
4.2.5 Massa fresca de plântulas .....	34

4.2.6 Massa seca de plântulas .....	35
4.3 Polpa de banana nanica e água de coco no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Cattleya loddigesii</i> 'Grande' x <i>Cattleya loddigesii</i> 'Alba' .....	37
4.3.1 Número de folhas .....	37
4.3.2 Número de raízes .....	38
4.3.3 Comprimento da maior raiz .....	39
4.3.4 Comprimento da parte aérea .....	40
4.3.5 Massa fresca de raízes .....	41
4.3.6. Massa fresca da parte aérea .....	41
4.4 GA <sub>3</sub> e número de explantes no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Cattleya loddigesii</i> .....	44
4.4.1 Número de folhas .....	44
4.4.2 Comprimento médio da parte aérea .....	45
4.4.3 Peso da matéria fresca da raiz.....	46
4.4.4 Peso da matéria fresca da parte aérea .....	49
4.4.5 Peso da matéria seca da raiz .....	49
4.4.6 Peso da matéria seca da parte aérea .....	51
5 Conclusões .....	53
6 Referências Bibliográficas .....	54

## RESUMO

RIBEIRO, Lilian de Sousa. Adequação de meio de cultura para crescimento *in vitro* de orquídeas do gênero *Cattleya*. 2005. 59p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.

Objetivou-se testar GA<sub>3</sub>, os micronutrientes B, Zn e Mn, água de coco, polpa de banana nanica e número de explantes por frasco de plântulas da orquídea *Cattleya loddgesii* variedades “Alba” e “Grande e *C. walkeriana*. As plântulas com 1,5 cm de comprimento foram obtidas de sementes germinadas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em frascos de vidro de 250 cm<sup>3</sup> contendo meio nutritivo Knudson com pH 5,8 ± 0,1 e solidificado com 5 g L<sup>-1</sup> de ágar. Os experimentos foram mantidos em sala climatizada a 25 ± 1° C, fotofase de 16 horas e 35 μM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa. Para *C. loddgesii* os tratamentos contendo B foram: 0; 0,056; 1,4; 2,8 e 5,6 mg L<sup>-1</sup>, Zn 0; 0,331; 1,655; 3,31 e 6,62 mg L<sup>-1</sup>, Mn 0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg L<sup>-1</sup>, o meio nutritivo foi acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 150 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana nanica. Estudou-se ainda o desenvolvimento de explantes de *C. loddgesii* inoculados em GA<sub>3</sub> (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 mg/L) e número de plântulas por frasco. Para os experimentos com plântulas de *C. loddgesii* var Alba e *C. loddgesii* var Grande, utilizou-se 0; 50; 100 e 200 mL L<sup>-1</sup> de água de coco e 0; 25; 50; 75 e 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana, acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Para *C. walkeriana* comparou-se o número de explantes (3; 6; 9 e 12) inoculados em diferentes volumes de meio nutritivo Knudson (25; 50; 75 e 100 mL), suplementado com 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana, 150 mL de água de coco e 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O melhor crescimento das plântulas de *C. loddgesii* foi observado quando se utilizou 1,4 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico, 6,62 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de zinco e 15 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de manganês. A adição de 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana ao meio promoveu o maior comprimento da parte aérea e raiz e o maior peso da massa fresca de raiz. Utilizando-se 12 plântulas da orquídea *C. loddgesii* por frasco e 10 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, obteve-se maior número de folhas, peso de matéria fresca da parte aérea e peso da matéria fresca de raiz

---

<sup>1</sup> Orientador: Moacir Pasqual – UFLA.

## ABSTRACT

RIBEIRO, Lilian de Souza. Adequacy of culture medium for *in vitro* growth of orchids of the genus *Cattleya*. 2005. 59 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.

It was aimed to test GA<sub>3</sub>, the micronutrients B, Zn and Mn, coconut water, "nannica" cv. banana pulp and number of explants per vial of orchid seedlings *Cattleya loddgesii* var "Alba" and "Grande" and *C. walkeriana*. The seedlings 1.5 cm long were obtained from *in vitro* germinated seeds. The explants were inoculated into glass vials of 250 cm<sup>3</sup> containing Knudson nutrient medium with pH 5.8 ± 0.1 and solidified with 5 g L<sup>-1</sup> of agar. The experiments were kept in a climatic chamber at 25 ± 1 C, 16-hour photophase and 35 μM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> of light intensity. For *C. loddgesii*, the treatments containing B were: 0; 0.056; 1.4; 2.8 and 5.6 mg L<sup>-1</sup>, Zn 0; 0.331; 1.655; 3.31 and 6.62 mg L<sup>-1</sup>, Mn 0; 3.75; 7.5; 15 and 30 mg L<sup>-1</sup>, the nutrient medium was added of 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal and 150 g L<sup>-1</sup> of "nannica" cv. banana pulp. Further, the development of explants of *C. loddgesii* inoculated into GA<sub>3</sub> (0; 2.5; 5; 7.5 and 10 mg/L) and number of seedlings per vial. For the experiments with *C. loddgesii* seedlings var. "Alba" and *C. loddgesii* var. "Grande" 0; 50; 100 and 200 mL L<sup>-1</sup> of coconut water and 0; 25; 50; 75 and 100 g L<sup>-1</sup> of nanina banana pulp added of 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal. For *C. walkeriana*, the number of explants (3; 6; 9 and 12) inoculated into different volumes of Knudson nutrient medium (25; 50; 75 and 100 mL), supplemented with 100g L<sup>-1</sup> of banana pulp, 150 mL of coconut water and 2 gL<sup>-1</sup> of activated charcoal. The best growth of the *C. loddgesii* seedlings was found when 1.5 mg L<sup>-1</sup> of boric acid, 6.62 mg L<sup>-1</sup> of zinc sulfate and 15 mg L<sup>-1</sup> of manganese sulfate were utilized. Addition of 100 g L<sup>-1</sup> of banana pulp to the medium promoted the greatest length of the shoot and root and the greatest weight of the root fresh mass. By utilizing 12 seedlings of *C. loddgesii* orchid per vial and 10 mg.L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, greatest number of leaves, shoot fresh matter weight and root fresh matter weight were obtained.

---

<sup>1</sup> Adviser: Moacir Pasqual – UFLA.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países que possui maiores quantidades de espécies de orquídeas no mundo. São mais de 2.700 espécies nativas, e muitas ainda não foram classificadas, principalmente as da região Amazônica.

Cultivar orquídeas no Brasil, é relativamente fácil e simples. As condições naturais muito nos facilitam. As orquídeas ocorrem em quase todas as regiões da terra, sendo mais freqüentes e exuberantes nos trópicos, entre os quais se destaca o Brasil, possuindo um banco de germoplasma dessas plantas, sendo também o responsável pela sua preservação.

O elevado número de espécies e híbridos tropicais possibilitam a existência de variadas formas, cores e flores, exploradas comercialmente em todo o mundo. Alguns gêneros de orquídeas de ocorrência natural no Brasil são bastante cultivados; como exemplo podem-se citar *Cattleya*, *Laelia* e *Brassavola*, sendo os mais procurados por colecionadores, orquidófilos, etc., além de atingirem altos preços no mercado interno e externo. As orquídeas são conhecidas não só pela sua beleza e exotividade (importância ornamental), mas também comercial e industrial em função da extração de baunilha (gênero *Vanilla*), fazendo com que sejam produzidas em todo o mundo.

Desde o começo do século passado as orquídeas foram levadas em grande escala para alguns países europeus e asiáticos. Hoje o que se vê no exterior é a reprodução comercial em larga escala de orquídeas, ou híbridos destas sendo patenteados e, assim, assegurando a propriedade intelectual dessas plantas.

A destruição das matas provocou também a extinção de inúmeros habitats naturais, e muitos deles não tinham sido inventariados para a catalogação das espécies existentes. Deve-se ainda considerar o uso abusivo e em larga escala de produtos fitossanitários, que eliminam pássaros e insetos

polinizadores de orquídeas, impedindo, assim, que sejam reproduzidas na natureza. Outro aspecto é a ação predadora de muitos catadores de orquídeas nas matas que também contribuiu para aumentar o risco de extinção dessas plantas.

Desse modo, uma evolução crescente nos sistemas de produção dessas plantas, tornando uma atividade extremamente competitiva, exigindo avanços tecnológicos, aperfeiçoamento nos conhecimentos técnicos e mão-de-obra especializada, garantindo assim uma produção elevada com excelente qualidade do produto final. Esses avanços constituem no uso de estufas, cultivares melhoradas e mais produtivas, domínio no manejo de adubações e irrigação na produção dessas plantas.

Em alguns países como Holanda, França, Espanha, Japão e recentemente no Brasil, a propagação *in vitro* de plantas ornamentais é uma realidade, podendo destacar o cultivo de rosas, crisântemos, begônias, gérberas, orquídeas, bromélias, samambaias e antúrios.

Relatos sobre o cultivo de orquídeas remonta ao período antes de Cristo, época em que já eram denominadas por *Orchis* pelos gregos e *Han* ou *Lan* pelos chineses. De acordo com Confúcio (551 - 479 a.C.), foi mencionado em seus escritos que os chineses utilizavam-nas na decoração dos lares, como sendo símbolo de pureza, perfume e graça, e os gregos e romanos cultivavam-nas para fins medicinais. Entre os séculos XVI e XX, iniciou-se a coleta predatória das orquídeas, liderada principalmente pelos ingleses, 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 atendessem eficazmente a demanda de orquídeas.

As orquídeas representam uma das ornamentais mais cobiçadas devido à exuberância de suas flores perfeitas e suas cores delicadas. Por este motivo, a

prática extrativista para comercialização vem conduzindo algumas espécies à beira da extinção. A devastação das matas é um outro motivo que tem levado à extinção que, como consequência, tem despertado a preocupação crescente em relação à preservação do meio ambiente.

A propagação *in vitro* vem sendo utilizada com freqüência em inúmeras espécies vegetais, por manter a identidade genética dos indivíduos e possibilitar a obtenção de grande número de plantas sadias e de alta qualidade fitossanitária em pequeno espaço físico e em curto tempo em qualquer época do ano. Uma das maiores vantagens da micropropagação é a obtenção de mudas livres de doenças. Estas plantas possuem maior capacidade de desenvolvimento, melhor florescimento e maior vigor fisiológico. O emprego da técnica de micropropagação possibilita minimizar as coletas predatórias de orquídeas, permitindo a manutenção das populações naturais dessas plantas.

Para atender a exigência do mercado consumidor em relação à qualidade do produto, os produtores de flores têm empregado as mais avançadas técnicas de produção e comercialização. A pesquisa em micropropagação vem desenvolvendo e adaptando protocolos para inúmeras espécies ornamentais visando atender à demanda do produtor por mudas de alto padrão, em quantidade suficiente e em curto espaço de tempo. No Brasil o desenvolvimento desse setor vem ressentindo a falta de inúmeros fatores, podendo-se destacar os meios nutritivos para cada espécie. Desta maneira, torna-se necessário a otimização do meio de cultura para que esta técnica torne viável a produção de mudas em escala comercial.

Os meios nutritivos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento das plântulas de orquídea. No sentido de promover melhor crescimento em tecidos de plântulas, deve-se apropriar um meio de cultura que proporcione os nutrientes necessários para o crescimento e diferenciação dos tecidos para cada fase do cultivo.

Objetivou-se, com este trabalho, adequar um meio de cultura que promova *in vitro* o crescimento de plântulas de orquídea do gênero *Cattleya*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da cultura

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae e compõem 7% de todas as espécies do planeta. Considerando as plantas já catalogadas, são aproximadamente 35 mil espécies naturais, nas suas duas subfamílias, duas divisões, cinco tribos, duas séries, duas subséries, 85 subtribos e mais de 2500 gêneros, sem contar a infinidade de híbridos, naturais e artificiais (Altafin et al., 2002).

As orquídeas são todas autotróficas, e vegetam como epífitas (desenvolvem-se em árvores), terrestres (desenvolvem-se sobre o solo), rupículas (crescem sobre pedras) e também as saprófitas (vegetam no subsolo e são desprovidas de clorofila) (Altafin et al., 2002).

No seu aspecto geral as flores possuem três sépalas, uma dorsal e duas laterais, três pétalas, duas laterais e uma modificada, chamada labelo. O centro do labelo é onde se projeta a coluna, órgão resultante da fusão dos órgãos masculinos (estames) e femininos (carpelos). Na antera ficam agrupados os grãos de pólen (políneas) que se dispõem de dois a oito. Logo abaixo da antera fica o estigma, o órgão receptivo feminino, de superfície viscosa, onde são depositadas as políneas, ocorrendo assim a polinização. Como segmento da coluna, encontra-se o ovário, onde, após a fecundação, desenvolve a cápsula das sementes, com até dezenas de milhares de minúsculas sementes. Entretanto, também há suas exceções como a de plantas que produzem por floração,

somente flores masculinas, femininas e raramente flores masculinas com femininas ou hermafroditas. Isso ocorre principalmente por influência climática com espécies da subtribo *Catasetinae*, por exemplo (Altafin et al., 2002).

A reprodução das orquídeas pode ser feita por cortes de partes de uma planta, por sementes e por meristemas. Quando se deseja reproduzir uma orquídea torna-se necessário saber se é uma planta nativa ou se é um híbrido, obtido pelo cruzamento de plantas diferentes. Sendo uma planta nativa, a reprodução para obter plantas idênticas poderá ser feita por cortes de partes da planta, por sementes ou por meristemas (cultura de tecidos). Quando se trata da reprodução de uma planta híbrida, para obter-se plantas idênticas, a técnica a ser usada deverá ser por cortes de parte da planta ou por meristemas. A reprodução por sementes de plantas híbridas poderá produzir plantas totalmente diferentes da planta mãe.

Com a descoberta do professor Lewis Knudson, em 1922, do método assimbiótico ou sementeira *in vitro* de orquídeas, pelo qual quase 100% das sementes de orquídeas germinam, sobrevivem e crescem rapidamente, foi possível produzir grande quantidade de espécies e híbridos, obtendo-se plantas com flores homogêneas e precoces, em curto espaço de tempo. Esse fato popularizou-se ainda mais, refletindo em preços mais acessíveis, quando comparado com o método natural através do qual além do desenvolvimento lento, somente 2 a 3% das sementes germinam por simbiose com o fungo *Micorriza*.

As orquídeas dividem-se em dois tipos básicos: Simpodiais (possuem um rizoma rasteiro e anualmente produzem um broto no qual será formado o pseudobulbo, folhas e flores) e Monopodiais (crescem verticalmente de uma haste central que produz folhas alternadas e inflorescências entre as mesmas) (Englert, 2000).

Plantas do gênero *Cattleya* que apresentam crescimento simpodial, possuem flores de valor comercial, ou seja, com os seguintes predicados: tamanho, beleza, durabilidade, pedúnculo relativamente longo e uma forma que faz realçar essas particularidades. Assim, há dois séculos são sempre preferidas pelos negociantes que exploram a floricultura orquidológica (Hoehne, 1949).

Das aproximadamente 50 espécies de *Cattleya* que vegetam desde o México até a América do Sul, 32 ocorrem no Brasil, isto sem contar o grande número de híbridos naturais entre suas próprias espécies e outros gêneros como *Laelia* e *Schomburgkia* (Araujo, 2004b).

O gênero *Cattleya* ocorre nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, em locais situados entre 500 e 900 m de altitude. Seu cultivo é mais fácil em locais de temperatura mais amena, protegida da luminosidade excessiva, com maior umidade nos meses mais quentes e um inverno mais seco. Seu período de florescimento vai do outono até a primavera com flores de até 9 cm de diâmetro e uma gama de cores, indo do rosa claro até o rosa mais intenso pintalgado, além da variedade alba (branca) (Araujo, 2004b).

## 2.2 Micropropagação de orquídeas

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas, nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em condições assépticas sobre um meio nutritivo artificial. O fundamento básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, segundo o qual qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (Pasqual, 2000). Desta forma, é uma importante ferramenta não só na genética e melhoramento de plantas, como também pode auxiliar em inúmeras outras áreas da agricultura (Ramalho et al., 1997).

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa quando aplicada em variedades melhoradas que possuem pouco material e necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em grande escala, sendo uma técnica importante principalmente para as culturas de ciclo longo (Andrade, 1998).

A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998). É uma técnica usada comercialmente, permitindo que uma planta de interesses desejáveis possa ser multiplicada indefinidamente (Pasqual, 2000).

A produção de mudas isentas de doenças é uma vantagem expressiva da micropropagação, pois as plantas saudáveis produzidas possuem maior vigor fisiológico apresentando uma maior capacidade de desenvolvimento e melhor florescimento (Altafin et al., 2002).

A importância da diminuição do tempo de produção dessas mudas é que algumas espécies que atingem maturidade apresentando o primeiro florescimento com 5-7 anos podem florescer com 3-4 anos de idade. Uma produção massal de mudas também é interessante, uma vez que naturalmente as sementes de orquídeas apenas germinam quando ocorre a interação simbiótica com certos gêneros de fungos. Na propagação *in vitro* as sementes são colocadas em condições ideais para germinarem e não se faz necessário à simbiose com certas espécies de micorrizas (Altafin et al., 2002).

### **2.3 Meios de cultura**

Os meios nutritivos utilizados para a 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*. Esses meios se baseiam nas exigências da plantas quanto aos nutrientes minerais, com

algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro* (Caldas et al., 1998).

No cultivo e subcultivo de plântulas do gênero *Cattleya*, George et al. (1987) sugerem o meio Knudson ou Reinert e Mohr (Reinert & Mohr, 1967).

O crescimento de células e a morfogênese de algumas espécies podem ser promovidos pelo aumento do nível de micronutrientes, além do recomendado pelo meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Em função desse aspecto, o meio básico de Knudson C (1946), amplamente utilizado no cultivo *in vitro* de orquídeas, pode apresentar deficiência de alguns nutrientes, principalmente os micronutrientes, se comparado ao meio de cultura MS. Assim, a determinação das exigências nutricionais para cada espécie é importante para o balanceamento do meio de cultivo a fim de evitar que alguns elementos estejam em deficiência ou excesso impedindo o desenvolvimento dos explantes.

Para que uma plântula se desenvolva normalmente, os elementos minerais devem encontrar-se em disponibilidade no meio de cultura e em concentrações adequadas nas plantas. O excesso ou deficiência de um deles pode provocar um desequilíbrio fisiológico que resultará em prejuízos de desenvolvimento (Hernandez, 1998).

Quando um dos elementos químicos essenciais para a vida de uma planta está presente no meio em quantidades insuficientes ou em combinações que o tornam pouco disponível, a deficiência de tal elemento nas células provocará distúrbios no metabolismo (Epstein, 1975).

Segundo Twyford & Walmsley (1968), em algumas situações, sintomas de deficiência de micronutrientes são visíveis nas plantas, mas na maioria das vezes é necessário utilizar análise de folhas ou de outros tecidos para uma avaliação mais precisa.

Todo o comportamento fisiológico das plantas, inclusive os nutricionais, é função da sua constituição genética e do meio em que vivem. Às vezes uma

concentração excessiva de um elemento pode reduzir a velocidade de absorção de um nutriente tornando a planta deficiente no último. Essa deficiência “induzida” resulta da ação “antagônica” do elemento em questão, podendo aparecer mesmo quando o nutriente esteja no meio em concentração que seria mais do que adequada se o primeiro não estivesse também presente (Epstein, 1975).

Em 1905 o pesquisador francês G. Bertrand concluiu que o manganês era um elemento essencial para as plantas e investigações subseqüentes confirmaram essa conclusão. Katherine Warington de Oxford, Inglaterra, mostrou nos anos 20 que o boro era um micronutriente para várias espécies de leguminosas e A.L. Sommer e C.B. Lipman da Universidade da Califórnia nos E.U.A. demonstraram sua essencialidade para plantas de outras famílias. J.S. McHargue em Kentucky (E.U.A.) demonstrou conclusivamente a necessidade de manganês e Lipman e colaboradores logo adicionaram o zinco e o cobre à lista dos micronutrientes (Epstein, 1975).

### **2.3.1 Boro**

O Boro (B) é encontrado no solo sob a forma de ácido bórico e este é o composto usado como fonte do elemento em cultura de tecidos (Pasqual, 2001). Este micronutriente é absorvido nas suas formas iônicas  $B_4O_7^{2-}$ ,  $HBO_3^{2-}$ , ou  $BO_3^{3-}$ . As plantas necessitam de B em quantidades muito pequenas e algumas são altamente sensíveis às concentrações empregadas (Camargo, 1970).

O Boro é, provavelmente, absorvido pelas raízes das plantas na forma de ácido bórico não dissociado ( $H_3BO_3$ ), e não é redistribuído nas plantas, o que provoca aparecimento dos sintomas de carência primeiramente nos órgãos mais novos e nas regiões de crescimento (Faquin, 2001). Esta afirmativa também foi

feita por Malavolta (1976), mencionando que o B é absorvido na forma de íon borato e não se transloca facilmente de um órgão para outro.

As funções atribuídas ao B estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos, fenóis, transporte de açúcares através das membranas, síntese de ácidos nucléicos (DNA e RNA) e de fitormônios, síntese, integridade e lignificação da parede celular e germinação do grão de pólen e tubo polínico (Marschner, 1995).

Gauch & Dugger (1953) propuseram a existência de um controle direto do movimento de carboidrato pelo boro, postulando formar este mineral um complexo ionizável boro-sacarose, que facilita o transporte de carboidratos através das membranas.

Lewin & Reimann (1969) relacionam o cessamento no alongamento dos pontos de crescimento da parte aérea e das raízes em plantas deficientes com a redução do teor de RNA. Para Albert (1965), além de deficiências de açúcar no câmbio, nas pontas do caule, raiz, flores e frutos, a deficiência de B causa cessação da divisão celular ocorrendo anormalidade na formação da parede celular e desorganiza a célula em suas funções na mitose. Ocorrem na região meristemática manchas escuras do citoplasma seguido por uma desintegração resultando num vazio com células mortas. Paredes celulares vazias são mais densas que as paredes celulares que contêm citoplasma.

Como resultado de seu papel em tecidos em expansão e sua limitada mobilidade, o suprimento de B deve ser contínuo por toda a vida da planta, usualmente pela raiz (Mariano, 1998).

### **2.3.2 Manganês**

O manganês (Mn) é um dos mais importantes micronutrientes e tem sido incluído na maioria dos meios de cultura de tecidos (Pasqual, 1998). É absorvido

na forma de  $Mn^{2+}$  e é um elemento necessário para integridade da membrana do cloroplasto e para a liberação do oxigênio na fotossíntese (Raven et al., 1996), tendo assim um importante papel na reação de Hill (Camargo, 1970).

Malavolta (1980) define os papéis do Mn na planta como formador de pontes entre o ATP e as enzimas transferidoras de grupos (fosfoquinases e fosfotransferase). As plantas possuem uma proteína com Mn, a manganina, cuja função ainda é desconhecida. Atribui-se ainda, como funções do Mn, a síntese do RNA, o acúmulo de fósforo de reserva, a inativação de protetores de ácido indolacético (AIA) e fixação do  $CO_2$  via compostos com 4 carbonos (Malavolta, 1986).

O Mn é ativador de enzimas relacionadas com o metabolismo dos carboidratos, com as reações de fosforilação e com o ciclo do ácido cítrico (Camargo, 1970).

A redutase da hidroxilamina, enzima que toma parte no sistema responsável pela redução do nitrato a N amoniacal depende do Mn para sua atividade (Komatuda, 1988).

Na ausência do Mn o crescimento da planta é prejudicado e sintomas drásticos de deficiência desenvolvem-se. Por outro lado, na presença de quantidades excessivas de suas formas trocável e solúvel no meio de crescimento, os tecidos vegetais também apresentarão elevadas quantidades desse nutriente, podendo atingir níveis tóxicos. Portanto, a finalidade é de não eliminar o Mn solúvel, mas, sim, mantê-lo dentro de uma faixa entre toxicidade e deficiência (Komatuda, 1988).

### 2.3.3 Zinco

O zinco (Zn) é um elemento muito importante, pois, é responsável direto pela síntese do triptofano, um precursor da auxina (ácido indolacético), e

indireto pela síntese de proteína (Tsui, 1948). Na ausência do triptofano, estimula a formação de calosidade nos tecidos vegetais (Kupper et al., 1979).

O Zn é absorvido pelas plantas na forma de  $Zn^{2+}$ . É ainda motivo de controvérsias se o  $Zn^{2+}$  é absorvido pelas plantas por processo passivo ou ativo, embora muitas pesquisas atestam que a absorção do elemento é tipicamente metabólica (Faquin, 2001). É ainda classificado como um elemento parcialmente móvel na planta (Malavolta, 1980).

A função mais importante nos processos metabólicos das plantas é o componente de várias enzimas. A participação do Zn está associada ao metabolismo de carboidratos e proteínas, de fosfatos e também na formação de auxinas, RNA e ribossomos (Malavolta, 1980; Dechen et al., 1991).

Além de atuar na síntese do ácido indolacético e das proteínas, o Zn desempenha relações importantes em diversos sistemas enzimáticos, e também a participação do Zn na ativação de quatro enzimas: anidrase carbônica, desidrogenase, aldobase e peptidase, além de inibidor poderoso da enzima ribonuclease que hidrolisa o RNA. Portanto, sua carência provoca diminuição da atividade fotossintética em função do desarranjo nos cloroplastos (Malavolta, 1976).

Segundo Ramaiah et al. (1964), a deficiência de Zn interfere no mecanismo de transformação de aminoácidos em proteínas nos seus processos enzimáticos, resultando em baixa síntese de proteína e no acúmulo de aminoácidos livres, (acumulação de aminoácidos livres a níveis tóxicos), os quais produzem deformação e sintomas de deficiência.

Sendo o Zn encontrado nas plantas formando substâncias determinantes da qualidade e desempenhando funções vitais, é extremamente importante o estudo das diferentes combinações de sulfato de zinco e seus efeitos na produção, principalmente na qualidade do produto final (Cardoso, 1994).

#### 2.3.4 Suplemento orgânico ou mistura complexa

A obtenção de orquídeas a partir da sementeira *in vitro* é, atualmente, um processo rotineiro; no entanto, os conhecimentos sobre a melhor formulação do meio de cultura para cada espécie ainda são limitados. Um grande número de fatores complexos influenciam a germinação e crescimento *in vitro* de orquídeas, sendo estes altamente dependentes da espécie em estudo.

Atualmente, orquidófilos estão produzindo suas próprias mudas, em laboratórios caseiros, por germinação assimbiótica *in vitro*, utilizando um meio de cultura de constituição orgânica.

A mistura complexa é uma preparação obtida de produtos naturais, de composição indefinida, que servem para enriquecer o meio de cultivo. A composição desses produtos é de determinação trabalhosa e de uso restrito a algumas culturas e de difícil repetição experimental, quando as tentativas de adequação não forem suficientes para favorecer determinado processo morfo genético. Em trabalhos de rotina, essas preparações podem ser usadas caso estimulem respostas desejadas. Segundo Torres et al. (2001), os aditivos orgânicos complexos podem ser adicionados ao meio visando à melhor resposta no padrão de crescimento.

Entre os extratos naturais utilizados na cultura de sementes de orquídeas estão a polpa de banana homogeneizada, água de coco, peptona, triptona, levedura de cerveja, caseína hidrolisada, suco de tomate, suco de abacaxi e extrato de batata. Estas misturas aumentam o efeito vitamínico, teor de aminoácidos e algumas agem como reguladores de crescimento (Pierik, 1989).

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). Torres et al. (2001) mencionaram 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 de banana utilizada. Há relatos da utilização da polpa de banana na germinação de *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilum* e *Phalaenopsis* por Arditti & Ernst (1993); entretanto, os dados comparativos disponíveis não permitem uma discussão detalhada sobre o efetivo estímulo ao crescimento promovido por esses elementos (George, 1993).

A água de coco, empregada em geral nas concentrações de 3 a 15%, é o aditivo que mais tem sido utilizado para um grande número de espécies *in vitro*, não somente para estimular o crescimento de calos, mas também para aumentar a formação de embriões somáticos, induzir a divisão de grãos de pólen e, na sua primeira aplicação, na indução do desenvolvimento de embriões imaturos (Caldas et al., 1998). Esse extrato natural contém sais minerais, mio-inositol e citocinina(s), além de nucleotídeos e outros compostos orgânicos.

O uso da polpa de banana em cultura *in vitro* de orquídeas é citado por alguns pesquisadores, os quais propuseram a sua adição no meio de cultivo de *Paphiopedilum* e *Phalaenopsi* (Arditti & Ernst, 1993).

Junto com a água de coco, a polpa de banana verde foi adicionada ao meio proposto por Vacin & Went na propagação *in vitro* de *Aranda wendy* Scott e *Aranthera james* Storei. Para o crescimento das gemas e multiplicação dos protocolos foi usado apenas água de coco na concentração de 15% e na indução de brotos de *A. wendy* foi utilizada a polpa de banana a 5%, enquanto que para induzir o enraizamento, foi necessário o emprego dos dois suplementos (Chead & Sagawa, 1978).

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

### 2.3.5 Reguladores de crescimento

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

Para uma otimização do processo de micropropagação, uma alternativa viável seria o uso de uma quantidade adequada de meio de cultivo e da dose certa de um hormônio de crescimento que atuasse no alongamento da planta de orquídeas.

Nesse contexto pode-se citar, dentre as giberelinas, o GA<sub>3</sub>, que é um regulador de crescimento utilizado no alongamento das partes aéreas e dos brotos, promovendo respostas contraditórias *in vitro* e apresentando diversos efeitos que variam de acordo com cada espécie. Em alguns casos, o GA<sub>3</sub> pode não apresentar efeito ou inibir o desenvolvimento (Grattapaglia & Machado, 1998; Caldas et al., 1998; Paiva et al., 1999). Em plantas de Marcela a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> proporcionou um maior crescimento na altura dos explantes (Diniz et al., 1999). Resultados semelhantes foram obtidos por Silva (2001) com a utilização de 10 mg L<sup>-1</sup>, trabalhando com gloxínia, obtiveram maior número de folhas e de brotos. Entretanto, a adição do GA<sub>3</sub> no meio de cultura não proporcionou incremento no tamanho e número de brotos formados em crisântemo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

No preparo dos meios de cultura foram utilizadas soluções-estoque do meio Knudson (Tabela 1) armazenadas em frascos de vidro ambar, à temperatura em torno de 5°C. O pH do meio foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ , com NaOH 0,5 e 0,1N ou HCl 0,1N e o meio solidificado com 5 g L<sup>-1</sup> de ágar. Os meios foram vertidos em frascos de vidro com capacidade para 250 cm<sup>3</sup> e contendo 60 mL de meio de cultura. Estes foram vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1,1 atm e à temperatura de 121°C, durante 20 minutos.

TABELA 1. Solução nutritiva (Knudson C, 1946).

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

Foram utilizadas plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com 1 a 1,5 cm de comprimento e contendo raízes pequenas ( $\pm 0,5$  cm). As plântulas de *Cattleya loddigesii* e *C. walkeriana* foram colocadas em frascos

com tampa plástica e vedados com parafilme, em câmara de fluxo laminar horizontal desinfestada com álcool etílico a 70%. Os instrumentos (pinças) foram autoclavados e periodicamente flambados, durante o seu uso, com álcool 96° GL. Após a inoculação, os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de  $35 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Os experimentos foram avaliados aos 180 e 120 dias para plântulas de *C. loddigesii* e plântulas de *C. walkeriana* respectivamente, avaliando-se em função das seguintes variáveis: altura da parte aérea, comprimento das raízes, número de folhas, número de raízes, massa de plântulas fresca e seca.

Para avaliação das variáveis dos experimentos utilizaram-se: a) balança analítica de precisão (microgramas) na determinação da massa fresca e seca das plântulas; b) régua graduada em mm, na determinação da altura da parte aérea das plântulas.

O ensaio foi em DIC (delineamento inteiramente casualizado), em esquema fatorial 5x5, com três repetições compostas de quatro plântulas cada uma. A análise de variância foi realizada utilizando o procedimento GLM do software estatístico SAS<sup>®</sup> (SAS, 1990) por meio do método dos quadrados mínimos ponderados pelo inverso das variâncias de cada tratamento, uma vez que estes apresentaram heterogeneidade de variâncias.

O delineamento experimental utilizado para avaliar o experimento com plântulas de *C. walkeriana* foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x4 com três repetições e quatro frascos por repetição. Os parâmetros avaliados foram: número de folhas, comprimento médio da parte aérea, peso médio fresco de raízes, peso médio fresco da parte aérea, peso médio seco do sistema radicular e peso médio seco da parte aérea. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão polinomial, empregando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

### **3.1 Boro ( $H_3BO_3$ ) e Zinco ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii***

Os tratamentos consistiram da combinação de cinco concentrações de ácido bórico (0; 0,056; 1,4; 2,8 e 5,6 mg L<sup>-1</sup>) e cinco concentrações de sulfato de zinco (0; 0,331; 1,655; 3,31 e 6,62 mg L<sup>-1</sup>) no meio de cultura 'Knudson', acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 150 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana nanica.

Após 15 dias da montagem do experimento, devido a uma contaminação do meio com uma bactéria, foi feita uma desinfestação e o microorganismo eliminado utilizando-se o Chlorphenicol – 200 mg L<sup>-1</sup>, sendo 2 mL por frasco.

### **3.2 Boro ( $H_3BO_3$ ) e Manganês ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ) no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii***

Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações salinas de Boro (0; 0,056; 1,4; 2,8 e 5,6 mg L<sup>-1</sup>) e Manganês (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg L<sup>-1</sup>) da formulação de sais do meio 'KC', em todas as combinações possíveis, acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 150 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana nanica.

### **3.3 Polpa de banana nanica e água de coco no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* 'Grande' x *Cattleya loddigesii* 'Alba'**

Plântulas resultantes do cruzamento de *C. loddigesii* 'Grande' x *C. loddigesii* 'Alba' foram inoculadas em meio de cultura contendo os tratamentos: água de coco (0, 50, 100, 150 e 200 mL.L<sup>-1</sup>) e polpa de banana nanica (0, 25, 50, 75 e 100 g.L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis acrescido de 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

Decorridos 180 dias da instalação do experimento, analisou-se o número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, massa fresca de raízes e massa fresca da parte aérea.

Os dados foram comparados por meio de regressão polinomial empregando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

### 3.4 GA<sub>3</sub> e número de explantes no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddgesii*

Plântulas de *C. loddgesii* com 1,0 - 1,5 cm foram submetidas à uniformização em meio de cultura Knudson (George et al., 1987) durante três meses. Após esse período, em cada frasco de 250 mL contendo aproximadamente 50 mL de meio, foram colocadas (3, 6, 9, 12) plântulas, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. O meio foi solidificado com 4% de ágar, o pH foi ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem a 121°C, 1 atm, por 20 minutos. No meio de cultura foram acrescidas as concentrações 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x5, com quatro repetições, sendo cada parcela formada por três frascos e com 3, 6, 9, 12 plântulas por frasco.

Ao término de 180 dias da instalação, analisou-se o número de folhas, comprimento da maior raiz e da parte aérea, massa fresca de raízes, massa fresca da parte aérea, massa seca de raiz e massa seca da parte aérea. Os dados foram comparados por meio de regressão polinomial empregando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Boro ( $H_3BO_3$ ) e Zinco ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii*

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão apresentados na Tabela 2. Observou-se para todas as variáveis que a interação entre os micronutrientes foi significativa.

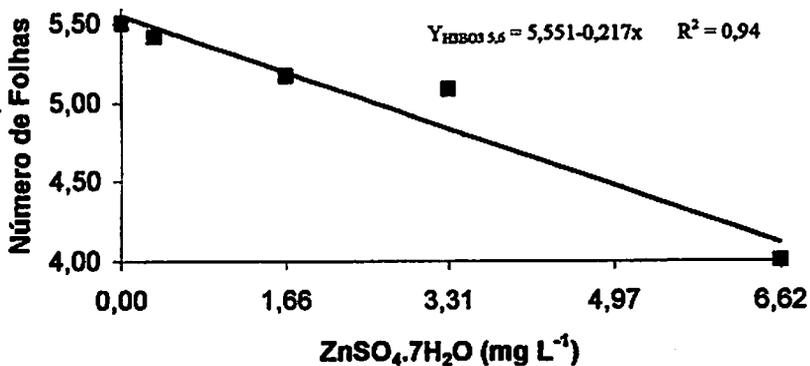
TABELA 2. Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento das raízes (CR), altura da parte aérea (APA), massa fresca de plântulas (MFP) e massa seca de plântulas (MSP).

Fontes de Variação	Quadrados Médios						
	GL	NF	NR	CR	APA	MFP	MSP
B	4	28,864**	6,678**	2,991*	16,160**	32,356**	20,678**
Zn	4	3,194*	3,458*	7,190**	2,137 <sup>m</sup>	44,580**	25,282**
B x Zn	16	7,223**	3,584**	6,628**	3,722**	34,774**	49,189**
Resíduo	75	1	1	1	1	1	1

\*\* , \* significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

#### 4.1.1 Número de folhas

O efeito das concentrações  $H_3BO_3$  e  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  no número de folhas pode ser observado na Figura 1. O incremento da concentração de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  associada a  $5,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $H_3BO_3$  promoveu diminuição no número de folhas das plântulas de forma linear, tendo o maior número de folhas (5,55) sido obtido na ausência do sulfato de zinco. A redução dessa variável pode ter sido causada pela toxidez por  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .



■ ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5,6 mg L<sup>-1</sup>

FIGURA 1. Número de folhas de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e zinco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Resultados contrastantes foram obtidos por Franco (2004), que obteve maior número de folhas com a utilização de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (17,2 mg L<sup>-1</sup>) e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (12,4 mg L<sup>-1</sup>) do meio de cultura 'MS' na micropropagação de crisântemo (*Dendranthema grandiflora*). Houve um aumento linear no número de folhas com o aumento da concentração de sulfato de zinco. Entretanto, deve-se observar que entre espécies ocorrem comportamentos distintos. Possivelmente e quando comparada ao crisântemo, as plântulas da orquídea *C. loddigesii* requerem um meio de cultura mais pobre em boro e zinco para um melhor desenvolvimento.

#### 4.1.2 Número de raízes

Observou-se que o maior número de raízes (4,75) foi obtido na ausência de sulfato de zinco associado a 0,056 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Figura 2). Concentrações superiores a 6,62 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O quando combinadas



com  $0,056 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  podem provavelmente proporcionar um aumento no número de raízes. Em função desse aspecto, torna-se necessário realizar outro ensaio com concentrações superiores a  $6,62 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de zinco, para uma melhor compreensão deste comportamento que foi observado no presente experimento.

Pode-se observar que houve um aumento no número de raízes (4,23) na concentração de  $2,8 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  combinada com  $4,25 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , após o qual detectou-se uma redução nesse parâmetro. Outra redução dessa variável pode ser observada com o incremento das concentrações de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  quando associadas a  $5,6 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Essa redução foi causada provavelmente por distúrbios nutricionais pela adição desses sais.

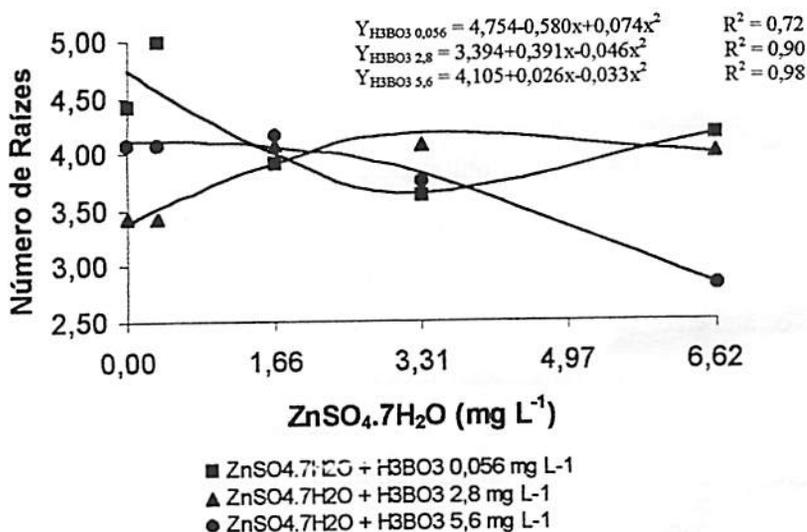


FIGURA 2. Número de raízes de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e zinco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Araújo (2004a), trabalhando com diferentes concentrações do meio Knudson C no crescimento *in vitro* de orquídeas, verificou que à medida que

aumentaram as concentrações de meio KC, maiores quantidades de raízes foram formadas. Entretanto, a partir de 96,5% (0,054 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e 0,319 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) do meio KC houve uma redução no número de raízes. Esses resultados estão de acordo com a afirmação citada anteriormente, a qual acentua a importância de se estabelecer um protocolo adequado ao crescimento de orquídeas.

Em 1951, Hemberg verificou o efeito de vários íons sobre o enraizamento de estacas de *Phaseolus vulgaris* L., demonstrando que o boro, fornecido como ácido bórico, aumentou a produção de raízes, enquanto estacas sem tratamento com boro não apresentaram raízes. Foi ainda relatado que, muitas vezes, o fornecimento de boro pode ocorrer pela simples presença do elemento como contaminante da água.

Middleton et al. (1978), em estacas de *Phaseolus aureus* Roxb., verificaram que aquelas que não receberam tratamento com boro conjuntamente com auxinas, não mostraram alta formação de raízes, sendo o mesmo observado nos tratamentos constituídos apenas com boro.

#### 4.1.3 Comprimento das raízes

Verificou-se que a concentração que permitiu a obtenção do maior comprimento das raízes (3,94 cm) foi de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (6,62 mg L<sup>-1</sup>) e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1,4 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 3).

Na concentração de 5,6 mg L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, à medida que concentrações de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O foram aumentadas, observou-se aumento no comprimento das raízes até o valor de 3,71 cm, quando se utilizou 1,845 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. A partir desse ponto houve redução, provavelmente devido ao excesso de nutrientes, provocando provavelmente um desbalanço nutricional.

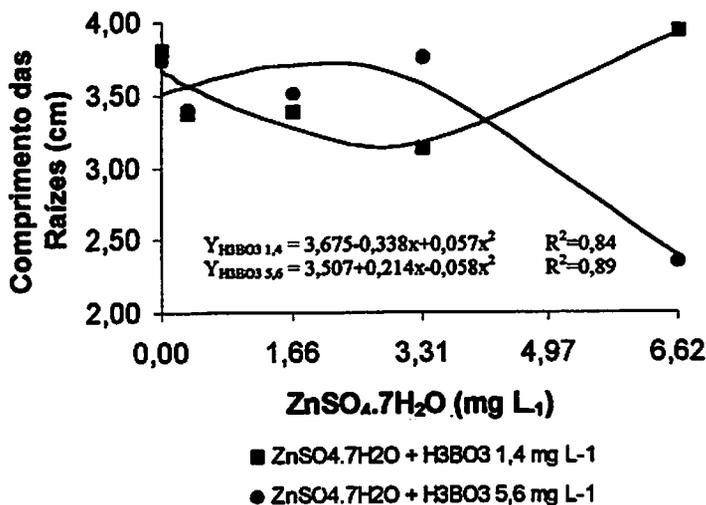


FIGURA 3. Comprimento de raízes de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e zinco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Esses resultados mostram que o meio Knudson C, utilizado no crescimento *in vitro* de plântula de orquídea, é realmente um meio pobre em sais quando comparados ao meio 'MS', e que deve ser modificado para se obter um maior crescimento dessas plântulas.

Segundo Jarvis (1983), a adição de boro proporciona um maior desenvolvimento de raízes em estacas de feijão, uma vez que este elemento é responsável pelo desenvolvimento dos primórdios radiculares.

Ono et al. (1992) afirmaram que o boro adicionado à solução de auxina se faz necessário para que ocorra um melhor desenvolvimento das raízes formadas nas estacas de plantas de camélia.

De acordo com Pasqual (2001), o B promove a destruição da auxina natural e aumenta sua translocação; logo, plantas com deficiência de B têm o sistema radicular reduzido.

#### 4.1.4 Altura da parte aérea

Constatou-se que incrementos nas concentrações de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  adicionadas ao meio Knudson C combinadas com  $2,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ , proporcionaram aumento na altura de plântulas de *C. loddigesii* de forma linear, até 3,6 cm. Entretanto, maior altura de plântulas (3,8 cm) foi observada com  $6,62 \text{ mg L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $1,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$  (Figura 4).

A altura de plântulas observada na ausência de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e com  $2,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$  foi inferior aos demais tratamentos, evidenciando-se a importância desses nutrientes para o crescimento de plântulas de orquídea.

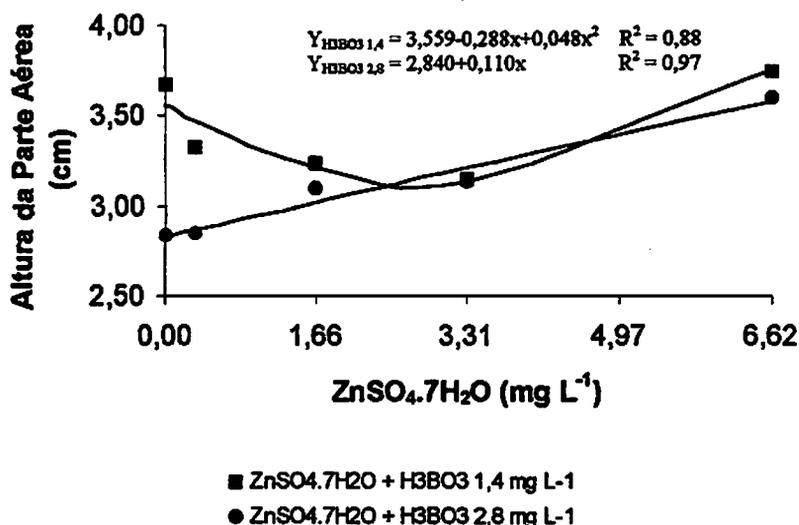


FIGURA 4. Altura de parte aérea de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e zinco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Franco (2004), trabalhando com micropropagação de plantas de crisântemo *in vitro* afirmou que maior comprimento de plântulas foi obtido com  $17,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $12,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ , demonstrando a necessidade do

aumento da disponibilidade desses nutrientes em meio de cultura para um melhor crescimento das plântulas.

#### 4.1.5 Massa fresca de plântulas

O maior peso de plântulas (0,674 g) foi verificado com a utilização de 6,62 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1,4 mg L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Figura 5). Provavelmente devido a alguma toxidez dos nutrientes, na concentração de 6,62 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 5,6 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, houve uma redução no peso de plântulas.

Na concentração de 2,8 mg L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e na ausência de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O pode-se observar que a massa fresca de plântulas foi inferior aos demais tratamentos, sendo que esta é aumentada com o incremento da concentração de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Isto mostra a necessidade de ajuste do meio de cultura Knudson C para o crescimento das plântulas.

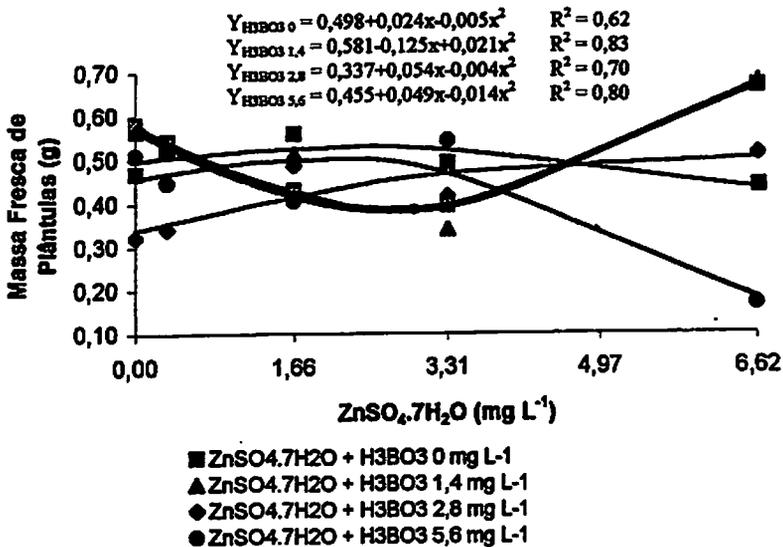


FIGURA 5. Massa fresca de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e zinco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Araujo (2004a) constatou maior peso da matéria fresca de plântulas de orquídea com a utilização de 50% de meio Knudson, ponto a partir do qual houve diminuição no peso dos explantes, provavelmente devido à toxidez.

Ono et al. (1992) observaram que em tratamentos contendo auxina mais boro houve um aumento significativo no teor de matéria fresca média, em relação aos tratamentos apenas com auxina. Este fato possivelmente poderá explicar a influência positiva do boro para essa variável.

#### 4.1.6 Massa seca de plântulas

O maior peso (0,05 g) obtido para este parâmetro foi verificado com a utilização de 6,62 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1,4 mg L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Com a utilização de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (5,6 mg L<sup>-1</sup>) e doses crescentes de sulfato de zinco, houve também uma redução no peso de plântulas, provavelmente devido à toxidez (Figura 6).

Concentrações superiores a 6,62 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, quando combinadas com 1,4 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, podem proporcionar um aumento na massa seca de plântulas. Essa mesma concentração de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, quando associada a concentrações de 0, 0,056 e 5,6 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, reduziu a massa seca de plântulas.

Segundo Franco (2004), o aumento das quantidades tanto de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e de ZnSO<sub>4</sub> provocaram aumento da massa seca das raízes de plantas de crisântemo. Este resultado evidencia que além de ter função na síntese do triptofano, precursor do AIA, o Zinco também tem função no metabolismo do desenvolvimento das raízes.

As pesquisas desenvolvidas sobre esse tema têm demonstrado que a não utilização do boro provoca atraso do desenvolvimento da raiz, devido possivelmente às alterações nos padrões de translocação de carboidratos para as raízes, as quais não dispõem de substratos para crescer. Portanto, a adição de boro, aumenta a translocação de açúcares, levando a um maior desenvolvimento

das raízes, conseqüentemente aumentando a matéria seca total (Andrew, 1962; Sarin & Sadgopal, 1965; Hull & Lermann, 1972; Venter & Currier, 1977).

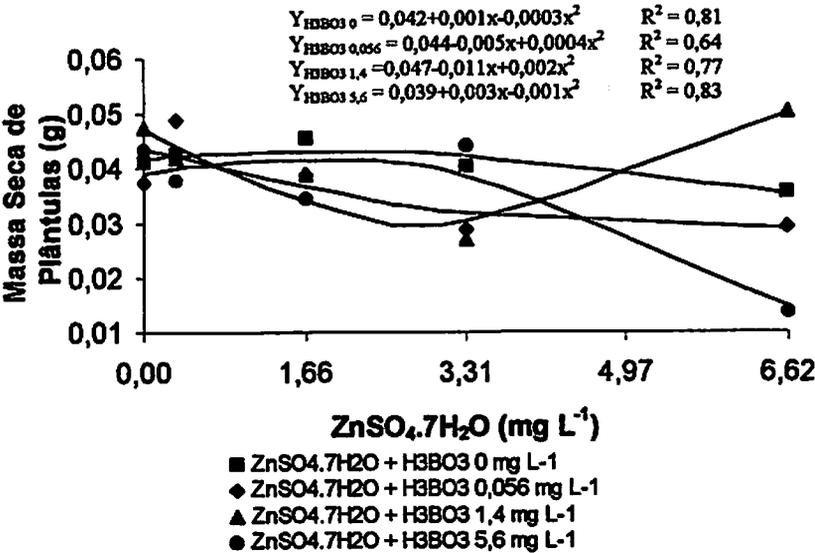


FIGURA 6. Massa seca de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e zinco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

## 4.2 Boro ( $H_3BO_3$ ) e Manganês ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ) no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii*.

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão apresentados na Tabela 3. Observa-se que para todas as variáveis a interação entre os micronutrientes foi significativa.

TABELA 3. Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento das raízes (CR), altura da parte aérea (APA), massa fresca de plântulas (MFP) e massa seca de plântulas (MSP).

Fontes de Variação	Quadrados Médios						
	GL	NF	NR	CR	APA	MFP	MSP
B	4	16,604**	33,800**	3,870**	12,443**	9,192**	8,453**
Zn	4	13,135**	3,305*	10,093**	5,695**	10,703**	6,619**
B x Zn	16	3,288**	4,924**	3,623**	7,015**	10,073**	7,504**
Resíduo	74	1	1	1	1	1	1

\*\* , \* significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

### 4.2.1 Número de folhas

Graficamente o efeito das concentrações  $H_3BO_3$  e  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  no número de folhas encontra-se apresentado na Figura 7. Maior número de folhas (6,8) foi obtido na ausência de  $H_3BO_3$  e  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ . O incremento da concentração de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  na ausência de  $H_3BO_3$  promoveu diminuição no número de folhas das plântulas até o valor de 5,18 folhas, quando se utilizaram 18 mg  $L^{-1}$  de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ; porém, concentrações superiores a esta proporcionaram um aumento dessa variável, provavelmente devido ao desbalanço nutricional causado por esses nutrientes. Observou-se ainda que concentrações acima de 30 mg  $L^{-1}$  de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  podem proporcionar um incremento no número de folhas. Torna-se necessário a repetição do

experimento com concentrações superiores a 30 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O para verificação desse comportamento.

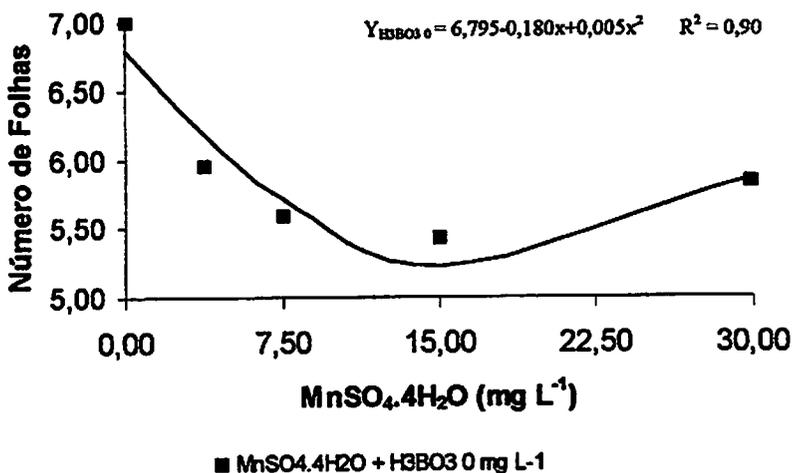


FIGURA 7. Número de folhas de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e manganês. UFLA, Lavras – MG, 2005.

#### 4.2.2 Número de raízes

Analisando-se o efeito das concentrações de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O no número de raízes (Figura 8), observou-se que a utilização de 2,8 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> na ausência de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, promoveu a formação de maior número de raízes (5,02). Nessa mesma concentração de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e em concentrações superiores a 30 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O constatou-se um aumento no número de raízes. Para confirmação deste comportamento, é necessário repetir o experimento utilizando-se concentrações superiores a 30 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O.

Pode-se observar que houve um aumento no número de raízes (4,8) na concentração de 1,4 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> combinada com 16,33 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, após o qual houve redução. Outra redução dessa variável pode ser

observada com o incremento das concentrações de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  na ausência de  $H_3BO_3$ . Essa redução foi causada provavelmente por distúrbios nutricionais em função da adição desses sais.

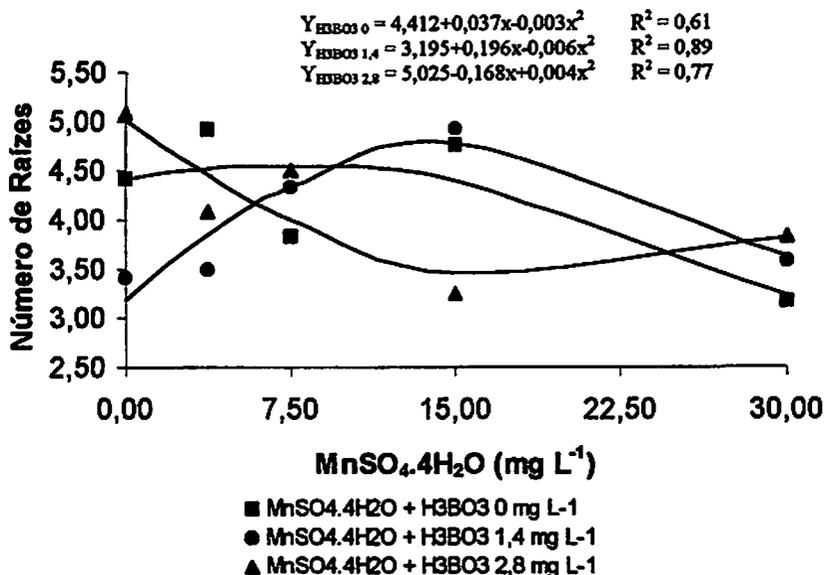


FIGURA 8. Número de raízes de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e manganês. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Esses resultados estão de acordo com Araujo (2004a) o qual, trabalhando com diferentes meios de cultura, também detectou um menor número de raízes quando foi usado o meio Knudson C. Isto possivelmente pode ser explicado pelo fato dos outros meios de cultura possuírem maior quantidade de sais minerais em relação ao Knudson C.

Jacob & Uexkull (1960) enfatizam o fato de ser o boro particularmente necessário nos processos que envolvem ativação da divisão celular, sendo pois de grande importância na regeneração das raízes.

### 4.2.3 Comprimento das raízes

Maior comprimento das raízes (3,96) foi obtido em plântulas quando se adicionou, ao meio de cultura,  $H_3BO_3$  na concentração de  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  combinada com  $19,13 \text{ mg L}^{-1}$  de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (Figura 9). A partir desse ponto houve redução, provavelmente devido ao desbalanço nutricional. Já o incremento da concentração de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  associada a  $5,6 \text{ mg L}^{-1}$  de  $H_3BO_3$ , promoveu aumento no comprimento das raízes de plântulas de forma linear.

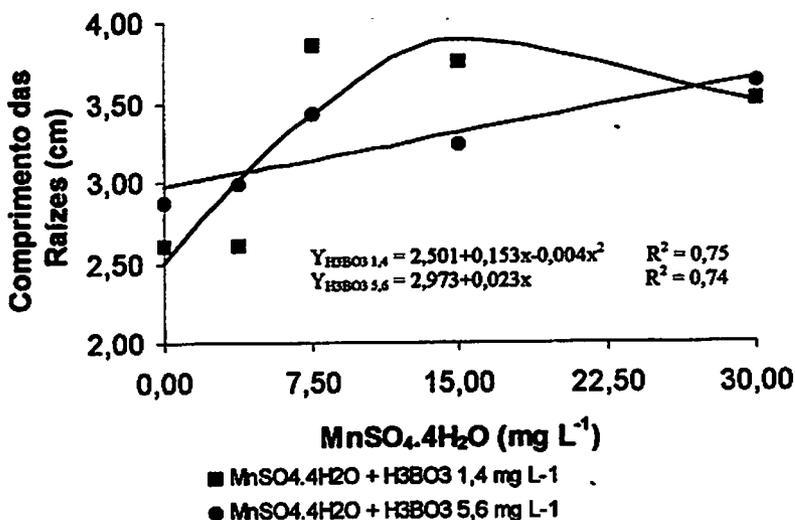


FIGURA 9. Comprimento de raízes de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e manganês. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Esses resultados mostram a importância em se estabelecer um novo protocolo otimizando o meio de cultura Knudson C, visando ao crescimento adequado de plântulas de orquídea. Melhores resultados de comprimento de raiz foram verificados, com a utilização de 100% de meio KC, por Araujo (2004a). A partir de 143% de meio KC houve diminuição do comprimento radicular,



mostrando mais uma vez uma redução ocasionada provavelmente por um desbalanço nutricional.

Jarvis (1983) observou que a presença de boro diminui o teor de AIA livre em raízes de trigo e milho. O boro tem a função de aumentar a atividade da enzima AIA-oxidase, sendo esta substância responsável pela degradação da principal auxina indutora do enraizamento (AIA).

#### 4.2.4 Altura da parte aérea

Melhores resultados para altura da parte aérea (4,1 cm) foram obtidos com a utilização de  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e  $15,3 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Figura 10), a partir do qual houve redução.

Observou-se que incrementos nas concentrações de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  adicionadas ao meio Knudson C na ausência de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , proporcionou diminuição na altura de plântulas de *C. loddigesii* de forma linear. Estas reduções foram provavelmente devido a um desbalanço nutricional do meio de cultura empregado.

De acordo com Araujo (2004a), maior comprimento da parte aérea foi observado quando se utilizou o meio Knudson na concentração de 121%. Entretanto, com metade da concentração do meio Knudson, os resultados foram bem semelhantes, não justificando a utilização de um meio mais concentrado, mas a redução do mesmo à sua metade.

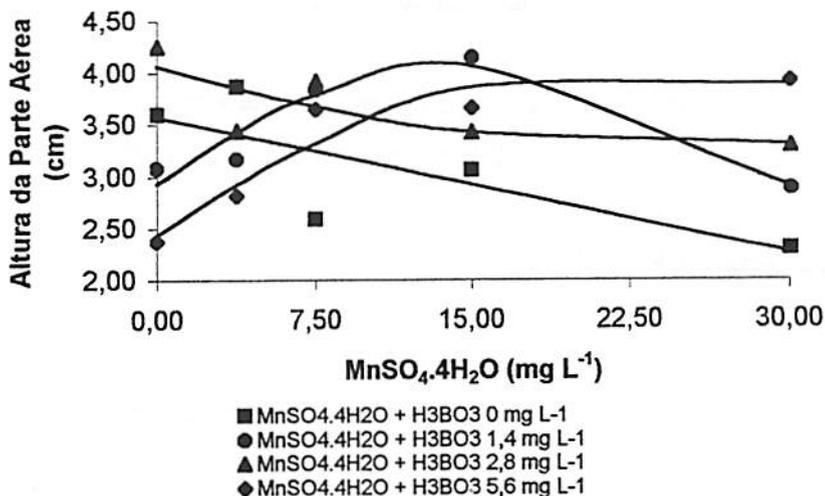


FIGURA 10. Altura de parte aérea de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e manganês. UFLA, Lavras – MG, 2005.

#### 4.2.5 Massa fresca de plântulas

Observou-se que o maior peso de plântulas (0,59 g) foi verificado com a utilização de 2,8 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> na ausência de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (Figura 11). Porém, resultados semelhantes foram obtidos para essa variável (0,57 g) na concentração de 1,4 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> combinada com 16,3 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O. Menores valores dessa variável (0,21 e 0,23 g) foram encontrados quando da utilização de 30 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O na ausência de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e 1,4 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> na ausência de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O.

Na ausência de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e com o incremento da concentração de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O houve uma redução no peso de plântulas de forma linear, provavelmente devido a um desbalanço desses nutrientes no meio de cultura usado.

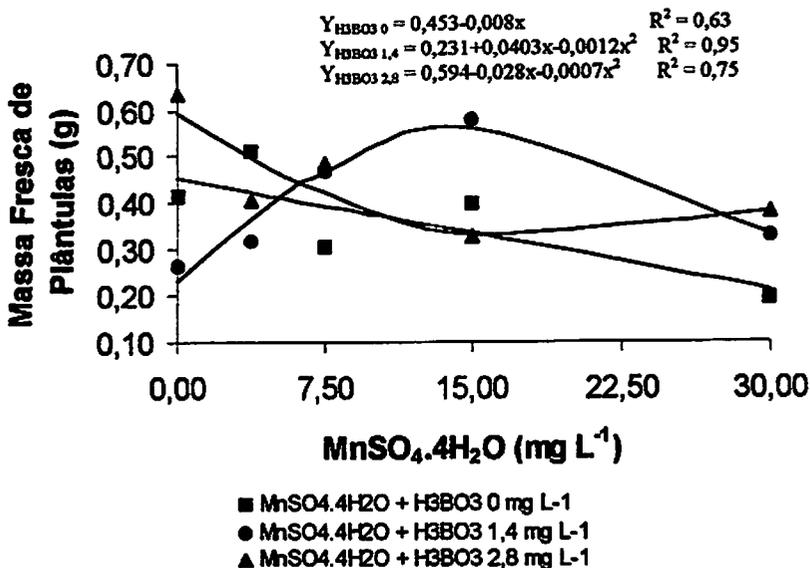


FIGURA 11. Massa fresca de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e manganês. UFLA, Lavras – MG, 2005.

De acordo com Araujo (2004a), menor peso de plântulas de orquídea foi obtido em meio Knudson C quando comparado a outros meios de cultura (MS e WPM). Isso implica a necessidade de se adequar o meio de cultura KC na micropropagação de orquídeas.

Ono et al. (1992), trabalhando com estacas de Camélia, observaram que o boro influenciou a matéria fresca total, aumentando esses valores.

#### 4.2.6 Massa seca de plântulas

Resultados semelhantes à massa fresca de plântulas podem ser observados na massa seca, onde na concentração de 2,8 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e ausência de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, a maior massa seca (0,053 g) foi observada (Figura 12). Entretanto, resultados semelhantes podem ser observados (0,047 g) na concentração de 1,4 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e 15,45 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O. Para

menores valores dessa variável, resultados semelhantes são observados com a utilização de  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  na ausência de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  na ausência de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

Houve uma redução no peso de plântulas de forma linear, na ausência de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e com o incremento da concentração de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , provavelmente devido a um desbalanço nutricional.

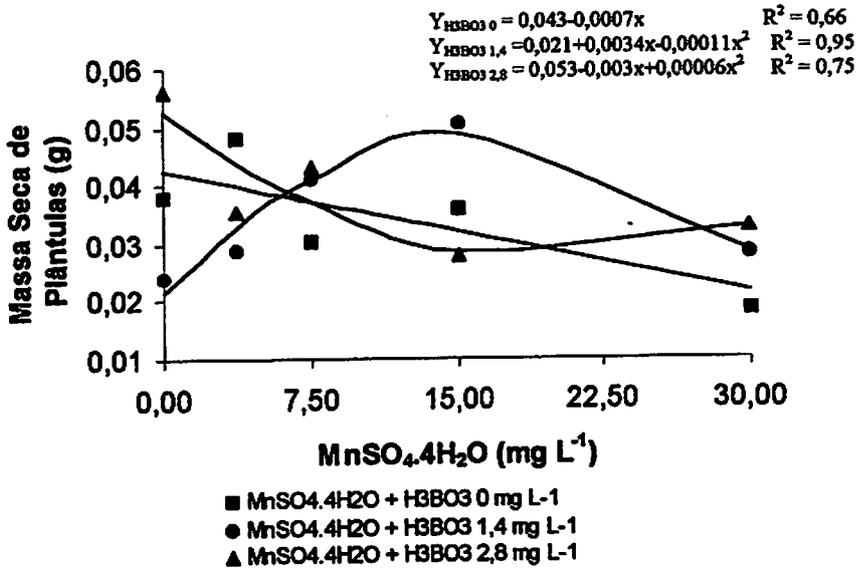


FIGURA 12. Massa seca de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* em função de boro e manganês. UFLA, Lavras – MG, 2005.

De acordo com Diniz et al. (1999), a quantidade de Mn extraída pelos explantes de bananeira aumentou com o tempo de cultivo, graças ao aumento de produção de matéria seca. Empregando-se as concentrações de B nos explantes inteiros e nas diferentes partes destes, foram maiores nos primeiros períodos de cultivo, e diminuíram em função do tempo.

### 4.3 Polpa de banana nanica e água de coco no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* 'Grande' x *Cattleya loddigesii* 'Alba'

#### 4.3.1 Número de folhas

Através do teste de F apenas as concentrações de 50, 100 e 150 mL de água de coco e concentrações de banana apresentaram significância. Maior número de folhas (8,36/plântula) foi observado quando se adicionaram 100 mL de água de coco ao meio Knudson C na ausência da polpa de banana nanica. As concentrações de 50 e 150 mL tiveram resultados inferiores (7,5 e 7,66 respectivamente) também na ausência da polpa de banana. Concentrações crescentes de polpa de banana ao meio de cultura promoveram redução linear na quantidade de folhas emitidas pelo explante (Figura 13). A polpa de banana juntamente com a água de coco pode ter desequilibrado os nutrientes do meio, desfavorecendo a emissão de folhas das plântulas de orquídea.

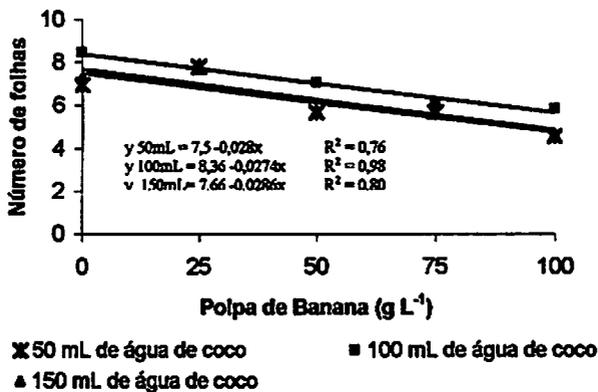


FIGURA 13. Número de folhas de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Grande' x *Cattleya loddigesii* 'Alba' cultivadas em meio Knudson com polpa de banana nanica e água de coco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

### 4.3.2 Número de raízes

Houve significância na interação entre as concentrações de polpa de banana nanica e água de coco. Porém, por meio do teste F, somente as concentrações de 50 e 200 mL de água de coco foram significativas em relação à polpa de banana (Figura 14).

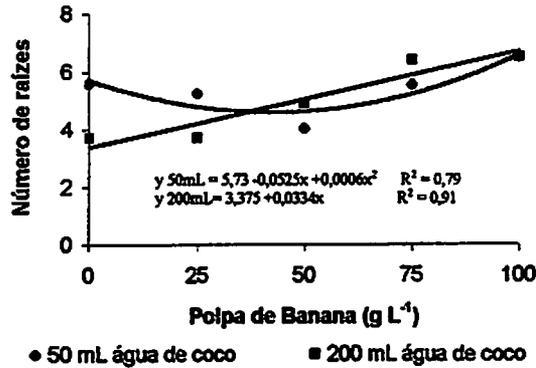


FIGURA 14. Número de raízes de plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio Knudson com polpa de banana nanica e água de coco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

O maior número de raízes (6,5) foi verificado com a utilização do meio de cultura Knudson C acrescido de 50 ou 200 mL de água de coco combinado com 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana nanica, enquanto que na ausência de polpa de banana foram obtidas respostas inferiores (Figura 14).

O aumento das concentrações de polpa de banana nanica influenciou positivamente na formação de raízes. (6,5) quando se utilizaram 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana nanica combinado com 200 mL de água de coco. Porém, com a utilização de 75 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana e 200 mL de água de coco, o número de raízes foi de 6,4. A diferença observada foi de 0,1, não se justificando a

utilização de um meio de cultura com maior quantidade de polpa de banana nanica.

Song et al. (1999), analisando o enraizamento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl, em diferentes meios de cultura, verificaram que a formulação (Adubo Peters®- 3 g L<sup>-1</sup>; 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 60 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana) proporcionou maior número de raízes.

#### 4.3.3 Comprimento da maior raiz

Para a variável comprimento da maior raiz houve significância apenas para os níveis de polpa de banana nanica. Verificaram-se melhores respostas (3,9 cm) com a adição de 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana ao meio Knudson (Figura 15).

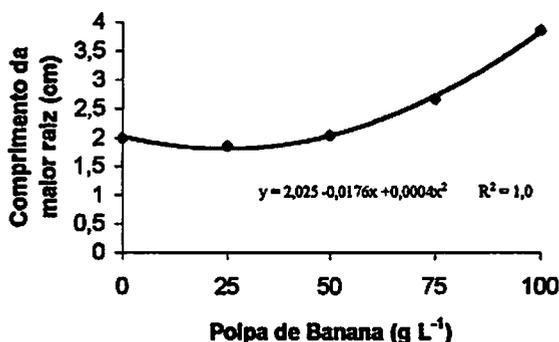


FIGURA 15. Comprimento da maior raiz em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio Knudson com polpa de banana nanica e água de coco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

A polpa de banana nanica pode promover diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, tais como espessamento e/ou crescimento de raízes, dependendo da cultivar e da quantidade de polpa utilizada (Torres & Barbosa, 2001).

#### 4.3.4 Comprimento da parte aérea

Para essa variável houve significância apenas para os níveis de polpa de banana nanica. Observou-se maior comprimento da parte aérea (5,12 cm) em meio Knudson C suplementado com 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana (Figura 16).

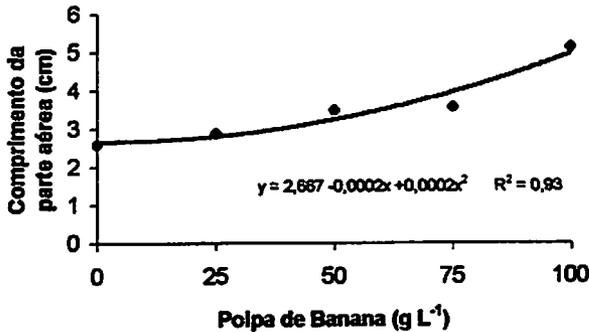


FIGURA 16. Comprimento da parte aérea em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio Knudson com polpa de banana nanica. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Estudando o efeito de diferentes meios de cultura, água de coco e carvão ativado na propagação *in vitro* de meristemas das plantas de *Epidendrum* sp. e *Dendrobium* sp. Simões et al. (1999) observaram maior crescimento quando acrescentaram-se 100 mL L<sup>-1</sup> de água de coco ao meio Knudson C.

Song et al. (1999).constatarem que o crescimento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl, em diferentes meios de cultura e quando foi empregada a formulação (Adubo Peters® - 3 g L<sup>-1</sup>; 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 60 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana), mencionaram ser este o meio de cultura mais eficiente para o desenvolvimento da altura das plântulas.

#### 4.3.5 Massa fresca de raízes

Houve significância apenas para o fator concentração de polpa de banana nanica. À medida que se acrescentou a polpa de banana ao meio Knudson, aumentaram a quantidade e conseqüentemente a massa fresca de raízes (Figura 17).

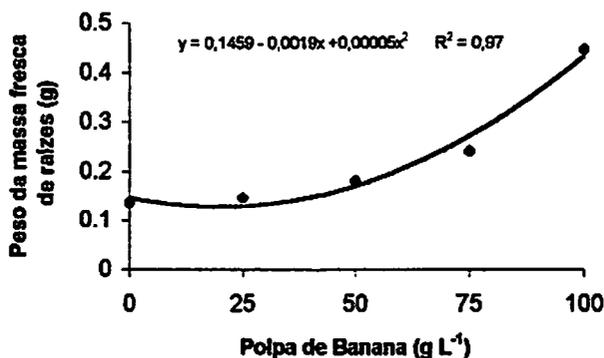


FIGURA 17. Massa fresca de raízes de plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio Knudson com diferentes concentrações de polpa de banana nanica. UFLA, Lavras – MG, 2005.

#### 4.3.6. Massa fresca da parte aérea

A interação entre os níveis de polpa de banana nanica e água de coco foi significativa. Os melhores resultados para esta variável foram observados com a utilização de 200 mL de água de coco combinado com 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana. O incremento das concentrações de polpa de banana promoveu aumento na massa fresca da parte aérea (Figura 18).

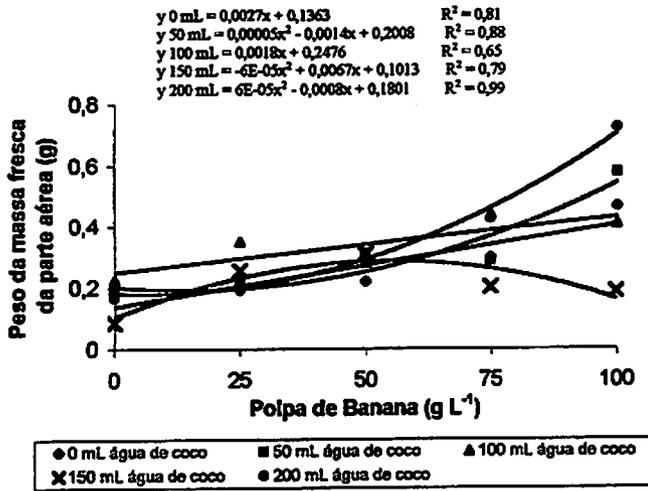


FIGURA 18. Massa fresca da parte aérea de plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio Knudson com água de coco e polpa de banana nanica. UFLA, Lavras – MG, 2005.

As concentrações de polpa de banana nanica incorporada ao meio Knudson influenciaram o desenvolvimento de maneira significativa. Como a relação foi direta, pode-se inferir que o efeito benéfico da polpa de banana no comprimento da maior raiz, no comprimento da parte aérea e na massa fresca de raízes e da parte aérea, continuaria para concentrações superiores a  $100 \text{ g L}^{-1}$  de polpa de banana.

Esse efeito foi provavelmente devido à composição da polpa de banana nanica, variável em aminoácidos, vitaminas e reguladores de crescimento. A adição de polpa de banana aumenta o número de brotos no cultivo de plântulas de orquídeas *in vitro* (Arditti & Ernst, 1993). Também promove diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, tais como espessamento do sistema radicular, desenvolvimento da parte aérea e emissão de brotos adventícios (Torres & Barbosa, 2001).

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 (Knudson, 1946).

De modo geral, a capacidade tamponante dos meios nutritivos é baixa. O acréscimo de água de coco, por sua vez, aumenta essa capacidade tamponante (Caldas et al., 1998) sendo, provavelmente, uma das causas da maior produção de massa fresca da parte aérea e maior número de folhas. Outro fator importante para explicar os resultados obtidos seria possivelmente a presença de aminoácidos e citocininas na água de coco.

Experimentos futuros deverão ser realizados, utilizando-se concentrações maiores de polpa de banana nanica, para definir a concentração ideal para a indução de melhor crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea.

#### 4.4 GA<sub>3</sub> e número de explantes no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddgesii*

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), comprimento da maior raiz (CMR), comprimento médio da parte aérea (CMPA), peso da matéria fresca de raiz (PMFR), peso da matéria fresca da parte aérea (PMSPA), peso da matéria seca de raiz (PMSR) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA).

Fontes de Variação	Quadrados Médios							
	GL	NF	CMR	CMPA	MFR	MFPA	MSR	MSPA
GA <sub>3</sub>	4	2129.30*	3.085	14.1128	0.5046*	0.4251	0.0047**	0.0071
Número de plantas	3	26082.10*	2.969	10.5036	0.8108**	20.1970**	0.0027**	0.0572*
GA <sub>3</sub> x N <sup>o</sup> plantas	12	4468.90	11.628	10.5671**	0.4646	1.1106	0.0012	0.0857
Resíduo	60	12580.50	45.86	18.5674	2.3615	6.4443	0.0039	0.3443
CV	-	20.45	36.98	16.16	87.66	26.19	41.91	81.32

\*\* , \* significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

##### 4.4.1 Número de folhas

A variável número de folhas apresentou significância apenas com o fator número de plântulas (Figura 19). Maior número de folhas (93,95) foram obtidos com a utilização de 12 plântulas/frasco. Esses resultados evidenciam que a utilização do meio de cultura sem a adição de

reguladores de crescimento foi suficiente para incrementar o número de folhas.

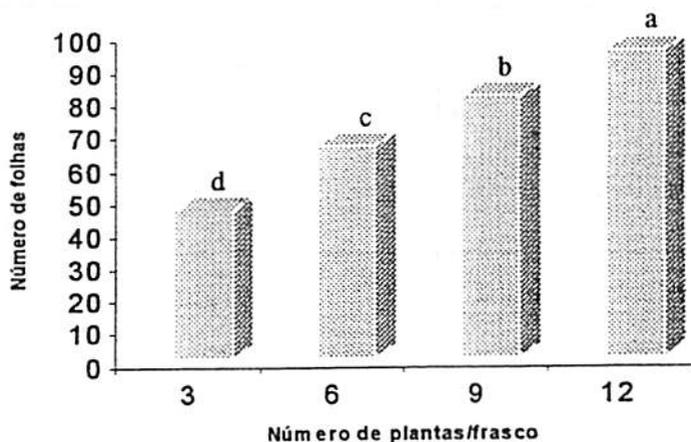


FIGURA 19. Número de folhas de plântulas de *Cattleya loddgesii* cultivadas em diferentes concentrações de  $GA_3$ . UFLA, Lavras – MG, 2005.

Segundo Caldas et al. (1998), algumas substâncias orgânicas, como o ácido giberélico, são degradadas pelo calor e precisam ser esterilizadas em filtros especiais do tipo Millipore. No presente trabalho, o ácido giberélico foi esterilizado por autoclavagem, o que poderá ter causado uma diminuição no seu efeito.

#### 4.4.2 Comprimento médio da parte aérea

Houve significância da interação entre número de plântulas e doses de  $GA_3$ . Os melhores resultados para a variável em questão foram observados com a utilização de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  e 12 plântulas de orquídea por frasco. O

incremento das concentrações de GA<sub>3</sub> promoveu aumento do comprimento da parte aérea (Figura 20).

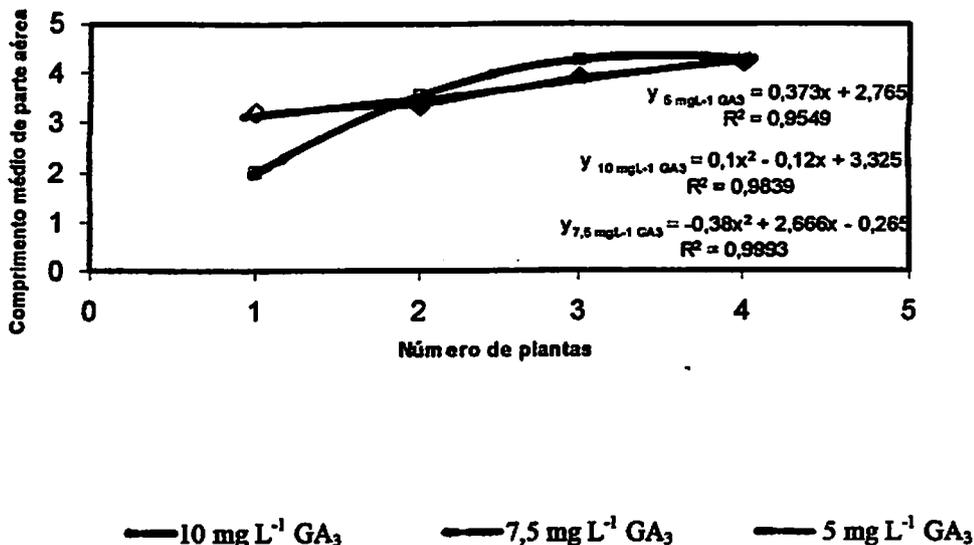


FIGURA 20. Efeito de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> no comprimento médio da parte aérea de plântulas de orquídea *Cattleya loddgesii*. UFLA, Lavras – MG, 2005.

A incorporação das concentrações de GA<sub>3</sub> ao meio Knudson influenciou no desenvolvimento da parte aérea de maneira significativa.

#### 4.4.3 Peso da matéria fresca da raiz

Para essa variável não houve interação significativa; contudo, houve significância na análise dos fatores isolados. Observando-se as Figuras 21 e 22, constatou-se que o maior peso da matéria fresca da raiz (0,58) foi obtido com a utilização de 12 plântulas de orquídea por frasco. As demais obtiveram resultados intermediários.

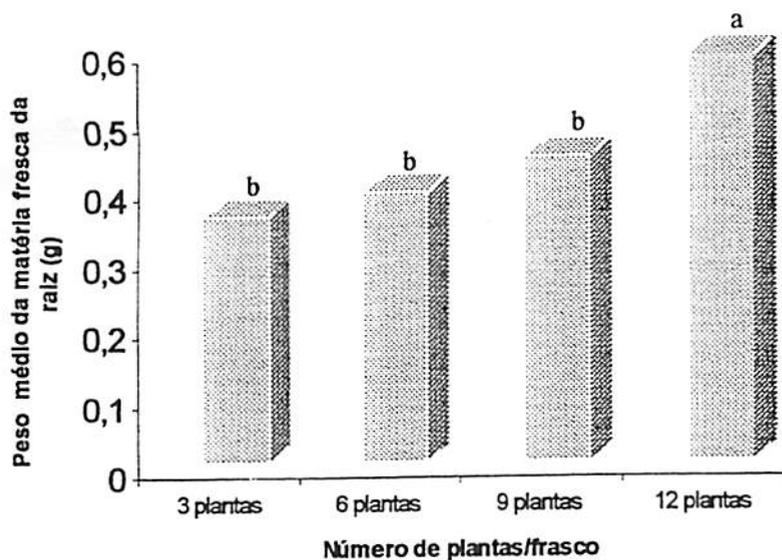


FIGURA 21. Peso da matéria fresca da raiz de plântulas de *Cattleya loddgesii* cultivada em diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras – MG, 2005.

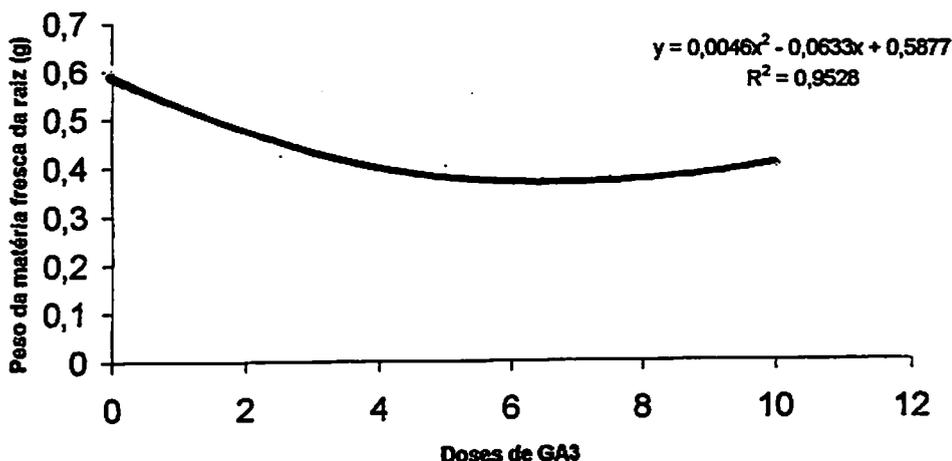


FIGURA 22. Efeito de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> no peso da matéria fresca da raiz de plântulas de *Cattleya loddgesii*. UFLA, Lavras – MG, 2005.

O melhor resultado para o peso da matéria fresca de raiz foi obtido na ausência de GA<sub>3</sub>. O aumento nas concentrações desta giberelina ocasionou uma redução no peso até a concentração de 7,5 mg.L<sup>-1</sup>. A partir desta concentração ocorreu um relativo aumento no peso fresco da raiz.

Muitas pesquisas têm evidenciado a existência de respostas diferentes entre espécies e variedades da mesma planta quanto à utilização de reguladores de crescimento. Isso possivelmente pode ser devido ao balanço endógeno entre auxinas/citocininas, pois um equilíbrio da relação em favor das citocininas provoca o início do desenvolvimento das brotações, o que acarreta o aumento de peso.

#### 4.4.4 Peso da matéria fresca da parte aérea

Para a variável peso da matéria fresca da parte aérea, apenas houve significância para o fator número de plantas. Observou-se maior peso da matéria fresca (1,91) com a utilização de 12 plântulas de orquídea por frasco (Figura 23).

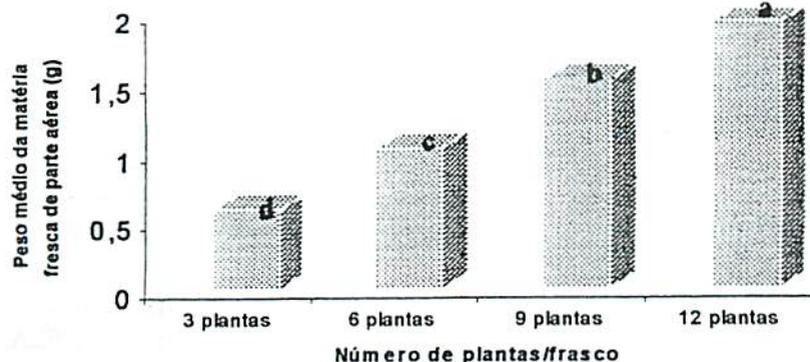


FIGURA 23. Efeito de diferentes concentrações de  $GA_3$  no peso da matéria fresca da parte aérea de plântulas de orquídea *Cattleya loddgesii*. UFLA, Lavras – MG, 2005.

#### 4.4.5 Peso da matéria seca da raiz

Não houve interação significativa, para a variável peso da matéria seca de raiz, apenas houve significância na análise dos fatores isolados. Ao analisar os resultados obtidos, verificou-se que plântulas da orquídea *C. loddgesii* apresentaram maior peso da matéria seca da raiz (0,0279g) com a utilização de 12 plântulas por frasco. As demais obtiveram resultados inferiores (Figura 24).

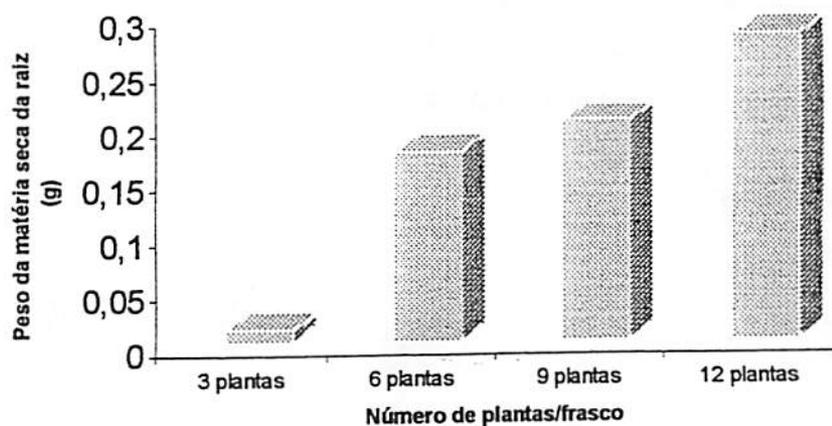


FIGURA 24. Peso da matéria seca da raiz de plântulas de *Cattleya loddgesii* comparado com o número de plântulas por frasco. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Para o fator doses de  $GA_3$ , o melhor resultado obtido para o peso da matéria seca da raiz ocorreu na ausência dessa giberelina. O aumento nas concentrações de  $GA_3$  proporcionou uma redução no peso da matéria seca da raiz e que permaneceu até a última dose utilizada (Figura 25).

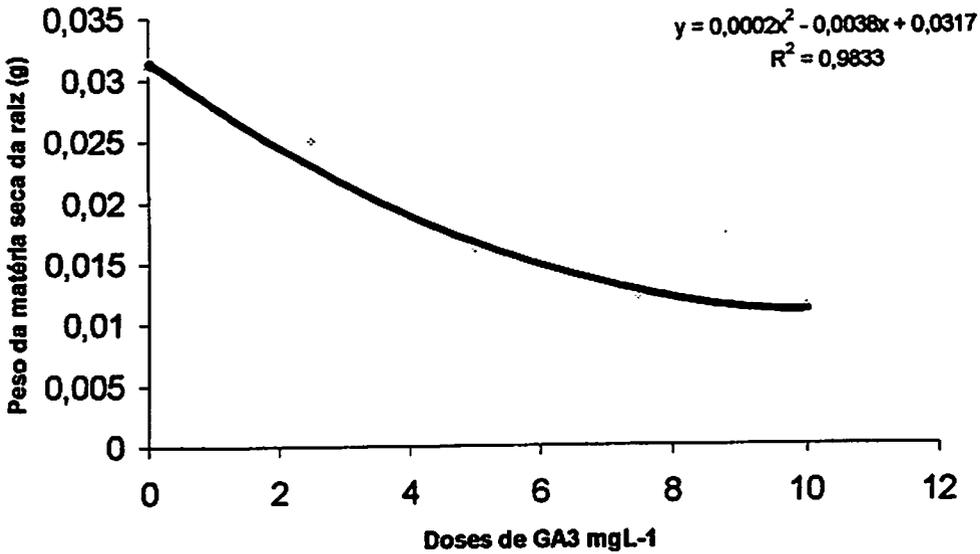


FIGURA 25. Peso da matéria seca da raiz de plântulas de *Cattleya loddgestii* cultivadas sob diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras – MG, 2005.

#### 4.4.6 Peso da matéria seca da parte aérea

Para a variável peso da matéria seca da parte aérea houve significância apenas para o fator número de plantas de orquídea. Observou-se maior peso (0,3635g) com o emprego de 12 plântulas por frasco. Com o uso de nove e seis plântulas por frasco obtiveram-se resultados intermediários, enquanto que com o uso de três plântulas por frasco obtiveram-se resultados inferiores às demais concentrações empregadas (0,2163g) (Figura 26).

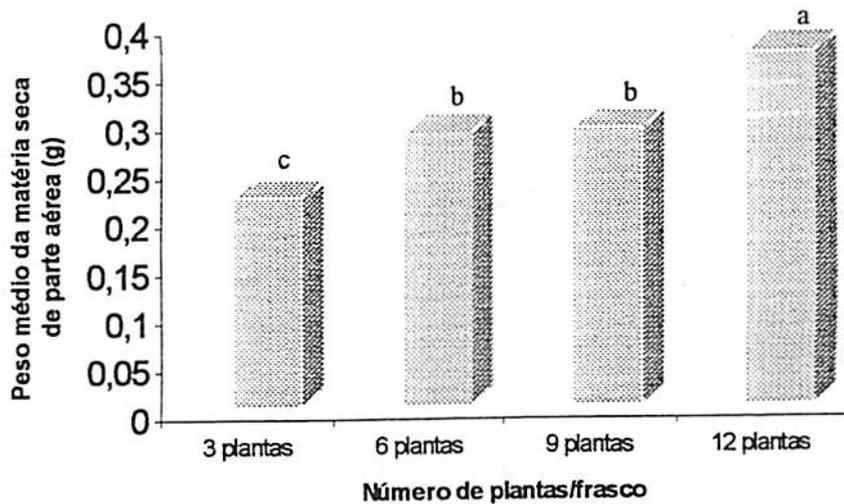


FIGURA 26. Efeito de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> no peso da matéria seca da parte aérea de plântulas de orquídea *Cattleya loddgesii*. UFLA, Lavras – MG, 2005

## 5 CONCLUSÕES

A utilização de  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido bórico,  $6,62 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de zinco e  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de manganês ao meio Knudson, proporcionou melhor crescimento *in vitro* de plântulas da orquídea *Cattleya loddigesii*.

A adição de  $100 \text{ g L}^{-1}$  de polpa de banana nanica, promoveu o maior comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz e massa fresca de raízes e quando combinada com 50 e 200 mL de água de coco, proporcionou melhores resultados para o número de raízes e massa fresca da parte aérea, respectivamente.

Para plântulas resultantes do cruzamento de *Cattleya loddigesii* 'Grande' x *Cattleya loddigesii* 'Alba', a adição de 100 mL de água de coco e na ausência de polpa de banana nanica, resultou no maior desenvolvimento de folhas.

Quando foram utilizadas 12 plântulas da orquídea *Cattleya loddigesii* por frasco e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , foram obtidos os melhores resultados para as variáveis: número de folhas, peso de matéria fresca da parte aérea e peso da matéria fresca de raiz.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, L. S. Ribonucleic acid content, boron deficiency. Symptoms, and elongation of tomato root tips. *Plant Physiology*, Rockville, v. 40, n. 4, p. 649-652, Apr. 1965.
- LTAFIN, V. L.; MENEZES, M. O.; LIMA, F. R. R.; PITOMBO, L. M. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal.** Espírito Santo do Pinhal, 2002. 14 p. (Boletim Técnico ; n. 7).
- ANDRADE, L. M. da C. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 1998. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ANDREW, C. S. Influence of nutrition on nitrogen fixation and growth of legumes. *Commonwealth Bureau Pastage Federation Crops Bulletin*, Farnham Royal, v. 46, p. 130-146, 1962.
- ARAUJO, A. G. de. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea.** 2004a. 73 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ARAUJO, D. de. Cultivo de Orquídeas – *Cattleya*, as mais belas orquídeas brasileiras. *Revista Brasil Orquídeas*, Brasília, v. 3, n. 8, p. 18-26, jan./mar. 2004b.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids.** New York: John Wiley, 1993. 682 p.
- 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/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 87-132.
- CAMARGO, P. N. de. **Princípios de nutrição foliar.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 118 p.
- CARDOSO, E. P. **Efeito da adubação com sulfato de zinco e gesso na produção e qualidade de grãos de arroz de sequeiro (*Oryza sativa* L.).** 1994. 34 p. Dissertação (Mestrado) – Escola superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

CHEAD, K. T.; SAGAWA, Y. *In vitro* propagation of *Aranda wendy* Scott and *Aranthera james* Storei. *HortScience*, Alexandria, v. 13, n. 6, p. 661-662, Dec. 1978.

DECHEN, A. R.; HAAG, H. P.; CARMELLO, Q. A. de C. Micronutrientes na planta. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. da (Ed.). *Micronutrientes na Agricultura*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1991. p. 65-78.

DINIZ, J. D. N.; FERNANDEZ, F. F. F.; GONÇALVES, A. N.; TORRES, A. C. Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 34, n. 8, p. 1385-1391, ago. 1999.

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

EPSTEIN, E. *Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas*. São Paulo, 1975. 344 p.

FAQUIN, V. *Nutrição mineral de plantas*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 182 p.

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.

FRANCO, J. C. C. *Micropropagação do crisântemo: ácido bórico e sulfato de zinco*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 21 p.

GAUCH, H. G.; DUGGER, W. M. The role of boron in the translocation of sucrose. *Plant Physiology*, Rockville, v. 28, n. 3, p. 457-466, Mar. 1953.

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

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

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-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

HEMBERG, T. Rooting experiments with hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* L. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 4, n. 2, p. 358-369, Feb. 1951.

HERNANDEZ, R. J. M. Efeito da aplicação de fosfato monoamônico e sulfato de zinco sobre a nutrição mineral do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em condições de dois níveis de saturação por bases. 1998. 131 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

HOEHNE, F. C. **Iconografia de orchidaceas do Brasil**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, 1949. 300 p.

HULL, R. J.; LERMANN, S. L. Photosynthate distribution in boron deficient bean leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 49, n. 1, p. 22, jan. 1972.

JACOB, A.; UEXKULL, H. V. **Fertilizer use, nutrition and manuring of tropical crops**. 2. ed. Hannover: Verlagsge-sellschaftur Acharbau, 1960. 230 p.

JARVIS, B. C. Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cuttings. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 95, n. 4, p. 509-518, 1983.

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.

KOMATUDA, C. R. N. **Comportamento de variedades de soja (*Glycine max* (L.) (Merril) em condições de deficiência ou excesso de manganês em solução nutritiva**. 1988. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

KUPPER, A. et al. Efeito do zinco, aplicado no solo em cobertura, na forma de sulfato e de óxido de zinco, sobre o cafeeiro – nota prévia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEIRAS, 7., 1979, Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/Gerca, 1979. p. 295-297.

LEWIN, J.; REIMANN, B. E. F. Silicon and plant growth. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p. 289-304, 1969.

**MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.**

**MALAVOLTA, E. Micronutrientes na adubação. [S. l.]: Nutriplant Indústria e Comércio, 1986. 70 p.**

**MALAVOLTA, E. Os nutrientes. In: \_\_\_\_\_. Manual de química agrícola: Nutrição de plantas e fertilidade do solo. São Paulo: Ceres, 1976. p. 413-448.**

**MARIANO, E. D. Resposta, níveis críticos e eficiência de extratores para boro em feijoeiro cultivado em solos de várzea. 1998. 82 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

**MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p.**

**MIDDLETON, W.; JARVIS, B. C.; BOOTH, A. The boron requirement for roots development in stem cutting of *Phaseolus aureus* Roxb. *New Phytology*, Cambridge, v. 81, n. 2, p. 287, 1978.**

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

**ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; RODRIGUES, S. D. Interações entre auxinas e boro no enraizamento de estacas de camélia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 4, n. 2, p. 107-112, dez. 1992.**

**PASQUAL, M. et al. Meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 127 p.**

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

**PASQUAL, M. Propagação de plantas ornamentais. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 80 p.**

**PIERIK, R. L. M. *In vitro* culture of higher plants. 2. ed. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1989. 344 p.**

**RAMAIAH, P. K.; RAO, M. R. V.; CHOKHANNA, N. G. Zinc deficiency and the amino ácido of coffe leaves (*Coffea arabica*, L.). *Turrialba*, Turrialba, Costa Rica, v. 14. n. 3, p. 136-139, jul./set. 1964.**

- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 4. ed. São Paulo: Globo, 1997. 359 p.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 728 p.
- REINERT, R. A.; MOHR, H. C. Propagation of *Catleya* by tissue culture of lateral bud meristems. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, New York, v. 91, p. 664-671, Dec. 1967.
- SARIN, M. N.; SADGOPAL, A. Studies on the effect of boron deficiency in tomato seedlings. I. Growth and anatomical responses. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v. 8, n. 2, p. 119- 129, 1965.
- SAS INSTITUTE SAS/ STAT. SAS/GLM. Software: usage and reference version 6. 12. Cary, 1990. 501 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.
- SONG, M. K. R.; SILVA, G. L.; FARIA, R. T.; TAKAHASHI, L. S. A. Análise do crescimento e enraizamento *in vitro* de híbridos de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) semeados em diferentes meios de cultura. In CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., 1999, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal- SP, 1999. p. 110.
- TORRES, A. C. et al. Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 2001. 20 p. (EMBRAPA-CNPq. Circular Técnica).
- TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R. Condições de incubação para cultura *in vitro*. ABCTP Notícias, Recife, p. 1-7, 2001.
- TSUI, C. The role of zinc in auxin synthens in the tomato plant. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 35, n. 3, p. 172-180, Mar. 1948.
- TWYFORD, I. T.; WALMSLEY, D. The status of some micronutrients in healthy robusta banana plants. **Tropical Agriculture**, London, v. 45, n. 4, p. 307-315, Oct./Dec. 1968.

VENTER, H. A.; CURRIER, H. B. The effect of boron deficiency callose formation and C<sup>14</sup> translocation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 64, n. 7, p. 861-865, Aug. 1977.

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.