

**UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

DISSERTAÇÃO

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CATLEIAS NATIVAS
DA MATA ATLÂNTICA**

Luana Schneider

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CATLEIAS NATIVAS
DA MATA ATLÂNTICA**

LUANA SCHNEIDER

Sob a orientação do Professor
João Sebastião de Paula Araújo
UFRRJ

e Co-orientação do Professor
Gilmar Roberto Zaffari
EPAGRI e UNIVALI

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de **Mestre**
em Ciências no Curso de Pós-
Graduação em Fitotecnia.

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2014

635.9344

S358p

T

Schneider, Luana, 1989-

Propagação *in vitro* de catlédias nativas da Mata Atlântica / Luana Schneider - 2014.

87 f.: il.

Orientador: João Sebastião de Paula Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Inclui bibliografia.

1. Orquídea - Cultivo - Teses. 2. Orquídea - Propagação *in vitro* - Teses. 3. Flores - Cultivo - Teses. 4. Fitotecnia - Teses. I. Araújo, João Sebastião de Paula, 1969-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

LUANA SCHNEIDER

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**
no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2014.

João Sebastião de Paula Araújo (*DSc*)
UFRRJ
(Orientador)

Ricardo Motta Miranda (*DSc*)
UFRRJ

Cleiton Mateus Sousa (*DSc*)
IF Goiano – Câmpus Ceres

*Dedico aos meus pais Marta e Sérgio Schneider,
às minhas irmãs Larissa e Laiana,
e ao meu amado Luiz Carlos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu amado Luiz Carlos pelo apoio incondicional em todos os momentos, por enxergar muito além dos meus olhos e caminhar ao meu lado pelos trilhos da felicidade plena.

Agradeço ao meu pai pelo exemplo de profissional competente e dedicado. À minha mãe pelos ombros e braços sempre prontos a me acolher. Agradeço a vocês dois por estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas, desde as sensatas até as mais ousadas. Obrigada pelos valores que me passaram e por serem sempre o meu porto-seguro.

Às minhas irmãs pelo carinho constante, mesmo à distância.

Ao Professor João Sebastião de Paula Araújo por ter se mostrado não apenas um excelente orientador, mas um bom amigo. Por confiar na minha capacidade e profissionalismo, por estar sempre por perto, mesmo na distância. Agradeço não só por ter viajado junto comigo nesta jornada, mas por estar ao meu lado desde o início da minha caminhada acadêmica na UFRRJ.

Ao meu co-orientador Professor Gilmar Roberto Zaffari que com sua serenidade e alegria abriu as portas do seu laboratório, dividiu comigo sua sala de aula, me emprestou seus estagiários e mostrou-se um grande mestre e exemplo.

Aos amigos “ruralinos” que foram o melhor presente que o Rio de Janeiro me deu e que levo comigo aonde for: Rhégia, Daiana, Amanda, Fernanda, Luiza, Cassiano, João Paulo e Anderson Amorim. Obrigada por fazerem parte da minha vida e tornarem mais fácil essa caminhada.

Aos companheiros do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFRRJ, Lucas e João Aguilar, pelas longas conversas e incentivos, principalmente no início dessa jornada.

Ao pessoal do Laboratório de Cultivo Celular Vegetal da UNIVALI, Stephanye e Fernando, pela acolhida, ajuda e incentivo.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia por compartilharem ideias, momentos e aprendizados.

E por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

A família Orchidaceae possui cerca de 30.000 espécies espalhadas por quase todo o globo terrestre. Dentre as orquídeas, o grupo das catleias tem grande importância no mercado mundial de flores, sendo que muitas espécies deste grupo são nativas do Brasil. A principal forma de multiplicação destas plantas é através da sementeira *in vitro*. No cultivo *in vitro*, o meio de cultura tem grande influência na resposta dos tecidos, sendo que a composição ideal varia conforme a espécie e o estágio de desenvolvimento. A adição de compostos orgânicos nos meios pode complementar parte ou todo o requerimento nutricional dos tecidos em desenvolvimento. O presente trabalho avaliou o efeito de meios de cultivo alternativos na germinação e no desenvolvimento de espécies de orquídea do grupo *Cattleya* com a realização de dois estudos de caso. No primeiro foi analisado a germinação e a diferenciação de protocormos de *Cattleya intermedia* e *Cattleya warneri* em seis formulações de meio ($\frac{1}{2}$ MS, KC, BG, E, KR e S), nas quais as cinco primeiras também foram avaliadas com a adição de polpa de banana madura, totalizando onze tratamentos testados. Sendo que, a germinação foi obtida através da contagem do número total de protocormos formados e a diferenciação foi avaliada por meio da classificação dos protocormos em diferentes fases. No segundo, estudou-se o desenvolvimento e crescimento dos protocormos de *C. intermedia* para a obtenção de mudas. Para tanto, foram testadas cinco formulações de meios (MS, KC, BG, KR e S), nas quais as quatro primeiras também foram suplementadas com polpa de banana, totalizando nove tratamentos. Quanto ao efeito na germinação, houve diferença significativa entre os meios e o uso da polpa de banana. Observou-se maior formação de protocormos nos meios $\frac{1}{2}$ MS e E enquanto que a maior conversão destes em plântulas ocorreu nos meios KR e E, evidenciando que um meio favorável à germinação pode não ser o mais indicado para o desenvolvimento posterior das plantas. A adição de polpa de banana nos meios reduziu a germinação de sementes, diminuindo a formação de protocormos em todos os meios. Em relação ao crescimento e desenvolvimento dos protocormos, o meio BG proporcionou a melhor resposta, com resultados maiores em todos os parâmetros avaliados, com exceção do número de folhas, seguido pelo meio KR. Houve resposta positiva no aumento do sistema radicular e na massa de raízes das plantas quando cultivadas em meios com adição da polpa de banana. Com base nos resultados do presente trabalho, conclui-se que a suplementação dos meios com polpa de banana é benéfica para o desenvolvimento de protocormos de *C. intermedia*, entretanto, é prejudicial para a germinação das sementes. A germinação de sementes foi melhor nos meios com menor concentração total de solutos, enquanto a formação de protocormos foi melhor nos meios com maior concentração de solutos. Além disso, formulações mais simples como, por exemplo, a base de adubo comercial Kristalon Laranja[®] (KR) ou o Meio Suplemento para Orquídeas B&G[®] (BG) podem não só substituir como também apresentar melhores resultados que meios de cultura complexos como o MS no cultivo *in vitro*. Entretanto, é preciso avaliar o custo dos meios alternativos, pois embora o BG tenha apresentado excelentes resultados esse teve custo mais elevado que os meios tradicionais. Já o meio KR, além de apresentar bons resultados no crescimento das plantas, também apresentou menor custo de elaboração do que o meio MS. O uso de fertilizantes pode reduzir os custos de produção do meio e facilitar o processo de obtenção e preparo, mostrando-se uma alternativa viável na obtenção de mudas *in vitro*.

Palavras-chave: *Cattleya intermedia*, *Cattleya warneri*, meios alternativos, cultivo *in vitro*, propagação.

GENERAL ABSTRACT

The Orchidaceae Family has about 30.000 species spread throughout most of the globe. Among orchids, the group *Cattleya* has great importance in the world flower market. The main form of production of these plants is through *in vitro* assymbiotic germination. During *in vitro* culture, the medium has great influence on the response of the tissue, and its ideal composition varies according to species and stage of development. Addition of organic compounds in the media may supplement in part or wholly nutritional requirements of the growing tissue. This work consists of two study cases evaluating the effects of alternative culture media and the use of banana pulp on germination and development of species of orchid *Cattleya* group. First of all, we analyzed the germination and formation of protocorms of *Cattleya intermedia* and *Cattleya warneri* in six formulations of culture media ($\frac{1}{2}$ MS, KC, BG, E, KR and S), in which the first five were also evaluated with the addition of ripe banana pulp, testing a total of eleven treatments. Germination rate was obtained by counting number of formed protocorms and differentiation was evaluated through classification in five different growing stages. In the second study, we tested the development and conversion of protocorms of *C. intermedia* into plantlets with five *in natura* media formulations (MS, KC, BG, KR and S), in which the first four were also supplemented with banana pulp, totaling nine treatments. As of the effect in germination, formation of protocorms was increased in $\frac{1}{2}$ MS and E media, however most of the conversion of this protocorms into plantlets occurred in the media KR and E, indicating that favorable medium to germination may not be the most suitable for further development of the plants. The addition of banana pulp on seed germination proved detrimental, reducing the formation of protocorms in all media. Regarding development and growing of protocorms, BG medium provided better development of plants, with better results in all parameters, except for the number of leaves, followed by KR medium. There was a positive response to the addition of banana pulp at all media, increasing the length of the root system and root mass plant. Based on the results of this work, we can settle that supplementation of media with banana pulp is beneficial to the development of protocorms of *C. intermedia*, however, it is detrimental to seed germination. Better results for seed germination were achieved in media with lower solute concentration, whereas for protocorm formation better results were obtained in media with higher solute concentration. Also, simpler formulations prepared with commercial fertilizer "Kristalon orange[®]" (KR) or "Supplement to Orchid B&G[®]" (BG) cannot only replace but also provide better results than complex culture media such as MS for *in vitro* culture. However, it is necessary to evaluate costs for alternative media since BG medium has the highest cost of production despite achieving excellent results. On the other hand, KR medium provided good results for plant growing and its cost of production was lower than that of MS medium. Therefore, using fertilizer in media formulation can also reduce production costs of medium and facilitate the process of acquiring and preparing it, thus revealing a viable alternative for the production of seedlings.

Key words: *Cattleya intermedia*, *Cattleya warneri*, alternative culture media, *in vitro* cultive, propagation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inflorescência de <i>Cattleya intermedia</i> (A) e <i>Cattleya warneri</i> (B). Fonte: OrquidaRio	20
Figura 2 - Meios utilizados para germinação de sementes de <i>C. intermedia</i> e <i>C. warneri</i>	22
Figura 3 - Procedimentos para implantação de culturas <i>in vitro</i> de <i>C. intermedia</i> a partir de sementes: cápsula em processo de maturação na planta (A); coleta de sementes a partir de cápsula madura aberta (B); detalhe das sementes (C); desinfestação das sementes com auxílio de seringa (D); produção de solução de sementes (E); deposição de alíquota de solução de sementes no frasco contendo meio de cultura (F); frascos de cultura na sala de crescimento (G)	25
Figura 4 - Morfologia geral e classificação dos estádios de desenvolvimento de protocormos até a formação de plântulas de <i>Cattleya intermedia</i>	26
Figura 5 - Início do processo de germinação de sementes de <i>C. intermedia</i> após 20 dias da inoculação em meio Krystalon Laranja [®] com polpa de banana	27
Figura 6 - Comparação visual da germinação de sementes de <i>Cattleya intermedia</i> em diferentes meios de cultura após 100 dias.....	31
Figura 7 - Seleção dos protocormos de <i>Cattleya intermedia</i> (A), disposição dos protocormos nos frascos no momento da implantação do experimento (B) e frascos de cultivo com meio de cultura / protocormos na sala de crescimento (C)	48
Figura 8 - Meios utilizados para cultivar protocormos de <i>C. intermedia</i>	49
Figura 9 - Comparação visual do desenvolvimento das plantas de <i>C. intermedia</i> após oito meses de cultivo nos meios KC (Knudson C, 1946), KC+b (Knudson C, 1946 + 100 g.l ⁻¹ de polpa de banana), MS (Murashige e Skoog, 1962), MS+b (Murashige e Skoog, 1962 + 100 g.l ⁻¹ de polpa de banana).....	55
Figura 10 - Comparação visual do desenvolvimento das plantas de <i>C. intermedia</i> após oito meses de cultivo nos meios KR (Kristalon Laranja [®]), KR+b (Kristalon Laranja [®] + 100 g.l ⁻¹ de polpa de banana), BG (Suplemento para orquídeas B&G [®]), BG+b (Suplemento para orquídeas B&G [®] + 100 g.l ⁻¹ de polpa de banana).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional da polpa de banana do tipo Nanica por 100g de porção comestível (Fonte: DRONK, 2004).....	7
Tabela 2 - Composição nutricional dos meios de cultura utilizados para germinação das sementes de <i>C. intermedia</i> e <i>C. warneri</i> (mg.l ⁻¹)	23
Tabela 3 - Resultado da análise de variância para os diferentes estádios e número totais de protocormos formados de <i>C. intermedia</i> a partir de sementes, após 100 dias de cultivo <i>in vitro</i>	27
Tabela 4 - Resultado da análise de variância para os diferentes estádios e número totais de protocormos formados de <i>C. warneri</i> a partir de sementes, após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i>	28
Tabela 5 - Número de protocormos totais de <i>C. intermedia</i> obtidos a partir da germinação de sementes após 100 dias de cultivo <i>in vitro</i>	29
Tabela 6 - Número de protocormos totais de <i>C. warneri</i> obtidos a partir da germinação de sementes após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i>	30
Tabela 7 - Número de protocormos (fases A, B e C) e plântulas (fases D e E) formadas a partir de sementes de <i>Cattleya intermedia</i> , após 100 dias de cultivo	35
Tabela 8 - Número de protocormos (fases A, B e C) e plântula (fases D e E) formadas a partir de sementes de <i>Cattleya warneri</i> , após 120 dias de cultivo	35
Tabela 9 - Porcentagem de protocormos formados e plântulas em relação ao número total de sementes de <i>Cattleya intermedia</i> consideradas germinadas, após 100 dias de cultivo.....	36
Tabela 10 - Porcentagem de protocormos formados e plântulas em relação ao número total de sementes de <i>Cattleya warneri</i> consideradas germinadas, após 120 dias de cultivo.....	37
Tabela 11 - Composição química dos meios de cultura utilizados para o desenvolvimento <i>in vitro</i> de protocormos de <i>C. intermedia</i> (mg.l ⁻¹).....	50
Tabela 12 - Desenvolvimento das plântulas de <i>C. intermedia</i> cultivadas em diferentes meios de cultura após oito meses. Meio acrescido do símbolo “+b” significa que houve acréscimo de polpa de banana na concentração de 100 g.l ⁻¹	52
Tabela 13 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para os parâmetros avaliados, após oito meses de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Cattleya intermedia</i> a partir de protocormos.....	53

Tabela 14 - Desenvolvimento de plântulas de <i>Cattleya intermedia</i> em diferentes meios de cultura e polpa de banana após oito meses de cultivo.....	54
Tabela 15 - Valores de pH dos diferentes meios de cultura após oito meses de cultivo com <i>C. intermedia</i> . Meio acrescido do símbolo “+b” significa que houve acréscimo de 100 g.l-1 de polpa de banana	61
Tabela 16 - Análise de variância do pH dos diferentes meios de cultura após oito meses de cultivo com <i>C. intermedia</i>	62
Tabela 17 - Comparação de valores de pH dos diferentes meios e presença de polpa de banana após oito meses de cultivo com <i>C. intermedia</i>	62
Tabela 18 - Teores de clorofila, proteínas solúveis totais e açúcares solúveis totais nas folhas das plantas de <i>C. intermedia</i> cultivadas em diferentes meios de cultura durante oito meses	64
Tabela 19 - Custo total dos reagentes para produção dos meios de cultura.....	66

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 - A família Orchidaceae e o gênero das Cattleias.....	3
1.2 - Meios de cultura para o cultivo <i>in vitro</i>	5
1.3 - Polpa de banana na composição de meios de cultura.....	7
1.4 - Controle do pH.....	8
1.5 - Absorção de nutrientes <i>in vitro</i>	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
CAP. I – GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ESPÉCIES DE CATLEIAS EM MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1 - INTRODUÇÃO.....	20
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4 - CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAP. II – DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Cattleya intermedia</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	44
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	46
1 – INTRODUÇÃO.....	47
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.1 - Análise de crescimento.....	52
3.2 - Alterações no pH.....	61
3.3 - Análises bioquímicas.....	63
3.4 - Análise de custo dos meios de cultura.....	65
4 – CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
ANEXOS	75

INTRODUÇÃO GERAL

A floricultura é uma atividade econômica que tem apresentado crescimento acelerado no Brasil. Essa expansão é favorecida pela diversidade climática do País, que possibilita o cultivo tanto de flores de clima tropical quanto de clima temperado. Segundo Barros (2011), desde 2006 o segmento de floricultura no Brasil tem registrado taxas de crescimento da produção entre 8% e 12% e de faturamento entre 15% e 17% ao ano. O Instituto Brasileiro de Floricultura estima que o mercado de flores no Brasil cresceu 15% em 2010 (IBRAFLOR, 2011).

Apesar do crescimento dos últimos anos, o mercado interno brasileiro tem potencial de crescer ainda mais, pois, em comparação com outras nações, o consumo de flores *per capita* ainda é baixo, girando em torno de US\$ 4,70 ao ano. Países desenvolvidos como Suíça e Noruega apresentam um consumo aproximado de US\$170 e US\$143 *per capita* anual, respectivamente. Porém, outros países em desenvolvimento, como a Argentina, ou de proporções continentais, como os EUA, consomem, respectivamente, em torno de US\$25 e US\$36 *per capita* ao ano (VENCATO, 2006).

Estima-se que a exportação da produção nacional fica entre 2% a 5%. Em 2006, o Brasil exportou US\$ 29,6 milhões em flores e plantas ornamentais, o que representou um crescimento de 14,8% em comparação ao volume exportado em 2005. É importante ressaltar que a maior parte dos produtos exportados foi composta por mudas de plantas ornamentais, incluindo orquídeas, alcançando o montante de US\$ 14,3 milhões (KIYUNA, 2007).

Pesquisas recentes mostram que o tamanho médio das propriedades produtoras de flores é de 1,5 hectares. Isso mostra que o agronegócio brasileiro de flores e plantas ornamentais é uma atividade dominada por pequenos produtores, o que contribui para a distribuição de renda no país (IBRAFLOR, 2011).

Dentre os tipos de flores mais produzidas e comercializadas no país, seja para corte ou vaso, as orquídeas destacam-se devido à exuberância de suas flores. O Brasil tem grande potencial para a produção de orquídeas, uma vez que o país apresenta condições ecológicas ideais para o crescimento de uma vasta gama de espécies, dentre elas as do gênero *Cattleya*, as quais são nativas da Mata Atlântica.

Segundo Gloeden (1998) e Carneiro *et al.* (2001), a pronunciada e desenfreada devastação e extração predatória de orquídeas diretamente da natureza tem aumentado a cada ano o número de espécies que correm o risco de serem extintas, sem ao menos serem estudadas ou catalogadas. Nesse sentido, é de extrema importância estudar e aperfeiçoar a produção em larga escala de tais espécies a fim de reduzir e, ou eliminar a extração predatória.

A propagação das orquídeas na natureza ocorre de forma assexuada, pela formação de brotos, ou sexuada, através das sementes. A formação de brotos é lenta e restrita a algumas brotações emitidas por ano em cada planta. Já em relação às sementes, estas têm tamanho muito reduzido e necessitam de condições específicas para germinar e se desenvolver, o que resulta em taxas abaixo de 5% de germinação na natureza. Ou seja, nenhum destes sistemas de propagação de orquídeas é eficiente na produção de mudas em escala comercial.

As técnicas de cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro* permitem a propagação massal das orquídeas, podendo elevar o índice de germinação para valores entre 98% e 100% para a maioria das espécies, ao mesmo tempo em que acelera o processo de desenvolvimento,

formando plântulas vigorosas e facilmente adaptáveis à aclimatização (MARTINI *et al.*, 2001).

No cultivo *in vitro*, o meio de cultura é um elemento-chave, pois é responsável por fornecer as condições ideais de nutrição (vitaminas, sais minerais, fonte de carbono, etc.) e as características físico-químicas adequadas para o desenvolvimento das plantas. Essa condição ideal pode variar muito entre espécies, ou mesmo para plantas de uma mesma espécie em estádios de desenvolvimento diferentes. A adição de compostos orgânicos complexos nos meios de cultura, como a água de coco e a polpa de banana, pode suplementar o teor de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento ao meio de cultura (GEORGE *et al.*, 2008), favorecendo o desenvolvimento das plantas.

O meio de cultura pode responder sozinho por 11,36% do custo operacional da muda no cultivo *in vitro* (STANCATO *et al.*, 2001). A simplificação dos meios de cultura, principalmente utilizando fertilizantes comerciais como base para a preparação dos meios, permite reduzir os custos de produção de mudas (MORAES *et al.*, 2009a). Além disso, estes meios apresentam vantagens pela facilidade de preparação e obtenção dos componentes necessários.

Portanto, o objetivo norteador deste trabalho é avaliar qualitativa e quantitativamente o desempenho de diferentes meios de cultura na produção *in vitro* de mudas de *Cattleya* a partir de sementes. Para tanto, foram realizados dois estudos de caso, sendo que no primeiro foram avaliados os efeitos dos diferentes meios de cultivo, dentre eles formulações mais simples, e a suplementação destes com polpa de banana, na germinação de sementes e diferenciação de protocormos de duas espécies de orquídea, *Cattleya intermedia* e *Cattleya warneri*. Já no segundo estudo de caso, analisou-se o efeito dos meios de cultura e da suplementação com polpa de banana no crescimento e desenvolvimento de protocormos de *Cattleya intermedia*, verificando também a influência da polpa de banana no potencial hidrogeniônico do meio. Por último, avaliou-se o custo financeiro, em termos de reagentes, para a preparação de cada meio e a sua viabilidade econômica em comparação aos meios tradicionais.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A família Orchidaceae e o gênero das *Catleias*

Dentro da família Orchidaceae existem cerca de 800 gêneros e mais de 25.000 espécies (CHUGH *et al.*, 2009), distribuídas por quase todo o mundo, com exceção da Antártida. Estas plantas podem ser encontradas em locais de altitude elevadas, em florestas tropicais, tundras semiárticas, regiões desérticas, pântanos ou pradarias de gramíneas (BLACK, 1973), mas apresentam maior concentração e diversidade em regiões tropicais. Entretanto, a destruição do habitat natural destas espécies, em grande parte devido à expansão das fronteiras agrícolas, e a coleta predatória têm levado muitas ao risco de extinção (COLOMBO *et al.*, 2004).

As orquídeas são plantas perenes com morfologia bastante diversificada, a qual varia principalmente devido ao habitat onde se desenvolvem, podendo ser epífitas, saprófitas, terrestres ou rupícolas. As epífitas constituem a maioria das espécies e são também as mais especializadas do ponto de vista ecológico por necessitarem de adaptações morfológicas e fisiológicas que lhe garantam absorção eficiente de água e nutrientes para sobreviverem em ambientes xerofíticos. Pelo fato de habitarem troncos de árvores em diversas alturas, elas são erroneamente confundidas com parasitas, já que utilizam as árvores apenas como suporte. Estas espécies possuem raízes aéreas, grossas, cilíndricas e suculentas, com as quais absorvem a água da chuva, do orvalho ou neblina e nutrientes dos resíduos acumulados de folhas e insetos em decomposição. Os nutrientes metabolizados são armazenados nos seus pseudobulbos e utilizados para a sua sobrevivência em condições desfavoráveis (RODRIGUES, 2009).

As orquídeas terrestres utilizam o solo como substrato para o seu desenvolvimento, sendo diferenciada das epífitas por possuírem sistema radicular delicado e fino, com uma camada fina de velame e por isso são mais sensíveis ao ressecamento (BLOSSFELD, 1999).

As espécies saprófitas, mais raras de serem encontradas, são aquelas que se desenvolvem sob matéria orgânica em decomposição, como troncos e galhos caídos. Seu sistema radicular é mais fino e menos carnoso e, conforme as raízes envelhecem e vão secando, adquirem resistência e tornam-se ásperas, penetrando nos interstícios da madeira (RODRIGUES, 2009); já as espécies rupícolas vivem diretamente sobre as rochas.

O tipo de caule das orquídeas pode ser simpodial ou monopodial, muitas vezes rizomatoso, mais raramente são cormos, e possuem os internós frequentemente formando pseudobulbos. As folhas são alternas, raramente opostas, dísticas ou espiraladas, simples, inteiras, com nervação geralmente paralelinérvea. Ou seja, apresentam grande variabilidade de formas, tamanhos e cores, tanto de suas folhas como de suas flores. A exuberância e aroma de suas flores desempenham papel importante na atração do agente polinizador que favorece a polinização cruzada (DRESSLER, 1993).

Após a fecundação, o fruto se desenvolve em formato de cápsula na qual as sementes serão formadas. Em uma única cápsula, ocorre a produção de, aproximadamente, 1.300 a 4.000.000 sementes. Entretanto, estas se diferenciam da maioria das sementes de outras espécies por não possuírem reservas nutritivas para promover sua germinação (RAMOS, 1969). Sendo assim, em condições naturais, menos de 5% das sementes germinam e o desenvolvimento das sementes em plântulas ocorre somente depois de instalada uma simbiose

com fungos micorrízicos. Esses fungos são estritamente saprófitas, muitas vezes específicos a cada espécie, e essenciais à realização do ciclo de vida das orquídeas.

No Brasil, são conhecidos aproximadamente 203 gêneros da família Orchidaceae e mais de 2.350 espécies, formando um rico patrimônio orquidológico de incalculável valor e beleza (MENEZES, 1987). A Mata Atlântica é considerada o principal habitat brasileiro das orquídeas, onde se encontram espécies endêmicas de relevante valor ornamental e comercial, como *Cattleya warneri*, *Cattleya labiata* e *Laelia purpurata* (FARIAS & RIBEIRO, 2000).

O gênero *Cattleya*, juntamente com o *Laelia*, constituem dentre as orquídeas, as mais utilizadas para ornamentação e também as mais conhecidas. Devido à popularidade deste gênero, foi considerado por Arditti & Ernst (1993) como sinônimo de orquídea. Já a exuberância das suas flores fez com que Menezes (1987) as denominassem de rainhas das orquídeas. A facilidade de cultivo e o baixo custo de produção, em relação a outras espécies de orquídeas, aliada à beleza das suas flores, tornaram-nas plantas muito procuradas por colecionadores, orquidófilos e para fins comerciais (BICALHO, 1980).

As plantas do gênero *Cattleya* são todas epífitas, com pseudobulbos proeminentes e tamanho variando de 10 a 130 cm. A parte basal, ligada ao resto da flor, normalmente é tubular, envolvendo a coluna (BLACK, 1973). As flores são geralmente grandes, com a terceira pétala transformada em labelo, quase sempre com os bordos franjados e na grande maioria de cor lilás-róseas.

Este gênero é originário das densas florestas da Bacia Amazônica e do litoral brasileiro, principalmente da Mata Atlântica, sendo ainda originárias das encostas florestadas da Costa Rica e outros países da América Central. O gênero contempla aproximadamente 70 espécies distribuídas desde o hemisfério norte até a América do Sul, onde ocorre o maior número de espécies. O Brasil possui em torno de 27 espécies nativas, com algum representante em todos os estados do país, desde o extremo norte até o Rio Grande do Sul (ARAÚJO, 2007; SMIDT *et al.*, 2006). Dentre as espécies nativas do Brasil, podemos destacar *Cattleya walkeriana*, *C. intermedia*, *C. leopoldi* e *C. warneri* pelo grande valor comercial e, ou beleza de suas flores.

Como a porcentagem de germinação das sementes na natureza é muito pequena, durante muito tempo a produção de mudas de orquídeas ocorreu através de métodos de propagação assexuada, consistindo em: divisão de touceiras, divisão de pseudobulbos, divisão de bulbos velhos e indução de brotamento a partir de hastes florais (BACH & CASTRO, 2004). Entretanto, essa forma de obtenção é ineficiente e demorada, uma vez que as plantas emitem poucas brotações por ano. Esse panorama mudou quando, em 1922, com base nos estudos de outros pesquisadores e nas suas próprias observações, Lewis Knudson relatou que os fungos micorrízicos, que até então eram tidos como essenciais para a germinação das sementes de orquídea, digeriam parte dos amidos, pentoses e substâncias nitrogenadas de compostos orgânicos em moléculas mais simples e que também secretavam nutrientes durante a sua decomposição. O fornecimento dessas substâncias às sementes junto com a regulação do pH no local deveria ser a causa da germinação na natureza, ou seja, que a germinação não era induzida pela ação do fungo dentro do embrião, mas pelos produtos externamente excretados pelo fungo. Diante desta constatação, postulou que a germinação das sementes de orquídea poderia ser obtida com o uso da combinação de certos sais e açúcares que imitassem a condição dada pelo fungo. Testando a germinação, em ambiente asséptico e condições controladas, com diferentes substratos contendo combinações de diversos compostos orgânicos e químicos, chegou à formulação de um meio de cultura específico para essa finalidade. Os seus estudos deram origem à germinação assimiótica de sementes de orquídeas, o que revolucionou a produção de mudas em larga escala e permitiu a obtenção de uma variedade gigantesca de híbridos (YAM & ARDITTI, 2009).

O cultivo *in vitro* das sementes, na maioria dos casos, eleva a porcentagem de germinação para valores superiores a 95%. Além disso, por possibilitar a obtenção de grande número de indivíduos, também contribui para a diminuição das práticas de coleta e exploração em habitats naturais para fins comerciais, que ocorrem principalmente nos países tropicais (LO *et al.*, 2004), diminuindo assim os riscos de extinção de muitas espécies nativas.

O fator que frequentemente determina o sucesso do cultivo *in vitro*, e aí se inclui a germinação *in vitro* de sementes, é o meio nutritivo no qual o material vegetal irá se desenvolver. Assim, vários estudos vêm sendo elaborados para que esse sucesso seja o maior possível, adequando a receita do meio de cultura a cada espécie a fim de obter maior produtividade (GONÇALVES, 2006).

1.2 Meios de cultura para o cultivo *in vitro*

Os meios de cultura têm a função de fornecer para o tecido vegetal todos os componentes de que ele precisa para se desenvolver. São geralmente constituídos de elementos minerais essenciais, vitaminas, aminoácidos, fonte de carbono, agente gelificante e reguladores de crescimento. Os elementos minerais essenciais são aqueles que a planta não consegue completar o ciclo de vida na sua ausência, pois têm relação direta com o metabolismo da planta e não podem ser substituídos. Além do carbono, oxigênio e hidrogênio, existem outros 14 elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas superiores, que são subdivididos em macro ou micronutrientes conforme a quantidade exigida. Os macronutrientes são aqueles exigidos em grandes quantidades (N, P, K, Ca, Mg e S) e os micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo e o Ni) são requeridos em quantidades menores (KERBAUY, 2008). Nos meios de cultivo esses elementos são adicionados principalmente na forma de sais.

A sacarose é o principal açúcar utilizado como fonte de carbono. Ela é essencial para o crescimento das plantas, pois na condição *in vitro*, a fotossíntese é limitada e as plantas necessitam obter carbono do meio de cultivo. O agente gelificante mais usado é o ágar, que é um polissacarídeo de alto peso molecular, solúvel em água, com a capacidade de fundir-se a 100°C e de permanecer semissólido à temperatura ambiente. Sua função é dar suporte ao material vegetal e às plantas mantidas *in vitro*. O ágar é um dos compostos que mais encarece o custo de produção do meio de cultura, embora muitos trabalhos estejam sendo feitos visando sua substituição por outras substâncias (SIMMI & NIRMALA, 2012; OZEL *et al.*, 2008; SAGLAM & CIFTCI, 2010), o seu uso ainda é a forma mais eficiente de manter a consistência ideal do meio.

Dentro deste contexto, existem diversas combinações de elementos para compor os meios de cultura. Na maioria das vezes, os meios são selecionados em razão da espécie e tipo ou estágio da cultura que está sendo produzida, uma vez que a formulação mais apropriada de meio pode variar em função da espécie, idade dos tecidos e objetivos desejados (PASQUAL *et al.*, 1997).

Inúmeros meios são utilizados para a propagação *in vitro* de orquídeas, com variada composição de sais, fontes de carbono, substâncias orgânicas, vitaminas e reguladores de crescimento (VENTURA, 2002). Alguns trabalhos relatam que a concentração de sais no meio de cultivo influencia diretamente o crescimento de orquídeas *in vitro*, seja pela falta, seja pelo excesso de componente e, ou qualidade (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; STANCATO *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013).

O meio de cultura mais utilizado para o cultivo *in vitro*, não só de orquídeas, mas para as mais diversas espécies é o meio de Murashige e Skoog (1962). Para orquídeas também é bastante utilizado o meio de Knudson (1946). Não existe, ainda, um meio ideal quanto à

composição nutricional para todos os gêneros, espécies, híbridos ou clones (VENTURA, 2002).

No que diz respeito à germinação das sementes de orquídea *in vitro*, um grande número de espécies, principalmente epífitas, germina melhor em meios com menor concentração de sais do que os meios utilizados para a germinação da maioria das outras espécies vegetais. Isto demonstra que a concentração do meio é um importante fator na germinação de orquídeas. Poole & Sheehan afirmaram em 1982 que devido à limitação de informação disponível, não existiam padrões definidos para cada espécie. Essa afirmação ainda é válida nos dias atuais, devido ao grande número e variabilidade das espécies existentes. Como resultado desta falta de conhecimento sobre qual é o melhor meio de cultivo para uma determinada espécie, há muita preocupação no cultivo de orquídeas, pois elas possuem uma imensa diversidade bioquímica, fisiológica e genética e não há a mesma diversidade de meios de cultura adequados para a multiplicação de cada espécie (REGO-OLIVEIRA & FARIA, 2005; ROY *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013).

O meio de cultura representa alto custo na produção da muda, sendo muitas vezes atribuído a ele mais de 11% do custo operacional da produção da muda (STANCATO *et al.*, 2001). O meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), embora seja o meio mais utilizado pela maioria dos produtores, apresenta um custo significativamente alto que incide no aumento do custo de produção. Além disso, é um meio com diversos nutrientes e vitaminas, aumentando o grau de complexidade durante a sua elaboração. Conforme Stancato *et al.* (2001), a diminuição de custos é possível através da simplificação dos meios de cultura, principalmente com o emprego de fertilizantes como base de meios de cultura, visando à produção em larga escala. Outras pesquisas com fontes alternativas de minerais para constituição de meios, adição de compostos orgânicos, tipos alternativos de suporte, visando substituir o ágar, fontes de luz mais econômicas, mostram que é possível reduzir os custos do cultivo *in vitro* e simplificar a técnica (DIGNART *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2009a; MORAES *et al.*, 2009b; SIMMI & NIRMALA, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013).

De acordo com Unemoto *et al.* (2007), o meio simplificado, constituído de fertilizante comercial, utiliza uma quantidade reduzida de elementos, sendo de fácil acessibilidade. Além da facilidade de preparo e do baixo custo dos componentes utilizados, este tipo de meio de cultura apresenta um fator favorável que é a não utilização de compostos como nitrato de amônia e de potássio, utilizados no meio MS, pois sua aquisição é controlada pelo Ministério da Defesa, conforme consta no Decreto Federal nº 3665, de 20 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000).

O uso de meios de cultura alternativos é uma técnica viável para o crescimento e o desenvolvimento de orquídeas pela simplicidade de utilização, pela disponibilidade dos produtos e pelo baixo custo final. Para a produção de um litro dos meios NPK (08-09-09), NPK (20-20-20), NPK (10-30-20) e NPK (06-06-06), o custo final apresentou uma economia de 80% quando comparado ao custo do meio MS, revelando a viabilidade de sua utilização (STANCATO *et al.*, 2001). Moraes *et al.* (2009a) compararam a germinação de *Cattleya tigrina* em meio MS, e dois fertilizantes comerciais - Hyponex[®] e Kristalon Laranja[®] - e obtiveram melhores resultados de altura das plântulas, número de raízes, massa fresca e comprimento da maior raiz nos frascos contendo meio à base do fertilizante Kristalon Laranja[®]. Os mesmos resultados foram encontrados por Moraes *et al.* (2009b) trabalhando com *Cattleya loddigessi*, comprovando a eficiência dos meios à base de fertilizantes para o desenvolvimento de plântulas de orquídea.

Além dos fertilizantes químicos, é comum encontrarmos estudos sobre o efeito da adição de compostos orgânicos complexos nos meios de cultura. Os aditivos orgânicos complexos são preparações obtidas de produtos naturais, como polpa de frutas, principalmente de banana, tomate e água de coco. Conforme George (1993), a adição desses

compostos ao meio de cultura pode suplementar o teor de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Essas preparações têm composição indefinida, mas que atendem ao propósito de enriquecimento do meio de cultura. Os aditivos orgânicos complexos podem ser adicionados ao meio visando à melhor resposta no padrão de crescimento (TORRES *et al.*, 2001).

1.3 Polpa de banana na composição de meios de cultura

A banana é um alimento rico em carboidratos, sais minerais, aminoácidos, ácidos graxos, niacina, vitaminas e outros compostos (Tabela 1). Além disso, outras substâncias de grande importância para a cultura de tecidos foram encontradas na banana, como a presença de citocininas (GE *et al.*, 2008). Dentre os componentes principais da polpa de banana estão 18% a 25% de carboidratos totais, variando de acordo com a variedade analisada, conforme concluíram Jesus *et al.* (2004).

Segundo Arditti & Ernst (1993), a polpa de banana nos meios de cultura foi utilizada pela primeira vez em 1950 no Brasil por Graeflinger, num meio para germinação de sementes de orquídeas. O uso de banana em meios de cultura para orquídea tornou-se popular depois disso. Muitos pesquisadores acreditam que a banana seja uma excelente fonte suplementar de potássio para as culturas e, com isso, estimule o enraizamento das mesmas. Entretanto, a resposta à adição dos compostos orgânicos ao meio depende da espécie que se está propagando, do seu estágio vegetativo, das concentrações e combinações utilizadas.

Tabela 1. Composição nutricional da polpa de banana do tipo Nanica por 100g de porção comestível (Fonte: DRONK, 2004).

Composição	Quantidade
Energia (cal)	85,0
Proteína (%)	1,1
Gordura (%)	0,2
Carboidratos (%)	22,2
Cálcio (mg)	8,0
Potássio (mg)	370,0
Fósforo (mg)	26,0
Ferro (mg)	0,7
Sódio (mg)	1,0
Magnésio (mg)	33,0
Vitamina A (UI)	190,0
Tiamina (mg)	50,0
Riboflavina (mg)	60,0
Niacina (mg)	0,7
Vitamina C (mg)	10,0

De acordo com Arditti e colaboradores (1982), a banana homogeneizada pode melhorar o crescimento de plântulas e plantas de orquídeas, dependendo da espécie, do meio de cultivo, de sua homogeneização, e do estágio de desenvolvimento do fruto, ou seja, se o fruto é verde, intermediário ou maduro. Arditti & Ernst (1993) confirmaram que a adição de polpa de banana aumenta o número de brotos no cultivo de plântula de orquídea *in vitro*. Já Arditti *et al.* (1984) afirmam que a adição da polpa de banana no meio, quando utilizado para semeadura, pode inibir a germinação das sementes de orquídea enquanto que Islam *et al.* (2000) observaram em seus resultados com *Cattleya* que a banana homogeneizada aumentou

a germinação e o crescimento de plântulas. Torres e colaboradores (2001) e Zhang *et al.* (2013) afirmam que a adição de polpa de banana promove diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, tais como espessamento do sistema radicular, maior desenvolvimento da parte aérea e emissão de brotos adventícios, dependendo da quantidade de polpa utilizada e sua interação com o genótipo da espécie cultivada.

Gnasekaran e colaboradores (2010) testaram a suplementação de extratos orgânicos de quatro cultivares de bananas, dentre outros extratos, e obtiveram maior proliferação de protocormos em *Phalaenopsis violacea* em meio MS com metade da força e suplementado com 10% de polpa de banana.

Bettão (2009) testou o efeito de diferentes variedades e concentrações de polpa de banana no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e observou que a suplementação do meio de Knudson com polpa de banana, de qualquer uma das três variedades testadas, estimulou a produção de raízes, com efeito mais pronunciado nas concentrações de 80 e 100 g.l⁻¹, e que as concentrações maiores, como de 120 e 140 g.l⁻¹, estimularam de forma significativa o número e o comprimento das folhas. O efeito positivo da adição da polpa de banana também foi observado em estudos com *Laelia tenebrosa*, obtendo-se o maior conteúdo de matéria seca nos tratamentos com banana (STANCATO *et al.*, 2008).

Entretanto, o uso da polpa de banana também pode apresentar desvantagens, principalmente em relação ao estabelecimento de padrões e protocolos, uma vez que existe grande variação entre a composição química das polpas das diversas variedades. Além disso, dentro da mesma variedade, a composição pode variar conforme as condições de cultivo e manejo da cultura. Sendo assim, é difícil estipular a dose ideal a ser adicionada para alcançar os resultados desejados, sem conhecer a composição da polpa em questão. O ideal seria analisar quimicamente a composição da polpa antes de adicioná-la ao meio, para verificar a concentração ideal a ser utilizada, contudo, essa prática é inviável do ponto de vista do produtor. A adição da banana ao meio de cultura pode ser feita através da homogeneização da polpa com o meio de cultura, geralmente com o auxílio de liquidificadores ou processadores, ou simplesmente pela submersão de fatias nos frascos contendo o meio (Silva *et al.*, 2005).

1.4 Controle do pH

O potencial hidrogeniônico (pH) do meio de cultura interfere diretamente no desenvolvimento dos vegetais *in vitro*. O pH é o fator responsável pela manutenção da solubilidade dos sais, influenciando assim a absorção de nutrientes e reguladores de crescimento, e conseqüentemente o desenvolvimento das plântulas. A maioria dos tecidos cultivados *in vitro* são inoculados em pH variando de 5,2 a 5,8 (SKIRVIN, 1986).

O controle do pH é importante pois, quando o pH inicial é muito ácido antes da autoclavagem, pode ocorrer a hidrólise de alguns compostos do meio. De acordo com Arditti & Ernest (1993), além dos constituintes do meio de cultura, o pH do meio alcançado após o processo de autoclavagem também pode influenciar diretamente o desenvolvimento dos tecidos vegetais sob cultivo *in vitro*.

Pierik *et al.* (1988), ao analisarem meios com diferentes pH (5,5; 6,0; 6,5; e 7,0), verificaram bom desenvolvimento de *Paphiopedilum ciliolare* em pH menor que 7,0 e a inibição do crescimento das plântulas sob pH 7,0. Arditti *et al.* (1982) afirmam que a faixa ótima de pH do meio nutritivo para a germinação de sementes de orquídeas é de 4,8 a 5,2. Entretanto, alterações têm sido observadas no pH durante o período em que as plântulas ficam inoculadas. Vacin & Went (1949) mediram o pH do meio contendo *Epidendrum brineanum* após cem dias e observaram uma alteração de 5,46 para 3,78, sendo que na ausência de

plântulas os autores verificaram que o pH do meio foi pouco alterado. Skirvin (1986) também afirmou que a presença dos tecidos de plantas pode afetar o pH final do meio de cultura. Neste contexto, Morales (2004) recomenda que a substituição do meio de cultura utilizado no cultivo *in vitro* de orquídeas seja realizada no prazo de 4 a 5 meses, quando levados em consideração os valores de pH do meio em questão.

Estes estudos evidenciam que a interação dos materiais vegetais com o meio de cultivo pode determinar a liberação de substâncias diversas que, em contato com o meio, determinam alterações na composição e disponibilidade dos sais minerais e, conseqüentemente, determinam alterações no pH do meio de cultura (BETTÃO, 2009). Estas alterações foram consideradas por alguns autores como dependentes da espécie trabalhada (MORALES *et al.*, 2006; PRIZÃO, 2006).

1.5 Absorção de nutrientes *in vitro*

Em condições normais, as plantas absorvem os nutrientes inorgânicos de que necessitam do solo, quase que inteiramente como íons (cátions ou ânions). Os nutrientes são absorvidos de forma passiva ou através de mecanismos ativos envolvendo gastos de energia. A absorção ativa é geralmente menos dependente da concentração iônica do que a absorção passiva. Entretanto, os dois sistemas são influenciados pela concentração de outros elementos, pH, temperatura e a condição bioquímica e fisiológica dos tecidos da planta (GEORGE & KLERK, 2008).

In vivo as plantas absorvem os íons minerais através da interceptação radicular, no qual as raízes crescem, explorando o solo em todas as direções e, assim, entram em contato direto com os nutrientes a ser absorvido, ou através da água absorvida pelas plantas. A água flui ao longo de um gradiente de potencial hídrico no solo, arrastando consigo os nutrientes dissolvidos na solução do solo para próximo da superfície radicular onde ficam disponíveis para a absorção.

Uma vez absorvido, o transporte dentro da planta ocorre pelo fluxo de massa através do xilema. Sendo que, há dois mecanismos para conduzir o fluxo de água: o primeiro é a pressão exercida pelas raízes, o segundo é o gradiente de potencial de água formado entre as extremidades, sendo uma delas as células da raiz em contato com o solo e a outra as células da planta em contato com a atmosfera. Sob condições normais, o segundo é o mais importante, mas o fluxo de água resultante da pressão da raiz é por si só suficiente para o abastecimento mineral à longa distância (TANNER & BEEVERS, 2001).

Quando se trata de cultivo *in vitro*, os nutrientes dos quais as células, tecidos ou plantas, precisam para se desenvolver devem ser fornecidos através dos meios de cultura. Nos meios de cultura os nutrientes inorgânicos são adicionados na forma de sais, esses, quando em solução aquosa, se dissociam em cátions e ânions ficando disponíveis para serem absorvidos pelos tecidos.

A absorção de nutrientes pelos tecidos *in vitro*, ocorre através do gradiente de concentração dos íons formado entre o interior das células e o meio de cultura. Sendo assim, no meio de cultura a absorção de um íon é geralmente proporcional à concentração do mesmo no meio, até um certo limite (GEORGE & KLERK, 2008). Da mesma forma o transporte através das células e tecidos do explante *in vitro* também é dependente do gradiente de potencial célula a célula, uma vez que o sistema vascular das plantas *in vitro* é reduzido (CAMPOSTRINI & OTONI, 1996; ALBARELLO *et al.*, 2001).

Plantas cultivadas *in vitro* muitas vezes não possuem raízes, estão sob um clima muito úmido, com isso o fluxo impulsionado pela diferença de potencial de água é conseqüentemente reduzido, diminuindo a movimentação dos nutrientes. Apesar disso, Beruto

et al. (1999) afirmam que o fluxo de água existente parece ser suficiente para a maioria dos casos. Esse fluxo pode ser favorecido pelo fato dos estômatos estarem continuamente abertos (KLERK & WIJNHOVEN, 2005).

Essas particularidades da nutrição mineral das plantas quando *in vitro* ressalta ainda mais a importância dos estudos das composições ideais dos meios de cultura. Pois, a concentração dos íons no meio interfere diretamente na absorção e utilização destes pelos tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, p.35-46, 2001.
- ARAUJO, A.G. **Micropropagação de *Cattleya loddigessii* ‘Tipo’: fontes de nitrogênio, qualidade de luz, sacarose e ácido giberélico**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2007. 74p. Tese (Doutorado)
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993. 682p.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti, J. (ed). **Orchid Biology: Reviews and Perspectives III**. Ithaca: Cornell University Press. p.179-222, 1984.
- ARDITTI, J. et al. Orchid seed germination and seedling culture – manual. In: ARDITTI, J. (Ed.) **Orchid biology: reviews and perspective II**. New York: Corenl University Press. 1982, 390 p.
- BACH, E.E.; CASTRO, O.L. Germinação de sementes de *Cattleya* sp. (ORCHIDACEAE) em cultura de tecido visando produção de mudas. **Arquivo Instituto Biológico**, v.71, p.741-749, 2004.
- BARROS, B. Mercado de flores cresce em ritmo forte no país. Revista Valor Econômico. 2011. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/empresas/982310/mercado-de-flores-cresce-em-ritmo-forte-no-pais>>. Acesso em: 10 maio. 2012.
- BERUTO, M.; CURIR, P.; DEBERGH, P. Influence of agar on *in vitro* cultures: II. Biological performance of Ranunculus on media solidified with three different agar brands. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.35, p.94-101, 1999.
- BETTÃO, F. C. **Efeito de variedades e concentrações de polpa de banana no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 35p. Dissertação (Mestrado).
- BICALHO, H.D. **Aspectos ornamentais e taxionômicos das orquídeas gênero *Cattleya* no continente sul-americano**. In: CONGRESSO DA ESCOLA SUPERIOR AGRONÔMICA LUIZ DE QUEIROZ, 1980. PIRACICABA. Anais... Piracicaba: ESALQ, 1980, p.157-168.
- BLACK, P.McK. **Orquídeas**. 1ª ed. Hamlyn Publishing Group Limited. Tradução: Maria Adelaide Freitas Soares. Livro Técnico S/A. Rio de Janeiro. 1973. 128p.
- BLOSSFELD, A. **Orquidologia, Orquidofilia e Orquicultura**. Jaboticabal: Funep, 1999.
- BRASIL, Ministério da Defesa. Decreto-Lei n. 3665, de 20 de novembro de 2000. Estabelece critérios para o regulamento para fiscalização de produtos controlados. Acesso em: 19 dez 2013.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimatização de mudas: abordagens recentes.** ABCTP Notícias, CNPH/EMBRAPA, Brasília, DF, n.25, 1996.

CARNEIRO, M.F.; CARNEIRO, I.F.; OLIVEIRA, S.A.; LEITE JÚNIOR, C.B.; PACHECO, R.A.; SOUZA, M.M.; RAMOS, T.V. **Bromélias e orquídeas na região dos Cerrados – Dados preliminares.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 13º, São Paulo, 2001. Anais, São Paulo, Sociedade Brasileira de Floricultura e Planas Ornamentais, 2001, p.13.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I.U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 507-520, 2009.

COLOMBO L.A.; FARIA R.T.; CARVALHO, J.F.R.P.; ASSIS, A.M.; FONSECA, I.C.B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, v. 6, p. 253-258, 2004.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.780-787, 2009.

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

DRONK, A.G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para o cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden e *Rchib*.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. 30p. Dissertação (Mestrado).

IBRAFLOR. Uma visão do mercado de flores. 2011. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=21>, Acesso em: 29 de maio de 2012.

ISLAM, M.O.; MATSIU, S.; ICHIHASHI, S. Effects of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. **Lindleyana**, v.15, p.81-88, 2000.

FARIAS, L.A.; RIBEIRO, R. Pôster apresenta orquídeas da Mata Atlântica. **Revista O Mundo das Orquídeas**, v.13, p.43-45, 2000.

FIGUEIREDO, M.A.; SANTOS, F.M.S.; SILVA, J.O.C.; COSTA, F.H.S.; PASQUAL, M. Variações no meio de cultura sobre o crescimento *in vitro* em híbridos de orquídea. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 294-296, 2007.

GE, L.Y.; TAN, S.N.; YONG, J.W.H.; HUA, L.; ONG, E.S. Separation of cytokinin isomers with a partial filling-micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry approach. **Electrophoresis**, v.32, p.2024-2032, 2008.

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

GEORGE, F.E.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture.** Volume 1. The background. Dordrecht, Netherlands, 3rd edition, Springer, 501 p. 2008.

GEORGE, E.F.; KLERK, G.J. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: GEORGE, F.E.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. Plant propagation by tissue culture. Volume 1. The background. Dordrecht, Netherlands, 3rd edition, Springer, p.65-114, 2008.

GLOEDEN, H. **A Jóia da Bruxa e outras histórias de orquídeas e orquidófilos**. 1ªed. São Paulo, SP, Editora Ativa, 1998. 170p.

GNASEKARAN, P.; RATHINAM, X.; SINNIAM, U.R.; SUBRAMANIAM, S.A Study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBs) growth of *Phalaenopsis violacea* (Orchid). **Journal of Phytology**, v.2, n.1, p.229-233, 2010.

GONÇALVES, L. M. PRIZÃO, E. C. MILANEZE -GUTIERRE, M. A. Influência da composição do meio de cultura sobre a germinação das sementes de duas espécies de orquídeas brasileiras mantidas estocadas por 4 anos. In: **XXI Semana da Biologia, VIII Encontro Maringense de Biologia**. 2006, Maringá – PR. Arq. Mud. Resumos de trabalhos apresentados, 2006. v.10, p.55.

GRAEFLINGER, B. Repicagem precoce de orquídeas sobre muscenas. **Orquidea**, v.12, p.131–134, 1950.

JESUS, S. C. de J.; FOLEGAT TI, M. I. da S.; MATSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. L. Caracterização física e química de frutos de diferentes genótipos de bananeira. **Bragantia**, v.63, p.315-323, 2004

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 446p

KIYUNA, I.; ÂNGELO, J.A.; COELHO, P.J. Floricultura: desempenho do comércio exterior em 2006. Instituto de Economia Agrícola, São Paulo, v.1, n.2, fev. 2007. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=8748>>. Acesso em: 30 maio de 2012.

KLERK, G.J.; WIJNHOFEN, F. Water retention capacity of tissue cultured plants. **Prop. Orn. Plants**, v.5, p.14-18, 2005.

KNUDSON, L. A new nutriente solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v.15, p.214-217, 1946.

LO S.H.; NALAWADE, S.M.; KUO C-L.; CHEN, C-L.; TSAY, H-S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaensemakino* – a medicinally important orchid. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v.40, p.528-535, 2004.

MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONTAO, V.M.T.S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.10, p.1319-1324, 2001.

MENEZES, L.C. **Cattleya labiata Lindley. Orquídeas brasileiras**. 1ª ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 1987. 112p

MORAES, C.P.; SANTOS, N.S.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G.M.; LEAL, T.S. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.13, p. 57-65, 2009a.

MORAES, C.P.; DIOGO, J.A.; PEDRO, N.P.; CANABRAVA, R.I.; MARTINI, G.A.; MARTELINE, M.A. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociência**, v.7, p. 67-69, 2009b.

MORALES, S. **Efeito de aditivos no cultivo *in vitro* de plântulas de *Catasetum fimbriatum* (E.MORREN) LINDL. e *Paxtonia randii* (BARB. RODR.) PORTO e *Bradea* e de um híbrido de *Laelia* LINDL. x *Cattleya* LINDL.(ORCHIDACEAE)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2004. 38p. Dissertação (Mestrado).

MORALES, S.; MILANEZE, M.A.G.; MACHADO, M.F.P.S. Effect of activated charcoal for seedling development of *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). **Journal of Plant Sciences**. v.1, p.388-391, 2006.

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

OZEL, C.A.; KHAWAR, K.M.; ARSLAN, O. A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on *in vitro* shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Scientia Horticulturae**, v.117, p.174-181, 2008.

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

POOLE, H.A.; SHEEHAN, T.J. Mineral nutrition of orchids. In: Arditti, J. (ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives**, II. Ithaca and London: Cornell University, 1982, p.195-221.

PRIZÃO, E.C.; GONÇALVES, L.M.; MILANEZE -GUTIERRE, M.A.; MACHADO, M.F. P.S. **Influência de diferentes concentrações de carvão ativado e de grafite sobre o desenvolvimento inicial de *Cattleya bicolor* Lindl. e do híbrido ‘BLC Pastoral Inocence’ (Orchidaceae)**. In: XXI Semana da Biologia, VIII Encontro Maringense de Biologia . 2006, Maringá – PR. Arq. Mud. Resumos de trabalhos apresentados, v.10, p.55 -56, 2006.

RAMOS, M.S.S. **A orquídea e sua reprodução pela semente**. Campinas: Indústria Gráfica Saraiva, 1969, 103p.

REGO-OLIVEIRA, L.V.; FARIA, R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum**, v.27, p.1-5, 2005.

RODRIGUES, G. **Cultivo *in vitro* de duas espécies de *Cattleya*, com diferentes concentrações de auxina e citocininas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 32f. Dissertação (Mestrado).

ROY, A.R.; PATEL, R.S.; PATEL, V.V.; SAJEEV, S.; DEKA, C. B. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, v.128, p.325–331, 2011.

SAGLAM, S.; CIFTCI, C.Y. Effects of agar and isubgol on adventitious shoot regeneration of woad (*Isatis tinctoria*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 12, n.2, p.281–285, 2010.

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

SIMMI, A.S.; NIRMALA, C. Utilization of coir fibers as an eco-friendly substitute for costly gelling agents for *in vitro* orchid seed germination. **Scientia Horticulturae**, v.133, p.89–92, 2012.

SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T.W. Stability of tissue culture medium pH as function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v. 5, n. 4, p. 292 -294, 1986.

SMIDT, E.C.; SILVA-PEREIRA, V.; BORBA, E.L. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, v.21, p.85-89, 2006.

STANCATO, G.C.; BEMELMANS, P.F.; VEGRO, C.L.R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, n.1, p.25-33, 2001.

STANCATO, G.C.; ABREU, M.F.; FURLANI, A.M.C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, v. 67, p. 51-57, 2008.

TANNER, W.; BEEVERS, H. Transpiration, a prerequisite for long-distance transport of minerals in plants? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.9443-9447, 2001.

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

UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.2, p. 267-269, 2007.

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

VENCATO, Â. **Anuário brasileiro das flores 2006**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2006.

VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; TEIXEIRA, L.S.; CARVALHOS, S.V.; MOTOIKE, Y.S.; NOVAIS, F.R.; CECON, R.P. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. Revista Ceres, Viçosa, v.47, n.286, p.613-628, 2002.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J.A.T; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, v.138, p.198–209, 2012.

ZHANG, Y.; LEE, Y.; DENG, L.; ZHAO, S. Asymbiotic germination of immature seeds and the seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw., an endangered lady's slipper orchid. **Scientia Horticulturae**, v.164, p.130–136, 2013.

YAM, T.W.; ARDITTI, J. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reporter**, v.3, p.1-56, 2009.

CAPÍTULO I

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ESPÉCIES DE CATLEIAS EM MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS

RESUMO

A destruição do habitat natural das orquídeas juntamente com o extrativismo predatório tem levado muitas espécies ao risco de serem extintas. Estudos que facilitem a produção de mudas tendem a auxiliar na preservação das espécies. Na natureza, a taxa de germinação das sementes de orquídea é muito baixa, sendo recomendada a germinação assimbiótica para obtenção de maior número de mudas. A germinação assimbiótica ocorre com o fornecimento de condições ideais de nutrição, luz, temperatura, pH e assepsia. A composição do meio de cultura tem grande influência no desempenho dos cultivos *in vitro* e afeta diretamente a complexidade no preparo do mesmo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a germinação de sementes de *Cattleya intermedia* e *Cattleya warneri* em meios alternativos. O delineamento experimental consistiu em um fatorial 5x2+1 disposto inteiramente ao acaso, sendo testado cinco meios de cultura, duas doses de polpa de banana (sem polpa e com 100 g.l⁻¹) e um meio adicional elaborado a partir de compostos orgânicos (S). Os meios testados foram Murashige e Skoog com metade da concentração de macronutrientes (½MS), Knudson C (KC), suplemento para orquídea da marca B&G[®] (BG), suplemento para orquídea da marca B&G[®] com 2/3 da concentração de sais (E) e fertilizante comercial Kristalon Laranja[®] (KR). As sementes foram desinfestadas, inoculadas em igual volume de solução de semente nos frascos e mantidas em sala de crescimento até o momento da avaliação. O desempenho dos meios para a germinação foi obtido através da contagem do número total de protocormos formados enquanto que a diferenciação inicial dos protocormos foi verificada através da classificação deles em diferentes estádios, após 100 dias da inoculação para *C. intermedia* e 120 dias para *C. warneri*. Verificou-se que os meios ½MS e E apresentaram a maior quantidade de protocormos formados, enquanto que os meios KR e E proporcionaram o melhor desenvolvimento dos protocormos, ou seja, maior conversão dos mesmos em plântulas. Além disso, observou-se que o uso da polpa da banana, de forma geral, não é benéfico à germinação e formação de protocormos das espécies de orquídea estudadas. Deste modo, observou-se que o meio favorável à germinação não apresenta mesmo comportamento para o desenvolvimento das plântulas.

Palavras-chave: orquídeas, germinação assimbiótica, meio de cultura, protocormos, polpa de banana.

ABSTRACT

The destruction of the natural habitat of orchids along with extraction has led many species to the risk of becoming extinct. Studies that facilitate the production of seedlings tend to assist in the preservation of species. In nature, the rate of germination of orchids is very low, being recommended assymbiotic germination for the greatest number of seedlings. The assymbiotic germination occurs providing ideal conditions of nutrient, pH and aseptically. The composition of culture medium has great influence on the performance of *in vitro* cultures and directly affects the complexity of preparing it. The aim of this study was to evaluate the performance of alternative media for seed germination of *Cattleya intermedia* and *Cattleya warneri*, as well as the influence of banana pulp on germination. The experiment consisted of a 5x2+1 factorial design at random, testing five culture media, two doses of banana pulp (no pulp and 100 g.l⁻¹) and an additional medium elaborated from organic compounds (S). The tested media were: Murashige and Skoog medium with half the concentration of macronutrients (MS), Knudson C (KC), Supplement to Orchid B&G® (BG), Supplement to Orchid B&G® with 2/3 of the salt concentration (E), commercial fertilizer Kristalon Orange® (KR). Seeds were sterilized, inoculated in equal quantity in the culture flasks and placed in a growth chamber until the moment of evaluation. The performance of media for germination was obtained by counting the number of protocorms formed and for initial differentiation by classifying them in different stages of development, after 100 days of inoculation for *C. intermedia* and after 120 days for *C. warneri*. Medium ½MS and medium E revealed the highest amount of protocorms formed, however medium KR and E provided the best protocorm development, that is, the highest conversion rate of protocorms into plantlets. Furthermore, it was observed that the use of banana pulp in general is not beneficial to germination of orchid seeds. Thus, results indicate that some medium favorable to germination may not be the most suitable for the subsequent development of the plants.

Keywords: orchids, assymbiotic germination, media culture, protocorms, banana pulp.

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas apresentam um vasto número de gêneros e espécies distribuídas ao redor do mundo, mas a maior concentração é encontrada nas regiões tropicais. O Brasil, devido à sua grande extensão e variedade de ecossistemas, possui muitas espécies nativas de grande exuberância, dentre elas as do gênero *Cattleya* e *Laelia*, como *Laelia purpurata*, *Cattleya labiata*, *Cattleya intermedia* (Figura 1-A) e *Cattleya warneri* (Figura 1-B).



Figura 1. Inflorescência de *Cattleya intermedia* (A) e *Cattleya warneri* (B). Fonte: OrquidaRio

A espécie *C. intermedia* é nativa da Floresta Atlântica Costeira do Sul e Sudeste Brasileiro e, em geral, cresce como uma epífita, mas também pode ser encontrada crescendo como terrestre. Sua floração geralmente ocorre no outono. Já a espécie *Cattleya warneri* possui algumas características próximas à espécie *Cattleya labiata*, tendo sido inicialmente descrita por T. Moore em 1862. Ela é endêmica dos estados do Espírito Santo e Minas Gerais, e sua floração ocorre durante os meses de junho e julho (BRAEM, 1986). Por ser uma espécie muito bela, com alto valor de mercado, vem sofrendo com o extrativismo predatório. Este fator junto com a destruição do seu habitat natural levou essa espécie à situação de alto risco de desaparecimento da natureza, reconhecido pelo Ministério do Meio Ambiente em 2008 (JORGE *et al.*, 2011). Neste sentido, estudos que visam aperfeiçoar a propagação das orquídeas tornam-se importantes para a conservação dessa e de outras espécies.

As orquídeas apresentam fecundação cruzada e seus frutos se desenvolvem em formato de cápsula no interior da qual as sementes são formadas. Dentro de uma única cápsula existem milhares de sementes. Entretanto, na natureza, poucas germinam, uma vez que não possuem reservas nutritivas (RAMOS, 1969) e necessitam de simbiose com fungos micorrízicos para completar o desenvolvimento das plântulas.

Em 1922, Lewis Knudson descobriu que a associação com os fungos micorrízicos não era obrigatória e que era possível germinar as sementes de orquídea em meio de cultura desde que sob condições adequadas que imitassem o ambiente originado pela simbiose com o fungo. Isso deu início ao desenvolvimento de técnicas de germinação assimbiótica de orquídeas e revolucionou a produção de mudas (YAM & ARDITTI, 2009), pois a germinação *in vitro* pode elevar a porcentagem de germinação para valores superiores a 95%, dependendo da

espécie. Além disso, permite a aceleração no processo de obtenção de mudas, já que o desenvolvimento *in vitro* das plântulas ocorre de forma mais rápida e propicia a obtenção de mudas de melhor qualidade, com maior uniformidade e livre de doenças.

Sabe-se que, no cultivo *in vitro*, o meio de cultura tem grande influência sobre as respostas dos tecidos vegetais, pois ele é o responsável por fornecer o estímulo necessário para o desencadeamento dos processos de diferenciação e prover os nutrientes para formação das novas células e tecidos. Os meios são formulações constituídas de sais minerais, vitaminas, aminoácidos, fonte de carbono e reguladores de crescimento, que podem variar na combinação dos tipos e quantidades dos elementos. Essas combinações mudam em função do objetivo desejado, seja implantação de uma nova cultura em ambiente asséptico, conservação *in vitro*, multiplicação de parte aérea, enraizamento, e também da fase em que as culturas se encontram *in vitro*.

O cultivo *in vitro* de orquídeas requer, para distintas espécies, meios de cultura específicos a fim de proporcionar as melhores condições de crescimento (VENTURA, 2007), pois as necessidades nutricionais variam conforme o genótipo e o estágio de desenvolvimento da planta. Não existe, ainda, um meio específico e ideal quanto à composição nutricional para todos os gêneros, espécies, híbridos ou clones (VENTURA, 2002).

Os meios de cultura mais tradicionais nessa área necessitam de uma série de compostos químicos para a sua formulação, o que dificulta a produção de mudas principalmente por pequenos produtores que pretendem iniciar na atividade. Pesquisas têm mostrado que uma das formas de simplificar a produção do meio é através do uso de fertilizantes comerciais como base nutricional (MORAES *et al.*, 2009a; MORAES *et al.*, 2009b; STANCATO *et al.*, 2001; DRONK, 2004). Além disso, é possível adicionar compostos orgânicos para substituir ou suplementar os teores de açúcar, vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento no meio de cultura (GEORGE *et al.*, 2008). Os compostos orgânicos mais utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas para melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas são a polpa da banana e a água de coco. Arditti *et al.* (1982) recomendam a adição de polpa de banana da variedade “nanica” para o crescimento *in vitro* de diferentes espécies de orquídeas, enquanto que Torres *et al.* (2001) sugerem a possibilidade do uso de frutos verdes ou maduros de banana, resultando em diferentes efeitos no crescimento e desenvolvimento das plântulas cultivadas, com respostas diferenciadas para cada espécie e quantidade utilizada.

Os benefícios da polpa de banana para o desenvolvimento das plantas a partir de protocormos já são bem conhecidos, porém, existem poucos estudos sobre a influência deste aditivo orgânico na germinação das sementes (ARDITTI *et al.*, 1984; ISLAM *et al.*, 2000; FLASHSLAND *et al.*, 1996; SHIAU *et al.*, 2002, ZENG *et al.*, 2012). Embora a técnica de germinação *in vitro* de orquídeas seja utilizada por muitos pesquisadores e produtores há quase um século, o conhecimento disponível a respeito da composição nutricional que favorece a germinação e o crescimento *in vitro* de orquídeas ainda é bastante escasso (SUZUKI *et al.*, 2010). Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho de diferentes meios de cultura na germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya intermedia* e *Cattleya warneri*, assim como analisar a influência da adição de polpa de banana madura nos meios utilizados para a germinação destas espécies.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo Celular Vegetal do Centro de Ciências da Terra e do Mar da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), em Itajaí, Santa Catarina. As sementes de *Cattleya intermedia* e *Cattleya warneri* utilizadas para os experimentos de germinação foram doadas pelo Orquidário Quinta do Lago, localizado em Itaipava, Rio de Janeiro. As sementes foram coletadas, por profissionais capacitados, de capsula maduras, antes da sua abertura, de plantas saudáveis mantidas em casa de vegetação.

Para cada uma das duas espécies foram realizados experimentos separados, porém com igual metodologia. Os experimentos de germinação consistiram em um fatorial 5x2+1 inteiramente casualizado, onde foram testados cinco meios de cultura (Figura 2 e Tabela 2) com e sem polpa de banana madura, e um tratamento adicional, totalizando 11 tratamentos. Sendo assim, os meios testados foram:

1. $\frac{1}{2}$ MS – Murashige e Skoog (1962) com $\frac{1}{2}$ da concentração de macronutrientes;
2. $\frac{1}{2}$ MS+b – Murashige e Skoog com $\frac{1}{2}$ da concentração de macronutrientes, acrescido de 100 g.l⁻¹ polpa de banana;
3. KC – Knudson C (1946);
4. KC+b – Knudson C, acrescido de 100 g.l⁻¹ polpa de banana;
5. E – suplemento para orquídea da marca B&G[®] com 2/3 da concentração de nutrientes;
6. E+b – suplemento para orquídea da marca B&G[®] com 2/3 da concentração de nutrientes, acrescido de 100 g.l⁻¹ polpa de banana;
7. BG – suplemento para orquídea da marca B&G[®];
8. BG+b – suplemento para orquídea da marca B&G[®], acrescido de 100 g.l⁻¹ polpa de banana;
9. KR+b – fertilizante Krystalon Laranja[®] (NPK 6-12-36), na concentração de 3 g.l⁻¹;
10. KR+b – fertilizante Krystalon Laranja[®] (NPK 6-12-36), na concentração de 3 g.l⁻¹, acrescido de 100 g.l⁻¹ polpa de banana;
11. S – meio a base de compostos orgânicos (50 g.l⁻¹ de polpa de banana, 50 g.l⁻¹ polpa de tomate, 50 g.l⁻¹ de polpa de abacate, 50 g.l⁻¹ polpa de mamão, 50 ml.l⁻¹ de caldo de batata, 120 ml.l⁻¹ de água de coco).

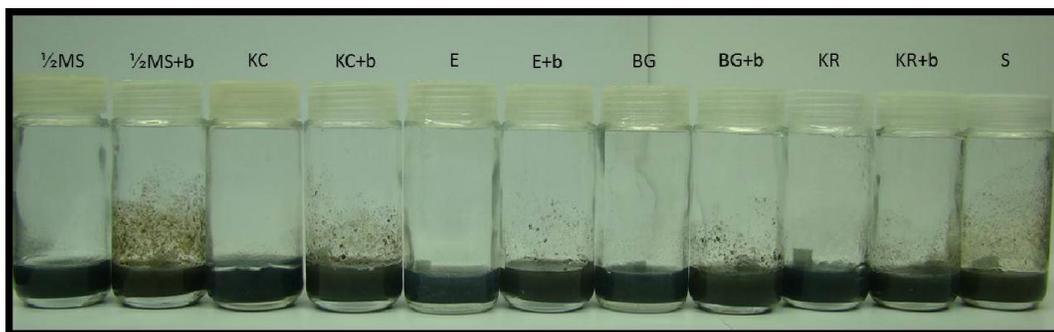


Figura 2. Meios utilizados para germinação de sementes de *C. intermedia* e *C. warneri*.

$\frac{1}{2}$ MS - Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes; $\frac{1}{2}$ MS+b - Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana; KC - Knudson C (1946); KC+b - Knudson C (1946) + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana; E - Suplemento para orquídeas B&G[®] diluído 2/3; E+b - Suplemento para orquídeas B&G[®] diluído 2/3 + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana; BG - Suplemento para orquídeas B&G[®]; BG+b - Suplemento para orquídeas B&G[®] + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana; KR - Kristalon Laranja[®]; KR+b - Kristalon Laranja[®] + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana; S - meio a base de compostos orgânicos.

Tabela 2. Composição nutricional dos meios de cultura utilizados para germinação das sementes de *C. intermedia* e *C. warneri* (mg.l⁻¹).

Componentes (mg.l ⁻¹).	Meios de cultura				
	½MS	KC	BG*	E*	KR*
N total	420,5	245,0	446,5	256,5	180,0
N-nitrico	276,0	140,0	380,7	218,7	135,0
N-amoniaco	144,5	105,0	65,8	37,8	45,0
Relação (N-amoniaco:N-nitrico)	0,52	0,75	0,17	0,17	0,33
P ₂ O ₅	44,3	127,5	347,8	199,8	360,0
K ₂ O	446,0	82,5	902,4	518,4	1080,0
Mg	18,0	70,3	61,1	35,1	54,0
S	24,0	92,35	103,4	59,4	240,0
Fe	5,60	4,75	7,52	4,32	2,10
B	1,08		2,35	1,35	0,75
Cu	0,01		0,47	0,27	0,30
Mn	5,490	1,875	3,760	2,160	1,200
Mo	0,100		0,047	0,027	0,120
Zn	1,95		2,35	1,35	0,75
Ca	60,0	200,0	286,7	164,7	
Cl		286,7	164,7		
Ni		0,376	0,216		
Na		10,34	5,94		
Total de Solutos	1027,03	1121,69	2335,25	1243,38	1919,22

*Valores fornecidos pelo fabricante.

Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes (½MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G[®] (BG); Suplemento para orquídeas B&G[®] diluído 2/3 (E); Kristalon Laranja[®] (KR).

Os meios ½MS, KC e KR foram suplementados com 30 g.l⁻¹ de sacarose, 3 g.l⁻¹ de carvão ativado e 7 g.l⁻¹ de ágar. Já no meio à base da formulação pronta BG, que já vem com sacarose e carvão ativado, foi adicionado 10 g.l⁻¹ de ágar e no meio E, além do ágar, foi adicionado 10 gramas de sacarose para completar 30 g.l⁻¹ como nos demais meios. O meio S teve as polpas de mamão, abacate, tomate, banana, caldo de batata e água de coco, homogêneas com auxílio de liquidificador e foi acrescentado 20 g.l⁻¹ de sacarose, 3 g.l⁻¹ de carvão ativado e 8 g.l⁻¹ de ágar. A polpa de banana foi acrescentada na concentração de 100 g.l⁻¹, de polpa madura da variedade Prata, homogênea com auxílio de liquidificador.

Todos os meios tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 0,05$ antes da esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos.

A desinfestação e a inoculação das sementes foram realizadas em câmara de fluxo laminar, na qual foram pesadas 0,7 g de sementes, para ambas as espécies, e colocadas em seringa descartável de 25 ml para, em seguida, adicionarem-se 20 ml de solução de hipoclorito de sódio a 2% com duas gotas de Tween 20. As sementes ficaram imersas na solução por quinze minutos e então foram lavadas quatro vezes com água destilada esterilizada, ainda com o auxílio da seringa. Posteriormente, as sementes desinfestadas foram depositadas em um béquer, com adição de 80 ml de água destilada esterilizada, formando uma solução de sementes que ficou sob agitação constante por meio de agitador magnético, a fim de manter as sementes em suspensão. Com auxílio de micropipeta e ponteiras estéreis, foi depositado 800 μl de solução de semente em cada frasco de vidro com capacidade de 100 ml contendo 15 ml de meio de cultura. Os frascos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]). Detalhes dos procedimentos são demonstrados na Figura 3. Os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância média de 30 a 50 $\mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo considerado cada frasco uma repetição. O experimento de germinação de sementes de *C. intermedia* foi avaliado após 100 dias de cultivo e o experimento com sementes de *C. warneri* foi avaliado 120 dias após a inoculação, sendo que foram consideradas como germinadas as sementes que originaram protocormos em qualquer estágio.

A análise da germinação das sementes foi realizada pela contagem dos protocormos formados e a análise do desenvolvimento inicial dos protocormos foi efetuada conforme Suzuki *et al.*(2009), com pequenas modificações, onde procurou-se classificar os protocormos conforme o seu estágio de desenvolvimento (Figura 4).

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5% com auxílio do software SisVar v.5.1 (FERREIRA, 2011).



Figura 3. Procedimentos para implantação de culturas *in vitro* de *C. intermedia* a partir de sementes: cápsula em processo de maturação na planta (A); coleta de sementes a partir de cápsula madura aberta (B); detalhe das sementes (C); desinfestação das sementes com auxílio de seringa (D); preparo de solução de sementes (E); deposição de alíquota de solução de sementes no frasco contendo meio de cultura (F); frascos de cultura na sala de crescimento (G).



Figura 4. Morfologia geral e classificação dos estádios de desenvolvimento de protocormos até a formação de plântulas de *Cattleya intermedia*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após vinte dias da implantação do experimento, observou-se o início da germinação das sementes de ambas as espécies em todos os meios, através de análise visual do intumescimento dos embriões e produção de clorofila pelos protocormos (Figura 5). A exceção foi o meio alternativo (S), no qual as sementes não germinaram. Por isso, este meio foi desconsiderado nas análises estatísticas e, portanto, não é recomendado para a germinação e desenvolvimento inicial das espécies aqui estudadas. A ausência de germinação de sementes no meio S pode ser devida a atuação de alguma substância orgânica inibindo o processo germinatório, ou a mistura de compostos pode ter resultado em um meio rico em solutos, com alto potencial osmótico, dificultando a absorção de água pelas sementes e início do processo de germinação.

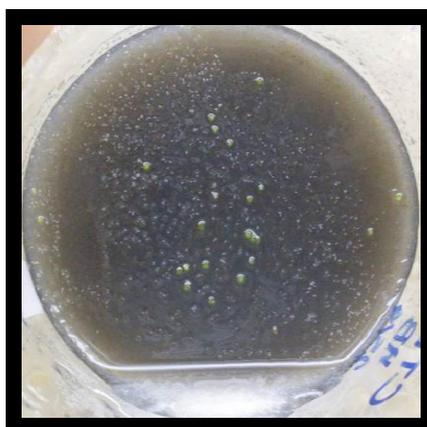


Figura 5. Início do processo de germinação de sementes de *C. intermedia* após 20 dias da inoculação em meio Krystalon Laranja[®] com polpa de banana.

Como não houve germinação no meio S, esse foi excluído da análise estatística e os experimentos foram analisados como um fatorial 5x2, sendo cinco composições de meios de cultura e duas doses de polpa de banana - com e sem polpa. O resumo da análise de variância pode ser observado na Tabela 3 e 4. Observamos que houve resposta significativa para o meio de cultura em todos os estádios avaliados, já a influencia da polpa de banana não foi significativa apenas nos estádios D e E para *Cattleya intermedia* e estádio E para *Cattleya warneri*. A interação entre o meio de cultura e o uso de polpa de banana foi significativa para todos os estádios, com exceção no número total de protocormos formados de *Cattleya intermedia*, evidenciando que a influencia do uso da polpa de banana deve ser estudada para cada meio em específico.

Tabela 3. Resultado da análise de variância para os diferentes estádios e número totais de protocormos formados de *C. intermedia* a partir de sementes, após 100 dias de cultivo *in vitro*.

Fator	Estádio					TOTAL
	A	B	C	D	E	
meio	*	*	*	*	*	*
banana	*	*	*	ns	ns	*
interação	*	*	*	*	*	ns
cv (%)	72,58	31,08	25,09	31,79	62,01	15,12

ns - não significativo ao teste f a 5%; * - significativo ao teste f a 5%

Tabela 4. Resultado da análise de variância para os diferentes estádios e número totais de protocormos formados de *C. warneri* a partir de sementes, após 120 dias de cultivo *in vitro*.

Fator	Estádio					TOTAL
	A	B	C	D	E	
meio	*	*	*	*	*	*
banana	*	*	*	*	ns	*
interação	*	*	*	*	*	*
cv (%)	37,82	23,8	21,78	21,22	57,96	11,78

ns - não significativo ao teste f a 5%; * - significativo ao teste f a 5%

Segundo nossas observações, para os parâmetros avaliados, os resultados aferidos sugerem comportamento similar para ambas às espécies. Os meios de cultura com maior índice de germinação, ou seja, que formaram o maior número total de protocormos a partir das sementes, foram o ½MS e o E sem polpa de banana. Estes não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%, com respectivamente 410 e 402,33 protocormos formados de *C. intermedia* (Tabela 5) e 389,25 e 390 protocormos formados de *C. warneri* (Tabela 6), mas diferem estatisticamente dos meios KC, BG e KR, sendo que estes não diferem entre si.

Tabela 5. Número de protocormos totais de *C. intermedia* obtidos a partir da germinação de sementes após 100 dias de cultivo *in vitro*.

	Meios de cultura					Média
	½MS	KC	BG	E	KR	
<i>Estádio A</i>						
com banana	7,66 Ba*	4,33 Aa	3,33 Aa	15,33 Aa	2,00 Aa	6,53
sem banana	43,00 Aa	3,33 Ab	5,33 Ab	14,33 Ab	3,66 Ab	13,93
Média	25,33	3,83	4,33	14,83	2,83	cv = 72,58%
<i>Estádio B</i>						
com banana	62,00 Ba	48,33 Aa	44,00 Aa	57,00 Aa	21,66 Ba	46,60
sem banana	121,00 Aa	42,66 Abc	36,33 Ac	85,66 Aab	56,66 Abc	68,47
Média	91,50	45,50	40,17	71,33	39,17	cv = 31,08%
<i>Estádio C</i>						
com banana	231,33 Aa	74,66 Bb	89,66 Bb	131,00 Bb	111,00 Ab	127,53
sem banana	214,33 Aab	142,66 Abc	172,00 Aabc	251,33 Aa	113,66 Ac	178,80
Média	222,83	108,67	130,83	191,17	112,33	cv = 25,09%
<i>Estádio D</i>						
com banana	48,66 Aa	8,00 Bb	4,00 Bb	86,00 Aa	81,33 Aa	45,60
sem banana	28,00 Ab	48,00 Ab	60,00 Aab	42,00 Bb	90,00 Aa	53,93
média	38,33	28,33	32,00	64,33	85,83	cv = 31,79%
<i>Estádio E</i>						
com banana	8,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ab	17,00 Aa	18,3 Ba	8,67
sem banana	3,66 Ab	1,00 Ab	6,00 Ab	8,33 Ab	31,3 Aa	10,07
média	5,83	0,50	3,00	12,67	24,83	cv = 62,01
<i>TOTAL</i>						
com banana	357,66 Aa	135,33 Bc	141,00 Bc	306,33 Bab	234,33 Abc	118,07
sem banana	410,00 Aa	238,33 Ab	279,66 Ab	402,33 Aa	295,66 Ab	173,73
média	383,83	186,83	210,33	354,33	265,00	cv = 15,12%

* médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes (½MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Suplemento para orquídeas B&G® diluído 2/3 (E); Kristalon Laranja® (KR).

Tabela 6. Número de protocormos totais de *C. warneri* obtidos a partir da germinação de sementes após 120 dias de cultivo *in vitro*.

	Meios de cultura					Média
	½MS	KC	BG	E	KR	
<i>Estádio A</i>						
com banana	7,5 Ba*	4,7 Ba	3,5 Ba	11,2 Ba	3,2 Aa	6,05
sem banana	42,0 Aa	11,7 Ac	12,5 Abc	21,7 Ab	6,5 Ac	18,90
Média	24,75	8,25	8,00	16,50	4,87	CV = 37,82%
<i>Estádio B</i>						
com banana	70,2 Ba	47,7 Aab	48,5 Aab	61,5 Ba	27,0 Bb	51,00
sem banana	128,0 Aa	50,0 Ac	43,5 Ac	91,2 Aa	64,0 Abc	75,35
Média	99,12	48,87	46,00	76,37	45,50	CV = 23,8%
<i>Estádio C</i>						
com banana	213,2 Aa	56,0 Bb	75,7 Bb	114,7 Bb	93,0 Ab	110,55
sem banana	195,0 Aab	143,0 Abc	158,5 Abc	234,0 Aab	103,5 Ac	166,80
Média	204,12	99,50	117,12	174,37	98,25	CV = 21,78%
<i>Estádio D</i>						
com banana	41,7 Ab	3,2 Bc	3,2 Bc	83,0 Aa	77,2 Ba	41,70
sem banana	22,0 Bc	40,0 Abc	54,0 Ab	37,2 Bbc	96,0 Aa	49,85
Média	31,87	21,62	28,62	60,12	86,62	CV = 21,22%
<i>Estádio E</i>						
com banana	7,2 Aab	0,0 Ab	1,2 Ab	15,2 Aa	15,7 Ba	7,90
sem banana	2,2 Ab	2,2 Ab	2,2 Ab	6,0 Bb	29,0 Aa	8,35
Média	4,75	1,12	1,75	10,62	22,37	CV = 57,96%
<i>TOTAL</i>						
com banana	340,00 Ba	111,75 Bc	132,25 Bc	285,75 Ba	216,25 Bb	217,20
sem banana	389,25 Aa	247,00 Ab	270,75 Ab	390,25 Aa	299,00 Ab	319,25
média	364,62	179,37	201,50	338,00	257,62	CV = 11,78%

* médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes (½MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Suplemento para orquídeas B&G® diluído 2/3 (E); Kristalon Laranja® (KR).

O meio ½MS apresentou germinação uniforme e satisfatória, com protocormos bem formados e de coloração verde vivo, assim como o meio E. No meio KC, a maior parte das sementes nem chegou a germinar, enquanto que no meio BG sem banana muitas sementes germinaram, mas morreram (Figura 6). Também podemos observar que o mesmo frasco contém protocormos em vários estádios, mostrando uma grande desuniformidade no processo de germinação.

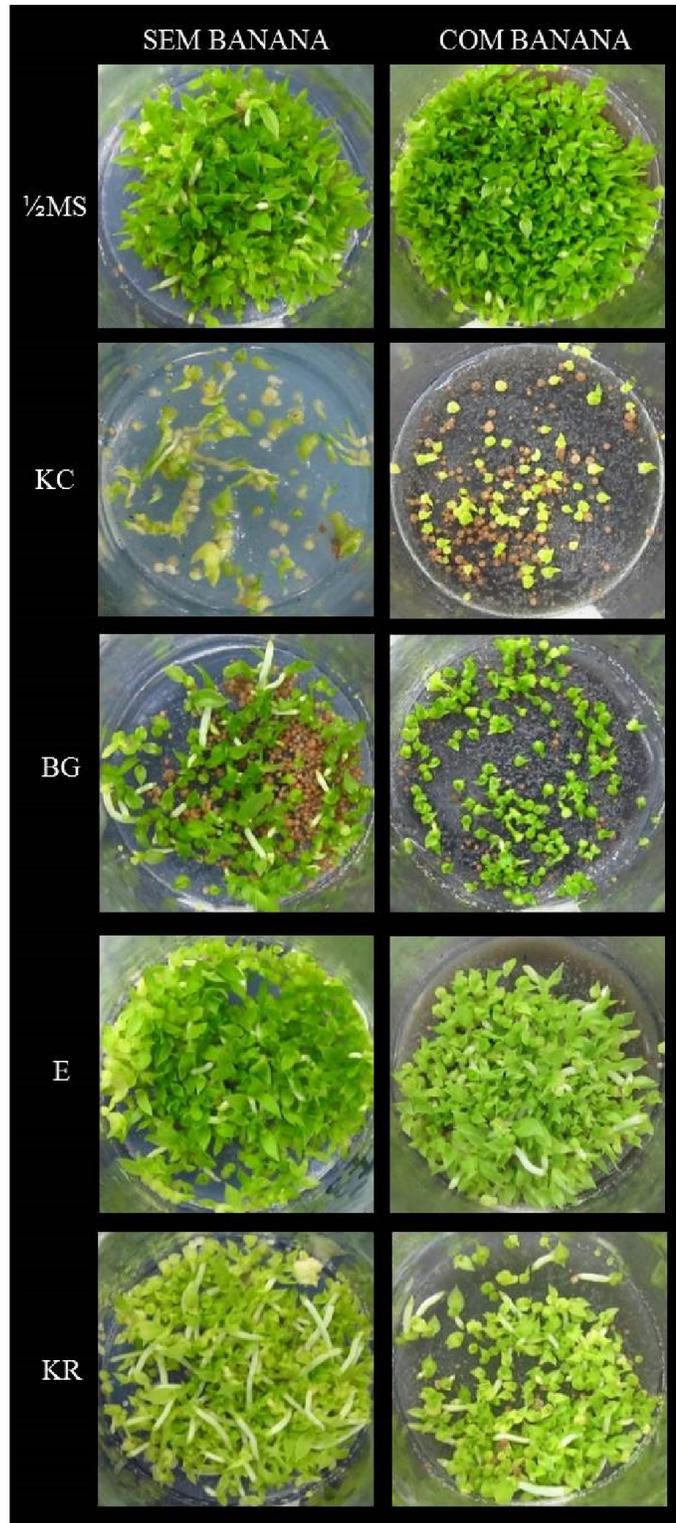


Figura 6. Comparação visual da germinação de sementes de *Cattleya intermedia* em diferentes meios de cultura após 100 dias.

Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes (½MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Suplemento para orquídeas B&G® diluído 2/3 (E); Kristalon Laranja® (KR).

O nitrogênio é um elemento de grande variação entre as diversas formulações dos meios de cultura. Esse é um elemento essencial que faz parte de muitos compostos celulares, como aminoácidos e ácidos nucléicos, influenciando o crescimento da planta em todas as fases (TAIZ & ZAIGER, 2009). Dijk & Eck (1995) afirmaram que embriões de um híbrido de *Cattleya* eram incapazes de usar íons nitrato nos primeiros sessenta dias de desenvolvimento, em contraste com íons amônio. Raghavan & Torrey (1964) também mostraram que o amônio era crítico para a germinação e desenvolvimento inicial de um híbrido de *Cattleya*. Neste mesmo sentido, Ichihashi & Yamashita (1977) verificaram que sementes de *Bletilla striata* têm preferência por baixas concentrações de nitrogênio inorgânico e pela forma reduzida amônia (NH₃⁺), e Rasmussen (1995) observou uma redução na porcentagem de germinação das sementes de *Dactylorhiza majalis* quando se aumentava a concentração de nitrato no meio de cultura. Kauth *et al.* (2006) observaram em *Calopogon tuberosus* que os meios de cultura com maior proporção de amônia em relação ao nitrato são mais eficazes para a germinação das sementes desta espécie de orquídea. Mais recentemente, Suzuki *et al.* (2010) observaram que a presença de amônia é mais eficiente para a germinação de sementes de *Cattleya bicolor* do que o nitrato, pois maiores taxas de germinação foram encontradas no meio com maior relação amônia:nitrato.

Diferentemente dos resultados da literatura, a germinação de sementes de *C. intermedia* e *C. warneri* parece não sofrer grande influência da relação entre os teores de amônia e nitrato, uma vez que a maior formação de protocormos ocorreu no meio ½MS, cuja relação amônia:nitrato é intermediária (0,52), e no meio E, cuja relação amônia:nitrato (0,17) e o teor de nitrogênio amoniacal são os mais baixos entre os meios testados. Esses resultados sugerem que as preferências pelo uso de formas nítricas ou amoniacais variam conforme a espécie (ADAMS & ATTIWILL, 1982).

Em relação ao uso da polpa de banana na composição do meio de cultura, observou-se um efeito prejudicial à germinação das sementes, pois houve menor formação de protocormos em todos os meios de cultura com polpa quando comparado ao mesmo meio sem a polpa de banana. Entretanto, nos resultados do meio ½MS e KR para *C. intermedia*, a diferença do uso da polpa de banana não foi estatisticamente significativa. As diferenças visuais da germinação de *C. intermedia* nos diferentes meios podem ser observadas na Figura 5. Estes resultados diferem daqueles encontrados por Shiau *et al.* (2002) na germinação e desenvolvimento de *Anoectochilus formosanus*, em que foram obtidos melhores resultados com o meio de cultura ½MS suplementado com 8% de polpa de banana e dos encontrados por Islam *et al.* (2000), que observaram em seus resultados com *Cattleya sp.*, que a banana homogeneizada aumentou a germinação e o crescimento de plântulas. Por outro lado, os resultados obtidos no presente trabalho assemelham-se aos de Arditti *et al.* (1984), que afirmam que a adição da polpa de banana no meio, quando utilizado para semeadura, pode inibir a germinação das sementes de algumas espécies de orquídea, e aos de Yam & Weatherhead (1988), que observaram que ocorreu inibição da germinação de várias espécies de orquídeas de Hong Kong, ao utilizar o meio de Knudson suplementado com 100 g.l⁻¹ de polpa de banana. Também Zeng *et al.* (2012) observaram menor germinação de sementes de *Paphiopedilum wardii* em meio ½MS com polpa de banana do que no mesmo meio sem o aditivo orgânico, afirmando que altas concentrações de polpa de banana no meio suprimem a germinação de sementes e formação de protocormos para essa espécie.

Segundo George (1993) e Hossain & Rubel (2013), o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura pode reduzir a porcentagem de germinação de sementes em virtude da regulação osmótica do meio de cultura. Concentrações elevadas de sacarose fazem com que o meio não possua água disponível para a embebição das sementes, impossibilitando o início do processo de germinação. Reis *et al.* (2008) observaram menor porcentagem de germinação de sementes de *Melissa officinalis* no meio contendo 3% de sacarose em

comparação com 1,5%. Além disso, Thorpe *et al.* (2008) comentam sobre a associação dos efeitos da sacarose suplementada ao meio de cultura com a conversão dos protocormos, observando que estes podem perder permanentemente a capacidade regenerativa quando cultivadas por muito tempo em altas concentrações de sacarose. Como a polpa de banana é rica em sacarose, a sua adição no meio de cultivo pode prejudicar a germinação e a capacidade de desenvolvimento dos protocormos por elevar os teores de sacarose do meio.

É conhecido que as giberelinas estimulam a germinação de sementes não dormentes. No entanto, há outros reguladores vegetais envolvidos no processo da germinação, como as citocininas, que têm a capacidade de promover a germinação em algumas espécies. Porém, os efeitos destas nesse processo ainda são pouco conhecidos (KERBAUY, 2008) e, em orquídeas, informações sobre a capacidade das citocininas promoverem a germinação são escassas.

Pesquisas realizadas há alguns anos evidenciam a presença de citocininas na polpa de banana (GE *et al.*, 2008). Soares *et al.* (2012) estudaram a embebição de sementes de *Dendrobium nobile* em diferentes doses de citocinina e giberelina como tratamento pré-germinativo e observaram que as sementes germinaram melhor na ausência de reguladores de crescimento. Resultados semelhantes foram observados por Miyoshi & Mii (1995) com *Calanthe discolor*, em que as maiores concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) na embebição inibiram a germinação das sementes. Entretanto, Pedroza *et al.* (2005) relatam que a adição de 3,37 mg.l⁻¹ de BAP, combinada ou não com auxina e ácido giberélico em meio de cultura, promoveu a porcentagem máxima de germinação de sementes de *Compantia falcata*. Esses resultados evidenciam que a resposta das sementes ao tratamento com citocinina podem ser dependentes dos níveis endógenos, variando conforme a espécie. Neste sentido, a redução nas taxas de germinação encontradas no presente estudo, com a menor formação de protocormos quando adicionada a polpa de banana, podem estar relacionadas com as alterações no balanço hormonal provocadas pela polpa. Além disso, a adição da polpa eleva os teores de nutrientes no meio, podendo aumentar o potencial osmótico do mesmo, diminuindo a disponibilidade de água e interferindo negativamente no processo de germinação.

Segundo Stewart (1989), as orquídeas que germinam *in vitro* podem ser divididas em dois grupos de acordo com suas necessidades nutricionais básicas. No primeiro grupo estão as orquídeas cujas sementes germinam em meios de cultura mais simples como o KC e o segundo grupo engloba as espécies que necessitam de meios com maior quantidade de macronutrientes e micronutrientes como o MS. Suzuki *et al.* (2009), trabalhando com *Hadrolaelia tenebrosa*, obtiveram maior porcentagem de germinação no meio KC quando comparado com o ½MS e o VW (VACIN & WENT, 1949), evidenciando que esta espécie germina melhor em meios mais pobres. Já Lo *et al.* (2004), utilizando os mesmos meios, obtiveram germinação de sementes de *Dendrobium tosaense* apenas no meio ½MS.

Roy *et al.* (2011), afirmam que *Vanda coerulea* germina melhor em meios com maiores teores de nutrientes, como PhytamaxTM e ½MS em comparação com VW e KC. Já Hossain & Rubel (2013) trabalhando com *Spathoglottis plicata*, obtiveram maiores teores de germinação em meios ½MS, que é ainda mais rico em nutrientes, quando comparado ao PhytamaxTM.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que tanto *C. intermedia* como *C. warneri* parecem pertencer ao segundo grupo. Isso porque os melhores resultados de formação de protocormos foram encontrados nos meios com teores mais altos de macronutrientes, onde houve melhor germinação.

Alguns autores afirmam que a germinação de sementes de orquídea está diretamente relacionada com a concentração total de solutos no meio, sendo que, a maior parte das espécies germina melhor em meios com menores concentrações de soluto (ROY *et al.*, 2011;

ZHANG *et al.*, 2013). George (1993) afirma que a adição de componentes ao meio de cultura, especialmente macronutrientes e fontes de carbono, representa decréscimo considerável no potencial osmótico do meio. A presença de maior concentração de sais no meio de cultura interfere no potencial osmótico e, conseqüentemente, na disponibilidade de água para o processo de embebição das sementes e germinação.

Reis *et al.* (2008) observaram maior porcentagem de germinação de sementes de *Melissa officinalis*, da família das *Lamiaceae*, em meio MS reduzido em um quarto da concentração de sais. Souza *et al.* (2003), estudando a germinação de embriões de *Lychnophora pinaster*, uma asterácea, observaram que o meio MS inibiu a germinação enquanto que a sua redução para 25% do teor de sais proporcionou maiores taxas de germinação. Em estudos comparativos com *Phalaenopsis*, obtiveram-se altos índices de germinação quando utilizado o meio de cultura com um terço da concentração dos sais do meio MS e nenhuma germinação para o meio MS completo (FAVETTA *et al.*, 2008). Devido ao alto potencial osmótico do meio MS, é recomendável a redução no teor de sais para a germinação de sementes de orquídeas. Por isso, no presente estudo utilizamos o meio MS com metade da concentração dos macronutrientes. O fato do meio BG ter apresentado valores inferiores ao E na formação dos protocormos é devido a maior concentração salina do meio BG, que resulta em maior potencial osmótico do meio quando usado com 100% de sua concentração de sais, assim como o meio MS.

Considerando que a germinação iniciou ao mesmo tempo para ambas as espécies, aos 20 dias após a inoculação, os protocormos de *Cattleya intermedia* apresentam desenvolvimento inicial mais rápido que os obtidos para *Cattleya warneri*. Todavia, em ambas a maior parte dos protocormos formados, em todos os meios, encontra-se no estágio C - protocormos com duas ou mais folhas sem a formação de raízes – evidenciando a desuniformidade no processo de germinação.

Observa-se que o meio KR sem polpa de banana é o meio que desenvolveu mais protocormos nos estádios D e E, o que evidencia maior aceleração no desenvolvimento dos protocormos e conseqüente transformação dos mesmos em plântulas com o uso deste meio.

Para facilitar a visualização dos resultados e distinguir os meios que possibilitaram a maior germinação, ou seja, formação de protocormos totais, dos meios que aceleraram o desenvolvimento dos mesmos, com a conversão dos protocormos em plântulas, dividimos os estádios em dois grandes grupos: protocormos (estádios A, B e C) e plântulas (estádios D e E). Os resultados desta divisão estão expressos nas Tabelas 7 e 8. Neste caso, o meio que possibilitou a maior formação de protocormos foi o ½MS seguido do E, enquanto que para o desenvolvimento de plântulas, ou seja, com formação de raiz, o meio KR sem polpa de banana apresentou melhores resultados, seguidos do meio E com polpa de banana. Observamos que há acréscimo no número de plântulas formadas no meio E e no meio ½MS quando adicionados de polpa de banana madura, diferindo dos demais resultados.

Tabela 7. Número de protocormos (fases A, B e C) e plântulas (fases D e E) formadas a partir de sementes de *Cattleya intermedia*, após 100 dias de cultivo.

	Meios de cultura					Média
	½MS	KC	BG	E	KR	
<i>Protocormos</i>						
com banana	301,00 Ba	127,33 Bb	137,00 Bb	203,33 Bab	134,66 Bb	180,66
sem banana	378,33 Aa	188,66 Ab	213,66 Ab	351,33 Aa	174,00 Ab	261,20
média	339,66	158,00	175,33	277,33	154,33	cv = 19,04%
<i>Plântulas</i>						
com banana	56,66 Ab	8,00 Bc	4,00 Bc	103,00 Aa	99,66 Aa	54,26
sem banana	31,66 Bc	49,66 Abc	66,00 Ab	51,00 Bb	121,66 Aa	64,00
média	35,00	28,83	35,00	77,00	110,66	cv = 23,61%
<i>Totais</i>						
com banana	357,66	135,33	141,00	306,33	234,33	118,07
sem banana	410,00	238,33	279,66	402,33	295,66	173,73
média	383,83	186,83	210,33	354,33	265,00	cv = 15,12%

* médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes (½MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Suplemento para orquídeas B&G® diluído 2/3 (E); Kristalon Laranja® (KR).

Tabela 8. Número de protocormos (fases A, B e C) e plântula (fases D e E) formadas a partir de sementes de *Cattleya warneri*, após 120 dias de cultivo.

	Meios de cultura					Média
	½MS	KC	BG	E	KR	
<i>Protocormos</i>						
com banana	291,00 Ba	108,50 Bc	127,75 Bbc	187,50 Bb	123,25 Bbc	167,60
sem banana	365,00 Aa	204,75 Ab	214,50 Ab	347,00 Aa	174,00 Ab	261,05
média	328,00	156,62	171,12	267,25	148,62	cv = 15,55%
<i>Plântulas</i>						
com banana	49,00 Ab	3,25 Bc	4,50 Bc	98,25 Aa	93,00 Ba	49,60
sem banana	24,25 Bc	42,25 Abc	56,25 Ab	43,25 Bb	125,00 Aa	58,20
média	36,62	22,75	30,37	70,75	109,00	cv = 16,78%
<i>Totais</i>						
com banana	340,00	111,75	132,25	285,75	216,25	217,20
sem banana	389,25	247,00	270,75	390,25	299,00	319,25
média	364,62	179,37	201,50	338,00	257,62	CV = 11,78%

* médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes (½MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Suplemento para orquídeas B&G® diluído 2/3 (E); Kristalon Laranja® (KR).

A Tabela 9 nos permite analisar os resultados na forma de porcentagem, em que, para *Cattleya intermedia* em média 88,2% das sementes germinadas permaneceram no estágio de protocormos no meio ½MS e somente 11,8% foram convertidas em plântulas, enquanto que, no meio KR 41,8% das sementes germinadas encontram-se no estágio de plântulas e apenas 58,2% delas permaneceram na fase de protocormos. Resultados semelhantes foram encontrados para germinação de sementes de *Cattleya warneri*, onde 90% das sementes germinadas em meio ½MS permaneceram em estágio de protocormo enquanto que apenas 10% foram convertidos em plântula. Já no meio KR 42,3% das sementes germinadas encontravam-se como plântulas e 57,7% como protocormos (Tabela 10). Isso evidencia a aceleração no desenvolvimento proporcionada por alguns meios, como o KR e o E, estimulando a formação de raízes e conversão dos protocormos em plântulas.

As cápsulas dessas espécies produzem milhares de sementes, e a sua germinação em meio de cultivo parece não apresentar grandes problemas, uma vez que pequenas quantidades de sementes originam grande número de protocormos. Sendo assim, na maioria das vezes, os produtores não chegam a utilizar o volume total de sementes no processo de semeadura, armazenando o restante, dessa forma, o fator limitante para eles não é gerar o maior número de protocormos possíveis, mas sim, acelerar o desenvolvimento destes, resultando em economias de material, mão-de-obra, e obtendo retorno financeiro mais rapidamente.

Tabela 9. Porcentagem de protocormos formados e plântulas em relação ao número total de sementes de *Cattleya intermedia* consideradas germinadas, após 100 dias de cultivo.

	Meios de cultura					Média
	½MS	KC	BG	E	KR	
	<i>Protocormos (%)</i>					
com banana	84,16	94,09	97,16	66,38	57,47	79,85
sem banana	92,28	79,16	76,40	87,32	58,85	78,80
Média	88,22	86,62	86,78	76,85	58,16	
	<i>Plântulas (%)</i>					
com banana	15,84	5,91	2,84	33,62	42,53	20,15
sem banana	7,72	20,84	23,60	12,68	41,15	21,20
Média	11,78	13,37	13,22	23,15	41,84	

Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes (½MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Suplemento para orquídeas B&G® diluído 2/3 (E); Kristalon Laranja® (KR).

Tabela 10. Porcentagem de protocormos formados e plântulas em relação ao número total de sementes de *Cattleya warneri* consideradas germinadas, após 120 dias de cultivo.

	Meios de cultura					Média
	½MS	KC	BG	E	KR	
	<i>Protocormos (%)</i>					
com banana	85,59	97,09	96,60	65,62	56,99	77,16
sem banana	93,77	82,89	79,22	88,92	58,19	81,77
Média	89,96	87,32	84,92	79,07	57,69	
	<i>Plântulas (%)</i>					
com banana	14,41	2,91	3,40	34,38	43,01	22,84
sem banana	6,23	17,11	20,78	11,08	41,81	18,23
Média	10,04	12,68	15,07	20,93	42,31	

Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes (½MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Suplemento para orquídeas B&G® diluído 2/3 (E); Kristalon Laranja® (KR).

Os resultados obtidos neste trabalho e outros estudos sobre a germinação de sementes e a análise do desenvolvimento inicial mostram que, em geral, o meio de cultura que promove a maior taxa de germinação e formação de protocormos não é o mais eficaz para o posterior desenvolvimento das plântulas (SUZUKI *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2010; DUTRA *et al.*, 2008; DUTRA *et al.*, 2009, ZENG *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram encontrados por Jorge *et al.* (2010) também com a espécie *C. warneri*, onde a mesma apresentou teores mais elevados de germinação, aos 20 dias de cultivo, no meio ½MS em relação ao meio KC e VW. Entretanto, após noventa dias observaram maior desenvolvimento e formação de raízes no meio KC.

Ainda em relação ao uso de meios alternativos para a germinação e desenvolvimento inicial de protocormos de orquídea, Moraes *et al.* (2009a) e Moraes *et al.* (2009b) trabalharam com germinação de *Cattleya tigrina* e *Cattleya loddigesii*, respectivamente, em meio MS com metade da concentração de macronutrientes e meios à base de fertilizantes comerciais: Hyponex® (NPK 6,5-9-19) e Kristalon Laranja®. Ambos verificaram, após 180 dias, que o meio à base do fertilizante Kristalon Laranja®, que continha menores teores de nitrogênio em relação aos outros meios, obteve o melhor desenvolvimento de plântulas, principalmente quanto ao número de raízes e o comprimento das mesmas. Entretanto, nestes experimentos não foi avaliada a porcentagem de germinação e número de protocormos formados em cada meio, apenas fizeram a avaliação do crescimento das plântulas formadas após 180 dias.

Além disso, o crescimento das raízes pode ser afetado por altas concentrações de sais (CALDAS *et al.*, 1998) como as encontradas no meio ½MS e BG. Pesquisas com concentrações decrescentes de sais nitrogenados no desenvolvimento de *Cattleya nobilior*, *Vanilla planifolia* e das bromélias *Pitcairnia flammaea* e *Vriesea philippocoburgii* mostraram que o desenvolvimento do sistema radicular foi favorecido nas baixas concentrações dos sais nitrogenados (MERCIER & KERBAUY 1991; MORAES *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2005). Suzuki *et al.* (2009) e Suzuki *et al.* (2010), trabalhando com germinação e desenvolvimento inicial de protocormos de *Hadrolaelia tenebrosa* e *Cattleya bicolor*, encontraram maior número de plântulas, ou seja, protocormos com raízes bem desenvolvidas, em meio VW quando comparado ao meio ½MS e KC, sendo que este meio apresenta menores teores de nitrogênio em comparação com os demais. No presente estudo, o meio com menor teor de nitrogênio era o KR, seguido pelo KC e E, com valores muito próximos, sendo

que nos meios KR e E houve a maior formação de plântulas com raízes, evidenciando que os teores de nitrogênio podem estar influenciando no desenvolvimento radicular. Entretanto, este raciocínio não explica o desenvolvimento insatisfatório obtido no meio KC, indicando que pode haver outros componentes influenciando na inibição da germinação verificada neste meio.

Os resultados encontrados no presente trabalho e os da literatura evidenciam que a escolha do meio de cultura é extremamente importante para o sucesso da germinação *in vitro* de orquídeas, o que varia de acordo a espécie em questão. Maximizar o sucesso da germinação assimbiótica depende da identificação das condições abióticas e o meio de cultivo mais adequado para cada espécie.

4 CONCLUSÕES

As espécies *Cattleya intermedia* e *Cattleya warneri* germinam melhor em meios contendo maior quantidade de nutrientes. Sendo assim, os meios MS com metade da concentração de macronutrientes e o meio BG com dois terços da concentração de sais apresentaram-se como os mais indicados para a germinação de sementes destas espécies, com a maior formação de protocormos totais.

Nas situações em que a germinação ocorrer em meio MS, recomenda-se transferência dos protocormos para meio BG com 2/3 da concentração de sais ou KR, visando acelerar o desenvolvimento radicular e a conversão dos protocormos em plântulas.

Uma vez que o número de sementes não é fator limitante para o cultivo *in vitro* dessas espécies de orquídeas, torna-se mais interessante o uso de meios que acelerem a produção das mudas, convertendo-se em economia para o produtor, sendo assim, é mais aconselhável o uso dos meios KR e E para a germinação e formação de plântulas.

A adição de polpa de banana madura nos meios de cultura, de forma geral, não proporcionou benefícios para a germinação de sementes de *C. intermedia* e *C. warneri*. O uso da polpa de banana na germinação somente é indicado se o objetivo for à formação de plântulas a partir de sementes com uso do meio E, neste caso, o acréscimo da polpa de banana ao meio é benéfico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.A.; ATTIWILL, P.M. Nitrate reductase activity and growth response of forest species to ammonium and nitrate sources of nitrogen. **Plant and Soil**, v.66, p.373-381, 1982.
- ARAÚJO, A.G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; RODRIGUES, V.A.; FERREIRA, A.L. Meios de cultura e GA₃ no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Horticultura Brasileira**, v.2, p.612-615, 2005.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993. 682p.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti, J. (ed). **Orchid Biology: Reviews and Perspectives III**. Ithaca: Cornell University Press. p.179-222, 1984.
- BRAEM, G.J. **Cattleya – Band II: Die unifoliaten (einblättrigen) Cattleyen**. Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim, 1986.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, v.1, p.87-132, 1998.
- DIJK, E.; ECK, N. Axenic *in vitro* nitrogen and phosphorus responses of some Dutch marsh orchids. **New Phytologist**, v.131, p.353-359, 1995.
- DRONK, A.G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para o cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden e *Rchib***. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. 30p. Dissertação (Mestrado).
- DUTRA, D.; JOHNSON, T.R.; KAUTH, P.J.; STEWART, S.L.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.94, p.11-21, 2008.
- DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.96, p.235-243, 2009.
- ICHIHASHI, S.; YAMASHITA, M. Studies on the media for orchid seed germination part 1: the effects of balances inside each cation and anion group for the germination and seedling development of *Bletilla striata* seeds. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.45, p.407-413, 1977.
- ISLAM, M.O.; MATSIU, S.; ICHIHASHI, S. Effects of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. **Lindleyana**, v.15, p.81-88, 2000.
- FAVETTA, M.M.S.; LEE, T.S.G.; SCHMIDT, V.A. **Uso de Meio sem Açúcar para o Desenvolvimento de Orquídeas *Phalaenopsis in vitro***. Anais... São Carlos, v.4, p.181, 2008.

- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FLACHSLAND, E.A.; TERADA, G. Medios de cultivo para la germinacion *in vitro* de 41 espécies de orquídeas. **Pacena**, v.12, 1996.
- GE, L.Y.; TAN, S.N.; YONG, J.W.H.; HUA, L.; ONG, E.S. Separation of cytokinin isomers with a partial filling-micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry approach. **Electrophoresis**, v.32, p.2024-2032, 2008.
- GEORGE, E.F. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. pt. 1, 574 p.
- GEORGE, F.E.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. Volume 1. The background. Dordrecht, Netherlands, 3rd edition, Springer, 501 p. 2008.
- HOSSAIN, M.M.; RUBEL, D. Multiple regeneration pathways in *Spathoglottis plicata* Blume - A study *in vitro*. **South African Journal of Botany**, v.85, p.56-62, 2013.
- JORGE, J.; ABRÃO, M.C.R.; SUZUKI, R.M. **Estudo da germinação de sementes e desenvolvimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae) em diferentes meios de cultura**. In: XVIII Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais & V Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2011.
- KAUTH, P.J.; VENDRAME, W.A.; KANE, M.E. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.85, p.91-102, 2006.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 446p
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v.15, p.214-217, 1946.
- LO S.H.; NALAWADE, S.M.; KUO C-L.; CHEN, C-L.; TSAY, H-S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense makino* – a medicinally important orchid. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v.40, p.528-535, 2004.
- MERCIER, H. & KERBAUY, G.B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p.195-199, 1991.
- MIYOSHI, K.; MII, M. Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, v.63, n.3-4, p.263-7, 1995.
- MORAES, C.P.; LEAL, T.S.; PANOSSO, A.R.; SOUZA, M.C. Efeitos da escarificação química e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae:Vanilloideae). **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.3, p.714-719, 2012.

MORAES, C.P.; SANTOS, N.S.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G.M.; LEAL, T.S. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.13, p. 57-65, 2009a.

MORAES, C.P.; DIOGO, J.A.; PEDRO, N.P.; CANABRAVA, R.I.; MARTINI, G.A.; MARTELINE, M.A. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociência**, v.7, p. 67-69, 2009b.

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

PEDROZA, J.; FERNÁNDEZ, C.; SUÁREZ, A. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcata* seeds under *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v.41, p.838-43, 2005.

POOLE, H.A.; SHEEHAN, T.J. Mineral nutrition of orchids. In: Arditti, J. (ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives**, II. Ithaca and London: Cornell University, 1982, p.195-221.

RAGHAVAN, V.; TORREY, J.G. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. **American Journal of Botany**, v.51, p.264-274, 1964.

RAMOS, M.S.S. **A orquídea e sua reprodução pela semente**. Campinas: Indústria Gráfica Saraiva, 1969, 103p.

RASMUSSEN, H.N. **Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant**. Cambridge University Press, 1995.

REIS, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CORREA, R.M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e na taxa de multiplicação de *Melissa officinalis*. **Revista Ceres**, vol.55, n.3, p.160-167, 2008.

ROY, A.R.; PATEL, R.S.; PATEL, V.V.; SAJEEV, S.; DEKA, C. B. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, v.128, p.325-331, 2011.

SHIAU, Y.J.; SAGARE, A.P.; CHEN, U.C.; YANG, S.R.; TSAY, H.S. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.43, p.123-130, 2002

SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; SUZUKI, R.M.; SCALON, S.P.Q.; ROSA JUNIOR, E.J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.4, p.617-623, 2012.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; CASTRO, E.M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Edição Especial, p.1532-1538, 2003.

STANCATO, G.C.; BEMELMANS, P.F.; VEGRO, C.L.R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, n.1, p.25-33, 2001.

STEWART, J. Orchid propagation by tissue culture techniques – past, presente and future. In: H.W. Pritchard (ed.). **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press, Cambridge, p.147-183, 1989.

SUZUKI, R.M.; MOREIRA, V.C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W.M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, vol.37, p.710-730, 2010.

SUZUKI, R.M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W.M. Estudo da Germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron e V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, vol.36, p.657-666, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

THORPE, T.; STASOLLA, E.C.; YEUNG, G.J. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: George, E. F.; Hall, M. A.; Klerk, G. J. D. (eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Springer, p.115-174, 2008.

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

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

VENTURA, G.M. **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 110p. Tese (Doutorado).

VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; TEIXEIRA, L.S.; CARVALHOS, S.V.; MOTOIKE, Y.S.; NOVAIS, F.R.; CECON, R.P. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. *Revista Ceres*, Viçosa, v.47, n.286, p.613-628, 2002.

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

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J.A.T; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, v.138, p.198-209, 2012.

ZHANG, Y.; LEE, Y.; DENG, L.; ZHAO, S. Asymbiotic germination of immature seeds and the seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw., an endangered lady's slipper orchid. **Scientia Horticulturae**, v.164, p.130–136, 2013.

YAM, T.W.; ARDITTI, J. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reporter**, v.3, p.1-56, 2009.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Cattleya intermedia* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

RESUMO

As orquídeas são as plantas ornamentais mais produzidas e comercializadas no Brasil. A micropropagação *in vitro* de orquídeas é a técnica mais utilizada para a produção de mudas, por permitir a obtenção de grande número de indivíduos em curto espaço de tempo. A composição do meio de cultura tem grande influência no desempenho dos cultivos *in vitro* e afeta diretamente o preço e a complexidade de preparo do mesmo. O presente trabalho teve como objetivo estudar o uso de meios alternativos no cultivo *in vitro* de protocormos de *Cattleya intermedia* e discutir a viabilidade econômica do uso destes meios. O delineamento experimental consistiu em um fatorial 4x2+1 disposto inteiramente ao acaso, sendo testados quatro meios de cultura, duas doses de polpa de banana (sem polpa e com 100 g.l⁻¹) e um meio adicional elaborado a partir de compostos orgânicos (S). Os meios testados no fatorial foram Murashige e Skoog (MS), Knudson C (KC), suplemento para orquídea da marca B&G[®] (BG) e fertilizante comercial Kristalon Laranja[®] (KR). Como explante inicial foram utilizados protocormos oriundos de sementes germinadas em meio MS com metade da concentração de macronutrientes, com dois primórdios foliares e sem raízes, sendo inoculados três protocormos por frasco e oito frascos por tratamento. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento por oito meses. Os parâmetros avaliados na análise de crescimento foram o número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento (CF) e largura da maior folha (LF), comprimento da maior raiz (CR), massa fresca total (MT), da parte aérea (MPA) e das raízes (MR). Também se verificou o potencial hidrogeniônico (pH) dos meios após os oito meses de cultivo e os teores de pigmentos, proteínas e açúcares dos tecidos foliares. O meio BG promoveu o melhor desenvolvimento das plantas, com valores maiores em todos os parâmetros, com exceção do número de folhas (NF), seguido pelo meio KR. A adição da polpa de banana foi benéfica para o desenvolvimento das plântulas, aumentando os valores de CR, MR e MT em todos os meios, com exceção da MR e MT do meio KC, onde o aumento não foi significativo. Em todos os meios, houve acentuada redução no pH após o tempo de cultivo, sendo que o uso da polpa de banana manteve os valores mais elevados, embora estatisticamente iguais aos mesmos meios sem a polpa. Em relação às análises bioquímicas, observamos maior produção de clorofila e acúmulo de açúcares solúveis com o acréscimo da polpa de banana, enquanto que o acúmulo de proteínas foi inversamente proporcional ao crescimento. Em termos de custos de reagentes para preparo do meio, o mais caro foi o meio BG e o de menor custo o KR, sendo que ambos apresentaram resultados satisfatórios no desenvolvimento das plantas. Conclui-se que, para a produção de mudas de *Cattleya intermedia* a partir de protocormos, pode-se utilizar o meio pronto BG, porém, é mais vantajoso economicamente o uso de meio de cultura à base do fertilizante Krystalon Laranja[®] e é recomendável a suplementação do meio com polpa de banana.

Palavras-chave: meios alternativos, polpa de banana, mudas, orquídeas, nutrição.

ABSTRACT

Orchids are ornamental plants most produced and sold in Brazil. *In vitro* micropropagation of orchids is the most used technique for production of seedlings, as it allows obtaining large number of individuals in a short period of time. Composition of culture medium has great influence on the performance of *in vitro* cultures and directly affects the price and complexity of preparing it. The present work aimed to study the use of alternative culture media for *in vitro* culture of *Cattleya intermedia* as well as supplementation of banana pulp in the media during plant development and discuss the economic viability of using these media. The experiment consisted of a 4x2+1 factorial design at random, testing four culture media, two doses of banana pulp (no pulp and 100 g.l⁻¹) and an additional medium elaborated from organic compounds (S). The tested media were: Murashige and Skoog (MS), Knudson C (KC), Supplement to Orchid B&G[®] (BG) and commercial fertilizer Kristalon Orange[®] (KR). It was used as explant protocorms germinated from seeds on MS medium with half the concentration of macronutrients, with two leaf primordia and no roots, grouped by three for inoculation in each flask and eight flasks per treatment. The flasks were kept in a growth chamber for eight months. The parameters evaluated in the analysis of growth were the number of leaves (NF), number of roots (NR), length (CF) and width of the largest leaf (LF), root length (CR), total fresh mass (MT), shoot (MPA) and roots (MR). Hydrogen potential (pH) was also verified in the media after eight months of culture as well as levels of pigments, proteins and sugars from the leaves. The BG medium promoted the best development of plants, with higher values in all parameters, except for the number of leaves (NF), followed by the KR medium. Addition of banana pulp was beneficial for the development of plants, increasing CR, MR and MT in all media, with the exception of MR and MT in KC medium in which increase was not significant. In all media there was markedly decrease in pH after cultivation period and the use of banana pulp resulted in higher values, although statistically equivalent to the same media without pulp. In terms of biochemical analysis, we observed higher production of chlorophyll and higher accumulation of soluble sugars as a result of banana pulp addition, whereas accumulation of proteins was inversely proportional to plant growth. In terms of cost of reagents for preparing medium, the most expensive was BG and the cheapest was KR, both of which provided satisfactory results in the development of the plants. Thus, production of seedlings of *Cattleya intermedia* from protocorms can be done by using the off-the-shelf medium BG, although it is economically more viable using culture medium based on Kristalon Orange[®] fertilizer. Furthermore, supplementation of the medium with banana pulp is recommended.

Keywords: alternative media, banana pulp, seedlings, orchids, nutrition.

1 INTRODUÇÃO

A micropropagação possibilita a produção de mudas em larga escala, além de resultar em plantas uniformes, sadias e com velocidade superior de crescimento em relação aos métodos convencionais de propagação. Também permite maior produção em menor tempo e espaço físico e a obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos (SANTOS *et al.*, 2006). Dentre as plantas propagadas em larga escala através da micropropagação *in vitro*, as mais cultivadas no mundo inteiro são as plantas ornamentais (GERALD, 2011), e dentre estas, destacam-se as orquídeas.

A família Orchidaceae é uma das mais numerosas com cerca de 800 gêneros e mais de 25.000 espécies (CHUGH *et al.*, 2009), distribuídas por quase todo o mundo. No Brasil, são conhecidos aproximadamente 203 gêneros e mais de 2.350 espécies, formando um rico patrimônio orquidológico de incalculável valor e beleza (MENEZES, 1987).

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais produzidas e comercializadas no país, devido à exuberância de suas flores. A principal técnica de cultivo utilizada é a produção de mudas *in vitro*. A técnica de germinação assimbiótica de sementes de orquídeas, iniciada em 1922 por Lewis Knudson, está amplamente difundida entre os produtores, uma vez que as taxas de germinação na natureza são muito baixas.

Estudos que aperfeiçoem e tornem mais fácil a produção de mudas de orquídea *in vitro* podem aumentar os lucros dos produtores e incentivar novas pessoas a investirem neste ramo de produção. Além disso, tendem a reduzir a devastação e extração predatória na natureza, contribuindo para a preservação de inúmeras espécies.

No cultivo *in vitro*, o meio de cultura tem a função de fornecer para o tecido vegetal todos os componentes que ele precisa para se desenvolver, como sais minerais, vitaminas, aminoácidos e fonte de carbono. Na literatura, existem diversas receitas de meios de cultivo publicadas, nas quais mudam as fontes e quantidades de nutrientes, sendo que as mais comuns são complexas, exigindo o preparo de soluções estoque de vários reagentes. A formulação mais apropriada para cada espécie e tipo ou estágio de desenvolvimento da cultura pode variar (PASQUAL *et al.*, 1997), pois as demandas nutricionais sofrem influência do genótipo e mudam ao longo do desenvolvimento da planta.

O meio de cultura pode responder sozinho por 11,36% do custo operacional da muda no cultivo *in vitro* (STANCATO *et al.*, 2001). Estudos têm mostrado que a utilização de fertilizantes comerciais (NPK) como base para a preparação dos meios permite reduzir os custos de produção de mudas (MORAES *et al.*, 2009a; DRONK, 2004), podendo inclusive apresentar melhores resultados no desenvolvimento das plântulas (UNEMOTO *et al.*, 2007; VENTURA, 2007). Ademais, estes meios oferecem vantagens como a facilidade de preparação e de obtenção dos componentes necessários para sua formulação.

Também é possível usar aditivos orgânicos para suplementar os teores de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento nos meios nutritivos. Diversos são os aditivos ou suplementos que podem ser adicionados às formulações básicas do meio de cultura para o crescimento *in vitro* das espécies de orquídeas, com os objetivos de aumentar a produtividade, obtendo-se plântulas vigorosas e sadias, reduzir o tempo de cultivo e os custos de produção. Como exemplo destes suplementos, pode-se citar a água de coco e a polpa de frutos, em especial a polpa de banana (BETTÃO, 2009).

A polpa de banana é rica em carboidratos, sais minerais, aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas. Muitos estudos têm mostrado que a adição da polpa ao meio de cultura melhora o

desenvolvimento das plântulas de orquídea (GNASEKARAN *et al.*, 2010; BETTÃO, 2009; STANCATO *et al.*, 2008; GONÇALVES, 2010).

O objetivo norteador dessa pesquisa foi testar meios alternativos para o cultivo *in vitro* de protocormos de *Cattleya intermedia* visando à produção de mudas, principalmente por pequenos produtores, e analisar a influência da adição de polpa de banana aos meios no desenvolvimento *in vitro* das plantas de orquídeas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultivo Celular Vegetal do Centro de Ciências da Terra e do Mar da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), em Itajaí, Santa Catarina. Para o experimento de crescimento e desenvolvimento *in vitro* de protocormos, foram utilizados protocormos de *Cattleya intermedia* (Figura 7) com 90 dias após a semeadura, oriundos de sementes germinadas em meio MS com metade da concentração de macronutrientes.

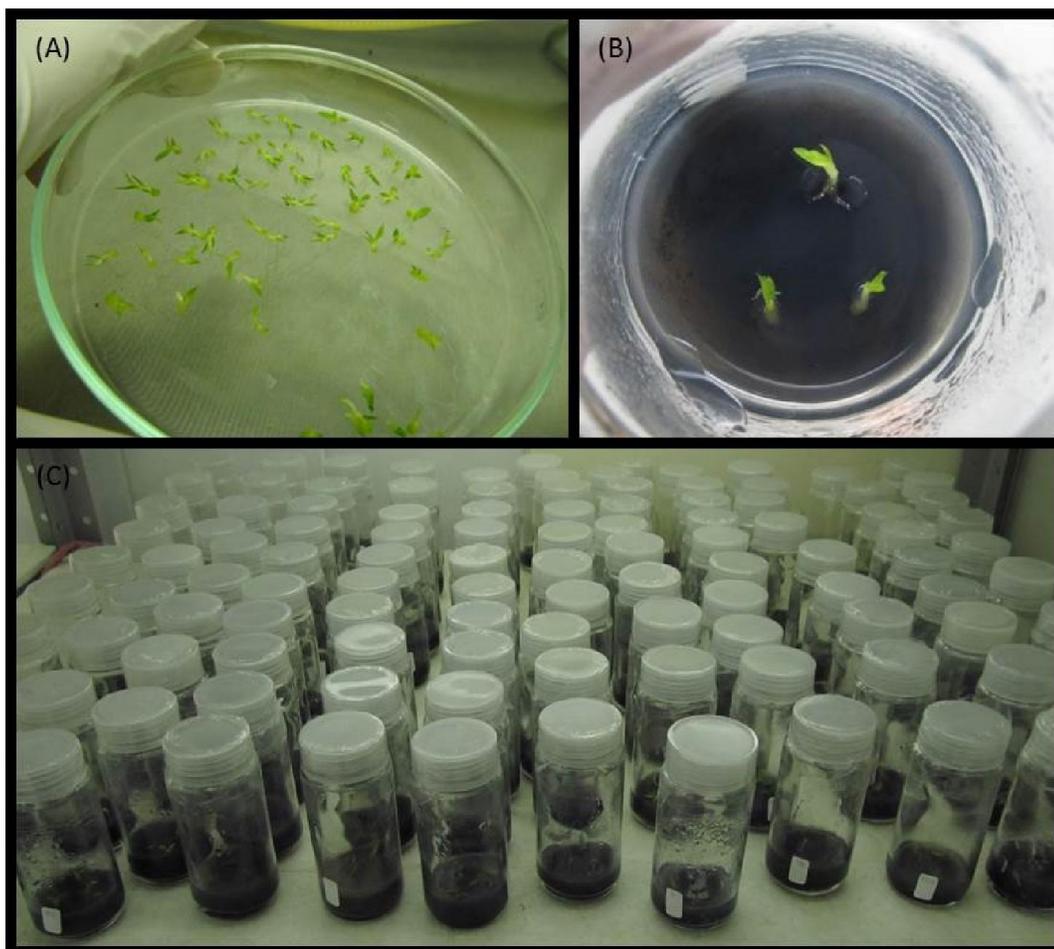


Figura 7. Seleção dos protocormos de *Cattleya intermedia* (A), disposição dos protocormos nos frascos no momento da implantação do experimento (B) e frascos de cultura / protocormos na sala de crescimento (C).

No experimento de crescimento e desenvolvimento de protocormos de *C. intermedia* foram testados quatro diferentes meios (Tabela 11), suplementados ou não com polpa de banana, e também um meio de cultivo preparado a partir de polpas de frutas (S). Dessa forma os tratamentos testados totalizaram nove diferentes composições de meio de cultivo (Figura 8):

1. MS – Murashige e Skoog (1962);
2. MS+b – Murashige e Skoog, acrescido de 100 g.l⁻¹ polpa de banana;
3. KC – Knudson C (1946);
4. KC+b – Knudson C, acrescido de 100 g.l⁻¹ polpa de banana;
5. BG – suplemento para orquídea da marca B&G[®]
6. BG+b – suplemento para orquídea da marca B&G[®], acrescido de 100 g.l⁻¹ polpa de banana;
7. KR – adubo Krystalon Laranja[®] (NPK 6-12-36), na concentração de 3 g.l⁻¹;
8. KR+b – adubo Krystalon Laranja[®] (NPK 6-12-36), na concentração de 3 g.l⁻¹, acrescido de 100 g.l⁻¹ polpa de banana;
9. S – meio à base de compostos orgânicos (50 g.l⁻¹ de polpa de banana, 50 g.l⁻¹ polpa de tomate, 50 g.l⁻¹ de polpa de abacate, 50 g.l⁻¹ polpa de mamão, 50 ml.l⁻¹ de caldo de batata, 120 ml.l⁻¹ de água de coco).

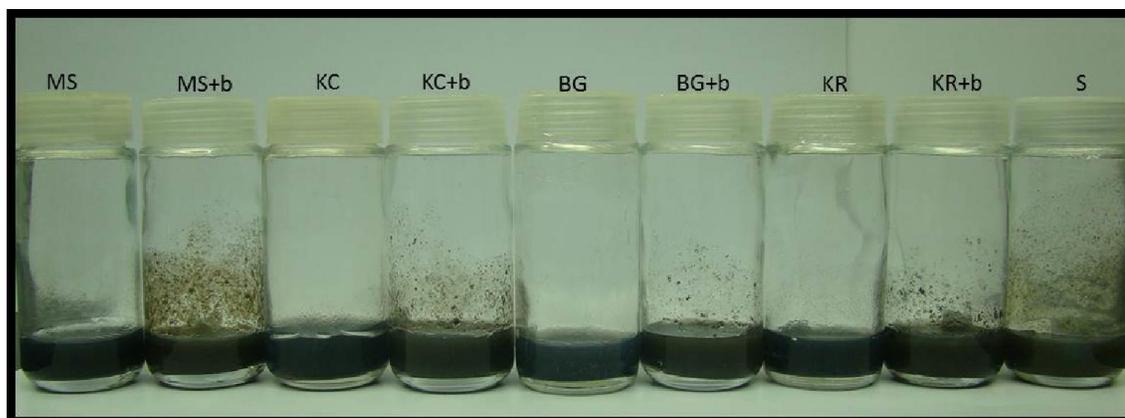


Figura 8. Meios utilizados para cultivar protocormos de *C. intermedia*.

MS - Murashige e Skoog (1962); MS+b - Murashige e Skoog (1962) + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana; KC - Knudson C (1946); KC+b - Knudson C (1946) + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana; BG - Suplemento para orquídeas B&G[®]; BG+b - Suplemento para orquídeas B&G[®] + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana; KR - Kristalon Laranja[®]; KR+b - Kristalon Laranja[®] + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana; S - meio a base de compostos orgânicos.

Os meios MS, KC e KR foram suplementados com 30 g.l⁻¹ de sacarose, 3 g.l⁻¹ de carvão ativado e 7 g.l⁻¹ de ágar. O meio à base da formulação pronta BG, teve apenas a adição de 10 g.l⁻¹ de ágar, uma vez que já possui sacarose e carvão ativado na sua formulação. O meio S teve as polpas homogêneas com auxílio de liquidificador e foi adicionado de 20 g.l⁻¹ de sacarose, 3 g.l⁻¹ de carvão ativado e 8 g.l⁻¹ de ágar. Nos meios onde foi adicionada a polpa de banana, esta foi acrescentada na concentração de 100 g.l⁻¹, de polpa madura da variedade Prata, homogênea com auxílio de liquidificador. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,7 ± 0,05 antes da esterilização em autoclave a 120° por 20 minutos. Os frascos utilizados para o experimento têm capacidade volumétrica de 100 ml e em cada frasco foi depositado 15 ml de meio de cultura.

Tabela 11. Composição química dos meios de cultura utilizados para o desenvolvimento *in vitro* de protocormos de *C. intermedia* (mg.l⁻¹).

Componentes (mg.l ⁻¹).	Meios de cultura			
	MS	KC	BG*	KR*
N	841,0	245,0	446,5	180
N-nitrico	552	140	380,7	135
N-amoniacal	289	105	65,8	45
P ₂ O ₅	88,7	127,5	347,8	158,4
K ₂ O	892,0	82,5	902,4	896,4
Mg	36,0	70,3	61,1	54
S	48,00	92,35	103,40	240
Fe	11,20	4,75	7,52	2,1
B	1,08		2,35	0,75
Cu	0,01		0,47	0,3
Mn	5,490	1,875	3,760	1,2
Mo	0,100		0,047	0,12
Zn	1,95		2,35	0,75
Ca	60,0	200,0	286,7	
Cl		286,7	164,7	
Ni		0,376	0,216	
Na		10,34	5,94	
Total de solutos	1985,53	1121,691	2335,253	1919,22

*Valores fornecidos pelo fabricante

Murashige e Skoog (1962) (MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G[®] (BG); Kristalon Laranja[®] (KR).

A inoculação dos protocormos nos frascos foi realizada em câmara de fluxo laminar, sendo selecionados protocormos com dois primórdios foliares, sem raízes e aproximadamente um centímetro de altura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco com três protocormos. Após a inoculação, os frascos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®). Os frascos contendo os protocormos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância média de 30 a $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. O experimento foi analisado estatisticamente de duas formas, na primeira delas o fator polpa de banana foi incorporado a cada meio. Os resultados obtidos nos nove tratamentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Na segunda forma de avaliação o meio S foi retirado da análise e o experimento foi considerado como um fatorial 4×2 , com o intuito de verificar a interação da polpa de banana com os diferentes meios de cultivo. Da mesma forma, para os resultados dos tratamentos do fatorial também se fez análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%, com auxílio do software SisVar v.5.1 (FERREIRA, 2011). A avaliação ocorreu oito meses após a inoculação, momento em que foram avaliados: o número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento (CF) e largura da maior folha (LF), comprimento de raiz (CR), massa fresca total (MT), da parte aérea (MPA) e das raízes (MR). Além disso, foi verificado o potencial hidrogeniônico (pH) nos diferentes meios.

Também foi determinada a concentração de pigmentos, proteínas e açúcares nas folhas das plântulas resultantes dos diferentes tratamentos. A análise de pigmentos foi realizada com a maceração de 100 mg de tecido foliar com acetona em almofariz. O extrato obtido foi filtrado em papel filtro e procedeu-se as leituras de absorvância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 644,8 e 661,6 nm, para leitura das clorofilas. A quantidade de clorofila foi calculada através das fórmulas de Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila A} = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{645,8}$$

$$\text{Clorofila B} = 20,13 A_{645,8} - 4,19 A_{661,6}$$

$$\text{Clorofila Total} = 7,05 A_{661,6} + 18,09 A_{645,8}$$

Os resultados das equações foram extrapolados para a quantidade de solução preparada (50 ml) e a quantidade de tecido foliar utilizado. Os resultados foram expressos em micrograma de clorofila por miligrama de massa foliar.

A extração de proteínas totais do tecido foliar foi realizada através da maceração de 100 mg de tecido com solução de hidróxido de sódio (NaOH) e o extrato foi centrifugado duas vezes, adicionando mais NaOH entre as repetições e juntando o sobrenadante de ambas. A dosagem das proteínas totais foi realizada conforme o método de Bradford (1976), utilizando o reagente azul brilhante de Coomassie G-250. A absorvância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 595 nm e a concentração de proteínas calculada com base em curva padrão de soro albumina bovina (BSA).

Para a extração de açúcares solúveis, foi utilizado o método de Shannon (1968), no qual se macerou 100 mg de folhas em solução metanol, clorofórmio e água destilada (MCW) na proporção 12:5:3. O extrato foi centrifugado duas vezes, adicionando mais MCW entre as repetições e juntando o sobrenadante de ambas. Para quatro partes de sobrenadante foi adicionada uma parte de clorofórmio e uma e meia de água destilada, sendo novamente centrifugado e a fase aquosa coletada. A dosagem deu-se pelo método de Umbreit & Burris (1964), utilizando o reagente antrona 0,2%. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 620 nm e a concentração de açúcares solúveis totais foi calculada com base numa curva de D-glicose.

Para a comparação de custos de produção, em termos de reagentes dos meios de cultura, foi coletado orçamento de pelo menos três fornecedores diferentes e fez-se a média entre os preços dos diferentes fornecedores (Anexos). Os valores foram comparados desconsiderando os gastos operacionais para o preparo e demais valores que são iguais para todos os meios.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de crescimento

Na primeira forma utilizada para analisar estatisticamente os resultados do experimento, em que os nove tratamentos foram comparados entre si, o objetivo maior era comparar o meio S com os demais meios. A análise de variância mostrou resultado significativo para todos os parâmetros pelo teste F a 5%, ou seja, mostrou que o meio utilizado influenciou nos resultados de todas as variáveis analisadas. O resultado da análise da comparação das médias (Tabela 12) mostra que o meio S apresentou resultados inferiores aos demais tratamentos para todos os parâmetros. Este meio alternativo tem sido testado por alguns produtores do Rio de Janeiro para o cultivo de orquídeas do gênero *Phalaenopsis*. Entretanto, para a espécie *Cattleya intermedia*, este meio proporcionou desenvolvimento inferior aos demais, não devendo ser recomendado para o seu cultivo.

Tabela 12. Desenvolvimento das plântulas de *C. intermedia* cultivadas em diferentes meios de cultura após oito meses. Meio acrescido do símbolo “+b” significa que houve acréscimo de polpa de banana na concentração de 100 g.l⁻¹.

Meios	Parâmetros							
	Número Folhas	Num Raízes	Comp Folha (cm)	Larg Folha (cm)	Comp Raiz (cm)	Massa fresca Aérea (g)	Massa fresca Raiz (g)	Massa fresca Total (g)
MS+b	5,333 ab	5,19 a	1,73 ab	0,59 ab	4,67 bc	0,176 a	0,257 bc	0,434 bc
MS	5,809 a	3,47 bc	1,18 bc	0,43 bc	2,95 de	0,079 bc	0,122 cd	0,201 d
KC+b	5,190 ab	4,95 a	1,17 bc	0,40 cd	4,30 cd	0,060 bc	0,172 cd	0,232 cd
KC	5,523 ab	5,19 a	0,83 c	0,33 cd	2,26 e	0,062 bc	0,141 cd	0,204 de
BG+b	5,857 a	5,28 a	2,21 a	0,61 a	6,52 a	0,177 a	0,471 a	0,649 a
BG	4,619 abc	5,14 a	2,08 a	0,62 a	4,88 abc	0,164 a	0,258 bc	0,421 bc
KR+b	5,238 ab	4,76 bc	1,96 a	0,49 abc	6,12 ab	0,137 ab	0,400 ab	0,537 ab
KR	4,523 bc	4,33 bc	1,83 ab	0,48 abc	4,48 bcd	0,140 ab	0,216 c	0,357 bcd
S	3,8 d	2,95 c	0,80 c	0,26 d	2,62 e	0,029 c	0,033 e	0,061 e
Média	5,11	4,60	1,54	0,47	4,32	0,114	0,231	0,345
CV =	25,44	32,16	45,53	36,82	39,31	74,8	67,9	62,05

* médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.
 Murashige e Skoog (1962) (MS); Murashige e Skoog (1962) + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana (MS+b); Knudson C (1946) (KC); Knudson C (1946) + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana (KC+b); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Suplemento para orquídeas B&G® + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana (BG+b); Kristalon Laranja® (KR); Kristalon Laranja® + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana (KR+b); meio a base de compostos orgânicos (S).

Meios à base de compostos orgânicos têm sido bastante estudados no cultivo *in vitro* de orquídeas. Silva *et al.*(2002), estudando o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina*, testaram diferentes meios de cultura, inclusive um meio orgânico constituído de 14 g.l⁻¹ de

sacarose, 5 g.l⁻¹ de carvão ativado, 150 ml.l⁻¹ de água de coco, 5 tomates cerejas, 40 g.l⁻¹ de polpa de banana da variedade Nanica e 9 g.l⁻¹ de ágar, e observaram que esse meio apresentou valores superiores para massa fresca de plântulas em comparação com o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e com o meio VW (VACIN & WENT, 1946), após 120 dias de cultivo. Brahm *et al.* (2003) também obtiveram bons resultados no desenvolvimento de plântulas de *Schomburgkia* sp. em meios alternativos, contendo polpa de tomate ou polpa de banana, acrescidos de água de coco, açúcar cristal, carvão ativado e ágar.

Os compostos orgânicos adicionados ao meio de cultivo podem suprir as demandas nutricionais das plantas em desenvolvimento durante o cultivo *in vitro*, entretanto, como essas exigências variam de espécie para espécie, cada caso deve ser estudado para verificar a viabilidade. O meio S apresentou desenvolvimento insatisfatório das plântulas de *C. intermedia*, evidenciando que, possivelmente, a sua composição nutricional não é ideal para o cultivo *in vitro* desta espécie.

Na segunda forma utilizada para analisar estatisticamente o trabalho o meio S foi excluído das análises e os demais meios foram avaliados como fatorial 4x2, para verificar o efeito da adição da polpa de banana aos diferentes meios e a sua interação com os mesmos. Na análise de variância houve resposta significativa para o uso dos diferentes meios para todos os parâmetros, com exceção do número de folhas, já para o uso da banana a resposta não foi significativa estatisticamente para o número de folhas e para a massa fresca da parte aérea. Em relação à interação entre os meios testados e o uso da polpa de banana, a resposta foi significativa apenas para o número de raízes, de folhas e a massa fresca da parte aérea, demonstrando que para estas variáveis a recomendação de usar ou não polpa de banana pode variar conforme o meio utilizado (Tabela 13).

Tabela 13. Resultado da análise de variância (ANOVA) para os parâmetros avaliados, após oito meses de cultivo *in vitro* de *Cattleya intermedia* a partir de protocormos.

Fatores	Parâmetros							
	NR	CR	NF	CF	LF	MR	MPA	MT
Meio	*	*	ns	*	*	*	*	*
Banana	*	*	ns	*	*	*	ns	*
Interação	*	ns	*	ns	ns	Ns	*	ns
CV (%)	31,39	38,98	25,63	45,36	36,57	65,13	71,23	59,48

*resultado significativo no teste F a 5%; ns - resultado não significativo no teste F a 5%

NR – número de raízes, CR – comprimento da maior raiz, NF – número de folhas, CF – comprimento da maior folha, LF – largura da maior folha, MR – massa fresca das raízes, MPA – massa fresca da parte aérea, MT – massa fresca total.

Os resultados da comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% estão expressos na Tabela 14. O meio BG mostrou resultados maiores em todos os parâmetros, com exceção do número de folhas (NF). O meio KR apresentou valores similares ao BG no comprimento da maior raiz (CR), comprimento (CF) e largura da maior folha (LF), massa fresca da parte aérea (MPA), massa fresca das raízes (MR) e massa fresca total (MT). Já o meio KC foi similar ao BG no número de raízes emitidas (NR), no NF, na LF e na MR. As diferenças visuais no desenvolvimento das plantas nos diferentes meios de cultivo avaliados podem ser observadas na Figura 9 e 10.

Tabela 14. Desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia* em diferentes meios de cultura e polpa de banana após oito meses de cultivo.

	Meios de cultura				Média
	MS	KC	BG	KR	
<i>NR - Número de raízes</i>					
Com banana	5,19 Aa	4,95 Aa	5,28 Aa	4,76 Aa	5,04
Sem banana	3,47 Bb	5,19 Aa	5,14 Aa	4,33 Aab	4,53
Média	4,33	5,07	5,21	4,54	cv = 31,39%
<i>CR - Comprimento de raiz (cm)</i>					
Com banana	4,67 Ab	4,30 Ab	6,52 Aa	6,12 Aa	5,40
Sem banana	2,95 Bb	2,26 Bb	4,88 Ba	4,48 Ba	3,64
Média	3,81	3,28	5,70	5,30	cv = 38,98%
<i>NF - Número de folhas</i>					
Com banana	5,33 Aa	5,19 Aa	5,85 Aa	5,23 Aa	5,40
Sem banana	5,80 Aa	5,52 Aab	4,62 Bb	4,52 Ab	5,11
Média	5,57	5,35	5,24	4,88	cv = 25,63%
<i>CF - Comprimento da folha (cm)</i>					
Com banana	1,73 Aab	1,17 Ab	2,21 Aa	1,96 Aa	1,77
Sem banana	1,18 Bb	0,83 Ab	2,08 Aa	1,83 Aa	1,48
Média	1,46	1,00	1,90	2,15	cv = 45,36 %
<i>LF - Largura da folha (cm)</i>					
Com banana	0,59 Aa	0,40 Ab	0,61 Aa	0,49 Aab	0,52
Sem banana	0,43 Bbc	0,32 Ac	0,61 Aa	0,48 Aab	0,46
Média	0,51	0,36	0,61	0,48	cv = 36,57%
<i>MR - Massa fresca de raiz (g)</i>					
Com banana	0,257 Ab	0,172 Ab	0,400 Aa	0,471 Aa	0,325
Sem banana	0,123 Bb	0,141 Aab	0,216 Bab	0,258 Ba	0,185
Média	0,190	0,157	0,308	0,365	cv = 65,13%
<i>MPA - Massa fresca de parte aérea (g)</i>					
Com banana	0,177 Aa	0,06 Ab	0,177 Aa	0,137 Aa	0,138
Sem banana	0,080 Bbc	0,062 Ac	0,164 Aa	0,141 Aab	0,112
Média	0,128	0,061	0,170	0,139	cv = 71,23%
<i>MT - Massa fresca total (g)</i>					
Com banana	0,435 Ab	0,231 Ac	0,650 Aa	0,538 Aab	0,296
Sem banana	0,201 Bb	0,205 Ab	0,420 Ba	0,358 Bab	0,463
Média	0,318	0,218	0,535	0,448	cv = 59,48%

* médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Murashige e Skoog (1962) (MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Kristalon Laranja® (KR).

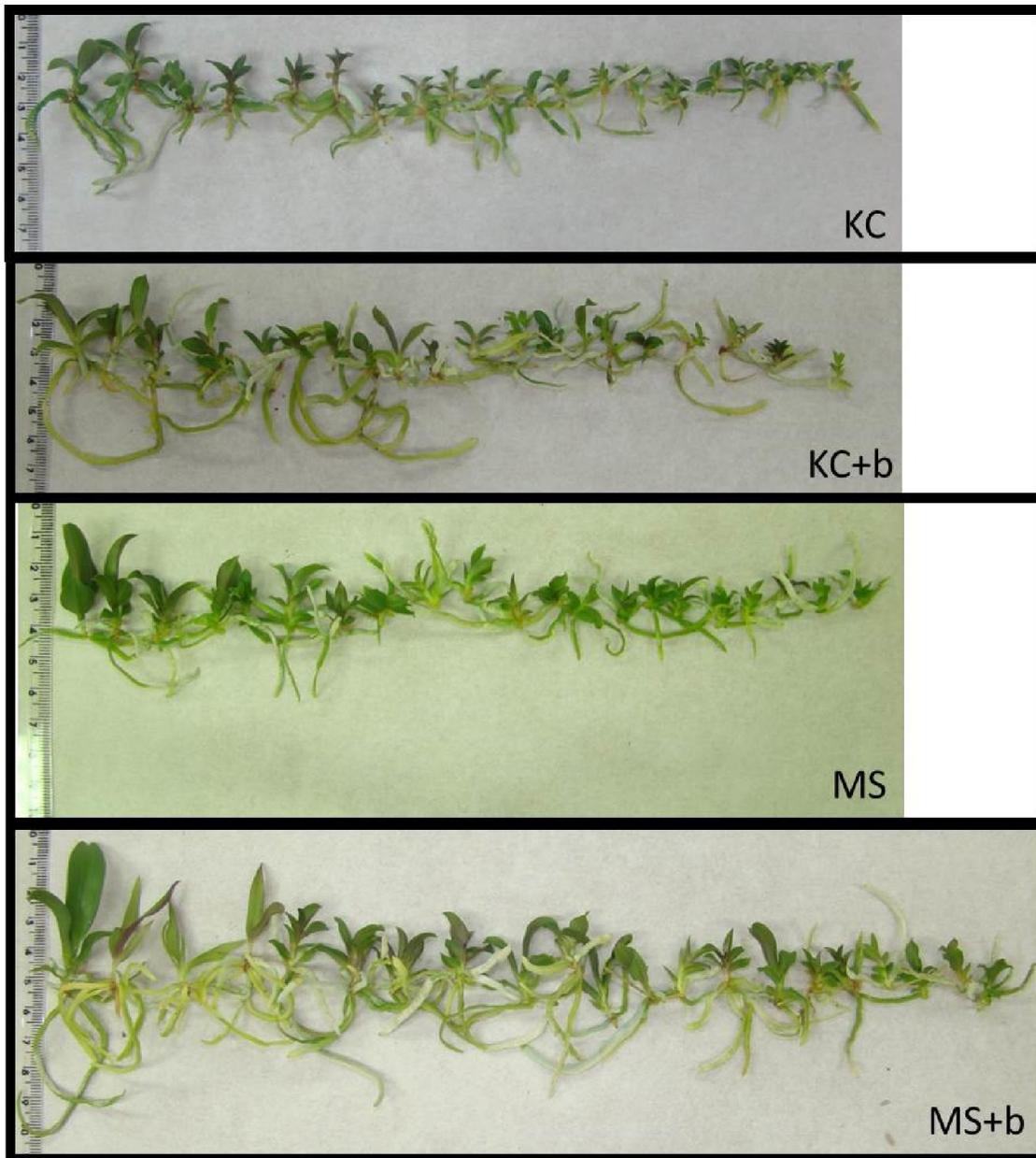


Figura 9. Comparação visual do desenvolvimento das plantas de *C. intermedia* após oito meses de cultivo nos meios KC (Knudson C, 1946), KC+b (Knudson C, 1946 + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana), MS (Murashige e Skoog, 1962), MS+b (Murashige e Skoog, 1962 + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana).

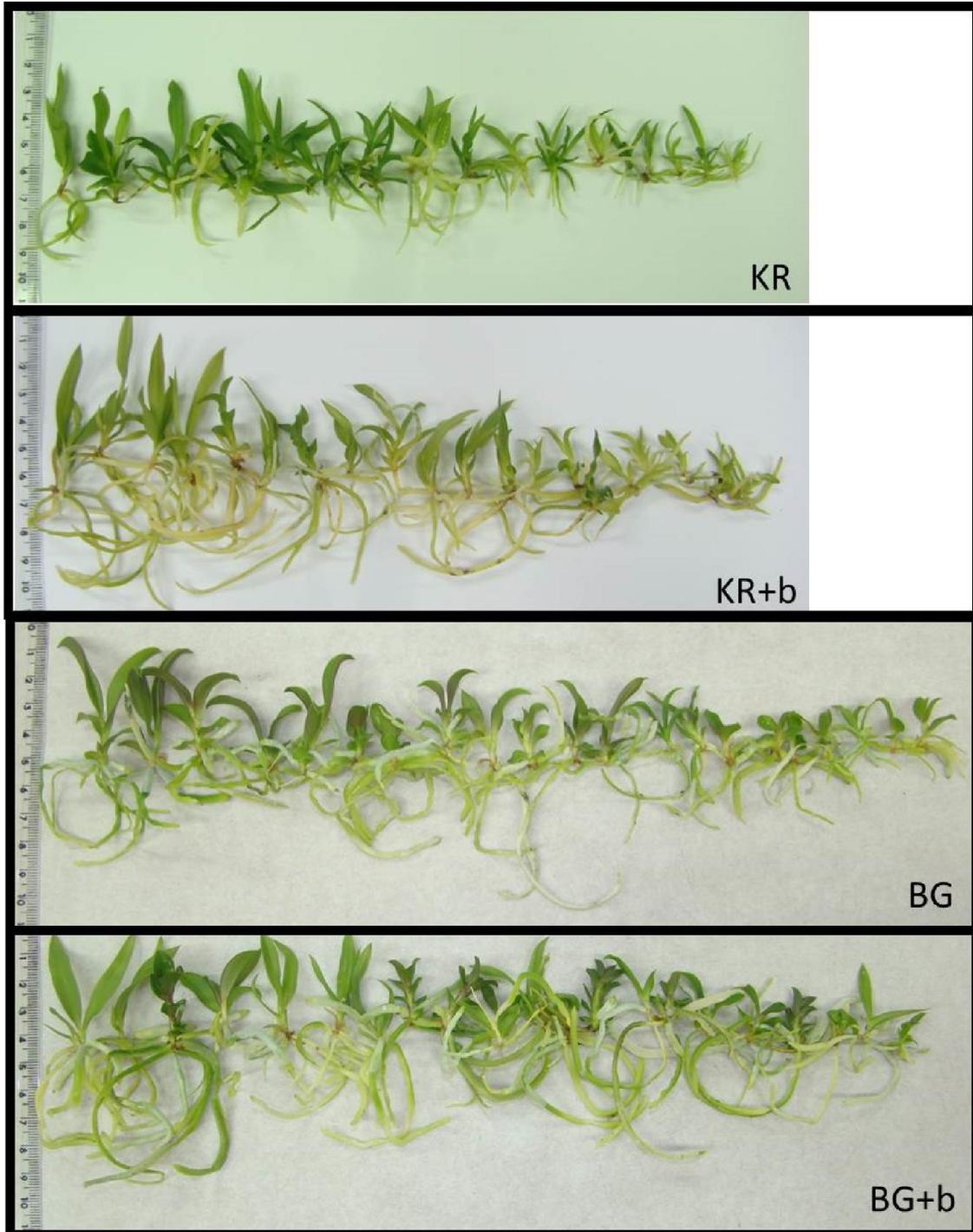


Figura 10. Comparação visual do desenvolvimento das plantas de *C. intermedia* após oito meses de cultivo nos meios KR (Kristalon Laranja[®]), KR+b (Kristalon Laranja[®] + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana), BG (Suplemento para orquídeas B&G[®]), BG+b (Suplemento para orquídeas B&G[®] + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana).

Ventura (2007) testou o meio GB5 (GAMBORG, 1968) e outros dois com base em fertilizantes comerciais - o Peters[®] (NPK 10-30-20) e o B&G Orchidées[®] (NPK 8-11-7) - para o desenvolvimento de plântulas de *Laelia anceps*, com tamanho inicial de 1-2 cm, e observou, após cinco meses de cultivo, que o meio à base do fertilizante B&G Orchidées[®] demonstrou maior eficiência, resultando em plantas mais vigorosas, com intenso crescimento da parte aérea e radicular. Unemoto *et al.* (2007) também verificaram em propagação de *Oncidium nanum* e *Cattleya forbesii*, que a utilização de fertilizante comercial (NPK 6-6-8), apresentou resultados superiores em relação aos meios de cultura MS ou MS reduzido. Diferente do apresentado até agora, Oliveira & Faria (2005), trabalhando com protocormos de *Catasetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaenses*, testaram diferentes meios: MS, MS modificado com metade da concentração dos macronutrientes, MS modificado com um quarto da concentração dos macronutrientes, Vacin & Went (VW), KC e dois adubos comerciais (NPK 10-5-5 e 10-30-20); e encontraram melhores resultados para o desenvolvimento vegetativo e enraizamento de ambas as espécies no meio MS modificado com metade da concentração dos macronutrientes. Isso indica que as exigências nutricionais são distintas entre os gêneros e, muitas vezes, entre as espécies da Família Orchidaceae. Esse indicativo destaca a especificidade do comportamento de plantas de orquídeas.

Os melhores resultados obtidos com o meio BG são atribuídos ao fato de que este meio de cultura foi desenvolvido especificamente para orquídeas, com base em análises do tecido vegetal das mesmas e da dinâmica de absorção de nutrientes destas *in vitro*. Schneider *et al.* (2013), comparando os meios MS, KC e BG no desenvolvimento de protocormos, com dois primórdios foliares, de *Cattleya forbesii*, também observou, após oito meses de cultivo, maior desenvolvimento, tanto de raiz como de parte aérea, no meio BG.

Descrever as necessidades nutricionais da maioria das orquídeas, no entanto, é tarefa difícil devido à enorme diversidade e complexas interações com micorrizas que contribuem para o estado nutricional da planta em crescimento. Na natureza, as orquídeas geralmente se desenvolvem em associação com fungos micorrízicos. As micorrizas são reconhecidas por sua habilidade de estimular o crescimento de plantas, principalmente por meio do incremento na absorção de nutrientes em geral, com maior destaque para o fósforo. É conhecido que, nas orquídeas, os fungos micorrízicos aumentam os teores de fosfato disponíveis, tanto na fase de protocormos (SMITH, 1966) como no desenvolvimento e crescimento das plântulas (ALEXANDER *et al.*, 1984). O incremento da nutrição de fósforo em plantas colonizadas com micorrizas ocasiona aumento no crescimento e na atividade fotossintética das mesmas (BERBARA *et al.*, 2006).

O fósforo desempenha papel-chave no metabolismo celular. Atua como a forma universal de troca de energia e é um componente integrante de compostos importantes das células, incluindo os açúcares fosfatados, os fosfolipídios, nucleotídeos, coenzimas e ácidos nucléicos (KERBAUY, 2008). Stancato & Faria (1996) avaliaram os efeitos *in vitro* da omissão de macro e micronutrientes em *Laelia cinnabarina* e os resultados mostraram que a omissão de fosfato reduziu drasticamente o crescimento das plântulas, causando diminuição do acúmulo de massa seca e, com isso, evidenciando a importância deste nutriente para as orquídeas. Dijk & Eck (1995) observaram tendência de aumento no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea do gênero *Dactylorhiza* com o aumento de fósforo no meio de cultivo. Elliot *et al.* (1993) também estudaram diferentes concentrações de fósforo no meio MS para o cultivo *in vitro* de *Alstroemeria* 'Parigo Pink' e observaram que os explantes cultivados nas doses mais elevadas (2,5 mM.l⁻¹) produziram maior quantidade de brotos e gemas, maior peso fresco de rizoma e brotos. Segundo Chen *et al.* (2000), a taxa de incorporação de íons fosfato em espécies de orquídeas depende do genótipo, que é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura. No presente estudo, observamos que as plantas de *C.*

intermedia crescendo nos meios com maiores teores de fósforo (BG e KR) apresentaram maior crescimento e desenvolvimento.

O potássio é um dos íons mais abundantes no vegetal embora não faça parte de nenhuma estrutura ou molécula orgânica da planta. Ele tem papel fundamental na regulação osmótica, na estabilização do pH do citoplasma, na ativação de um grande número de enzimas, na manutenção do turgor das células, na regulação da abertura e fechamento dos estômatos. Também promove a absorção de água, regula a translocação de nutrientes na planta, favorece o transporte e armazenamento de carboidratos, incrementa a absorção do nitrogênio e a síntese de proteínas, além de participar na síntese de amido nas folhas (KERBAUY, 2008; MEURER, 2006).

Para verificar a importância da suplementação do meio de cultura com íons potássio, Figueiredo *et al.* (2008) verificaram que a combinação de 500 mg.l⁻¹ de cloreto de potássio com 500 mg.l⁻¹ de sulfato de potássio, que continham as maiores doses de potássio testadas, promoveu maior crescimento *in vitro* em plântulas de *C. loddigesii*, exceto em relação ao comprimento das raízes, que se apresentou melhor com 500 mg.l⁻¹ de cloreto de potássio na ausência de sulfato de potássio. Kanashiro (2005), estudando diferentes concentrações de potássio no meio MS no cultivo *in vitro* de *Aechmea blanchetiana*, obteve melhores resultados em todos os parâmetros avaliados com teores mais elevados de potássio. No presente estudo, apenas o meio KC possui baixos teores de potássio em sua constituição e justamente este meio apresentou os piores resultados no crescimento e desenvolvimento das plantas, evidenciando que este elemento pode ser importante para o crescimento de *C. intermedia*. Entretanto, o efeito dos nutrientes varia muito conforme a espécie (DIJK & ECK, 1995), sendo necessário estudo específico para cada caso.

A adição da polpa de banana aumentou significativamente o CR, MR e MT em todos os meios quando comparado aos mesmos sem a polpa, com exceção da MR e MT do meio KC em que não houve aumento significativo com a adição da polpa de banana. A maior formação de massa radicular nos meios com polpa pode ser observada visualmente na Figura 8 e 9. O acréscimo da polpa, além de aumentar o crescimento radicular, melhora o desenvolvimento da parte aérea em alguns meios, aumentando significativamente o CF, LF e MPA no meio MS, e o NF no meio BG. Além disso, a adição da polpa aumentou a emissão de raízes em plântulas mantidas no meio MS.

Araújo *et al.* (2006) testaram diferentes doses de banana no meio KC para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas híbridas, com 1,0 a 1,5 cm, do gênero *Cattleya* e, após 180 dias, verificaram que a adição de 100 g.l⁻¹ de polpa de banana promoveu maior alongamento da parte aérea e de raiz e maior acúmulo de massa fresca de raízes. Resultados parecidos foram encontrados por Vieira *et al.* (2009), também trabalhando com um híbrido e adição de polpa de banana e água de coco no meio MS, observaram maior desenvolvimento das plântulas nos meios onde foi adicionada a polpa de banana ou ambos os compostos orgânicos. Bettão (2009) estudou a adição de diferentes doses de polpa de banana de diferentes variedades no meio KC para o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. Após seis meses de cultivo, observou que a suplementação do meio com 80 e 100 g.l⁻¹ de polpa de banana estimulou o aumento do número de raízes, enquanto que a adição de teores mais elevados, como 120 g.l⁻¹ de polpa, estimulou a indução e crescimento de folhas. Alegou que este efeito pode estar relacionado ao balanço hormonal, devido à descoberta da presença de citocininas na polpa de banana (GE *et al.*, 2008). Com isso a adição de diferentes doses da polpa pode resultar em respostas diferentes nos tecidos, já que para diversas espécies de plantas, a maior proporção de auxina em relação à citocinina estimula a formação de raízes, enquanto que maiores proporções de citocininas em relação às de auxinas estimulam o desenvolvimento de partes aéreas (RODRIGUES, 2009).

Golçalves (2010), estudando o desenvolvimento de um híbrido de *Laeliacattleya*, testou os efeitos da adição de diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento e de diferentes suplementos adicionados ao meio nutritivo KC na expectativa de encontrar efeitos equivalentes de algum dos suplementos adicionados com combinações dos reguladores de crescimento. Ela verificou que, após oito meses de cultivo, a adição de 90 g.l⁻¹ de polpa de banana reproduzia os efeitos da adição de auxinas, aumentando consideravelmente o número e comprimento das raízes, enquanto que a adição de 100 ml.l⁻¹ de água de coco simula os efeitos da adição das citocininas, estimulando a emissão de folhas e brotos. Estes trabalhos mostram que a adição de compostos orgânicos, como a polpa de banana, pode afetar o balanço de fitorreguladores no meio de cultivo resultando em respostas diferentes nos tecidos vegetais, dependendo do tipo, concentração e origem do composto orgânico.

Além disso, a polpa de banana pode suplementar o teor de açúcares, sais, vitaminas e aminoácidos no meio de cultura. Segundo Bettão (2009), a adição de 100 g.l⁻¹ de banana da variedade Prata ao meio de cultura acrescenta 16,81 g de açúcares totais; 15,4 mg de fósforo; 13,97 mg de sódio; 5,18 mg de cálcio e 319,7 mg de potássio ao meio. Vidoz *et al.* (1999) atribuíram os bons resultados de crescimento das plântulas de *Brassavola perrinii* e de três híbridos em meio MS e meio contendo fertilizante comercial Hyponex[®] quando adicionados de polpa de banana aos altos teores de potássio e fósforo encontrados na polpa do fruto partenocárpico. Como já discutido anteriormente, o aumento nos teores de fósforo e potássio, que quase dobra em alguns meios com o acréscimo de 100 g.l⁻¹ de polpa, podem resultar em maior crescimento das plantas e este pode ser um dos fatores responsáveis pelos efeitos benéficos da adição da polpa de banana.

A sacarose é essencial na formulação dos meios, pois serve como fonte de esqueleto carbônico e energia aos explantes. Faria *et al.* (2004), cultivando *Dendrobium nobile* em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura MS, observaram que houve maior crescimento da parte aérea das plântulas com 60 g.l⁻¹, enquanto que o acréscimo de sacarose no meio de cultura não influenciou o enraizamento *in vitro* das mesmas. Oliveira *et al.* (2003) também concluíram que 60 g.l⁻¹ de sacarose foi a melhor fonte e concentração de açúcar para o desenvolvimento de plântulas de *Oncidium varicosum*, mas, neste caso, o acréscimo de açúcar influenciou positivamente o enraizamento. Araújo (2007), trabalhando com *Cattleya loddigesii*, obteve maior número de folhas, brotos e comprimento da parte aérea com doses mais baixas de sacarose - 15 g.l⁻¹ -, enquanto que doses maiores - 45 g.l⁻¹ - resultaram em maior número de raízes, comprimento destas e massa seca das plântulas. Já Sorace *et al.* (2008) constataram que o meio contendo 40 g.l⁻¹ de sacarose e a metade da concentração dos macronutrientes do meio MS foi mais eficiente do que com 60 g.l⁻¹ para o desenvolvimento vegetativo e para o enraizamento da orquídea *Oncidium baueri*, evidenciando que a resposta das plantas em relação aos teores de açúcares no meio é dependente da espécie em estudo. O incremento de sacarose fornecido pela polpa de banana no presente trabalho pode ter contribuído para o melhor desenvolvimento das plântulas nos meios suplementados, indicando que a espécie *C. intermedia* responde positivamente ao acréscimo do teor de sacarose no meio.

O nitrogênio é um dos fatores mais limitantes no crescimento das plantas e as mesmas têm vários mecanismos para maximizar a eficiência do metabolismo do nitrogênio. A maioria das plantas adquire o nitrogênio na forma de NO₃⁻ ou NH₃⁺, que são as principais formas disponíveis no solo (MARSCHNER, 1995). Entretanto, a preferência por nitrato ou amônia varia conforme a espécie, o que geralmente está relacionado com as adaptações fisiológicas da planta ao ecossistema onde ela se diferenciou enquanto espécie (ADAMS & ATTIWILL, 1982). O nitrogênio orgânico solúvel, incluindo proteínas e aminoácidos livres, muitas vezes tem grande importância para a nutrição de nitrogênio das plantas (SCHMIDT & STEWART,

1999), sendo que algumas espécies podem se desenvolver melhor com fontes de nitrogênio orgânico (CHAPIN *et al.*, 1993; SCHMIDT & STEWART, 1999). Ao suplementar o meio de cultura com misturas de aminoácidos ou preparações de proteínas hidrolisadas, frequentemente intensifica-se o crescimento vegetal, embora certos aminoácidos possam inibi-lo (GAMBORG, 1970).

Majerowicz *et al.* (2000), testando diferentes fontes de nitrogênio no cultivo *in vitro* de *Catsetum fimbriatum*, observaram as maiores taxas de crescimento das plantas no meio contendo glutamina, que é um aminoácido livre. Verificaram que o acúmulo de matéria seca na presença de glutamina foi de 30% a 63% maior do que nas plantas crescendo em meios com nitrogênio inorgânico, indicando que os aminoácidos livres podem ser uma importante fonte natural de nitrogênio para essa espécie. Neste sentido, outra possível explicação para o aumento do crescimento das plantas de *C. intermedia* observado nos meios contendo polpa de banana é que esta espécie responde positivamente ao acréscimo de aminoácidos no meio de cultura, ou seja, a polpa de banana pode suplementar os teores de nitrogênio através dos aminoácidos.

A polpa de banana é uma substância complexa, rica em açúcares, sais, vitaminas e aminoácidos. A elevação do crescimento e o maior desenvolvimento das plântulas de *C. intermedia* com a suplementação do meio com a polpa pode ser resultado das alterações no balanço hormonal, do aumento dos teores de fósforo, potássio, açúcares, do fornecimento de nitrogênio orgânico, ou ainda, como resultado da interação destes fatores. Deve-se levar em consideração que as interações iônicas afetam a disponibilidade, absorção e transporte de nutrientes. A quantidade e velocidade de absorção de um nutriente pode sofrer aumento, diminuição ou não ser influenciada pela modificação nos teores de outro elemento (MALAVOLTA *et al.*, 1997). Desta forma, o simples aumento nos teores de sacarose, fósforo e potássio ao mesmo tempo no meio de cultivo não necessariamente resultarão em maior desenvolvimento das plantas.

Quando cultivadas *in vitro*, as plantas obtêm do meio nutritivo os nutrientes que necessitam para o seu desenvolvimento, incluindo carbono, uma vez que a taxa fotossintética *in vitro* é muito baixa. Além disso, elas estão num ambiente totalmente protegido onde não ocorre mudança de umidade, temperatura e iluminação. Quando retiradas dos frascos, no momento da aclimatização, em condições *ex vitro*, as plantas precisam se adaptar ao novo ambiente, principalmente às mudanças de umidade e temperatura. Se a planta estiver mais desenvolvida, esta adaptação se dará de forma mais rápida e com menores prejuízos.

A produção de maior número de raízes está intimamente relacionada à maior sobrevivência em casa de vegetação (CHANDRA *et al.*, 2010). Sob esta perspectiva, a maior produção de raízes promoverá maior superfície de contato, absorção de nutrientes e assim poderá auxiliar no estabelecimento e sobrevivência da plântula após a retirada do frasco e cultivo em casa de vegetação.

Dronk (2004) verifica em seus experimentos que plântulas de orquídea com sistema radicular mais desenvolvido, oriundas de meios com polpa de banana, apresentam taxas de mortalidade menores na aclimatização. Vidoz *et al.* (1999) observaram maior porcentagem de sobrevivência na aclimatização de plantas de *Brassavola perrinii* quando cultivadas em meio contendo polpa de banana. Gonçalves (2010) também observou que cerca de 90% das plântulas do híbrido *Laeliacattleya* cultivadas em meio contendo polpa de banana sobreviveram ao processo de aclimatização, enquanto que, dentre as oriundas de meio sem a suplementação, a taxa de sobrevivência foi inferior a 50%, o que evidencia o maior vigor e capacidade de aclimatização das plantas cultivadas em meios suplementados com polpa de banana. Sendo assim, a adição de polpa de banana aumenta o desenvolvimento do sistema radicular e influencia diretamente a taxa de sucesso no momento da aclimatização.

Embora no presente trabalho não tenhamos analisado a aclimatização das plantas de *Cattleya intermedia* produzidas *in vitro*, com base na literatura é esperado que as plantas produzidas nos meios BG e KR, por apresentarem maior desenvolvimento, principalmente do sistema radicular, apresentem melhores taxas de sobrevivência. Da mesma forma, é esperado que a adição da polpa de banana tenha efeito significativo aumentando as taxas de sobrevivência na aclimatização.

3.2. Alterações do pH

Assim como a análise de crescimento, o pH também foi avaliado estatisticamente de duas formas, sendo a primeira delas a comparação das médias dos nove tratamentos e a segunda a eliminação do tratamento adicional da análise, passando o experimento a ser considerado como um fatorial 4x2, sendo quatro meios de cultura com e sem polpa de banana. Analisando os resultados da comparação de valores de pH dos nove tratamentos, observa-se que houve pouca diferença entre os dados obtidos (Tabela 15). Nessa análise, o pH se manteve mais elevado no meio KR e sofreu maior redução no meio KC. Com isso descartamos a possibilidade dos resultados inferiores no crescimento das plântulas cultivadas no meio S ser devido a uma maior redução do pH deste meio.

Tabela 15. Valores de pH dos diferentes meios de cultura após oito meses de cultivo com *C. intermedia*. Meio acrescido do símbolo “+b” significa que houve acréscimo de 100 g.l⁻¹ de polpa de banana.

Meio	pH
MS+b	3,42 ab
MS	3,18 ab
KC+b	3,43 ab
KC	2,82 b
BG+b	3,79 ab
BG	3,42 ab
KR+b	3,95 a
KR	3,38 ab
S	3,41 ab
Média	3,42
CV (%) =	10,97

* médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Murashige e Skoog (1962) (MS); Murashige e Skoog (1962) + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana (MS+b); Knudson C (1946) (KC); Knudson C (1946) + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana (KC+b); Suplemento para orquídeas B&G[®] (BG); Suplemento para orquídeas B&G[®] + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana (BG+b); Kristalon Laranja[®] (KR); Kristalon Laranja[®] + 100 g.l⁻¹ de polpa de banana (KR+b); meio a base de compostos orgânicos (S).

Ao avaliarmos o experimento como fatorial, excluindo o tratamento S, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de pH dos diferentes meios de cultura, mas houve diferença entre usar ou não a polpa de banana (Tabela 16). Todos os meios, quando acrescidos de polpa de banana, mostraram valores mais altos de pH em comparação ao mesmo meio sem a polpa. No entanto, a diferença só foi estatisticamente significativa na média geral dos meios (Tabela 17) e não em cada caso em particular.

Tabela 16. Análise de variância do pH dos diferentes meios de cultura após oito meses de cultivo com *C. intermedia*.

Fonte variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Meio	3	1,1727	0,3909	2,4644	0,099761	ns
Banana	1	1,2015	1,2015	7,574767	0,014169	*
Interação	3	0,132	0,044	0,277395	0,840870	ns
Erro	16	2,5379	0,158619			
Total	23	5,044	0,219304			

*resultado significativo no teste F a 5%; ns – resultado não significativo no teste F a 5%

Tabela 17. Comparação de valores de pH dos diferentes meios e presença de polpa de banana após oito meses de cultivo com *C. intermedia*.

	Meios de cultura				Média
	MS	KC	BG	KR	
Com banana	3,423 Aa	3,433 Aa	3,79 Aa	3,956 Aa	3,650 A
Sem semana	3,18 Aa	2,826 Aa	3,42 Aa	3,386 Aa	3,203 B
Média	3,30	3,13	3,61	3,67	cv = 11,62%

* médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Murashige e Skoog (1962) (MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Kristalon Laranja® (KR).

Embora se trate de um tema pouco explorado, as observações de alterações de pH do meio de cultura durante o cultivo *in vitro* são registradas desde a década de 1940 (VACIN & WENT, 1949). Sabe-se que a interação de explantes diferentes (de diferentes espécies) com o meio de cultivo pode determinar a liberação de substâncias diversas que, em contato com o meio, determinam alterações na composição e disponibilidade dos sais minerais e, conseqüentemente, determinam alterações de pH no meio de cultura (BETTÃO, 2009).

Alterações têm sido observadas no pH durante o período em que as plântulas ficam inoculadas. Vacin & Went (1949), ao medir o pH do meio contendo *Epidendrum brineanum* após cem dias, observaram uma alteração de 5,46 para 3,78, enquanto que na ausência de plântulas os autores verificaram que o pH foi pouco alterado. Majerowicz *et al.* (2000) também observaram redução no pH dos meios com o cultivo de *Catasetum fimbriatum* e que esta redução variava conforme a fonte de nitrogênio do meio.

Bettão (2009), ao testar diferentes doses de diferentes variedades de banana no meio KC, observou que doses mais elevadas de polpa de banana, principalmente da variedade Prata, mantinham os valores de pH mais elevados após seis meses de cultivo com *Cattleya walkeriana*, e estes valores diferiam dos encontrados nos meios sem a polpa. Entretanto, Su *et al.* (2012), testando diferentes adubos comerciais (NPK) no cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile*, com e sem polpa de banana, após seis meses, não observaram diferenças em relação aos pH dos meios, independente da presença ou não da polpa.

Embora no presente estudo não tenhamos observado uma diferença significativa entre os meios com e sem polpa, os valores mantiveram-se um pouco mais elevados, após os oito meses de cultivo, nos meios com polpa de banana. Esses resultados evidenciam que este

composto orgânico tem alguma atuação como tamponante do pH, atenuando a acidificação do meio que ocorre com o passar do tempo de cultivo.

O pH é o fator responsável pela manutenção da solubilidade dos sais, influenciando assim a absorção de nutrientes e reguladores de crescimento, e consequentemente o desenvolvimento das plântulas. A capacidade tamponante dos meios de cultura pode ser aumentada adicionando-se água de coco (CALDAS *et al.*, 1998). A adição de polpa de banana também pode, em menor proporção, auxiliar na capacidade tamponante do meio de cultivo. A adição de compostos orgânicos, além de suplementar o meio com nutrientes, pode melhorar a absorção dos nutrientes do meio por manter os valores de pH mais elevados.

3.4 Análises bioquímicas

Não houve variação estatisticamente significativa entre os teores de clorofila A e clorofila total nos diferentes meios sem a adição da polpa de banana (Tabela 18). Quando adicionado de polpa de banana, o teor de clorofila A aumentou em todos os meios, mas este só foi significativo nos meios BG e KR, e o teor de clorofila total aumentou significativamente no meio BG. Já os teores de clorofila B aumentaram nos meios BG e KR com o acréscimo da polpa, evidenciando que os efeitos da adição da polpa de banana são dependentes do meio de cultivo.

Sabe-se que, a polpa de banana é rica em sacarose. Estudos apontam que a concentração de sacarose no meio interfere na produção de clorofila A e total, sendo o resultado variável conforme a espécie (JUNIOR *et al.*, 2013; DIGNART *et al.*, 2009).

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram encontrados por Neto *et al.* (2013) ao observarem que não houve diferença entre os teores de clorofila nas plantas de *Aspasia variegata* cultivadas em meio MS e KC. Já Schneider *et al.* (2013) encontraram maiores teores de clorofila em plantas de *Cattleya forbesii* cultivadas em meio BG quando comparado com os meios MS e KC, sendo que este meio também apresentou os melhores resultados na análise de crescimento.

Não são bem compreendidos os fatores que determinam os efeitos negativos ou positivos dos açúcares no crescimento e na fotossíntese (LE *et al.*, 2001). Estes efeitos controversos da adição de diferentes concentrações de sacarose poderiam depender hipoteticamente de uma quantidade limiar do conteúdo de sacarose que está presente nas plantas (FURBANK, 1997) e de suas condições fisiológicas associadas ao desenvolvimento (KOVTON & DAIE, 1995).

A clorofila A atua com maior efetividade na atividade fotossintética, uma vez que, diferentemente da clorofila B e carotenóides (denominados pigmentos acessórios), desempenha o processamento da luz (TAIZ & ZEIGER, 2009) e pode apresentar, portanto, maior eficiência fotossintética.

As plantas crescendo em cultivo *in vitro* são semi-autotróficas (HAZARIKA, 2003) e as folhas formadas sob tais condições podem não adquirir competência fotossintética (VAN HUYLENBROECK & DEBERGH, 1996). Entretanto, as plantas oriundas dos tratamentos com maiores teores de clorofila total durante a fase *in vitro* apresentaram as maiores taxas de sobrevivência e melhor desenvolvimento na fase de aclimatização (NETO *et al.*, 2013).

Os teores de clorofila são normalmente empregados como fornecedores de uma estimativa do conteúdo de nitrogênio total da planta (MAJEROWICZ *et al.*, 2002). De acordo com Majerowicz *et al.* (2002) e Tamaki *et al.* (2007), o teor foliar de pigmentos fotossintéticos foi suficiente para diagnosticar diferenças no estado nutricional das plantas de milho e abacaxi em função da quantidade de nitrogênio disponível. Neste sentido, a quantidade de nitrogênio presente no meio KR já é suficiente para o desenvolvimento de protocormos de *C. intermedia*, uma vez que este meio apresenta o menor teor de nitrogênio

dentre os estudados. Apesar das plantas deste meio terem apresentado resultados satisfatórios na análise de crescimento, a produção de clorofila foi igual ou superior à encontrada nos outros meios. Isso evidencia que há outros nutrientes com grande importância na nutrição mineral *in vitro* desta espécie.

Tabela 18. Teores de clorofila, proteínas solúveis totais e açúcares solúveis totais nas folhas das plantas de *C. intermedia* cultivadas em diferentes meios de cultura, durante oito meses.

	Meios de cultura				Média
	MS	KC	BG	KR	
<i>Clorofila A (µg.mgMF⁻¹)*</i>					
Com banana	0,0523 Ab**	0,0453 Ab	0,0710 Aa	0,0550 Ab	0,0559
Sem banana	0,0493 Aa	0,0456 Aa	0,0420 Ba	0,0390 Ba	0,044
Média	0,0508	0,0455	0,0565	0,047	cv = 11,37%
<i>Clorofila B (µg.mgMF⁻¹)</i>					
Com banana	0,0946 Ab	0,0763 Ab	0,1400 Aa	0,1280 Aa	0,1035
Sem banana	0,0910 Ab	0,0813 Ab	0,0700 Bb	0,1030 Ba	0,0925
Média	0,0928	0,0788	0,105	0,1155	cv = 12,76%
<i>Clorofila total (µg.mgMF⁻¹)</i>					
Com banana	0,1470 Ab	0,1213 Ab	0,2110 Aa	0,1463 Ab	0,1564
Sem banana	0,1403 Aa	0,1263 Aa	0,1083 Ba	0,1360 Aa	0,1277
Média	0,1436	0,1238	0,1596	0,1411	cv = 12,92%
<i>Proteínas solúveis totais (µg.mgMF⁻¹)</i>					
Com banana	6,774 Ba	6,865 Ba	7,109 Aa	6,656 Aa	6,851
Sem banana	8,305 Aab	8,582 Aa	6,376 Abc	5,348 Ac	7,153
Média	7,539	7,724	6,742	6,002	cv = 11,92 %
<i>Açúcares solúveis totais (µg.mgMF⁻¹)</i>					
Com banana	40,749 Aa	48,204 Aa	43,587 Aa	43,152 Aa	43,923
Sem banana	25,163 Bb	45,185 Aa	27,766 Bb	25,644 Bb	30,939
Média	32,956	46,695	35,676	34,398	cv = 15,86%

* Resultado expresso em µg da substância por mg de matéria fresca.

** Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Murashige e Skoog (1962) (MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G® (BG); Kristalon Laranja® (KR).

Os carboidratos ou sacarídeos são as moléculas biológicas mais abundantes nas células e funcionam como fonte de energia, como nutriente de reserva ou ainda como material de estrutura. Segundo Kraus *et al.* (2004), os carboidratos estão envolvidos no processo que antecede a divisão celular, possivelmente servindo como fonte de energia para as células ou fornecendo esqueletos de carbono para a síntese de outros compostos necessários para a célula (TAIZ & ZEIGER, 2009).

A sacarose é uma das principais formas de transporte de carbono em quase todas as angiospermas e o principal produto da fotossíntese, constituindo a principal forma de

translocação de carbono e o principal substrato para o metabolismo e a síntese de reservas como o amido (FARRAR *et al.*, 2000, LUNN & MACRAE, 2003). Além disso, a sacarose tem funções na regulação metabólica, sinalizando processos na expressão de genes e na determinação do crescimento, desenvolvimento e diferenciação nas plantas (SALISBURY & ROSS, 1992). Os teores de sacarose interferem diretamente no crescimento e nos processos biossintéticos das plantas (FERREIRA *et al.*, 2011). Segundo Hazarika (2003), o suprimento exógeno de açúcar pode ampliar as reservas de amido e sacarose nas plantas micropropagadas e favorecer a aclimatização, bem como acelerar as adaptações fisiológicas.

No presente trabalho observou-se que dentre os diferentes meios testados, apenas o KC sem a adição de polpa de banana apresentou teores mais elevados de açúcares solúveis totais (Tabela 18). Ao adicionar a polpa de banana ao meio, os teores de açúcares aumentam em todos os meios, com exceção do KC. Esse aumento pode ser ocasionado pelo suprimento exógeno de açúcar fornecido pela polpa de banana. Ferreira *et al.* (2011), trabalhando com *Dendrobium sp. in vitro*, observaram que o aumento crescente nos teores de sacarose do meio causava um aumento progressivo nos teores de carboidratos totais e amido nas plantas.

Em relação ao acúmulo de proteínas, apesar da grande variação no número total de solutos, na quantidade de nitrogênio e enxofre, entre as formulações testadas, a variação na quantidade de proteínas formadas pelas plantas foi pequena. Isso demonstra que os menores valores destes nutrientes já seriam suficientes para o desenvolvimento normal das proteínas *in vitro*.

O acúmulo de proteínas no tecido foliar foi inversamente proporcional ao crescimento, ou seja, os meios que apresentaram maior crescimento de parte aérea (BG e KR) resultaram em valores menores de proteínas solúveis totais. Já os meios onde o crescimento foi menor (MS e KC), o acúmulo de proteínas solúveis totais foi maior quando comparados aos meios sem acréscimo da polpa de banana (Tabela 18). Isso pode estar relacionado ao balanço fonte:dreno, aonde as proteínas solúveis das plantas cultivadas nos meios BG e KR podem ter sido utilizadas no metabolismo de crescimento ou na estruturação das células, uma vez que estas cresceram mais.

Pesquisas mostram que o estresse causado por algum fator biótico ou abiótico pode elevar os teores de proteínas solúveis totais nas folhas das plantas (COSTA *et al.*, 2008; LOBATO *et al.*, 2008). As maiores concentrações observadas no meio MS e KC podem ser uma resposta do tecido vegetal ao estresse por excesso e falta, respectivamente, de nutrientes, evidenciado que estes meios não são ideais para o cultivo *in vitro* desta espécie.

Em relação à adição da polpa de banana, o meio MS e KC quando suplementados reduziram o acúmulo de proteínas solúveis totais. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa no acúmulo de proteínas solúveis totais entre os meios com polpa de banana.

3.5 Análise de custo dos meios de cultura

Levando em consideração apenas o valor dos reagentes, observamos que o meio mais caro é o BG, que custa R\$ 11,34 (74% mais caro que o MS) para preparação de um litro de meio (Tabela 19). Este valor, muito superior aos demais, em parte deve-se ao fato de que este meio necessita maior quantidade de ágar para atingir a mesma consistência que os outros (2 a 3 gramas a mais) sendo que o ágar é um dos componentes mais caros do meio. Pesquisas recentes objetivam encontrar substitutos para o ágar, visando reduzir os custos do cultivo *in vitro* (OZEL *et al.*, 2008; SAGLAM & CIFTCI, 2010). Um exemplo é o trabalho realizado por Simmi & Nirmala (2012), no qual utilizaram fibra de coco e meio líquido para germinação de sementes e produção de plântulas de *Cymbidium pendulum*, no qual eles observaram que era viável a substituição ao ágar.

Apesar desse fator, o meio BG apresentou os melhores resultados para o desenvolvimento das plântulas *in vitro*, originando em curto espaço de tempo, e sem a necessidade de repicagens, plântulas vigorosas capazes de sobreviverem ao processo de aclimatização. Já o meio de menor custo para formulação é o KR, que custou R\$ 5,95 o litro. Este meio é 7% mais barato que o MS e apresenta a vantagem de ser mais fácil de preparar. Dronk (2004) comparou os meios MS e KC com outro à base de fertilizante (NPK 7-7-7) e observou grande redução nos custos de preparo de meio quando utilizado fertilizante comercial como base, além deste ter apresentado melhores respostas para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya amethystoglossa*.

Tabela 19. Custo total dos reagentes para produção dos meios de cultura

Meio	Custo dos reagentes (R\$ por litro)	Custo ágar (R\$ por litro)
MS	6,50	5,30
KC	6,05	5,30
KR	5,95	5,30
BG	11,34	7,60

Murashige e Skoog (1962) (MS); Knudson C (1946) (KC); Suplemento para orquídeas B&G[®] (BG); Kristalon Laranja[®] (KR).

Reduções maiores com o uso de fertilizantes no meio nutritivo, como a de 80% no custo total do meio citada por Stancato *et al.* (2001), podem ser encontradas se analisarmos os custos de preparo do meio como um todo. Os meios tradicionais mais complexos, como o MS, requerem o preparo de inúmeras soluções estoque, manutenção das mesmas, maior gasto com água, energia e mão-de-obra. Além disso, os reagentes do meio MS não estão disponíveis em todas as cidades, sendo muitas vezes necessário gastar com frete enquanto que os fertilizantes comerciais são facilmente encontrados em agropecuárias.

Outro inconveniente do meio MS é que leva na sua composição o nitrato de amônia e o nitrato de potássio. A aquisição destes reagentes é controlada pelo Ministério da Defesa através do Decreto Federal nº3665, de 20 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000), pois são considerados produtos químicos de interesse militar. Isso torna sua aquisição mais difícil por pessoas não pertencentes às universidades ou aos institutos de pesquisa.

O meio KC apresenta um custo baixo em termos de reagentes, de R\$ 6,05 por litro, mas, no presente trabalho mostrou resultados muito inferiores aos demais meios no desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia in vitro*.

Em relação ao uso da polpa de banana, segundo os dados divulgados pelo Programa Brasileiro de Modernização do Mercado Hortigranjeiro (PROHORT, 2013), o custo médio do quilo da banana Prata em 2013 nas centrais de distribuição e abastecimento foi de R\$ 1,31. Sendo assim, a adição de 100 g.l⁻¹ de polpa de banana reflete em um aumento de aproximadamente R\$ 0,13 no valor do litro do meio de cultura, o que representa um acréscimo de 2%, em média, no valor gasto com reagentes no meio. Esse acréscimo é compensado pelos ganhos em termos de aceleração do desenvolvimento das plântulas e vigor das mesmas quando cultivadas em meios suplementados com polpa de banana.

Entretanto, é preciso considerar que o uso da polpa de banana torna o processo de preparo do meio mais oneroso para o produtor, uma vez que é necessário preparar a polpa. Além disso, a falta de uniformidade entre as polpas encontradas, uma vez que cada banana tem uma composição, pode resultar em respostas diferenciadas ao longo do uso.

4 CONCLUSÕES

O melhor meio de cultivo para o desenvolvimento *in vitro* de mudas de *Cattleya intermedia* a partir de protocormos foi o meio BG, proporcionando maior desenvolvimento tanto de raízes quanto de parte aérea.

A adição de polpa de banana ao meio de cultivo melhora o desenvolvimento de plantas de *C. intermedia* cultivadas *in vitro*, principalmente do sistema radicular. Além disso, a polpa de banana aumenta a produção de clorofila nas folhas e o acúmulo de açúcares solúveis totais, o que possivelmente contribui para o sucesso na aclimatização das mudas.

A adição da polpa de banana ao meio não tem efeito tamponante considerável no pH do meio.

O meio à base do fertilizante comercial Krystalon Laranja[®] teve o menor custo em termos de reagentes e apresentou resultados similares ao BG no desenvolvimento das mudas, produção de clorofila e acúmulo de açúcares solúveis, podendo ser recomendado para a produção de mudas de *C. intermedia*. Sendo assim, é possível utilizar esse meio em substituição ao meio MS.

As análises bioquímicas, além de nos proporcionem uma ideia do estado nutricional da planta, permitem uma melhor comparação entre os efeitos provocados pelo uso dos diferentes meios de cultivo, servindo de suporte para muitas discussões. Entretanto, a análise de crescimento ainda é a melhor forma de verificar qual o melhor meio para a espécie que se pretende estudar e, ou trabalhar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.A.; ATTIWILL, P.M. Nitrate reductase activity and growth response of forest species to ammonium and nitrate sources of nitrogen. **Plant and Soil**, v.66, p.373-381, 1982.
- ALEXANDER, C.; ALEXANDER, I.J.; HADLEY, G. Phosphate uptake by *Gouyera repens* in relation to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, v.91, p.401-411, 1984.
- ARAUJO, A.G. **Micropropagação de *Cattleya loddigessii* ‘Tipo’: fontes de nitrogênio, qualidade de luz, sacarose e ácido giberélico**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2007. 74p. Tese (Doutorado)
- ARAUJO, A.G.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F.C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Revista Ceres**, v.53, p.608-613, 2006.
- BERBARA, R.L.L.; SOUZA, F.A.; FONSECA, H.M.A.C. Fungos Micorrízicos Arbusculares: muito além da nutrição. In: **Nutrição mineral de plantas**. Manlio Silvestre Fernandes (ed). Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, 432p.
- BETTÃO, F. C. **Efeito de variedades e concentrações de polpa de banana no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 35p. Dissertação (Mestrado).
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAHM, R.Ü.; GOMES, J.C.C.; BOSENBECKER, V.K. **Meios de cultura alternativos para o crescimento e desenvolvimento de orquídeas *in vitro***. In: I Congresso Brasileiro de Agroecologia, IV Seminário Internacional sobre Agroecologia, V Seminário Estadual sobre Agroecologia, 2003, Porto Alegre. Anais, 2003.
- BRASIL, Ministério da Defesa. Decreto-Lei n. 3665, de 20 de novembro de 2000. Estabelece critérios para o regulamento para fiscalização de produtos controlados. Acesso em: 19 dez 2013.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, v.1, p.87-132, 1998.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v.32, p.1199-1205, 2010.
- CHAPIN, F.S.; MOILANEN, L.; KIELLAND, K. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. **Nature**, v.361, p.150-153, 1993.

- CHEN, Y.; CHANG, C.; CHANG, W. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.36, p.420-423, 2000.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I.U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 507-520, 2009.
- COSTA, R.C.L.; LOBATO, A.K.S.; OLIVEIRA NETO, C.F.; MAIA, P.S.P.; ALVES, G.A.R.; LAUGHINGHOUSE, H.D. Biochemical and physiological responses in two *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Cultivars under water stress. **Journal of Agronomy**, v. 7, p. 98 - 101, 2008.
- DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.780-787, 2009.
- DIJK, E.; ECK, N. Axenic *in vitro* nitrogen and phosphorus responses of some Dutch marsh orchids. **New Phytologist**, v.131, p.353-359, 1995.
- DRONK, A.G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para o cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden e *Rchib***. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. 30p. Dissertação (Mestrado).
- ELLIOT, G.C.; SMITH, M.A.; BRIDGEN, M.P. Growth response of *Astroemeria* 'Parigro Pink' to phosphate supply *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.199-204, 1993.
- FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA, L.V.R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations, **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.22, p.780 -783, 2004.
- FARRAR, J.; POLLOCK, C.; GALLAGHER, J. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science**, v.154, p.1-11, 2000.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, W.; SUZUKI, R.M.; PESCADOR, R.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.L.; KERBAUY, G.B. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, p. 420-427, 2011.
- FIGUEIREDO, M.A.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A.G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RODRIGUES, V.A. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, vol.38, 2008.
- FURBANK, R.T.; PRITCHARD, J.; JENKINS C.L.D. Effects of exogenous sucrose feeding on photosynthesis in the C3 plant tobacco and the C4 plant *Flaveria bidentis*. **Journal of Plant Physiology**, v.24, p.291-299, 1997.

GAMBORG, O.L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, v.45, p.372-375, 1970.

GE, L.Y.; TAN, S.N.; YONG, J.W.H.; HUA, L.; ONG, E.S. Separation of cytokinin isomers with a partial filling-micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry approach. **Electrophoresis**, v.32, p.2024-2032, 2008.

GERALD, L.T.S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1. ed. São Paulo: Antiqua, 2011.

GNASEKARAN, P.; RATHINAM, X.; SINNIAN, U.R.; SUBRAMANIAM, S.A Study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBs) growth of *Phalaenopsis violacea* (Orchid). **Journal of Phytology**, v.2, n.1, p.229-233, 2010.

GONÇALVES, L.M. **Efeito de diferentes suplementos adicionados no cultivo *in vitro* do híbrido *Laeliacattleya***. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010. 49p. Dissertação (Mestrado).

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Bangalore, v.85, n.12, p. 1704-1712, 2003.

JUNIOR, R.F.G.; MANTOVANI, C.; FARIA, R.T.; LEMOS, E.G.M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.2, p.583-592, 2013.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro***. Piracicaba, 2005. 187p. Tese (Doutorado)

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 446p

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v.15, p.214-217, 1946.

KOVTUN, Y.; DAIE, J. End-product control of carbon metabolism in culture-grown sugar beet plants. **Plant Physiology**, v.108, p.1647-1656, 1995.

KRAUS, J.E., KERBAUY, G.B.; MONTEIRO, W.R. Aspectos histoquímicos da formação de protocormóides em ápices radiculares de *Catasetum pileatum* cultivados *in vitro*. In: F. Barros, & G.B. Kerbauy (eds.). **Orquidologia Sul Americana: uma compilação científica**. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp.85-89, 2004.

LE, V.Q.; SAMSON, G.; DESJARDINS, Y. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of *in vitro* plantlets of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO₂ concentration. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.599-605, 2001.

LICHTENTHALER, H.K. (1987), Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. In: Douce, R.; Packer, L. (eds) **Methods Enzymol 148**. Academic Press Inc, New York, p.350-382, 1987.

LOBATO, A.K.S.; OLIVEIRA NETO, C.F.; COSTA, R.C.L.; SANTOS FILHO, B.G.; CRUZ, F.J.R.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D. Biochemical and physiological behavior of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. under stress during the vegetative phase. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 44 - 49, 2008.

LUNN, J.E.; MACRAE, E. New complexities in the synthesis of sucrose. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.208-214, 2003.

MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G.B.; NIEVOLA, C.C.; SUZUKI, R.M. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. **Environmental and Experimental Botany**, v.44, p.1995-2006, 2000.

MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, J.M.S.; MÉDICI, L.O.; BISON, O.; PEREIRA, M.B.; SANTOS JÚNIOR, U.M. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, p.129-136, 2002.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2ª ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potássio e Fósforo, 1997, 319 p.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, 2nd edn. Academic Press, London, 1995.

MENEZES, L.C. **Cattleya labiata Lindley. Orquídeas brasileiras**. 1ª ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 1987. 112p

MEURER, E.J. Potássio. In: **Nutrição mineral de plantas**. Manlio Silvestre Fernandes (ed). Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 432p. 2006.

MORAES, C.P.; SANTOS, N.S.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G.M.; LEAL, T.S. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.13, p.57-65, 2009a.

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

NETO, V.B.P.; CAMPOS, G.O.; BOARETTO, A.G.; ZUFFO, M.C.R.; TORREZAN, M.A.; BENETÃO, J. *In vitro* behaviour of *Aspasia variegata*, an epiphytic orchid from the Brazilian Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.12, p.2178-2184, 2013.

OLIVEIRA, L.V.R.; FARIA, R.T.; FONSECA, I.C.B.; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Ciências Agrárias**, v. 24, p. 265 -272, 2003.

OLIVEIRA, L.V.R.; FARIA, R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, p.1-5, 2005.

OZEL, C.A.; KHAWAR, K.M.; ARSLAN, O. A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on *in vitro* shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Sci. Hort.**, v.117, p.174–181, 2008.

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

PROHORT, Programa de Modernização do Mercado Hortigranjeiros. Relatório – Média Mensal dos Preços, 2013. Disponível em: <www3.ceasa.gov.br/prohortweb/>. Acesso em: 07 de janeiro de 2014.

RODRIGUES, G. **Cultivo *in vitro* de duas espécies de *Cattleya*, com diferentes concentrações de auxina e citocininas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 32f. Dissertação (Mestrado).

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. Plant development. In: Salisbury, S.B.; Ross, C.W. (eds.) **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, p.329-357, 1992.

SANTOS, A.F.; VENTURE, G.M.; DIAS, J.M.M.; GOULART, M.S.; NOVAIS, M.S.; CECON, P.R.; TEIXEIRA, L.S.; MOURA, E. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta**, v.46, p.8-12, 2006.

SCHMIDT, S.; STEWART, G.R. Glycine metabolism by plant roots and its occurrence in Australian plant communities. **Austr. J. Plant Sci.**, v.26, p.253-264, 1999.

SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; GESING, J.P.A.; PESSOA, C.C. Efeitos de alguns meios de cultura sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Rich. Ex Beer - Orchidaceae. **ABCTP Notícias in vitro** p.4-7, 2002.

SIMMI, S.; NIRMALA, C. Utilization of coir fibers as an eco-friendly substitute for costly gelling agents for *in vitro* orchid seed germination. **Scientia Horticulturae**, v.133, p.89–92, 2012.

SCHNEIDER, L.; CARDOSO, S.O.; ZAFFARI, G.R.; ARAÚJO, J.S.P. **Desenvolvimento de protocormos de *Cattleya forbesii* *in vitro* a partir de diferentes meios de cultura suplementados com polpa de banana**. In: VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Recife, 2013.

SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T.W. Stability of tissue culture medium pH as function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports.**, v.5, n.4, p.292-294, 1986.

SMITH, S.E. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. **New Phytologist**, v.65, p.488-499, 1966.

SAGLAM, S.; CIFICI, C.Y. Effects of agar and isubgol on adventitious shoot regeneration of woad (*Isatis tinctoria*). **Int. J. Agric. Biol.**, v.12, p.281–285, 2010.

SORACE, M.; FARIA, R.T.; JÚNIOR, C.V.D.; GOMES, G.P.; BARBOSA, C.M.; VIEIRA, F.G.N.; SILVA, G.L.; TAKAHASHI, L.S.A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 775-782, 2008.

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

STANCATO, G.C.; BEMELMANS, P.F.; VEGRO, C.L.R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, n.1, p.25-33, 2001.

STANCATO, G.C.; ABREU, M.F.; FURLANI, A.M.C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, v. 67, p. 51-57, 2008.

SU, M.J.; SCHNITZER, J.A.; FARIA, R.T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Revista Científica**, Jaboticabal, v.40, n.1, p.28-38, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C.C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. **Hoehnea**, v.34, n.1, p.69-73, 2007.

UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.2, p. 267-269, 2007.

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

VAN HUYLENBROECK, J. M.; DEBERGH, P. C. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of *Spathiphyllum plantlets*. **Physiologie Plantarum**, v.96, n.2, p.298-304, 1996.

VENTURA, G.M. **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 110p. Tese (Doutorado).

VIDOZ, M.L.; FLACHSLAND, E.A.; REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. Comportamiento *ex vitro* de plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de três híbridos intergenéricos. **Ciencia y Técnica**, v.5, p.13-16, 1999.

VIEIRA, J.G.Z.; UNEMOTO, L.K.; YAMAKAMI, J.K.; NAGASHIMA, G.T.; FARIA, R.T.; AGUIAR, R.S. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Revista Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.48-52, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante analisar o efeito de diferentes meios de cultura na resposta morfogênica *in vitro* de cada espécie vegetal. A exigência nutricional costuma ser específica e também relativa à fase de desenvolvimento da planta. Para *Cattleya intermedia* constatou-se que o meio de cultivo mais adequado para a germinação de sementes, não é o mais indicado para o desenvolvimento dos protocormos.

A floricultura no Brasil é dominada por microprodutores, o que reforça a necessidade de encontrar formas alternativas mais simples e econômicas, a fim de garantir a sustentabilidade das pequenas produções e possibilitar que mais pessoas invistam nessa atividade.

Pode-se inferir que foi possível diminuir o tempo para produção de plantas vigorosas com a utilização de meios de cultura alternativos mais simples. O emprego de fertilizantes hidrossolúveis comerciais e meios específicos para orquídeas, em substituição aos meios de cultura provenientes de formulações mais complexas, podem reduzir o tempo de cultivo e diminuir os custos de produção.

Tomando-se como referencial o presente estudo, novas formulações devem ser investigadas com o objetivo de reduzir ainda mais o custo de produção dos meios de cultura. Adicionalmente, é importante salientar que cada espécie de orquídea pode apresentar resposta diferente aos diferentes meios, sendo necessário estudar cada caso em particular.

Pesquisas que visam simplificar o processo de cultivo *in vitro*, como o uso de luz natural, tampas permeáveis, substitutos ao ágar, alternativas de esterilização e meios simplificados tendem a ampliar o uso da técnica, tornando o cultivo *in vitro* menos dependente de tecnologias custosas e assim garantir a sustentabilidade da produção pelos pequenos e médios produtores.

Além disso, a simplificação das técnicas de cultivo *in vitro* tende a auxiliar na preservação das espécies vegetais, pois aumentam o número de mudas produzidas e reduzem os custos de produção, reduzindo assim a extração predatória das espécies na natureza.

ANEXOS

Levantamento de custos dos reagentes do meio de Murashige & Skoog (1962) com base no orçamento de produtos recebidos de três diferentes fornecedores.

Componentes do meio MS	Quantidade requerida (mg.l ⁻¹)*	Preço médio (R\$/l)
Nitrato de potássio	1900	0,25045
Nitrato de amônia	1650	0,20790
Cloreto de cálcio (monohidratado)	440	0,01721
Sulfato de Magnésio (heptahidratado)	370	0,00720
Fosfato de potássio	170	0,01097
Ácido bórico	6,20	0,00017806
Sulfato de manganês (tetrahidratado)	15,60	0,00052057
Sulfato de zinco (tetrahidratado)	10,55	0,00071160
Cloreto de potássio	0,83	0,00001693
Molibdato de sódio (dihidratado)	0,25	0,00009645
Sulfato de cobre (pentahidratado)	0,0025	1,0662E-07
Cloreto de cálcio (sexahidratado)	0,025	7,4750E-07
Glicina	2,0	0,0001348
Ácido nicotínico	0,5	0,0001845
Piridoxina	0,5	0,0024400
Tiamina	0,1	0,0000699
Inositol	100	0,0231000
Sulfato de ferro	27,85	0,0011123
EDTA	37,30	0,0021405
Sacarose	30000	0,55650
Carvão ativado	2000	0,10320
Agar	7000	5,31627
TOTAL		6,50040

* O cálculo foi realizado para a elaboração de um litro de meio.

Levantamento de custos dos reagentes do meio de Knudson C (1946) com base no orçamento de produtos recebidos de três diferentes fornecedores.

Componentes do meio KC	Quantidade requerida (mg.l⁻¹)*	Preço médio (R\$/l)
Sulfato de amônia	500	0,011
Nitrato de cálcio (tetrahidratado)	1000	0,046
Sulfato de magnésio (heptahidratado)	250	0,004
Sulfato de manganês (tetrahidratado)	7,5	0,000
Fosfato de potássio	250	0,016
Sulfato de ferro (heptahidratado)	25	0,001
Sacarose	30000	0,557
Carvão ativado	2000	0,103
Agar	7000	5,316
TOTAL		6,054

* O cálculo foi realizado para a elaboração de um litro de meio.

Levantamento de custos dos reagentes para elaboração do meio KR, produzido com base no fertilizante Krystalon Laranja[®], NPK 6-12-36, produzido pela empresa de fertilizantes Yara[®]. Para o cálculo do preço médio foram obtidos orçamento dos produtos de três diferentes fornecedores.

Componentes do meio KR	Quantidade requerida (mg.l⁻¹)*	Preço médio (R\$/l)
Krystalon Laranja	3000	0,018
Sacarose	30000	0,557
Carvão ativado	2000	0,103
Agar	7000	5,316
TOTAL		5,994

* O cálculo foi realizado para a elaboração de um litro de meio.

Levantamento de custos dos reagentes para elaboração do meio BG, produzido especialmente para o cultivo *in vitro* de orquídeas pela empresa B&G Flores[®] - Fertilizantes e Nutrição Vegetal. A embalagem do produto contém sachês de 47g, sendo que cada sachê faz 1 litro de meio de cultura.

Componentes do meio BG	Quantidade requerida (mg.l⁻¹)*	Preço médio (R\$/l)
BG	47000	3,750
Agar	10000	7,594
TOTAL		11,344

* O cálculo foi realizado para a elaboração de um litro de meio.