

GIZELLA MACHADO VENTURA

**CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS DO GRUPO *Cattleya*, EM
DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E IRRADIÂNCIAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V465c
2007

Ventura, Gizella Machado, 1974-

Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de culturas e irradiâncias / Gizella Machado Ventura. – Viçosa, MG, 2007.
xi, 110f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Maria Moreira Dias.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Orquídeas - Nutrição. 2. Orquídeas - Propagação *in vitro*. 3. Orquídeas - Ambiência. 4. Orquídeas - Irradiância. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.93415

GIZELLA MACHADO VENTURA

CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS DO GRUPO *Cattleya*, EM
DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E IRRADIÂNCIAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 5 de julho de 2007.

Prof. Roberto Ferreira de Novais
(Co-Orientador)

Prof. Victor Hugo Alvarez V.

Prof. Ricardo Tadeu de Faria

Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre

Prof. José Maria Moreira Dias
(Orientador)

Com amor, dedico à minha grande família:
Machado, Garcia, Ventura e Mafia

AGRADECIMENTOS

À Deus Pai, Nossa Senhora Aparecida, Santa Rita de Cássia e Divino Espírito Santo que conhecemos e Neles cremos, sem os quais não seria possível concluirmos este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, que com muito zelo me acolheu e muito contribuiu para minha formação intelectual e pessoal.

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

Ao meu orientador, Prof. José Maria Moreira Dias, pela orientação, apoio, confiança, conselhos, críticas, sugestões e amizade ao longo do curso, pelo incentivo incessante e, acima de tudo, por acreditar que nós podemos fazer melhor.

Aos meus professores e conselheiros Sílvio Lopes Teixeira, Roberto Ferreira de Novais e Paulo Roberto Cecon pelos conselhos, orientações, sugestões, apoio, amizade, incentivo, e por acreditar no nosso trabalho.

Aos Prof^{tes} da UFV, aqui representados por Victor Hugo, Wagner Campos Otoni e Vicente Wagner Casali, pelos conselhos, apoio e laboratórios.

Aos meus pais, Virgília e Daniel, por suportarem a ausência e ainda com tanto amor darem força para continuar o meu caminho em busca da realização pessoal e profissional. Aos meus sogros, Nira e Rubens, por me acolherem por tantos anos, apoiando e fazendo o papel dos meus pais aqui em Viçosa. Às minhas irmãs e cunhadas, Daniella, Graziella, Izabella, Adriana Luiza, Adriana e Elenice, que carinhosamente souberam me apoiar. Aos meus cunhados, Dorgival, Cláudio, Moacir, Silmar e Geomar, pelos incansáveis favores e carinho. Aos meus queridos e muitos sobrinhos, Matheus, Helena, Luiza, Marina e Ana Clara, que em cada sorriso, beijo e abraço me ensinavam a amar a vida.

Ao meu marido Reginaldo, por acreditar, apoiar, fortalecer e respeitar as minhas convicções diante das dificuldades, me incentivando sempre e trilhando junto com muito amor um caminho único.

À Sra. Inês Dias e os filhos Gustavo e Leandro Dias, pelo apoio, incentivo, carinho e, amizade materna e fraterna que tive durante minha estada nesta cidade.

Ao André Ferreira Santos que muito contribuiu para a realização e execução deste trabalho, com sua persistência, otimismo e amizade, me incentivou a montar mais e mais experimentos, incansavelmente. Em especial a Cenira que muito me ajudou com seu apoio e amizade, sempre olhando por minhas plantinhas.

Aos estagiários e amigos que muito me ajudaram e complementaram os meus trabalhos, Marcus, Marília, Raquel, Rita, Lorena, Everton, Elaine. Aos amigos, Virginia, Gustavo Denarte, Rodrigo, Aurora, Elisa, Raquel, Cíntia, Donizetti, Gustavo, amigos técnicos e funcionários, aqui representados por Márcio Rocha, Mara Rodrigues, Vânia Ferreira, Valério, Lígia, pelo apoio, bom trato, amizade e incentivo, que de modo simples muito contribuíram na condução dos experimentos e na minha estada nesta Universidade.

Aos meus amigos da Associação Orquidófila e Orquidóloga de Viçosa (AOOV) e Núcleo de Pesquisa e Conservação de Orquídeas (NPCO), em memória de um grande amigo, Marco Túlio David das Neves, que muito me ensinaram a acreditar nos nossos sonhos e, principalmente, a realizá-los.

Enfim, a todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

GIZELLA MACHADO VENTURA, filha de Daniel Ventura Netto e Virgília Machado Ventura, nasceu em 15 de junho de 1974, em Belo Horizonte.

Em janeiro de 2000, graduou-se Engenheira-Agrônoma pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Iniciou, em março de 2000, o Curso de Mestrado em Fitotecnia, na área de Propagação Vegetal e Cultura de Tecidos e Células Vegetais, na mesma Instituição, concluindo-o em março de 2002.

Deste 2001, participou de grupos de estudos sobre cultivo de orquídeas, resultando na formação e criação da Associação Orquidófila e Orquidóloga de Viçosa (AOOV), sendo diretora de Assuntos Culturais e Eventos no período de 2004 a 2006. Participando ainda da comissão organizadora de três exposições de orquídeas na cidade de Viçosa. Além de ministrar cursos sobre orquídeas na Semana do Fazendeiro, em Belo Horizonte e Juiz de Fora.

Ingressou, em fevereiro de 2003, no Curso de Doutorado em Fitotecnia, na mesma área, tendo como linha de pesquisa nutrição e metabolismo de orquídeas cultivadas *in vitro*, na UFV.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 1	27
Carvão ativado na germinação, crescimento e desenvolvimento de protocormos de orquídeas <i>in vitro</i>	
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Germinação <i>in vitro</i> de sementes.....	29
2.1.1. Meios de cultura com distintas formulações químicas.....	29
2.1.2. Meios de cultura com adição de diferentes concentrações de carvão ativado	30
2.2. Crescimento e desenvolvimento <i>in vitro</i> de protocormos	31
2.2.1. Adição de carvão ativado de diferentes marcas	31
3. RESULTADOS	33
3.1. Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Laelia purpurata</i> var. <i>carnea</i> em meios de cultura com distintas formulações químicas	33
3.2. Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Cattleya amethystoglossa</i> em meio de cultura com adição de diferentes concentrações de carvão ativado	36
3.3. Crescimento e desenvolvimento <i>in vitro</i> de protocormos.....	37
3.4. Germinação de <i>Laelia purpurata</i> var. <i>carnea</i> em meio de cultura com carvão ativado de diferentes marcas	39
4. DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

CAPÍTULO 2	48
Nutrição de orquídeas <i>in vitro</i>	
RESUMO	48
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Obtenção das plântulas	51
2.1.1. Fase de desinfestação das sementes	51
2.1.2. Preparo do meio de cultura para germinação das sementes	51
2.1.3. Inoculação das sementes nos meios de cultura e condições de incubação	52
2.2. Cultivo de <i>Cattleya loddigesii</i> em meio de cultura com diferentes concentrações de sais e de sacarose	52
2.3. Cultivo de <i>Sophronitis coccinea</i> em diferentes formulações químicas de meio de cultura	54
2.4. Cultivo de <i>Cattleya bicolor</i> em diferentes formulações químicas de meio de cultura	56
2.5. Cultivo de <i>Laelia anceps</i> var. semi-alba em diferentes formulações químicas de meio de cultura	56
2.5.1. Efeito dos meios de cultura na germinação	56
2.5.2. Efeito dos meios de cultura no crescimento das vitroplantas.....	57
3. RESULTADOS	59
3.1. Cultivo de <i>Cattleya loddigesii</i> em meio de cultura com diferentes concentrações de sais e de sacarose	59
3.2. Cultivo de <i>Sophronitis coccinea</i> em diferentes formulações químicas de meio de cultura	62
3.3. Cultivo de <i>Cattleya bicolor</i> em diferentes formulações químicas de meio de cultura	64
3.4. Cultivo de <i>Laelia anceps</i> var. semi-alba em diferentes formulações químicas de meio de cultura	65
3.4.1. Efeito dos meios de cultura na germinação	65
3.4.2. Efeito dos meios de cultura no crescimento e desenvolvimento das vitroplantas	68
4. DISCUSSÃO	73
5. CONCLUSÕES	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

CAPÍTULO 3	81
Efeito dos níveis de irradiância sobre crescimento <i>in vitro</i> de <i>Cattleya guttata</i> ‘Leopoldi’ x <i>Laeliocattleya</i> ‘Guadalajara’	
RESUMO	81
1. INTRODUÇÃO	82
2. MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1. Obtenção das plantas	84
2.2. Fase de cultivo das plantas	85
2.3. Características avaliadas	88
2.3.1. Análise de crescimento	88
2.3.2. Produção de etileno e de dióxido de carbono	88
2.3.3. Determinação dos pigmentos foliares	88
2.3.4. Determinação das trocas gasosas	89
2.3.5. Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	89
2.4. Análise estatística	90
3. RESULTADOS	91
3.1. Análise de crescimento	91
3.2. Produção de etileno e de CO ₂	95
3.3. Análise dos pigmentos foliares	95
3.4. Determinação das trocas gasosas	96
3.5. Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	97
4. DISCUSSÃO	101
5. CONCLUSÕES	106
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CONCLUSÕES GERAIS.....	110

RESUMO

VENTURA, Gizella Machado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias.** Orientador: José Maria Moreira Dias. Co-orientadores: Roberto Ferreira de Novais, Sílvio Lopes Teixeira e Paulo Roberto Cecon.

A propagação *in vitro* de orquídeas requer condições específicas de cultivo. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito dos meios de cultivo na germinação e no crescimento de espécies de orquídeas do grupo *Cattleya*, e estabelecer níveis adequados de irradiância para o crescimento de vitroplantas. Avaliaram-se os efeitos da adição de doses (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 g L⁻¹) de carvão ativado e de sete marcas comerciais nos meios de cultura GB₅; MN e Peter's. Na segunda etapa, avaliaram-se quatro formulações de meios de cultura (Peter's; MS; GB₅ e B&G), com 0,0 e 2,0 g L⁻¹ carvão ativado. Finalmente, estudaram-se os efeitos de irradiância (12; 25; 50; 100 e 150 μmol m⁻² s⁻¹). A germinação de sementes de *Laelia purpurata* var. *carnea*, *Cattleya amethystoglossa* e *Laelia anceps* var. *semia-alba* ocorreu em menor tempo (≅ 30 dias) e em maior porcentagem (80%) em meio de cultura sem adição de carvão ativado. Nestas condições houve também maior formação de protocórmios verdes. Em contrapartida, a adição de carvão ativado aumentou o crescimento de protocórmios com primórdios radiculares. Formulações mais simples, por exemplo, a base de adubo comercial Peter's ou B&G orchidée (3,0 gL⁻¹) podem substituir meios de cultura complexos como o MS (1962) e o GB₅ (1968). Vitroplantas do híbrido *Cattleya guttata* 'Leopoldi' x *Lc. Guadalajara* cultivadas na irradiância de 65 μmol m⁻² s⁻¹ resultaram em melhores respostas no crescimento vegetativo. Em maiores níveis de irradiância, observou-se fotoinibição reversível e em baixa frequência, demonstrando a plasticidade do híbrido estudado.

ABSTRACT

VENTURA, Gizella Machado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2007. **Orchids cultivation *in vitro* of the *Cattleya* group, in different means of culture and light irradiations.** Adviser: José Maria Moreira Dias. Co-Advisers: Roberto Ferreira de Novais, Sílvio Lopes Teixeira and Paulo Roberto Cecon.

The propagation *in vitro* of orchids requires specific conditions to be cultivated. This work aimed to evaluate the effects of the methods of cultivation in the process of germination and growth of the species of the *Cattleya* group, and establish better levels of irradiation for the growth of vitroplants. We evaluated the effects of adding doses (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L⁻¹) of activated charcoal and of commercial brands in the means of culture GB₅, MN, and Peter's. In the second step we evaluated four formulations in the means of culture (Peter's; MS; GB₅; and B&G), with 0,0 and 2,0 g L⁻¹ activated charcoal. Finally we studied the effects of the light irradiation (12; 25; 50; 100; and 150 μmol m⁻² s⁻¹). The seeds germination of the *Laelia purpurata* var. *carnea*, *Cattleya amethystoglossa* e *Laelia anceps* var. *semia-alba* occurred in less time (≈ 30 days) and in higher percentage level (80%) in means of culture without the addition of activated charcoal. In the same conditions, there were more green protocorms also, but the addition of activated charcoal increased the growth of the protocorms with roots. Simpler formulations, for example, the commercial fertilizer Peter's or B&G orchidée can substitute more complex means of culture as MS (1962) and GB₅ (1968). Vitroplants of the *Cattleya guttata* 'Leopoldi' x *Lc. Guadalajara* cultivated under light irradiation of the 65 μmol m⁻² s⁻¹ resulted in a better vegetative growth. In higher levels of irradiation, photo inhibitor effects were observed, but it was reversible in lower frequency, showing the plasticity of the hybrid studied.

INTRODUÇÃO GERAL

O estudo nutrição e metabolismo de orquídeas *in vitro*, principalmente do grupo *Cattleya*, apresenta poucos trabalhos publicados, com sendo importante realizar pesquisas que forneçam novas informações para o cultivo desse importante grupo das orquídeas (Hinnen et al., 1989; Adelberg et al., 1997; Kumaria, 1991; Kishi e Tagaki, 1997).

Além do mais, as orquídeas do grupo *Cattleya* apresentam grande potencial para o agronegócio, visto que o país apresenta condições ecológicas ideais para o crescimento de muitas espécies, sendo *habitat* de muitos outros gêneros e espécies, como nas regiões da Mata Atlântica, Amazônia e dos Cerrados (Menezes, 1987; Farias e Ribeiro, 2000).

No entanto, segundo Gloeden (1998) e Carneiro et al. (2001), a pronunciada e desenfreada devastação e extração predatória, aumenta a cada ano o número de espécies que correm o risco de serem extintas, sem ao menos serem estudadas ou conhecidas.

Um dos grandes problemas da propagação de orquídeas pelos métodos clássicos deriva do fato das sementes dessas plantas serem de tamanho extremamente reduzido, sem endosperma. Além disso, embora ocorra formação de inúmeras sementes por cápsula, a porcentagem de germinação, em condições naturais, é em torno de 2 a 3 %, dependendo de associações micorrízicas (Sheehan, 1992; Corrie e Tandon, 1993). Há que considerar, ainda, que a propagação por semente não é adequada, quando aplicada em larga escala, por não apresentar homogeneidade da população descendente, dada à segregação genética (Pierik, 1990).

Outro fator relevante é o lento crescimento da planta, dependendo de vários anos para formação de uma muda, uma vez que, para a maioria das espécies de *Cattleya*, é necessário, em geral, um ano para a formação de um broto constituído de um pseudobulbo, e sendo recomendado, no mínimo, três pseudobulbos por muda (Sheehan, 1992).

As técnicas de cultivo de células e tecidos vegetais permitem a produção massal desse grupo de plantas da família orquidácea (Nayak et al., 2002). Sobretudo, reduzindo o número de espécies em extinção, aumentando o índice da germinação *in vitro* (98 a 100 %), para a grande maioria dessas espécies, acelerando o processo de crescimento e

desenvolvimento, formando vitroplantas muito mais vigorosas e adaptáveis para o cultivo *ex vitro* (Martini et al., 2001).

Inúmeros trabalhos discutem tipos de meios de cultivo utilizados para as orquídeas, porém, poucos estudam objetivamente como se dá a nutrição e o metabolismo das orquídeas *in vitro*. Sabe-se que generalizações são arriscadas ou contra indicadas para o cultivo, devido às peculiaridades das espécies, quanto às exigências bióticas e abióticas.

Portanto, objetivou-se estudar os efeitos da nutrição e metabolismo nas distintas fases da propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*. Primeiramente, avaliaram-se os efeitos da adição de carvão ativado em distintos meios de cultura, empregando-se diferentes doses e marca, visando à germinação de sementes e o crescimento de protocormos de orquídeas do grupo *Cattleya in vitro*. Posteriormente, estudou-se o emprego de distintas formulações de meios de cultura que promovessem melhores condições nutricionais para o crescimento de plantas, reduzindo os custos de produção e o período de cultivo. Finalmente, estudaram-se os efeitos de diferentes níveis de irradiância que proporcionam melhores condições de crescimento para plantas de orquídeas deste grupo.

REVISÃO DE LITERATURA

Graças à beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas apresentam elevado valor como planta ornamental, com grande interesse econômico e botânico; com destaque, ainda, para sua importância na indústria medicinal, alimentícia e de cosméticos (Kumaria e Tandon, 2001).

Taxonomicamente, as orquídeas são consideradas a maior e mais diversificada família entre as plantas fanerógamas (Yew e Hew, 2000). Embora ainda não se conheça o número exato, estima-se que existam aproximadamente 20.000 espécies, contemplando ao redor de 1.000 gêneros, correspondendo a um sétimo de todas as plantas com flores (Black, 1973). Atualmente, esse número de espécies é considerado 30.000 (Cronquist, 1981), sendo citados valores entre 17.000 a 35.000 (Dressler, 1993).

No Brasil, são conhecidos aproximadamente 203 gêneros e 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 e Ribeiro, 2000).

As orquídeas constituem fator de agronegócio para grande número de países, sendo os principais produtores Holanda, Itália, Dinamarca, Espanha, Alemanha, Japão, Israel, Nova Zelândia, África do Sul, Quênia, Estados Unidos, Costa Rica, Colômbia e Equador (Bañeras, 1997; Castro, 1998).

Os Estados Unidos gastam, por ano, em torno de 15 bilhões de dólares com a importação de flores e plantas ornamentais (Walt, 2001). A Holanda é o principal importador e exportador desses produtos, sendo responsável por 59 % da exportação de flores cortadas e 48 % de plantas envasadas, comercializando, em 1995, 67 milhões de dólares somente em orquídeas do gênero *Cymbidium* (Castro, 1998). Próximo de um milhão de flores de *Cymbidium* e *Cattleya* são exportadas para Sidney (Austrália) à cada ano (Kumaria e Tandon, 2001). Outros gêneros de orquídea bastante comercializados são *Dendrobium*, *Oncidium* e *Phaleonopsis* (Bañeras, 1997). No Equador, um dos principais produtores da América do Sul, comercializam-se 3.300 variedades de orquídeas (Walt, 2001).

A floricultura brasileira é uma atividade consolidada, com importância socioeconômica em vários Estados, apesar de 95 a 98 % da produção nacional destinarem-se ao mercado interno e, em algumas datas especiais, devido à grande

demanda, ser necessária ainda a importação (Kämpf, 1997). Apenas 2 a 5 % da produção nacional destina-se à exportação, principalmente para a Alemanha, Holanda, Itália, EUA, Argentina, Japão e Espanha. Nos anos de 1999 e 2001, o Brasil atingiu com a exportação de plantas ornamentais valores de US\$13,12 e US\$22,3 milhões, respectivamente. Do total exportado em 1999, US\$10 milhões deveram-se a materiais propagativos (Kämpf, 1997, Castro, 1998).

A floricultura brasileira é representada principalmente por crisântemos, rosas, orquídeas, lisiantos, gladiolos, lírios e gérberas, para flor de corte; e por crisântemos, violetas, prímulas, azaléas, gloxínias, *poinsetias*, orquídeas, samambaias, aráceas, entre outras, para plantas envasadas (Castro, 1998).

Este setor apresenta possibilidades de crescimento, uma vez que se observa o grande potencial do Brasil no que se refere ao agronegócio em floricultura. Nesse contexto, devido à exuberância e beleza de suas flores, as orquídeas têm grandes e reais perspectivas, uma vez que nosso País apresenta ampla diversidade climática e multiplicidade de variedades, somado às inúmeras espécies raras e exóticas, encontradas apenas no território brasileiro, com destaque ao grupo das *Cattleya* e seus híbridos, que atingem elevados preços de mercado (Ventura, 2002).

Para o cultivo, como flor de corte, o gênero *Cattleya* é o mais importante, sendo considerado por Arditti e Ernst (1992) sinônimo de orquídea e, por Menezes (1987), a rainha das orquídeas, notadamente pela exuberância e tamanho de flor. Este gênero é originário das densas florestas da Bacia Amazônica e litoral do Brasil, principalmente Mata Atlântica, sendo ainda originárias das encostas florestadas da Costa Rica e outros países da América Central, contemplando, aproximadamente, 70 espécies, todas epífitas, com proeminentes pseudobulbos, cujos tamanhos variam de 10 cm a 1,3 m. As flores são geralmente grandes, com a terceira pétala transformada em labelo, quase sempre com os bordos franjados. A parte basal, ligada ao resto da flor, normalmente é tubular, envolvendo a coluna (Black, 1973).

O gênero *Cattleya* está inter-relacionado com os gêneros *Laelia*, *Brassavola* e *Sophranitis* (Eigeldinger e Murphy, 1972), por apresentarem aparência de suas estruturas florais e por se intercruzarem, produzindo formas mais bonitas que aquelas que seriam obtidas, utilizando-se apenas um gênero para a produção de híbridos. Muitos dos híbridos intergenéricos conservam a morfologia da *Cattleya* e somente ao se observar as partes reprodutivas das flores é que as diferenças se tornam evidentes (Black, 1973).

As orquídeas foram, inicialmente, exploradas por meio de coletas indiscriminadas de uma única espécie ou de variedades existentes, retiradas de seus *habitats*. Esse problema tem se agravado com o crescimento urbano, com o aumento das atividades agrícolas e extrativismo predatório (Menezes, 1987, 1995), desmatamentos e incêndios (Carneiro et al., 2001). Muitos exemplares dessa família de plantas vêm sendo dizimados ou suprimidos e, segundo Carneiro et al. (2001), empobrecendo, de forma gradativa, a biodiversidade. Atualmente, inúmeras variedades estão em risco ou já foram extintas, provavelmente sem nem haverem sido estudadas ou classificadas; ou delas restam poucos exemplares, geralmente, em domínio de colecionadores e, às vezes, restritos apenas a um proprietário (Menezes, 1987, Gloeden, 1998).

Em relação ao modo de reprodução, as orquídeas produzem elevado número de sementes, embora menos que 5 % germinam em condições naturais, pois as sementes são demasiadamente pequenas, quase que desprovidas de endosperma, apresentando embrião reduzido, cotilédone não diferenciado e requerendo associação micorrízica (Corrie e Tandon, 1993).

Durante a germinação, o embrião das orquidáceas diferencia em um órgão especial denominado protocórmio, o qual tem um ou vários órgãos foliares cuja natureza foi bastante investigada em vários estudos de anatomia (Treub, 1890; Bernard, 1909; Champagnat, 1977; Margara, 1984; Barabé et al., 1993) citados por Leroux (1997). A distinção anatômica entre embrião e protocórmio é de difícil determinação. Entretanto, quando o embrião rompe o envoltório da semente e torna-se ovóide, pode ser denominado de um protocórmio (Leroux et al., 1997).

Estudos anatômicos focalizam principalmente o desenvolvimento dos protocormos em condições simbióticas em espécies tropicais. A comparação do desenvolvimento destas estruturas em espécies tropicais com o de espécies da zona temperada pode contribuir para o melhor entendimento da morfogênese dos protocormos de Orchidaceae (Leroux et al., 1997).

A propagação *in vitro* de orquídeas a partir de sementes constitui um dos métodos mais conhecidos e utilizados para multiplicação das espécies botânicas desta família (Stancato et al., 2001). A técnica existente para germinação *in vitro* necessita de certos aperfeiçoamentos e conhecimentos. As cápsulas são primeiramente esterilizadas e as sementes transferidas asépticamente para um meio de cultivo, mantidas em condições controladas de temperatura, luz, e umidade (Kumaria e Tandon, 2001).

As respostas de sementes de orquídeas aos fatores físicos e químicos diferem de uma espécie para outra, como demonstram alguns trabalhos com as espécies de *Purpurella* (Harvais e Hadley, 1967), *Epipactis*, *Calypso*, *Goodyera*, *Piperia* e *Platanthera* (Arditti et al., 1981), *Cypripedium* (Arnaud et al., 1992; Pauw e Remphrey, 1993; Lauzer et al., 1994; Wagner e Hansel, 1994; Pauw et al., 1995), *Dendrobium* (Kumaria e Tandon, 1991; Handique e Talukdar, 1998), *Elythranthera* e *Diuris* (Oddie et al., 1994), *Spiranthes* (Zettler et al., 1995); *Encyclia* (Stenberg e Kane, 1998), *Cymbidium* (Kumaria et al., 1990; Buzarbarua, 1999) e *Acampe* (Kalita e Sarma, 2001).

Os meios de cultura utilizados para germinação e para o crescimento *in vitro* dessas espécies são diversos, assim como modificações em suas formulações e condições de cultivo (Carvalho, 2002; Ventura, 2002) (Quadros 1 e 2).

A propagação clonal de orquídeas, utilizando técnicas de cultura de tecidos, vem ampliando sua importância industrialmente. Como as orquídeas são heterozigóticas, dotadas de uma fase juvenil bastante longa e plântulas com crescimento e desenvolvimento extremamente lento, as técnicas de propagação *in vitro* constituem uma ferramenta essencial para multiplicação rápida de alguns híbridos. Híbridos de *Aranda*, *Ascocenda*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Renanthera* e *Vanda* têm sido clonados, com êxito, mediante tais técnicas. A cultura de tecido de orquídeas ainda reveste-se de grande importância e valor, como ferramenta para pesquisa básica e método efetivo para resgatar muitas espécies em risco de extinção (Kumaria e Tandon, 2001).

Não existe, ainda, um meio de cultura específico adequado para um gênero, espécie, híbrido ou clone. Em geral, é difícil explicar porque em certas combinações de componentes do meio e condições de cultivo os resultados têm sido bem sucedidos, enquanto em outras não se tem logrado êxito (Ventura, 2002).

A resposta morfogênica de um tecido a condições de cultivo *in vitro* pode variar amplamente entre gêneros, espécies, cultivares e mesmo entre plantas individuais do mesmo genótipo, crescendo em diferentes condições ambientais. Ademais, em plantas que sofrem flutuações anuais ou mesmo diárias dos fatores climáticos, parecem existir ritmos endógenos fisiológicos, os quais podem ser críticos para o estabelecimento da cultura (Arditti e Ernst, 1992).

Arditti e Ernst (1992) mencionam as seguintes formulações de meios para o cultivo *in vitro* de *Cattleya*: KC (Knudson, 1946); VW (Vacin e Went, 1949); H (Heller, 1953); MS (Murashige e Skoog, 1962), LS (Linsmaier e Skoog, 1965); RM (Reinert e

Mohr, 1967); Lind. (Lindemann et al.,1970); e Ball (Ball et al., 1971). O quadro 1 apresenta a constituição mineral e orgânica das principais formulações de meios empregadas para a germinação de sementes e cultivo de células e tecidos de orquídeas do grupo *Cattleya in vitro*. Estes mesmos autores mencionam, ainda, a formulação de meios de cultivos testada em outros gêneros como o de Curtis (1936), White (1963), Woter e Skoog (1966), Gamborg et al. (1968), Nitsch (1969), Norstog (1973), Mitra et al.(1976), Harvais (1982) e Van Waes e Deberg (1986) (Quadro 2). Estes meios são utilizados em sua formulação original ou modificados.

Pelos quadros 1 e 2, pode-se observar grande variabilidade das concentrações dos macros e micronutrientes utilizados, variando as formulações e suas concentrações, assim como para a fonte de C, vitaminas, substâncias orgânicas e complexas, tais como água de coco, banana, que não apresentam composição definida, também podendo encerrar diferentes reguladores de crescimento. Portanto, não se tem definido um meio de cultura que atenda, em condições ótimas, as necessidades nutricionais de forma geral para a maioria das espécies de orquídeas.

Fontes de C são adicionadas ao meio de cultura, com vistas a fornecer energia metabólica e esqueletos carbônicos para a síntese de compostos orgânicos, além de apresentar suma importância nos processos de divisão e diferenciação celular, necessários para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Caldas et al, 1998; Vaz et al, 1998). Segundo Rego-Oliveira (2003), a sacarose é o carboidrato mais utilizado em meios de cultura, visando à propagação *in vitro* de plantas ornamentais. Na propagação *in vitro* de orquídeas, porém, outras fontes têm sido utilizadas com menor frequência como a glicose, frutose, maltose, entre outras.

De acordo com os quadros, se tem utilizado sacarose, na grande maioria dos trabalhos revisados, variando sua concentração de 0,5 a 30,0 g L⁻¹. Apenas no meio de cultura de Curtis (1936) e WeS (Woter e Skoog, 1966), a sacarose foi substituída por glicose (10,0 g L⁻¹).

Quadro 1- Constituição química original das principais formulações utilizadas para germinação e cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*^(*).

Formulações	KC	VW	Heller	MS	LS	RM	Champ.	Lind.	Ball
Macro nutrientes	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃		500		1650	1650		1000		
(NH ₄) ₂ SO ₄	500					400		1000	
CaCl ₂ .2H ₂ O			75	440	440	-			75
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1000					1000	500	500	
Ca ₃ (PO ₄) ₂		200							
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	250	250	370	370	400	125	120	250
KNO ₃		525		1900	1900				
KCl			750			500	1000	1050	750
KH ₂ PO ₄	250	250		170	170	250	125	135	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O			125						125
NaNO ₃			600						600
Micro nutrientes	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
H ₃ BO ₃			1,0	6,2	6,2	0,03		1,014	1,0
CoCl ₂ .6H ₂ O				0,025	0,025				
CuSO ₄ .5H ₂ O			0,030	0,025	0,025	0,001	0,030	0,019	0,03
MnSO ₄ .H ₂ O						7,5			
MnSO ₄ .4H ₂ O	7,5	7,5	0,100	22,3	22,3		0,010	0,068	0,01
KI			0,010	0,83	0,83		0,010	0,099	0,01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O				0,25	0,25				
ZnSO ₄ .4H ₂ O				8,6					
ZnSO ₄ .7H ₂ O			1,0		9,0	0,03	1,0	0,565	1,0
AlCl ₃			0,030				0,030	0,031	0,03
NiCl ₂			0,030					0,017	
NiCl ₂ .6H ₂ O									0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O							0,030		
FeCl ₃ .6 H ₂ O			1,0				1,0		1,0
Na ₂ .EDTA				37,3	37,3	22,4			
FeSO ₄ .7H ₂ O	25			27,8	27,8				
FeC ₆ H ₅ O ₇ .3H ₂ O								5,4	
Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃		28							
Fe ₂ (SO ₄) ₃						10,67			
Adit. orgânicos	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹
Sacarose	20	20	30	30	30	15-30	20	0,5	30
Aminoácidos	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Glicina				2,0		2,0			
Edamina				1000					
Myo-inositol				100	100				
Fitorreguladores	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
ANA						1,75		1,0	
AIA				1-30	2				
IBA						1,75			
2,4-D									1,0
BAP									0,500

Continua

Quadro 1- Continuação.

Formulações	KC	VW	Heller	MS	LS	RM	Champ.	Lind.	Ball
Vitaminas	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Niacina				0,5		0,5			
Piridoxina				0,5		0,5			
Tiamina				0,1	0,4	0,1			1,0
Ác.cítrico						150,1			
Adit. Complexos		mL L ⁻¹						mL L ⁻¹	
Água de coco		150						150	
Solidificante	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹
Ágar	12-15			10	10		8		10

* FONTE: Arditti e Ernest (1993)

Formulações: KC = Knudson (1946); VW = Vacin e Went (1949); Heller = Heller (1953); MS = Murashige e Skoog, (1962); LS = Linsmaier e Skoog (1965); RM = Reinert e Mohr (1967); Champ. = Champagnat *et al.* (1970); Lind = Lindemann *et al.* (1970); e Ball (Ball *et al.*, 1971).

Quadro 2- Constituição química original das principais formulações utilizadas para germinação e cultivo *in vitro* de orquídeas de outros gêneros^(*).

Formulações	Curtis	White	WeS	Gamb	Nitsch	Norstog	Mitra	Harvais	VeD
Macro nutrientes	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	220		4800		720			400	370
(NH ₄) ₂ SO ₄				134			100		60
CaCl ₂ .2H ₂ O				150	219,9	740			
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	350	300	613				200	400	
MgSO ₄ .7H ₂ O	260	750	1550	500	185	740	250	200	101
KNO ₃		80	170	3000	950		180	200	400
KCl		65	142			750		100	
KH ₂ PO ₄	120				68	910		200	383
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		19	400	150			150		
Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O			1388						
Na ₂ SO ₄		200							
Micro nutrientes	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
H ₃ BO ₃	6,2		3,2	3,0	10	0,5	0,6	0,5	10
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025			0,025		0,025	0,04088		
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O								0,025	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025			0,025	0,025	0,025	0,050	0,5	0,025
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3		9,0	10	25	3,0		2,03	25
MnCl ₂ .2H ₂ O							0,400		
KI	0,83		1,6	0,750			0,030	0,1	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25			0,250	0,250	0,025	0,050	0,02	0,250
ZnSO ₄ .4H ₂ O			3,2						
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,0			2,0	10	0,5	0,050	0,5	10
ZnCl ₂	3,93								
AlCl ₃	0,3								
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,03								
FeCl ₃ .6 H ₂ O	1,0								
Na ₂ .EDTA			5,5		37,3		22,3		37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,53				27,8		16,7		27,8
Fe-citrato						10,0		25	
FeDTPA				28					
Adit. orgânicos	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹
Glicose	10		10						
Sacarose				20		10			20
Dextrose								10	
Ác. Málico						1,0			
Myo-inositol	0,0001		0,100	0,100		0,050			0,100
Aminoácidos	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
L-alanina						50			
L-arginina						10			
L-cisteína						20			
L-glutamina						400			
L-leucina						10			
L-fenilalanina						10			
L- tirosina						10			
Glicina		3,0							

Continua

Quadro 2- Continuação

Formulações	Curtis	White	WeS	Gamb	Nitsch	Norstog	Mitra	Harvais	VeD
Fitorreguladores	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
ANA	0,1								
Kinetina	1,0								
2,4-D				2,0					
BAP	1,0								
6-dimetil-aminopu.	0,25								
Zeatina	0,25								
Wuchstoff 66f	0,1 ml L ⁻¹								
Vitaminas	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Niacina	1,0	0,500		1,0	5,0				5,0
Piridoxina	1,0	0,100		1,0	0,500	0,25			0,500
Tiamina	1,0	0,100	0,1	10	0,500	0,25			0,500
Biotina	1,0				0,050				0,050
Ca pantotenato	1,0					0,25			
Ác. Fólico	1,0				0,500				0,500
Caseína								5000	
Adit. Complexos									
Água de coco	50 mL L ⁻¹								
Banana (homog.)	75 g L ⁻¹								
Extrato de malte								1,0 g L ⁻¹	
Solidificante	g L ⁻¹					g L ⁻¹		g L ⁻¹	g L ⁻¹
Ágar	14					6		10	6,0
Carvão	2 g L ⁻¹								

* FONTE: Arditti e Ernest (1993); George (1993)

Formulações: Curtis (1936); White (1963); WeS = Woter e Skoog (1966); Gamb. = Gambor B5 (1968); Nitsch (1969); Norstog (1973); Mitra (1976); Harvais. (1982); e VeD = Van Waes e Deberg (1986).

Preferencialmente, têm-se utilizado o meio inicial e de manutenção, ambos no estado líquido, para formação de protocormóides. Para a transformação destes em plântulas, têm-se empregado o meio sólido (Pierik, 1990). O meio de cultura, no estado sólido, também tem sido preferencialmente utilizado para o processo de enraizamento, com a concentração de ágar variando de 6,0 a 17,5 g L⁻¹, dependendo de sua qualidade, sendo a concentração mais utilizada 8,0 g L⁻¹.

Diversos trabalhos relatam a absorção de nutrientes e o crescimento *in vitro* e *ex vitro* de várias espécies de orquídeas cultivadas em diferentes soluções, meios de cultura, compostos e fertilizantes.

Yoneda et al. (1999) estudaram o efeito das concentrações de macronutrientes no crescimento, florescimento e absorção de nutrientes. Utilizaram plântulas do híbrido de *Odontoglossum* cultivadas em 'sphagnum', no qual a concentração de N (0,0; 55; 110 e 220 mg L⁻¹), P (0,0; 15,5; 31,0 e 62,0 mg L⁻¹) e K (0,0; 195,5; 391,0 e 782,0 mg L⁻¹) variava independentemente na irrigação. Os autores observaram que o número e a área foliar não variaram significativamente entre tratamentos, entretanto a cor da folha se tornou mais clara com o decréscimo de N, assim como o diâmetro de bulbo e número de raízes também se apresentaram menores neste tratamento. Menores concentrações de N, no "sphagnum" resultaram, também, em atraso no florescimento e proporcionaram hastes mais curtas, finas e portadoras de menor número de flores. Estas eram de menor tamanho em presença de menores concentrações de K.

Sharma et al. (1992) investigaram o efeito de diferentes fontes de N, na resposta morfogênica de ápices caulinares de *Dendrobium wardianum* Warner, cultivados no meio MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionando-se nitrato de cálcio, sulfato de amônio, uréia e aminoácidos (alanina, glutamina, glicina, leucina e serina) nas seguintes concentrações: 0,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹. Foram observadas diversas respostas. Nitrato de cálcio e uréia (2,5 mg L⁻¹) promoveram a multiplicação direta de brotações, formando protocormóides que, após transferidos para o meio MS basal formaram raízes e plantas completas, as quais foram aclimatizadas em condições de casa de vegetação, obtendo-se uma taxa de sobrevivência de 65 %. Altas concentrações de nitrato de cálcio e uréia (5,0 mg L⁻¹) resultaram em dessecamento dos explantes. Explantes cultivados em meios com sulfato de amônio com alta concentração (5,0 mg L⁻¹), apresentaram pouca formação de protocormos. Muitos explantes, em concentrações elevadas dos nutrientes, tornaram-se oxidados e morreram. Adição de aminoácidos não mostrou individualmente resultado significativo.

Para o desenvolvimento de um meio de cultura para novas espécies, cultivares ou híbridos, o procedimento tem sido testar o balanço hormonal e alguns meios comerciais, sendo utilizados mais freqüentemente os minerais nutrientes de MS (Murashige e Skoog, 1962) com algumas adaptações, como metade de sua força ou algumas modificações nas concentrações de alguns minerais. Recentemente, diferentes estratégias têm sido utilizadas, adaptando-se a concentração dos minerais do meio de cultivo, de acordo com a análise dos elementos presentes nas plantas (Bouman et al., 2001) ou determinando o nível de absorção de componentes orgânicos e inorgânicos durante o cultivo (Kishi e Takagi, 1997). Entretanto, segundo estes mesmos autores, poucos estudos têm procurado investigar a absorção de nutrientes dos meios de cultura para orquídeas *in vitro* e a escolha dos macro e microelementos dos meios de cultura têm sido baseada em formulações comumente empregadas.

Bouman e Tiekstra (2001) compararam o crescimento de *Cymbidium* e *Gerbera* nos meios MS (Murashige e Skoog, 1962) e DKW (Driver et al., 1984) bem como nos meios adaptados CAM ou GAM, respectivamente para cada espécie. Para a constituição dos dois últimos meios de cultura (CAM e GAM), no referente à macronutrientes, os autores levaram em consideração análise química foliar de plantas adultas, e micronutrientes do meio de cultura de MS (Quadro 3). É importante salientar que para o cultivo de *Cymbidium*, os meios de cultura tiveram sua força reduzida à metade. O meio adaptado resultou em protocormos de *Cymbidium* com maiores valores de matéria fresca e melhor taxa de multiplicação da *Gerbera*, com plântulas maiores e de mais fácil separação entre elas. Análises dos meios de cultura adaptados não demonstraram exaustão de nenhum dos minerais, sendo que as comparações da concentração de minerais das plantas demonstraram que maior absorção de S, Mg, Ca e Fe, além das diferenças relativas nas concentrações dos nutrientes, podem explicar os melhores resultados com estes meios de cultura.

Quadro 3 – Concentração de macronutrientes dos meios utilizados para cultivo de *Gerbera* e *Cymbidium* em mol L⁻¹

Elementos	GAM	MS _{Gerbera}	DKW _{Gerbera}	CAM	½ MS _{Cymb}	½ DKW _{Cymb}
NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	6,0/32,0	20,0/40,0	17,0/33,0	11,6/18,4	10,0/20,0	8,5/16,5
PO ₄ ³⁻	1,7	1,25	1,95	1,6	0,61	0,98
K ⁺	11,9	20,0	18	10,0	10,0	9,0
Ca ²⁺	8,0	3,0	9,3	6,7	1,5	4,7
Mg ²⁺	2,5	1,5	3,0	2,8	0,75	1,5
SO ₄ ²⁻	2,5	1,5	12,0	7,5	0,75	6,0

Em quase a totalidade dos trabalhos revisados, utilizam-se como fonte de C exclusivamente a sacarose, variando sua concentração de 0,5 a 30 g L⁻¹. Concentração esta que tem dependido muito do tipo e idade do material vegetal utilizado. Por exemplo, os embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento requerem relativamente elevadas concentrações de sacarose, variando sua necessidade de acordo com seu desenvolvimento. Outras fontes de C podem ser testadas tais como glicose, galactose, maltose e frutose, visando à manutenção do potencial osmótico do meio de cultivo, uma vez que os açúcares apresentam maior influência sobre o potencial osmótico do meio de cultura. Quando o potencial osmótico se torna aproximadamente menor que -0,3 MP (= -3,0 bar), o crescimento e o processo organogênico são interrompidos, em consequência da impossibilidade de absorção de água pelos explantes (Pierik, 1990).

Kishi e Takagi (1997) analisaram, por meio de cromatografia líquida de alta resposta (HPLC), os componentes do meio de cultura Kishi e Takagi (1996), utilizando protocormos de *Dendrobium moniliforme* e *Darwinara* Pretty Girl. Amostras do meio foram analisadas antes da autoclavagem e um mês após o início do cultivo, submetendo-o à análise dos íons inorgânicos, açúcar, pH e pressão osmótica. Observaram diferentes requerimentos nutricionais dos protocormos *in vitro* entre as duas espécies, com diferenças nos valores de absorção de NH₄⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, NO₃⁻, H₂PO₄⁻, glicose, frutose, sorbitol e manitol. Resultando também diferença na matéria seca entre as orquídeas, provavelmente devido às diferenças de genótipo e parcialmente diferenças nos métodos de micropropagação e meios de pré-cultivo utilizados anteriormente. Índícios do período de subcultivos foram observados pelos autores, ao determinarem a análise da exaustão dos íons inorgânicos que poderiam se tornar limitantes para o crescimento e desenvolvimento dos explantes.

As orquídeas simpodiais (*Cattleya*, *Cymbidium*) e monopodiais (*Phalaenopsis*) diferem em seus requerimentos nutricionais devidos, provavelmente, a diferenças nos seus sistemas radiculares (Warnakraioj e Tanyasonti 1996). Estes autores relatam o requerimento de micronutrientes e pH para micropropagação de orquídeas monopodiais, utilizando três espécies, *Ascocentrum ampullaceum* (Roxb.) Schltr., *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. e *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. Plantas das referidas espécies foram cultivadas em meio WS (Warnakraioj, 1992) que é composto pelos macronutrientes do meio de cultivo Vacin e Went (1949) e micronutrientes do meio de Murashige e Skoog (1962), contendo ainda 15 % de água de coco. O pH experimental variou de 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0. Os elementos Fe e Mn foram testados em conjunto nas concentrações de 25; 50; 75; e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os demais micronutrientes foram determinados individualmente, testados nas seguintes concentrações: B (0,0; 25; 50 e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$); Zn (0,0; 7,5; 15,0 e 22,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$); Cu (0,0; 0,025; 0,050 e 0,075 $\mu\text{mol L}^{-1}$); Mo (0,0; 0,25; 0,50 e 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$); Co (0,0 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$); e I (0,0 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os melhores resultados de multiplicação dos protocormos ocorreram no meio de cultura contendo 25-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, 25-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Mn e 0,075 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Co, com pH variando de 4,5 a 5,0. Os demais micronutrientes não demonstraram afetar o crescimento e desenvolvimento dos explantes.

Tanaka et al. (1988) relataram o efeito da concentração de solução nutritiva, ao utilizarem quatro concentrações e cinco tipos distintos de substratos no crescimento em vaso de um híbrido de *Cattleya* (*C. Ray Park* x *Laeliocattleya*. Dakland 'Maria', AM/AOS), e na composição química da planta, posteriormente ao cultivo.

Primeiramente, plantas de *Cattleya* com matéria fresca de aproximadamente 27,8 g, foram transplantadas para vasos de 12 cm de diâmetro de boca, enchidos com o substrato pedra-pome (Bora). As plantas passaram a receber adubação de cobertura com 20 mL de solução nutritiva por vaso, a partir de um mês após o transplântio, durante oito meses. A solução nutriente padrão (ST) era composta de N, P, K, Ca e Mg nas concentrações de 231; 46,5; 117,3; 80,1 e 12,2 mg L^{-1} respectivamente. Os quatro tratamentos constituíram de 1/3 de ST, 2/3 de ST, ST e 4/3 de ST. Ca e Mg e micronutrientes foram incluídos na mesma concentração em todos os tratamentos. Como resultado, o aumento da produção de matéria fresca foi maior em plantas que receberam a solução padrão (ST). O crescimento de raízes das plantas que receberam a maior concentração (4/3 de ST) foi ligeiramente inferior às plantas que receberam 1 ST.

As concentrações de N, P e K nas folhas aumentaram com o aumento da concentração da solução nutriente.

Para o experimento com substratos, as plantas de *Cattleya* com aproximadamente 27,7 g de matéria fresca, foram envasadas na mesma época, em vasos de polietileno de 12 cm de diâmetro de boca. Cinco tipos de substratos foram utilizados: a mistura de pedra-pome (Bora) e turfa nas proporções de 3:1; 2:1 e 1:1; casca de cicuta (decomposta); e 'sphagnum'. Os vasos receberam semanalmente 30 mL da solução padrão com 1/3 de sua concentração. Os autores observaram que plantas crescidas em pedra-pome e turfa (1:1) apresentaram melhor crescimento. As concentrações de N, P, K, Ca e Mg nas folhas foram respectivamente, 1,20; 0,17; 1,86; 1,14 e 0,92 % em peso seco. A taxa de crescimento em matéria fresca e crescimento de raízes das plantas em 'sphagnum' e cicuta foram inferiores ao crescimento de plantas crescidas em pedra-pome e turfa (1:1). A concentração de Mg nas folhas de plantas crescidas em 'sphagnum' e cicuta foi 0,57 e 0,50 dag/Kg, respectivamente. Este valor de Mg aparentou ser baixo em comparação àqueles obtido em folhas de plantas crescidas em pedra-pome e turfa (1:1).

Outro estudo realizado por Tanaka et al. (1989) comparou o crescimento e absorção de nutrientes de um híbrido de *Cattleya* (*Laeliocattleya*. Pacif South x *Brassocattleya*. Deesse), crescendo em diferentes substratos ('sphagnum', pedra-pome em mistura com turfa (1:1) e casca de cicuta), adubados com os seguintes fertilizantes: torta de mamona e farinha de osso (1:1, v/v), ou solução padrão a 1/3, 2/3, 3/3 e 4/3 de sua concentração. Como resultados, verificaram que as plantas apresentaram bom crescimento, quando cultivadas pela prática usual, isto é, crescidas em 'sphagnum' com três aplicações de 2,5 g de torta de mamona e farinha de osso (1:1, v/v), totalizando 376,5 mg de N. As taxas de absorção de N, P, K, Ca e Mg foram 19,3; 2,7; 149,7; 16,5; e 85,2 %, respectivamente. As plantas crescidas em pedra-pome e turfa (1:1, v/v) e três aplicações de 2,5 g de torta de mamona e farinha de osso (376,5 mg de N) também apresentaram bons resultados de crescimento. Em relação à solução nutriente padrão (ST), a concentração de N, P, K, Ca, e Mg foram as mesmas descritas no trabalho anterior. Tanaka et al. observaram que as plantas crescidas em pedra-pome e turfa que recebiam 20 mL de solução padrão semanalmente (184,4 mg N), igualaram-se àquelas da prática usual. As taxas de absorção de N e P foram 45,9 e 39,8 %, respectivamente. As proporções de K, Ca e Mg foram 226; 208,8 e 804,3 %, respectivamente. As concentrações de K, Ca e Mg da solução nutriente padrão (1 ST) utilizadas mostraram-

se baixas para o crescimento de *Cattleya*, quando comparadas àquelas de N e P. A concentração de 1/3 de ST foi inadequada para o crescimento. As plantas crescidas em casca de cicuta, adubada semanalmente com 20 mL de ST (184,4 mg N), igualaram-se àquelas da prática usual. A taxa de absorção dos cinco elementos foi similar àquela das plantas crescidas em pedra-pome e turfa e tratadas com ST. Em relação à adubação com torta de mamona e farinha de ossos, 43 % do K presente na planta inteira foram encontrados no bulbo dianteiro (folhas novas e novo pseudobulbo), sugerindo que a adubação com apenas estes componentes parece inadequada para o crescimento ideal de plantas do híbrido de *Cattleya*, visto que a mistura contém baixa porcentagem de K (Tanaka *et al.*, 1989).

Com base na literatura revisada, o requerimento nutricional de orquídeas tem sido intensivamente estudado, vista a ampla distribuição destas plantas pelo mundo, com muitos exemplares de elevado interesse comercial. Apesar disso, há ainda grupos de orquídeas cuja demanda nutricional são desconhecidas, tanto nas condições de seu habitat, como *in vitro*. Exemplos dessas orquídeas são as espécies rupícolas ou litofíticas que são encontradas no Brasil em lugares rochosos de 800 a 1.500 m de altitude (Stancato e Faria, 1996).

Além do aspecto nutricional, outros fatores relevantes para a propagação *in vitro* são as modificações nas condições ambientais reinantes na sala de cultivo do laboratório e, mais específicos, no ambiente interno dos frascos de cultivo, tais como luz, temperatura, umidade relativa do ar, meio de cultura e gases, como etileno e CO₂, visando aumentar a capacidade fotossintética das vitroplantas e que, em última análise irá favorecer o êxito da fase de aclimatização destas vitroplantas (Gouk *et al.*, 1999).

Recentes pesquisas têm demonstrado os efeitos positivos para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de várias espécies, por meio da redução das concentrações de sacarose nos meios de cultura, do aumento das concentrações internas de CO₂ ou do aumento da irradiância (Kozai *et al.*, 1990; Kozai, 1991; Hider e Desjardins, 1994; Kozai e Kubota, 2001; Mosaleeyanon *et al.*, 2004).

Entretanto, é limitado o conhecimento sobre os efeitos do enriquecimento com CO₂ na suscetibilidade à luz em vitroplantas, particularmente em plântulas de orquídeas. Além do mais, a absorção excessiva de luz pelas folhas, no ambiente *in vitro*, pode causar distúrbios fisiológicos que, por sua vez, podem limitar o crescimento e a reprodução das plantas (Gouk *et al.*, 1999; Taiz e Zeiger, 2004).

Uma iluminação de alta intensidade sobre os tecidos fotossintetizantes resulta em uma série de reações de estresse, conhecidas como fotoinibição. Segundo Baker et al. (1994), Choudhury e Behera (2001) e Štroch et al. (2004), a fotoinibição é a incapacidade dos tecidos fotossintetizantes em dissipar o excesso de energia radiante. Nas plantas, o dano fotoinibitório pode ser verificado por meio da redução do rendimento quântico, redução da capacidade de fixar CO₂, alterações nas características da fluorescência e do transporte de elétrons entre os fotossistemas.

Uma forma eficiente de monitorar danos fotooxidativos causados pelo estresse tem sido o uso de medidas da fluorescência da clorofila *a*, associada ao fotossistema II (PS II) (Bolhàr-Nordenkamp e Öquist, 1993; Newton e McBeath et al., 1996). Dentre as variáveis de fluorescência, a relação F_v/F_m (fluorescência variável/fluorescência máxima) que representa a eficiência quântica potencial do fotossistema II, é um indicador sensível do desempenho fotossintético de plantas (Björkman e Demming, 1987). Alguns trabalhos relatam a utilização dessa relação (Kadleček et al., 2001; Alexandre, 2002; Kadleček et al., 2003; Fuentes et al., 2005, Alexandre, 2006), como forma de avaliar o dano fotooxidativo em explantes cultivados *in vitro*.

A maioria dos trabalhos sobre ambiência do cultivo de orquídeas é referentes aos aspectos *ex vitro*. Chen e Wang (1996) estudaram as irradiâncias fotossinteticamente ativas para o cultivo *ex vitro* do gênero *Phalaenopsis*; He et al. (1998) relataram a suscetibilidade de folhas e flores de *Dendrobium Sonia* às altas intensidades de luz e temperatura em condições naturais; Gouk et al. (1999) estudaram as mudanças da capacidade fotossintética e da produção de carboidratos em plântulas cultivadas *in vitro* de orquídeas epífitas CAM (*Arachnis hookeriana* x *Ascocenda Madame Kenny*) expostas à elevada concentração de CO₂; Stancato et al. (2002) pesquisaram o efeito do estresse luminoso sobre o crescimento *ex vitro* de *Cattleya forbesii* x *Lc. tenebrosa* em ambientes sombreados e sob alta irradiância; e Lin e Hsu (2004) demonstraram a plasticidade fotossintética de *Phalaenopsis amabilis* crescidas em diferentes irradiâncias, também em condições *ex vitro*.

Não há trabalhos específicos sobre níveis de radiação para o cultivo *in vitro* que seriam realmente eficientes para elevar as taxas fotossintéticas, resultando em maior crescimento para as vitroplantas, sobretudo, para o cultivo de orquídeas do grupo *Cattleya*.

Assim, com base no exposto, verifica-se ser escassos, ou não difundidos para a comunidade científica, os conhecimentos básicos de propagação *in vitro* de orquídeas,

desde os procedimentos de germinação à aclimatização. De forma geral, os trabalhos realizados não têm levado em consideração a questão fundamental dos aspectos nutricionais e metabólicos para a maioria das espécies; questões estas importantes para o desenvolvimento de técnicas, visando à propagação rápida e massal de orquídeas. Além do mais, neste contexto, não se encontram trabalhos revisando exclusivamente as espécies de orquídeas do grupo *Cattleya*, importantes espécies do nosso país, com grande potencial de exploração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELBERG, J.W.; DESAMERO, N.V.; HALE, S.A.; YOUNG, E. Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on liquid/membrane system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 48:1-7, 1997.
- ALEXANDRE, R.S. Germinação de sementes e fatores de estresse na propagação *in vivo* e *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2006. 166 p. (Tese de Doutorado)
- ALEXANDRE, R.S. Germinação *in vitro* e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2002. 103p. (Tese de Mestrado)
- ARDITTI, J.; MICHAUD, J.D.; OLIVA, A.P. Seed germination of north american orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia*, and *Plantanthera*. *Bot. Gaz.*, 142(4):442-453, 1981.
- ARDITTI, J e ERNST, R. Micropropagation of orchids. 1^a ed. New York, Chinchester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley e Sons, Inc., 1992. 682p.
- ARNAUD, M.St.; LAUZER, D.; BARABÉ, D. *In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 7:22-27, 1992.
- BAKER, N.R.; FARAGE, P.K.; STIRLING, C.M.; LONG, S.P. Photoinhibition of crop photosynthesis in the field at low temperature. In: BAKER, N.R.; BOWER, J.R. Photoinhibition of Photosynthesis – from molecular mechanisms to the field. 1994. p.349-364.
- BAÑERAS, J.C. Tecnologia em floricultura tropical. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.*, 3:5-9, 1997.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMING, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:489-504, 1987.
- BLACK, P.McK. Orquídeas. 1a ed. Hamlyn Publishing Group Limited. Tradução Maria Adelaide Freitas Soares. Livro Técnico S/A. Rio de Janeiro. 1973. 128p.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, R.H.; LONG, S.P. (eds). Photosynthesis and production in a changing environmental, Chapman & Hall, London, 1993, p.193-206.

- BOUMAN, H.; MORRIS, B.; TIEKSTRA, A. Development of new tissue culture media, using the relation between mineral composition of plant and medium. *Acta Hort.*, 560:373-376, 2001.
- BOUMAN, H.; TIEKSTRA, A. Mineral nutrition in tissue culture: influence on propagation and quality of the plantlets. *Plant nutrition: food security and sustainability of agro ecosystems through basic and applied research. Fourteenth International Plant Nutrition Colloquium, Hannover, Germany*, 316-317, 2001.
- BUZARBARUA, A. Effect of auxins and kinetin on germination of *Cymbidium aloifolium* SW, seeds. *Indian J. Plant Physiol.*, 4:46-48, 1999.
- 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 Plantas Ornamentais, 2001, p.13
- CARVALHO, V.S. Morfogênese *in vitro* em orquídeas do grupo *Cattleya*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2002. 164p. (Tese de Mestrado)
- CASTRO, C.E.F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.*, 4:1-46, 1998
- CHEN, W.H.; WANG, Y.T. *Phalaenopsis* orchid culture. *Taiwan Sugar*, 43:11-16, 1996.
- CHOUDHURY, N.K.; BEHERA, R.K. Photoinhibition of photosynthesis. Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica*, 39:481-488, 2001.
- CORRIE, S.; TANDON, P. Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. through high frequency conversion of encapsulated protocorms under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Indian J. Experimen. Biol.*, 31:61-64, 1993.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. 1º ed. New York, Columbia University Press, 1981. 1262p.
- DATTA, K.B.; KANJILAL, B.; SARKER, D.De; Artificial seed technology: development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr. - an endangered orchid. *Current Science*, 76:1142-1145, 1999.
- DRESSLER, R.L. *Phylogeny and classification of the Orchid family*. 1a ed. Portland, Oregon. Dioscorides Press, 1993. 314p.

- EIGELDINGER, O. e MURPHY, L.S. *Cattleya*. In: _____ Orchids – A complete guide to cultivation. 1a ed. London, John Gifford Ltda, 1972. p.154-167.
- FARIAS, L.A. e RIBEIRO, R. Pôster Apresenta orquídeas na Mata Atlântica. Revista O Mundo das Orquídeas, 13:43-45. 2000.
- FUENTES, G.; TALAVERA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J.M. High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grow coconut plantlets. *Biologia Plantarum*, 49:7-15, 2005.
- GEORGE, E.F. Components of culture media. In: _____. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology. 2a ed. Basingstoke, Exegetics Limited, 1993. p.338-343.
- GLOEDEN, H. A Jóia da Bruxa e outras histórias de orquídeas e orquidófilos. 1ª ed. São Paulo, SP, Ativa, 1998. 170p.
- GOUK, S.S.; HE, J.; HEW, C.S. Changes in photosynthetic capability and carbohydrate production in an epiphytic CAM orchid plantlet exposed to super-elevated CO₂. *Environ. Exp. Bot.*, 41:219-230, 1999.
- HANDIQUE, A.K.; TALUKDAR, A. Phytohormone induced variation in *in vitro* seed culture of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.). *J. Phytol. Res.*, 11:19-22, 1998.
- HARVAIS, G.; HADLEY, G. The development of orchis *Purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytology*, 66:217-230, 1967.
- HE, J.; KHOO, G.H.; HEW, C.S. Susceptibility of CAM *Dendrobium* leaves and flowers to high light and high temperature under natural tropical conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 40:255-264, 1998.
- HEW, S.; KHOO, S.I. Photosynthesis of Young orchid seedlings. *New Phytol.*, 86:349-357, 1980.
- HIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* culture strawberry plantlets. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.*, 36:27-33, 1994.
- HINNEN, M.G.J.; PIERIK, R.L.M.; BRONSEMA, F.B.F. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro*. *Sci. Hortic.*, 41:105-116, 1989.
- KADLEČEK, P.; RANK, B.; TICHÁ, I. Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* grown plantlets. *J. Plant Physiol.*, 160:1017-1024, 2003.

- KADLEČEK, P.; TICHÁ, I.; HASEL, D. ČAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Sci.*, 161:695-701, 2001.
- KALITA, M.; SARMA, C.M. Selection of suitable medium for *in vitro* germination and protocorm formation of *Acampe longifolia* Lindl. *Advances in Plant Sci.*, 14:243-248, 2001.
- KÄMPF, A.N. A floricultura brasileira em números. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.*, 3:1-7, 1997.
- KISHI, F.; TAKAGI, K. Analysis of medium components used for orchid tissue culture. *Lindleyana*, 12:158-161, 1997.
- KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.*, 22:205-211, 1990.
- KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.), *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer, Dordrecht, p. 447-469, 1991.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *J. Plant Res.* 114:525-537, 2001
- KUMARIA, S.; CHRUNGOO, N.K.; TANDON, P. Activities of some oxidative enzymes in axenic cultures of protocorms of *Cymbidium giganteum* Wall. as influenced by different growth regulators. *J. Orchid Soc. India*, 4:37-44, 1990.
- KUMARIA, S.; TANDON, P. Asymbiotic germination of *Dendrobium fimbriatum* var. *oculatum* Hk. f. seeds on different media. *Proceedings India of the National Sciences Academy*, 57:277-279, 1991.
- KUMARIA, S.; TANDON, P. Orchids: the world's most wondrous plants. In: PATHAK, P.; SEHGAL, R.N.; SHEKHAR, N.; SHARMA, M.; SOOD, A. *Orchids: science and commerce*. 1^a ed. India, Bishen Singh Mahendra Pal Singh, 2001. p.17-28.
- LAUZER, D.; ARNAUD, M.St.; BARABÉ, D. Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 9:197-204, 1994.
- LEROUX, G.; BARABÉ, D.; VIETH, J. Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* Aiton (Orchidaceae). *Plant Systematics Evolution*, 205: 53-72, 1997.

- LIN, M.J.; HSU, B.D. Photosynthetic plasticity of *Phalaenopsis* in response to different light environments. *J. Plant Physiol.*, 161:1259-1268, 2004.
- MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.A.; DONATO, V.M.T.S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 36:1319-1324, 2001.
- MENEZES, L.C. *Cattleya labiata* Lindley. Orquídeas brasileiras. 1a ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 1987. 112 p.
- MENEZES, L.C. *Laelia purpurata*. 1ª ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura. 1995. 143p.
- MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. *Sci. Hortic.*, 103:51-63, 2004.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-497, 1962.
- NAYAK, N.R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S.P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium alaifolium* (L.) Sw and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Sci. Hortic.*, 94:107-116, 2002.
- NEALES, T.F.; HEW, C.S. Two types of carbon fixation in tropical orchids. *Planta*, 123:303-306, 1975.
- NEWTON, A.C.; McBEATH, C. The impact of desiccation on chlorophyll fluorescence in detached leaves of six tropical tree species. *Photosynthetica*, 32(4):491-501, 1996
- ODDIE, R.L.A.; DIXON, K.W.; McCOMB, J.A. Influence of substrate on asymbiotic and symbiotic *in vitro* germination and seedling growth of two Australian terrestrial orchids. *Lindleyana*, 9:183-189, 1994.
- PAUW, M.A.; REMPHREY, W.R. *In vitro* germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media, and cold treatment. *Can. J. Bot.*, 71:879-885, 1993.
- PAUW, M.A.; REMPHREY, W.R.; PALMER, C.E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. *Annals of Botany*, 75:267-275, 1995.
- PIERIK, R.L.M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3a ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

- RODRIGUES, D.T. Nutrição e fertilização de orquídeas *in vitro* e em vasos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005.87p. (Tese de Mestrado).
- SHARMA, A.; TANDON, P. KUMAR, A. Regeneration of *Dendrobium wardianum* Warner (Orchidaceae) from synthetic seeds. Indian Journal of Experimental Biology, 30:747-748, 1992.
- SHEEHAN, T.J. Orchids. In: Larson, R.A., ed. Introduction to floriculture. 2a ed. San Diego, Academic Press, 1992. p.13-142.
- STANCATO, G.C.; FARIA, R.T. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae) I: effects of macro and microelements. Lindleyana, 11:41-43, 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. Rev. Bras. Hortic. Ornam., 7:25-33, 2001.
- STANCATO, G.C.; MAZZAFERA, P.; BUCKERIDGE, M. Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. x *Laelia tenebrosa* Rolfe. Rev. Bras. Bot., 25:229-235, 2002.
- STENBERG, M.L.; KANE, M.E. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, and endangered Florida orchid. Lindleyana, 13:101-112, 1998.
- ŠTROCH, M.; ŠPUNDA, V.; KURASOVÁ, I. Nonradiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants. Photosynthetica, 42:323-337, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Trad. SANTARÉM, E.R.; MARIATH, J.E.; ASTARITA, L.V.; DILLENBURG, L.R.; ROSA, L.M.G.; OLIVEIRA, P.L. 3 ed., Porto Alegre. Artmed, 2004.
- TANAKA, T.; MATSUNO, T.; MASUDA, M.; GOMI, K. Effects of concentration of nutriente solution and potting media on growth and chemical composition of a *Cattleya* hybrid. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 57:85-90, 1988.
- TANAKA, T.; KANTO, Y.; MASUDA, M.; GOMI, K. Growth and nutrient uptake of a *Cattleya* hybrid grown with different composts and fertilizers. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 57:674-684, 1989.
- VENTURA, G.M. Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2002. 147p. (Tese de Mestrado)

- WAGNER, J.; HANSEL, A. *In vitro* seed germination of *Cypripedium calceolus* L. at various embryogenic stages. *Angewandte Botanik*, 68:5-9, 1994.
- WALT, V. Mercado das Flores – da estufa ao vaso, um longo caminho. *National Geographic*, Brasil, 1:96-113, 2001.
- WANNAKRAIROJ, S; TANYASONTI, P. Micronutrient and pH requirements for micropropagation of monopodial orchids. *Journal of the Orchid Society of India*, 10:13-17, 1996.
- YEW, C.K.; HEW, C. S. Orchid pseudobulbs – ‘false’ bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival. *Sci. Hortic.*, 83:165-172, 2000.
- YONEDA, K.; SUZUKI, N.; HASEGAWA, I. Effects of macroelement concentrations on growth, flowering, and nutrient absorption in *Odontoglossum* hybrid. *Sci. Hortic.*, 80:259-265, 1999.
- ZETTLER, L.W.; BARRINGTON, F.V.; McINNIS JR., T.M. Developmental morphology of *Spiranthes odorata* seedlings in symbiotic culture. *Lindleyana*, 10:211-216, 1995.

CARVÃO ATIVADO NA GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE ORQUÍDEAS *IN VITRO*

RESUMO

Nos últimos anos, aumentou-se, significativamente, o agronegócio de orquídeas como plantas ornamentais, sendo o cultivo *in vitro* uma técnica importante e bastante utilizada para a propagação destas plantas. Por isso, é necessário que se desenvolvam protocolos eficientes e economicamente viáveis para a produção massiva destas espécies, obtendo-se mudas de qualidade, em menor espaço de tempo possível. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a adição de carvão ativado em diferentes formulações químicas de meio de cultura para duas espécies de orquídeas do grupo *Cattleya*, testando essas formulações na germinação de sementes e no crescimento e desenvolvimento de protocormos. No primeiro experimento, avaliou-se a germinação de sementes de *Laelia purpurata* variedade carnea. As sementes foram desinfestadas e inoculadas em três meios de cultura: GB₅ (Gambor et al., 1968); MN (meio Knudson modificado segundo Novais e Rodrigues, 2004); e Peter's (meio composto dos sais nutrientes do adubo comercial Peter's), sem e com carvão ativado, formando o esquema fatorial 3 x 2. Observou-se que os meios GB₅ e Peter's apresentaram melhores respostas quando acrescidos com carvão ativado. No segundo experimento, testou-se o efeito de diferentes concentrações de carvão ativado no meio de cultura MN. Avaliou-se a germinação de sementes e o crescimento e desenvolvimento de protocormos de *Cattleya amethystoglossa*. Concluiu-se que o meio MN com adição de carvão ativado mostrou-se prejudicial à germinação e retardou o crescimento dos protocormos, independentemente da dose utilizada do carvão. No terceiro experimento, foi avaliada a germinação de sementes de *Laelia purpurata* variedade carnea cultivadas em meio de cultura GB₅ (Gambor et al, 1968), acrescido de carvão ativado de diferentes marcas. As marcas de carvão que proporcionaram as melhores respostas foram Ciba lavado, Ecibra, Ciba e Dinâmica, em relação à produção de matéria fresca dos protocormos formados; entretanto, a testemunha sem o uso de carvão obteve melhor resultado para porcentagem de protocormos verdes.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de orquídeas requer, para distintas espécies, meios de cultura específicos, de modo a proporcionar as melhores condições de crescimento. Assim, várias estratégias podem ser utilizadas para aumentar a eficiência e rapidez na produção, tais como adição de aminoácidos e vitaminas aos meios de cultivo, aditivos orgânicos (água de coco, banana, tomate, etc), carvão ativado e sais minerais diferentes (Arditti e Ernest, 1992).

O carvão ativado, adicionado ao meio de cultura, pode apresentar efeitos benéficos ou prejudiciais, tanto ao processo organogênico, como embriogênico. Os efeitos proporcionados pela adição do carvão podem ser atribuídos à formação de ambiente escuro no meio, à adsorção de algumas substâncias, que podem ser inibitórias ou não às plantas, como fenóis, etileno, reguladores de crescimento e outras substâncias orgânicas polares. Ainda, o carvão ativado pode liberar substâncias naturalmente presentes, ou, adsorvidas, por ele (Pan e Staden, 1998). Em geral, têm sido utilizados 2,0 g L⁻¹ desse material no meio para germinação e crescimento de algumas espécies de orquídeas, como testado por George e Ravinshanker (1997) e Faria et al. (2002).

Em ensaios preliminares deste trabalho, observaram-se problemas na germinação e no crescimento e desenvolvimento dos protocormos de orquídeas, quando se adicionou carvão ativado ao meio de cultivo. Ao processo de germinação, acompanhavam-se a turgescência e o esverdeamento das sementes e, tão logo se formavam os protocormos, estes se oxidavam e morriam.

Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito da adição de carvão ativado nos meios de cultura, visando à germinação de sementes *in vitro* e o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de protocormos de algumas espécies de orquídeas do grupo *Cattleya*, variando à formulação química do meio de cultura, alterando as doses e as marcas do carvão ativado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Germinação *in vitro* de sementes

2.1.1. Meios de cultura com distintas formulações químicas

Utilizaram-se sementes maduras, recém colhidas de *Laelia purpurata* var. carnea. A desinfestação e inoculação das sementes foram realizadas sob condições de câmara de fluxo laminar, na qual as sementes foram retiradas das cápsulas, pesadas (0,010 g) e colocadas em seringa descartável de 25 mL, para, em seguida, adicionarem-se 20 mL de álcool 70 % v/v por um min. Após esse tempo, com o emprego do êmbolo da seringa, foi descartado o álcool e succionado uma solução a 10 % de hipoclorito de sódio (0,6 % de cloro ativo), produto comercial da marca Globo[®], deixando imersas as sementes por 15 min sob agitação constante, posteriormente foram submetidas a enxaguadura com água desionizada e autoclavada. Posteriormente, as sementes estéreis foram transferidas para um béquer, com imediata adição de 20 mL de água desionizada e autoclavada, com agitação constante por meio de agitador magnético, a fim de manter as sementes em suspensão, quando se pipetam 200 µL, de forma que a suspensão contivesse entre 80 e 100 sementes, de acordo com o método utilizado por Stenberg & Kane (1998). A suspensão foi, então, inoculada nos frascos de vidro com capacidade de 320 cm³, diâmetro externo de 6,8 cm e interno de 6,5 cm, contendo 30 mL de meio de cultivo à temperatura ambiente. Estes foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]).

Os meios de cultura utilizados foram GB₅ basal (Gambor et al., 1968); MN (denominação dada ao meio de Knudson (1946) modificado por Novais e Rodrigues (2004)), com a seguinte constituição: 1,0 g L⁻¹ de Ca(NO₃)₂.4H₂O; 0,250 g L⁻¹ de MgSO₄; 0,5 g L⁻¹ de NH₄H₂PO₄.H₂O; 0,250 g L⁻¹ de K₂SO₄; 0,0075 g L⁻¹ de MnSO₄.H₂O; 0,025 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O; 0,0075 g L⁻¹ de H₃BO₃ e 0,0075 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; e o meio denominado de Peter's (constituído de 3,0 g L⁻¹ do adubo comercial Peter's 10-30-20, acrescido com 200 mL L⁻¹ de água de coco). A estes quatro meios de cultura, adicionaram-se 20 g L⁻¹ de sacarose e assim, testar 0,0 e 2 g L⁻¹ de carvão ativado, no esquema fatorial 3 x 2 (três formulações de meios de cultura sem ou com adição de carvão ativado). O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,7 ± 0,1,

antes da adição de 8,0 g L⁻¹ de ágar (Sigma[®], lote 83 H 0090). A esterilização do meio de cultura deu-se em autoclave a 121 °C, pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 min.

Os frascos contendo as sementes foram incubados na sala de cultivo sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiância média de 34,15 μmol m⁻² s⁻¹.

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições.

Após cinco meses de cultivo *in vitro*, avaliaram-se a produção de matéria fresca, número total de protocormos, número de protocormos verdes e estágio de desenvolvimento destes.

2.1.2. Meios de cultura com adição de diferentes concentrações de carvão ativado

O experimento foi realizado com sementes maduras, recém colhidas de *Cattleya amethystoglossa*.

A desinfestação e inoculação das sementes foram realizadas, como descrito no item anterior.

O meio de cultura empregado foi o de Knudson (1946) modificado, segundo Novais e Rodrigues (2004), com adição de 20 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio de cultivo foi ajustado em 5,7 ± 0,1, antes da adição de 8,0 g L⁻¹ de ágar (Sigma[®], lote 83 H 0090). O tratamento constituiu das diferentes concentrações de carvão ativado, sendo estas de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L⁻¹.

Alíquotas de 30 mL dos meios de cultura foram distribuídos em frascos, cujas características já foram descritas anteriormente, previamente esterilizados. Os explantes foram mantidos sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiância média de 34,15 μmol m⁻² s⁻¹.

O experimento foi montado em dois sistemas (dois tipos de explantes) e cinco concentrações de carvão ativado, no delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições. Para o teste de germinação, inocularam-se entre 80 a 100 sementes por frasco.

Avaliou-se a porcentagem de germinação das sementes durante um mês de cultivo.

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão. Os modelos foram escolhidos baseados no nível de significância dos β 's, utilizando o teste 't', adotando-se o nível de até 10 % de probabilidade. Além disso, considerou-se o valor do coeficiente de determinação ($R^2 = \text{SQ Regressão} / \text{SQ Tratamento}$) e a consistência do modelo de acordo com o comportamento esperado para o fenômeno biológico.

2.2. Crescimento e desenvolvimento *in vitro* de protocormos

Para o experimento de crescimento e desenvolvimento *in vitro* de protocormos, foram utilizados protocormos de *Cattleya amethystoglossa* com três meses de idade, germinados e crescidos *in vitro* no meio GB₅ (Gambor et al., 1968), sendo transferidos, posteriormente, para o meio de cultura MN com os respectivos tratamentos.

O meio de cultura empregado é o de Knudson (1946), modificado por Novais e Rodrigues (2004), denominado de meio MN, preparado e distribuído da mesma forma como descrito no item 2.1.1, empregando-se o mesmo tipo de frasco e volume de alíquota do meio. Os tratamentos constituíram-se de cinco concentrações de carvão ativado (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L⁻¹), sendo realizado o experimento no delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições, cada uma com cinco protocormos por frasco.

Após cinco meses de cultivo, foram avaliados a produção de matéria fresca dos explantes número e comprimento de folhas e de raízes.

Os dados foram submetidos à análise de regressão, utilizando o teste 't', ao nível de 5 %.

2.2.1. Adição de carvão ativado de diferentes marcas

Para este experimento utilizaram-se sementes maduras, recém colhidas de *Laelia purpurata* var. *carnea*.

A desinfestação e inoculação das sementes foram realizadas da mesma forma como descrito no experimento 2.1.1.

O meio de cultura utilizado foi o GB₅ (Gambor et al., 1968), acrescido de 2 g L⁻¹ de carvão ativado, das seguintes marcas: Ecibra (lote 15.398), Ciba (normal e lavado, lote 9.774), Purex (lote 10.0762), Dinâmica (lote 5.624), Nuclear (lote 98.101.689), Synth (lote 35.908), Merck (normal e lavado, lote 229K 180.901.86). O pH dos meios de cultura foi ajustado em $5,7 \pm 0,1$, antes da adição de 8 g L⁻¹ de ágar (Sigma[®], lote 83 H 0090).

O carvão foi lavado com água destilada, visando eliminar possíveis resíduos de substâncias que pudessem interferir na germinação das sementes. Posteriormente, para testar este possível efeito foram colocadas sementes de alface para germinarem no lixiviado. Para a lavagem do carvão, foram empregados funil e papel de filtro. O carvão foi submetido a três sucessivas lavagens em água destilada. Uma vez lavado, o carvão foi seco à temperatura ambiente e, posteriormente pesado para adição ao meio de cultivo.

Alíquotas de 30 mL dos meios de cultivo foram distribuídos em frascos cujas características já foram descritas no item 2.1.1, previamente esterilizados.

Foram inoculadas entre 80 e 100 sementes por frasco de cultivo, no delineamento em blocos ao acaso, com nove repetições.

Os frascos contendo as sementes foram incubados na sala de cultivo à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiância média de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após quatro meses de cultivo *in vitro*, avaliaram-se produção de matéria fresca, número de protocormos verdes e oxidados e estágio de desenvolvimento destes. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5 %.

3. RESULTADOS

3.1. Germinação *in vitro* de sementes de *Laelia purpurata* var. *carnea* em meios de cultura com distintas formulações químicas

Observou-se que, em geral, a adição de carvão ativado beneficiou a germinação das sementes dessa espécie de orquídea. Nos meios Peter's e GB₅ houve formação de algumas plântulas completas, muito embora se tenha observado um número significativamente elevado de protocormos oxidados e, posteriormente, mortos com o avanço do período de cultivo (Figura 1).

Para a variável matéria fresca, após cinco meses de cultivo, não houve interação significativa entre meio de cultura e carvão ativado, indicando que, independentemente da formulação química do meio utilizado, a adição de carvão ativado aumentou, em média, o peso da matéria fresca dos protocormos de 89,70 para 179,82 mg.

Independentemente da adição de carvão ativado ao meio, houve efeito da formulação química do meio de cultura utilizado (Figura 2), sendo que os meios GB₅ e Peter's foram melhores para o aumento da produção de matéria fresca, sendo esta de 176,3 mg e 164,1 mg, respectivamente.

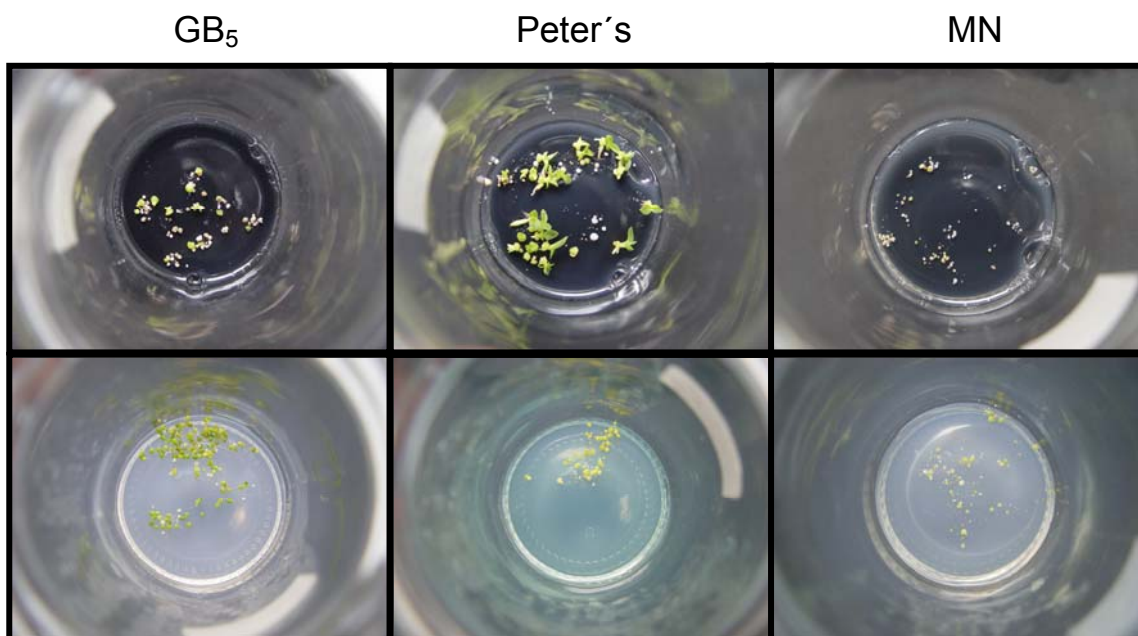


Figura 1 – Aspecto visual dos protocormos de *Laelia purpurata* var. *carnea* cultivados nos meios de cultivo GB₅, Peter's e MN, com ou sem adição de carvão, após cinco meses.

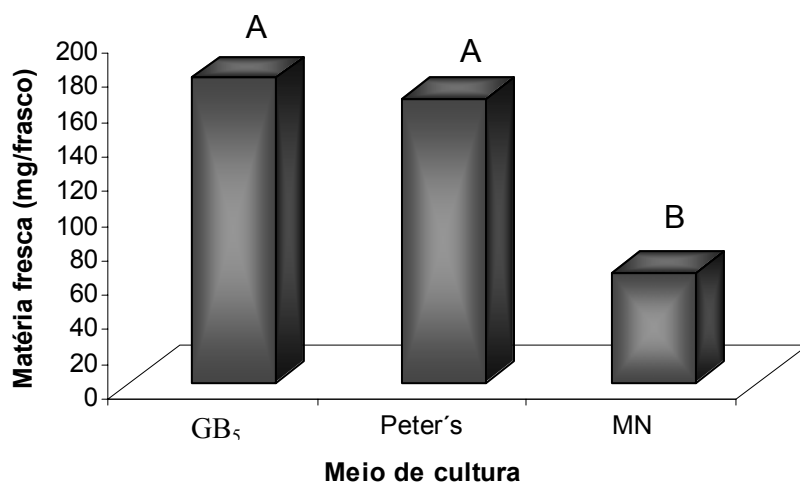


Figura 2 – Produção de matéria fresca dos protocormos formados, de acordo com os meios de cultura (GB₅, Peter's e MN), independentemente da adição de carvão ativado.

Analisando o número de protocormos verdes, houve resposta significativa para meio de cultura, carvão ativado e interação meio e carvão (Quadro 1). Em relação ao meio de cultivo, houve maior número de protocormos verdes no meio de cultura MN (57,2), quando se adicionou o carvão ativado, e, sem adição de carvão, o meio GB₅ apresentou melhores resultados (84).

Quadro 1 – Resultados médios do número de protocormos verdes em função do meio de cultura e adição de carvão ativado

Adição de carvão	Meio de cultivo		
	GB ₅	Peter's	MN
0,0 g L ⁻¹	84,0 aA	39,2 bB	44,0 bB
2,0 g L ⁻¹	18,5 bB*	18,2 bB	57,2 aB

*Letras minúsculas na horizontal comparam meio de cultura.

*Letras maiúsculas na vertical comparam efeito da adição de carvão.

Para o número total de protocormos formados, somente meio teve efeito significativo ao nível de 5 % pelo teste de Tukey (Figura 3), sendo o meio GB₅ o que apresentou maior número (96,6).

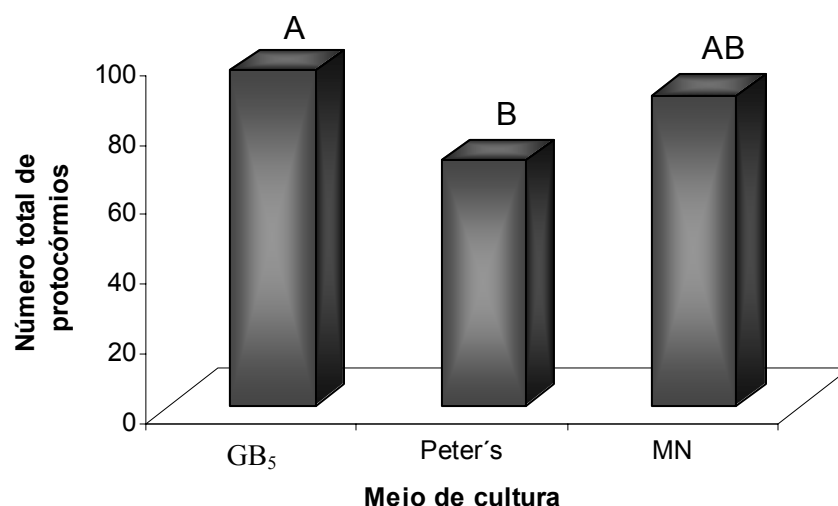


Figura 3 –Número total de protocormos formados, de acordo com os meios de cultura (GB₅, Peter's e MN), independentemente da adição de carvão ativado.

Observando o estágio de crescimento dos protocormos formados, fez-se uma escala diagramática, na qual cada nota correspondia a um grau de desenvolvimento. A nota 1 caracterizava o protocórmio na forma globular, 2 caracterizava o protocórmio com a formação de um primórdio foliar, 3, protocórmio com formação de dois primórdios foliares, 4, protocórmio com dois primórdios foliares e radiculares, e 5, formação de plântulas completas.

Como demonstrado na quadro 2, houve resposta significativa para tipo de meio de cultura, carvão ativado e interação meio e carvão.

Quadro 2 –Estádio de crescimento dos protocormos, em resposta ao meio de cultura e adição de carvão ativado

Adição de carvão	Meio de cultivo		
	GB ₅	Peter's	MN
0,0 g L ⁻¹	2,1 a A*	1,4 ab B	1,0 b A
2,0 g L ⁻¹	2,5 b A	3,8 a A	1,2 c A

*Letras minúsculas na horizontal comparam meio de cultura.

*Letras maiúsculas na vertical comparam efeito da adição de carvão.

Nos meios de cultura com presença de carvão ativado, o meio Peter's apresentou o melhor crescimento e desenvolvimento médio dos protocormos, formando protocormos com dois primórdios foliares. Com ausência de carvão ativado no meio de

cultura, o meio GB₅ demonstrou ser o melhor para esta variável, apesar de formar protocormos com um primórdio foliar.

Comparando a adição de carvão ativado nos meios de cultura, somente o Peter's mostrou-se beneficiar com a adição desse componente ao meio para o desenvolvimento dos protocormos.

3.2. Germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya amethystoglossa* em meio de cultura com adição de diferentes concentrações de carvão ativado

Vale ressaltar que o experimento foi repetido três vezes e nas três ocasiões foram observadas porcentagens variando de 0 a 1,0 % de germinação, em todos os tratamentos.

As sementes iniciavam o processo de germinação, tornavam-se túrgidas, esverdeadas e alguns protocormos eram formados até o primeiro estágio (forma esférica, com aproximadamente 1,0 mm de diâmetro). Posteriormente, alguns destes protocormos assumiam coloração esbranquiçada e outros, um aspecto oxidado, sendo observada a paralisação do crescimento e desenvolvimento, após 30 dias de cultivo e, logo após, morriam (Figura 4).



Figura 4- Aspecto visual dos protocormos de *Cattleya amethystoglossa*, após 30 dias de cultivo, inicialmente túrgidos e esverdeados, posteriormente, esbranquiçados e mortos,.

Este problema foi inicialmente relacionado com alta irradiância sobre os frascos de cultivo, que variou entre 45,0 e 53,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Assim, os experimentos seguintes foram mantidos em prateleiras com lâmpadas apagadas, que recebiam luz difusa de outras lâmpadas, apresentando irradiância entre 4,5 a 6,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, entretanto, ainda foi observado o esbranquiçamento e morte dos protocormos.

Ainda se testou a germinação em outro meio de cultivo, MS (1/4; 1/3; 1/2; e 1 força) com adição de carvão ativado, entretanto, foram observados os mesmos problemas de reduzida porcentagem de germinação, formação de protocormos esbranquiçados, oxidados e mortos.

Para se testar a viabilidade das sementes utilizadas, realizou-se a semeadura de *C. amethystoglossa* em meio de cultura GB₅, sem carvão ativado, no qual a germinação e o crescimento ocorreram normalmente, formando protocormos verdes, vigorosos, que após quatro meses de cultivo, apresentavam duas folhas e raízes, demonstrando que as sementes eram viáveis.

3.3. Crescimento e desenvolvimento *in vitro* de protocormos

Com base nos resultados obtidos nos itens 3.1 e 3.2, as sementes foram germinadas no meio GB₅, sem adição de carvão ativado. Formados os protocormos, estes eram transferidos para o meio de cultura MN, visando avaliar o crescimento de protocormos nesse meio contendo diferentes concentrações de carvão ativado.

Após 50 dias de cultivo, os protocormos cultivados no meio MN sem carvão ativado, desenvolveram em plantas completas, com parte aérea e radicular, havendo ainda a neoformação de alguns protocormos. Os meio de cultura com adição de carvão ativado (1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 g L⁻¹) apresentou reduzido número de plantas completas, apenas uma a duas plântulas, observando, porém, a neoformação de protocormos com tamanho menor que 0,2 mm de diâmetro e morte de protocormos (Figura 5).



Figura 5 – Aspecto visual das plântulas e dos protocormos de *Cattleya amethystiglossa* após quatro meses de cultivo em meio MN com as concentrações de carvão ativado de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L⁻¹.

A produção de matéria fresca por frasco foi explicada pelo modelo linear negativo. Obteve-se maior produção de biomassa de plantas, equivalente a 118 mg/frasco, em meio de cultura sem adição de carvão ativado. A produção de matéria fresca por frasco foi em média 86,8 mg.

O número médio de folhas e de raízes, bem como o comprimento de raízes, reduziu em função do aumento da concentração de carvão ativado no meio de cultura. Desta forma, obteve-se melhores respostas quanto ao crescimento dos protocormos (4,3 folhas por planta, 2,5 raízes por planta com 7,8 mm de comprimento médio), inclusive com formação de plantas completas, em meio de cultura sem carvão ativado. De forma geral, os protocormos desenvolveram um número reduzido de folhas e raízes, variando de 2,0 a 4,0 folhas, com comprimento médio de 7,33 mm e desvio padrão de 1,67 mm, e em torno de 0 a 3 raízes por planta, com comprimento médio de 2,2 mm.

O número de plantas por frasco e o comprimento de folhas não variou em função das doses de carvão ativado. Estes resultados demonstram que as concentrações de carvão ativado variando de 1,0 a 4,0 g L⁻¹ não apresentaram efeito positivo para o crescimento e desenvolvimento dos protocormos.

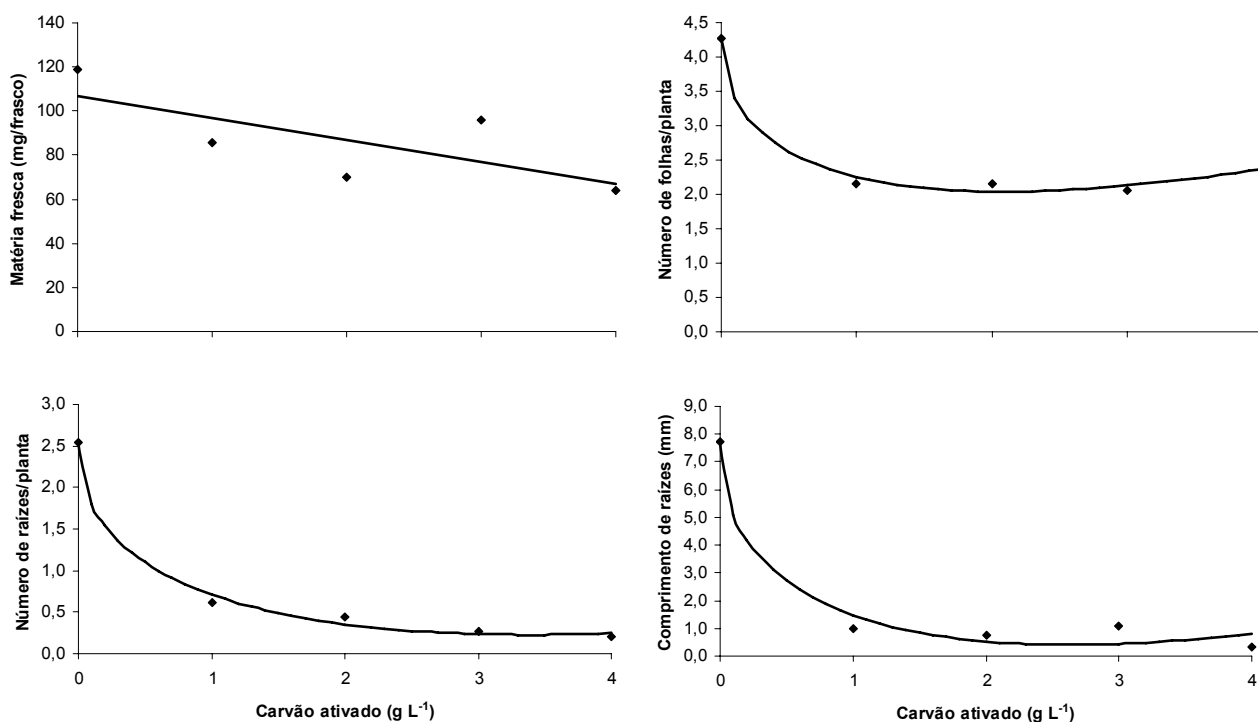


Figura 6 – Produção de matéria fresca de plantas por frasco (A, $\hat{Y} = 106,9 - 10,1 \cdot x$, $R^2 = 0,52$); número de folhas por planta (B, $\hat{Y} = 4,2568 - 3,0835 \cdot \sqrt{x} + 1,06782 \cdot x$, $R^2 = 0,99$); número de raízes por planta (C, $\hat{Y} = 2,5280 - 2,4947 \cdot \sqrt{x} + 0,6766 \cdot x$, $R^2 = 0,99$) e comprimento de raízes (D, $\hat{Y} = 7,66067 - 8,935 \cdot \sqrt{x} + 2,7533 \cdot x$, $R^2 = 0,97$) de protocórmios de *Cattleya amethystoglossa*, após quatro meses de cultivo em meio MN com as concentrações de carvão ativado 0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L⁻¹.

3.4. Germinação de *Laelia purpurata* var. *carnea* em meio de cultura com carvão ativado de diferentes marcas

Por meio do teste de Scott-Knott, agruparam-se as marcas de carvão ativado que promoveram as melhores respostas. Para a variável porcentagem de protocormos verdes por frasco (Figura 6), a testemunha sem carvão apresentou melhor resposta (82,8 %), seguida das marcas Ciba lavado (62,5 %), Purex (57,6 %) e Ecibra (56,6 %). Logo após seguem-se as marcas Dinâmica (50,8 %), Ciba (49,1 %) e Merck (46,9 %), e, por último, as marcas, Nuclear (39,1 %), Merck lavado (34,6 %) e Synth (31,3 %).

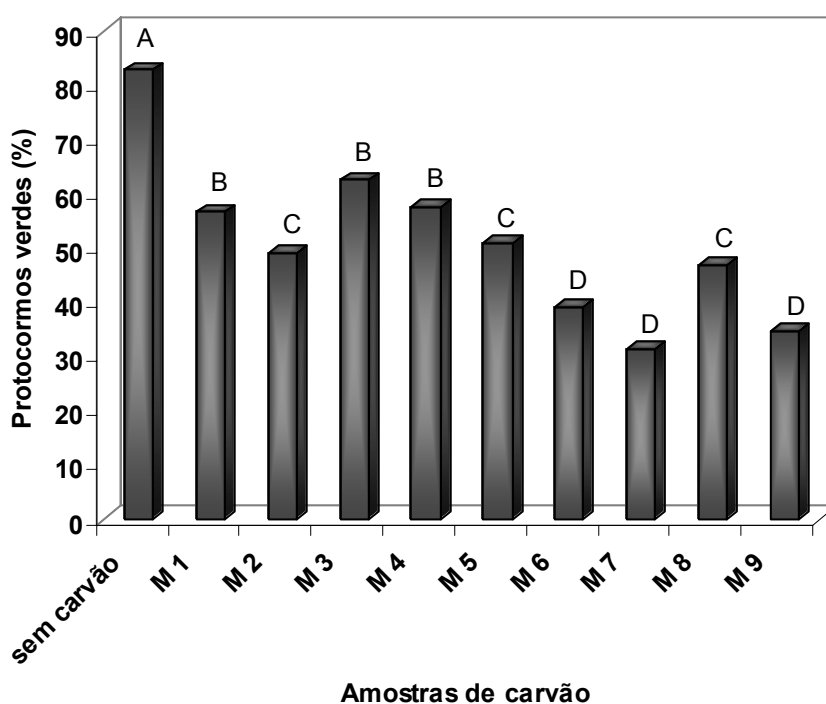


Figura 6 – Estimativa da porcentagem de protocormos verdes (%) formados no meio de cultivo GB₅, em função da adição das diferentes marcas de carvão ativado.

Em relação à variável matéria fresca (Figura 7), as marcas de carvão ativado que apresentaram os melhores resultados foram: M 3 (0,4968g), M 1 (0,4271 g), M 2 (0,3792 g) e M 5 (0,3786 g), seguidas pela testemunha sem carvão (0,2737 g), e finalmente, as marcas, M 7 (0,1756 g), M 4 (0,1024 g), M 6 (0,0921 g), M 8 (0,0893 g) e M 9 (0,0828 g).

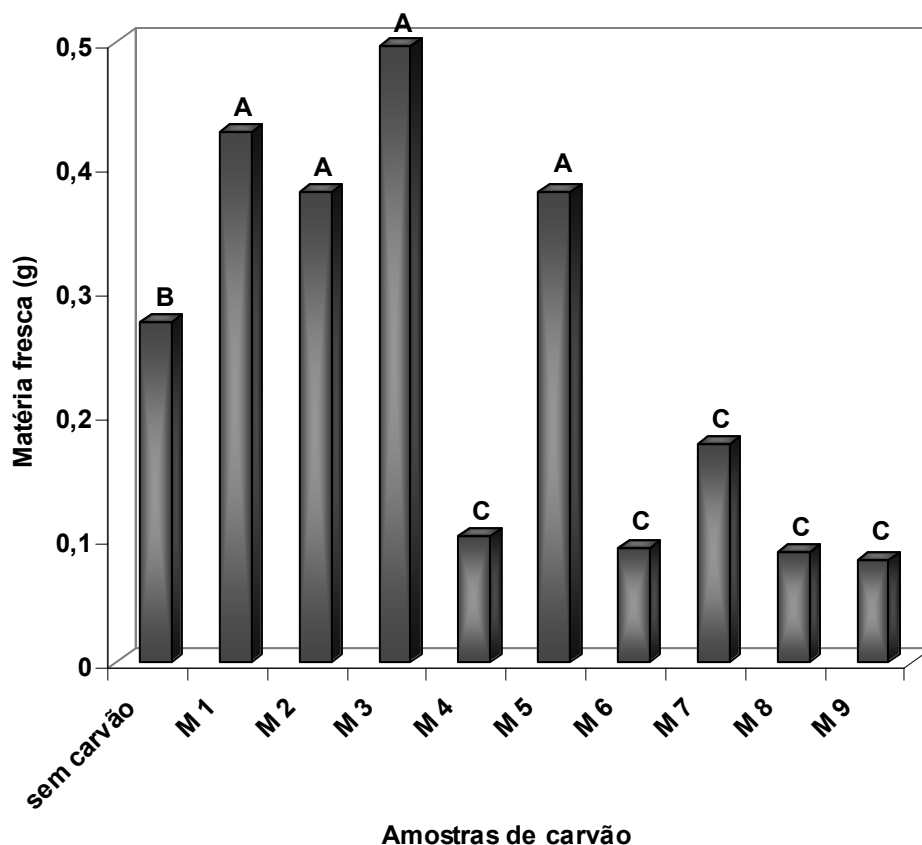


Figura 7 – Produção de matéria fresca dos protocormos formados no meio de cultivo GB₅, em resposta à adição das diferentes marcas de carvão ativado.

As marcas de carvão que proporcionaram as melhores respostas de crescimento e desenvolvimento dos protocormos foram M 3, M 1, M 2 e M 5, em relação à matéria fresca; entretanto, a testemunha sem o uso de carvão obteve melhor resultado em comparação a todas as outras marcas em relação à porcentagem de protocormos verdes. As marcas que tinham maior grau de pureza apresentaram maiores problemas para a germinação e crescimento para os protocormos.

4. DISCUSSÃO

O efeito da adição de carvão ativado nos meios de cultura para germinação, crescimento e desenvolvimento de protocormos de orquídeas demonstrou ser, em alguns casos, dependente do meio de cultura utilizado, da espécie de orquídea e da marca do carvão testado, sendo observada uma frequente oxidação, necrose e subsequente morte dos protocormos.

Escurecimento ou necrose e subsequente morte dos protocormos é um fenômeno comum no cultivo *in vitro* de orquídeas terrestres (Harvais, 1982; Pauw et al., 1995). Segundo esses autores, esses fenômenos podem se dever a condições inapropriadas de cultivo, tais como desbalanço nutricional ou falta de substância(s) estimuladora(s) do crescimento. O escurecimento de protocormos tem sido relatado por diversos autores. Nagaraju e Parthasarathy (1997) obtiveram reduzida germinação de sementes de espécies de orquídeas quando se empregou o meio VW (Vacin e Went, 1949) e observaram o escurecimento dos protocormos.

Morte dos protocormos pode ser uma característica inerente da semente que origina o protocormo. É possível que embriões inviáveis possam embeber água suficiente para expandir e romper a testa, porém não para continuar o desenvolvimento (Pauw et al., 1995).

Alguns protocormos germinados e mantidos por três meses em meio de cultura MN e já apresentando aparência oxidada, quando transferidos para um novo meio MN com carvão mostraram, após cinco meses, com primórdios foliares e, aparentemente, formando-se calos; outros apresentaram aspecto esbranquiçado ou oxidado. Os protocormos recultivados no meio GB₅ sem carvão, desenvolveram partes aéreas e radiculares. Isto demonstra que o meio MN poderia estar apresentando algum tipo de deficiência ou toxidez para os protocormos.

É importante salientar que sementes de orquídeas terrestres germinam, geralmente, em baixa concentração de sal do meio de cultura e a fonte de nitrogênio tem uma função crítica na germinação. Entretanto, o requerimento para o cultivo é específico para o gênero e, algumas vezes, para espécies (Henrich et al., 1981; Arditti e Ernst, 1984).

Van Waes e Debergh (1986), estudando a germinação *in vitro* de algumas espécies de orquídeas européias, relataram que todas as espécies testadas germinaram

melhor no escuro; e que em baixa irradiância (1,2 e 30,4 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a germinação foi reduzida e completamente inibida para todas as espécies testadas na irradiância de 30,4 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Ainda, descreveram que orquídeas terrestres européias são consideradas mais sensíveis à concentração salina que espécies tropicais; e quando comparadas às espécies epífitas, demonstram melhor resposta ao processo de germinação em meios de cultura com menor concentração salina.

Embora o NH_4^+ como fonte de N, raramente seja adequado para certas plantas, em pequenas quantidades pode ser fundamental para o crescimento. Entretanto, NH_4^+ , pode ser prejudicial ao crescimento de células. O escurecimento e desidratação de explantes tratados com NH_4^+ (sulfato de amônio) podem ser devido à toxidez amoniacal, em razão do acúmulo de N, quando NH_4^+ é utilizado em altas concentrações (Sharma e Tandon, 1992).

Nitrato de amônio, nos meios Nitsch e MS, é considerado uma fonte mais adequada de N para a germinação de orquídeas (Arditti e Ernest, 1984). O meio MN utiliza 1,0 g L^{-1} de nitrato de cálcio tetra hidratado, sem empregar sulfato de amônio, e o meio GB₅, por sua vez, somente utiliza 134 mg L^{-1} de sulfato de amônio, empregando-se como fonte de cálcio, o cloreto de cálcio (150 mg L^{-1}).

No primeiro experimento, o cultivo de *Laelia purpurata* var. carnea em distintas formulações de meios de cultura (GB₅, Peter's e MN) demonstrou efeito benéfico da adição de carvão sobre a germinação das sementes. Para a variável matéria fresca, independentemente do meio utilizado, a adição de carvão resultou em melhores respostas. Sem a adição de carvão, GB₅ e Peter's, meios mais ricos em nutrientes, mostraram-se melhores. O meio MN resultou em maior número de protocormos verdes com a adição de carvão.

Rodrigues (2005), estudando os efeitos de três meios: Novais (MN), Peter's nas formulações 10-30-20 + micro e 30-10-10 + micro, cada um sendo testado com cinco concentrações (0,25; 0,50; 1,00; 1,75 e 2,25 g L^{-1}) e meio Knudson C (KC), concluiu que a matéria fresca total aumentou linearmente com o aumento da dose dos meios MN e Peter's. A utilização de fertilizantes NPK, como o Peter's acrescido de água de coco, para o cultivo *in vitro* de plântulas de orquídeas demonstrou ser viável, uma vez que com sua utilização resultou em maior produção de matéria fresca, em comparação com o meio KC e MN.

A germinação de sementes da espécie *Cattleya amethystoglossa* foi testada no meio MN com diferentes concentrações de carvão (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L^{-1}).

Observou-se reduzida porcentagem de germinação, chegando ao máximo de 1 %. Para o crescimento e desenvolvimento de protocormos, o status de plântulas completas somente foi alcançado no meio de cultura sem carvão. Concluindo-se que a adição de carvão, neste caso, foi deletéria.

Faria et al. (2002) estudaram a propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana*, utilizando meio MS modificado com a metade da concentração dos macro nutrientes, sendo adicionadas as concentrações de 1, 2, 3, 4 e 6 g L⁻¹ de carvão ativado e o pH ajustado para 6,0 e empregando-se plântulas com aproximadamente 1,0 cm de altura. Os autores observaram que o crescimento vegetativo das plântulas de *C. walkeriana* aumentou com o incremento de carvão ativado e com o tempo de cultivo. Concluíram que a adição de 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura foi benéfica para a propagação desta espécie *in vitro*.

No presente trabalho, foi observado em diversos experimentos preliminares de germinação com várias espécies e meios de cultivo, com ou sem adição de carvão ativado, que, da germinação das sementes até a formação das raízes das plântulas, o carvão se mostrava deletério, retardando o crescimento ou mesmo impedindo a germinação. Após a formação de raízes e mais claramente em plântulas completas, com altura igual ou superior a 0,5 cm, de altura, a adição de carvão no meio se tornava altamente benéfica, como será demonstrado no capítulo seguinte.

No teste com sementes de alface colocadas para germinar no lixiviado do carvão ativado germinaram 99,0 %, como indicado pelo fabricante, demonstrando que o carvão ativado não continha substância química que poderia ser inibitória para a germinação neste lixiviado.

Hinnen et al. (1989), ao estudarem a influência da adição de macronutrientes e outros fatores na germinação de sementes e no crescimento dos protocormos de um híbrido de *Phalaenopsis in vitro*, empregaram três tipos de carvão ativado comparando-os por ordem de pureza, Merck 2183, Merck 2184 e Merck 2186. Esses autores observaram que as variáveis produção de matéria fresca de raiz e de planta foram significativamente favorecidas pelo alto grau de pureza do carvão. Concluíram que os melhores resultados foram obtidos, quando se utilizou carvão ativado de melhor qualidade (pureza), no caso Merck 2186.

No terceiro experimento, testou-se o efeito do carvão ativado de diferentes marcas sobre o processo de germinação visando encontrar soluções para o problema da oxidação e morte dos protocormos. As marcas M 1 e M 3 lavado foram as que

resultaram em melhores respostas para produção de matéria fresca e percentagem de protocormos verdes, apesar de que a testemunha, sem carvão, apresentou maior percentagem de protocormos verdes e bons resultados de matéria fresca.

No presente trabalho, pôde-se observar que a adição ao meio de cultura de carvão ativado com maior grau de pureza prejudicou o crescimento dos protocormos. Isso pode ser explicado possivelmente pela maior adsorção de sais dos meios de cultivo ou de outras substâncias reguladoras do crescimento, como o etileno, que é necessário em pequenas concentrações para desencadear importantes reações inerentes à germinação das sementes e o crescimento das estruturas, até a formação de plantas completas (Taiz e Zeiger, 2004).

Segundo Pan e Staden (1998), a adição de carvão ao meio de cultura pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tipo de tecido utilizado, além da fonte de carvão e do seu grau de ativação. A fonte de carvão ativado pode ser importante para a morfogenia e sua efetividade pode ser alterada por meio de impurezas. Segundo, ainda, esses autores, a adsorção não seletiva do carvão ativado, como por exemplo, em relação à tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido fólico, reguladores de crescimento, quelatos ferrosos e zinco, pode resultar em efeitos negativos para o cultivo.

Johansson (1983) descreve que o efeito estimulatório do carvão ativado no processo embriogênico não seria somente devido à adsorção de substâncias fenólicas em combinação com substâncias inibitórias do ágar, e sim a adsorção de etileno e ácido abscísico e que, ademais, esse efeito seria ainda dependente das condições de cultivo, como volume do meio de cultura no frasco de cultivo.

Segundo Van Waes (1987), a adição de carvão ativado no meio de cultura resultou em baixas taxas de germinação e desenvolvimento mais lento, em espécies de orquídeas européias, apresentando efeito positivo para tais processos, somente para os meios nos quais observou-se oxidação fenólica dos explantes.

Ainda será necessário investigar os mecanismos de adsorção e identificação das substâncias adsorvidas ou liberadas do carvão ativado, para que se entenda como este age no crescimento e desenvolvimento de plantas.

5. CONCLUSÕES

- Os meios GB₅ e Peter's apresentam melhores respostas na presença de carvão ativado.
- O meio MN com adição de carvão ativado é prejudicial à germinação, além de retardar o crescimento dos protocormos, com independência da dose utilizada do carvão.
- As marcas de carvão que proporcionam as melhores respostas de crescimento e desenvolvimento dos protocormos foram M 3, M 1, M 2 e M 5, em relação à matéria fresca; entretanto, a testemunha sem o uso de carvão obteve melhor resultado em comparação a todas as outras marcas em relação à percentagem de protocormos verdes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J.; ERNEST, R.. Physiology of germination of orchid seeds. In: Arditti. J. (ed): Orchid Biology. Reviews and Perspectives. Vol. III. Chapter 4. Comstock Publishing Associates, Ithaca. USA. 177-122. 1984.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Micropropagation of orchids. 1^a ed. New York, Chinchester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons, Inc., 1992. 682p.
- FARIA, R.T.; SANTIAGO, D.C.; SARIDAKIS, D.P.; ALBINO, U.B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2:489-492, 2002.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutriente requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158, 1968.
- GEORGE, P.R.; RAVISHANKER, G.A. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. Plant Cell Rep., 16:490-494, 1997.
- HARVAIS, G. An improved cultures medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. Can. J. Bot., 60:2547-2556, 1982.
- HENRICH, J.E.; STIMART, D.P.; ASCHER, P.D. Terrestrial orchid seed germination *in vitro* on a defined medium. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 106:193-196, 1981.
- HINNEN, M.G.J.; PIERIK, R.L.M.; BRONSEMA, F.B.F. The influence of macronutrientes and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro*. Sci. Hortic., 41:105-116, 1989.
- JOHANSSON, L. Effects of activated charcoal in anther cultures. Physiol. Plant, 59: 397-403, 1983.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Soc. Bull., 14:214-217, 1946.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15:473-497, 1962.
- NAGARAJU, V.; PARTHASARATHY, V.A. *In vitro* response of *Aerides* to certain basal media. Indian J. Hort., 54:176-178, 1997.
- NOVAIS, R.F.; RODRIGUES, D.T. Nutrição e fertilização de orquídeas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, 2004, Viçosa. Simpósios Palestras e Mesas Redondas. Sociedade Botânica do Brasil, 2004.

- PAN, M.J.; STADEN, J.van. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. *Plant Growth Reg.*, 26:155-163, 1998.
- PAUW, M.A.; REMPHREY, W.R.; PALMER, C.E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. *Ann. Bot.*, 75:267-275, 1995.
- RODRIGUES, D.T. Nutrição e fertilização de orquídeas *in vitro* e em vasos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 87p. (Tese de Mestrado).
- SHARMA, A.; TANDON, P. KUMAR, A. Regeneration of *Dendrobium wardianum* Warner (Orchidaceae) from synthetic seeds. *Indian J. Exp. Biol.*, 30:747-748, 1992.
- STENBERG, M.L.; KANE, M.E. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, and endangered Florida orchid. *Lindleyana*, 13:101-112, 1998.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Trad. SANTARÉM, E.R.; MARIATH, J.E.; ASTARITA, L.V.; DILLENBURG, L.R.; ROSA, L.M.G.; OLIVEIRA, P.L. 3 ed., Porto Alegre. Artmed, 2004.
- VACIN, E.T.; WENT, F.W. pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.*, 110:605-613, 1949
- VAN WAES, J. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of Western European orchids. *Acta Hort.*, 212:131-138, 1987.
- VAN WAES, J.M.; DEBERG, P.C. *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiol. Plant*, 66:435-442, 1986.

NUTRIÇÃO DE ORQUÍDEAS *IN VITRO*

RESUMO

Devido à ampla distribuição das espécies de orquídeas pelo mundo, apresentando elevado número de exemplares de interesse comercial, há ainda grupos de orquídeas cuja demanda nutricional são desconhecidas, como as do grupo das *Cattleyas*. Diversas formulações químicas para meios de cultura são estudadas visando à redução do tempo e do custo do cultivo, bem como, ao aumento da produção. Este trabalho objetivou estudar diferentes meios de cultura para a germinação e crescimento *in vitro* de quatro espécies de orquídeas do grupo *Cattleya*. Foram testadas desde formulações mais complexas até aquelas constituídas por sais de adubos comerciais, sem ou com adição de carvão ativado que promovessem melhores condições nutricionais para a germinação de sementes, crescimento e desenvolvimento de vitroplântulas. No primeiro experimento, foi utilizado o meio de cultura composto dos sais nutrientes do adubo Peter's, testando as combinações de três concentrações salinas e seis concentrações de sacarose no cultivo de plantas de *Cattleya loddigesii*. Observou-se que as melhores respostas morfogênicas eram obtidas com o aumento da concentração de sais, até $6,0 \text{ g L}^{-1}$, assim como da de sacarose, até 40 g L^{-1} . Acima destas concentrações, as respostas decresciam. No segundo e terceiro experimento, os meios MS (Murashige e Skoog, 1962), GB₅ (Gambor et al., 1968) e Peter's foram testados com a adição ou não de carvão ativado, utilizando vitroplântulas de *Sophranitis coccinea* e *Cattleya bicolor*, com parte aérea e raízes bem desenvolvidas e com aproximadamente 1,0 a 2,0 cm de comprimento. Observou-se que, a adição de carvão ativado aos meios de cultura promoveu as melhores respostas para todas as variáveis avaliadas, caracterizando como o melhor meio o Peter's, não diferindo, entretanto do meio GB₅, seguido pelo meio MS. No quarto experimento, utilizando-se sementes de *Laelia anceps* var. semi-alba, testou-se a germinação desta espécie nos meios Peter's, GB₅ e B&G sem adição de carvão ativado e um tratamento com o meio B&G com adição de carvão. O meio GB₅ apresentou menor número de dias para a germinação, provavelmente por ser um meio mais rico em nutrientes, seguido dos meios com concentrações salinas menores, B&G com carvão, Peter's e B&G sem carvão. No quinto experimento, utilizando-se plantas

de *Laelia anceps* var. semi-alba, com parte aérea e raízes bem desenvolvidas e com aproximadamente 1,0 a 2,0 cm de comprimento, testou-se o crescimento e desenvolvimento dessa espécie nos meios de cultura Peter's, GB₅ e B&G sem adição de carvão ativado e um tratamento de B&G com adição de carvão. Observou-se que o meio B&G acrescido com carvão ativado demonstrou maior eficiência, resultando em plantas vigorosas, com intenso crescimento de parte aérea e radicular, desenvolvendo-se pseudobulbos ainda *in vitro*. Também, o meio Peter's proporcionou um crescimento e desenvolvimento vegetativo satisfatório, demonstrando melhores resultados, se comparado ao meio GB₅. Pode-se concluir que foi possível diminuir o tempo em dias da germinação e obter vitroplantas vigorosas com a utilização de meios de cultura alternativos mais simples, com o emprego de fertilizantes hidrossolúveis comerciais em substituição dos meios de cultura provenientes de formulações mais complexas, reduzindo o tempo de cultivo e diminuindo os custos de produção.

1. INTRODUÇÃO

As orquídeas apresentam grande potencial econômico no setor de floricultura. Espécies como *Cattleya bicolor*, *Sophronitis coccinea*, *Cattleya loddigesii*, todas de origem brasileira, são plantas de flores de rara beleza e duração de flor de até 30 dias, características estas que favorecem sua comercialização. São muito utilizadas para cruzamentos entre os gêneros do grupo *Cattleya*, visando à transferência de genes que transmitam características importantes para sua comercialização, como coloração, tamanho e forma de flor (Watanabe, 2002).

Um grande problema no cultivo de orquídeas é a longa fase juvenil dessas plantas (Fráguas et al., 2003). Por isso, a cultura de células e tecidos apresenta-se como uma ferramenta indispensável para a propagação massiva dos principais gêneros de orquídeas, sendo estudadas diversas formulações químicas para meios de cultura que possibilitem reduzir o tempo de cultivo e aumentar os rendimentos (Arditti e Ernst, 1992). Têm sido empregados meios de cultura complexos, com diversos macros e micronutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, elevando os custos de produção (Ventura, 2002). De acordo com Stancato *et al.* (2001), os meios simplificados apresentam seu custo reduzido.

Ainda não existe um meio de cultura com balanço nutricional adequado para o cultivo *in vitro* de orquídeas. Tem sido difícil explicar porque em certas combinações de componentes do meio de cultura e condições de cultivo os resultados têm sido bem sucedidos, enquanto em outras não se tem logrado êxito. Um exemplo disso é quando se utiliza o carvão ativado (Ventura, 2002).

Entretanto, não apenas os fatores de ordem nutricional, como também ambiental e genotípico afetam a propagação *in vitro* de orquídeas. A resposta morfogênica *in vitro* pode variar amplamente, dependendo do gênero, espécie, cultivar e mesmo entre plantas individuais do mesmo genótipo, crescendo em diferentes condições ambientais (Arditti e Ernst, 1992).

Este trabalho objetivou estudar diferentes formulações químicas para meios de cultura, testando desde meios mais complexos até meios mais simples, constituídos de sais de adubo solúvel comercial, com e sem adição de carvão ativado, que promovessem melhores condições nutricionais para a propagação *in vitro* de quatro espécies de orquídeas do grupo *Cattleya*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das plântulas

2.1.1. Fase de desinfestação das sementes

As sementes maduras de cada uma das quatro espécies foram desinfestadas e inoculadas sob condições de câmara de fluxo laminar, da seguinte forma: foi retirado da cápsula aproximadamente 200 mg de sementes, colocadas em peneira de 50 μm e utilizando placa de Petri como suporte. As sementes foram mergulhadas em álcool 70 cL L^{-1} por 1 min, em seguida, imersas em solução a 10 cL L^{-1} de hipoclorito de sódio 0,2 % do produto comercial da marca Globo[®], por 15 min. Em seguida, foram submetidas a três enxaguaduras com água desionizada e autoclavada; as sementes estéreis foram então mantidas em aproximadamente 30 mL de água desionizada e autoclavada, a fim de mantê-las em suspensão, de acordo com método utilizado por Stenberg e Kane (1998).

2.1.2. Preparo do meio de cultura para germinação das sementes

Os meios de cultura empregados para a germinação das sementes e obtenção das plântulas foi KC (Knudson, 1946), no primeiro experimento e, nos demais, meio Peter's.

O meio KC constituiu-se dos minerais nutrientes de Knudson (1946), acrescido de 20 g L^{-1} de sacarose, 3,0 g L^{-1} de carvão ativado e solidificado com 8,0 g L^{-1} de ágar (Sigma, lote 83 H 0090). O pH do meio foi ajustado para 5,0 a 5,5, antes da adição do ágar.

O meio Peter's foi constituído de 3,0 g L^{-1} do adubo comercial Peter's 10-30-20, acrescido com 200 mL L^{-1} de água de coco, 20 g L^{-1} de sacarose. O pH dos meios de cultura foi ajustado em $5,7 \pm 0,1$, antes da adição de 8,0 g L^{-1} de ágar (Sigma[®], lote 83 H 0090).

Após a preparação dos meios de cultura, foram distribuídas alíquotas de 30 mL de cada meio em frascos de vidro, previamente esterilizados. Os recipientes tinham a capacidade volumétrica de 320 cm^3 , diâmetro externo de 6,8 cm, interno de 6,5 cm e

altura de 12,5 cm. Estes recipientes, contendo o meio de cultura, foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®). A esterilização foi realizada em autoclave a uma temperatura de 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², por 20 min.

2.1.3. Inoculação das sementes nos meios de cultura e condições de incubação

As sementes estéreis foram inoculadas nos meios de cultura também estéril, à temperatura ambiente, sob condições de câmara de fluxo laminar, pipetando-se 200 µL da suspensão de sementes, de forma que contivesse entre 80 e 100 sementes por frasco.

Depois da inoculação, os frascos foram fechados com tampas transparente de polipropileno e suas bordas envoltas com filme transparente PVC (Rolopac®).

Os frascos contendo as sementes e, posteriormente as plântulas, foram mantidos sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiância média de 40 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W).

O período de cultivo variou para cada espécie de orquídea utilizada nos experimentos, variando de três meses a um ano, até que as plântulas apresentassem as características de tamanho e vigor ideal para os objetivos almejados.

2.2. Cultivo de *Cattleya loddigesii* em meio de cultura com diferentes concentrações de sais e de sacarose

Plantas de *Cattleya loddigesii*, com nove meses de idade e com 1,0 a 2,0 cm de comprimento, obtidas conforme descritas no item anterior, foram utilizadas para testar o efeito da combinação de distintas concentrações de sais do adubo Peter's com diferentes concentrações de sacarose, em presença ou em ausência de carvão ativado, sobre o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas dessa espécie.

O meio de cultura foi constituído pelos sais nutrientes do adubo Peter's, que representa uma linha comercial de fertilizantes NPK e micronutrientes, largamente

utilizado no meio orquidófilo. Utilizou-se, nesse experimento, a formulação Peter's 10-30-20.

O meio de cultura foi preparado empregando-se esquema fatorial (3 x 6), combinando-se três concentrações (2,0; 4,0 e 6,0 g L⁻¹) de Peter's e seis concentrações (0; 5; 10; 20; 40 e 60 g L⁻¹) de sacarose e adicionando-se, ainda, a essas combinações de meio, 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado e 200 mL L⁻¹ de água de coco. O pH foi ajustado em 5,7 ± 0,1, antes da adição de 7,0 g L⁻¹ de ágar (Merck®, K 30920315-230), sendo distribuídos 30 mL de cada meio em frascos de cultivo de vidro de 320 cm³, diâmetro externo de 6,8 cm, interno de 6,5 cm e altura de 12,5 cm.

Estes recipientes, contendo o meio de cultura, foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®). A esterilização foi realizada em autoclave a uma temperatura de 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², por 20 min.

Sob condições de câmara de fluxo laminar, foram transferidas 10 plantas por frasco de cultivo, e depois fechados como já descrito.

Os frascos com as plântulas foram transferidos para a sala de cultivo e incubados à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiância média de 40 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W).

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos ao acaso, com um frasco por unidade experimental e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão. Os modelos foram escolhidos baseados no nível de significância dos β's, utilizando o teste 't', adotando-se os níveis de até 10 % de probabilidade. Além disso, considerou-se o valor do coeficiente de determinação (R² = SQ Regressão / SQ Tratamento) e a consistência do modelo de acordo com o comportamento esperado para o fenômeno biológico.

Avaliaram-se a produção de matéria fresca de folhas e raízes e maior comprimento de folhas e raízes, após o período de cultivo de seis meses.

2.3. Cultivo de *Sophronitis coccinea* em diferentes formulações químicas de meio de cultura

Plantas de *Sophronitis coccinea* com um ano de idade e apresentando aproximadamente 1,0 cm de comprimento e obtidas conforme descrito no item 2.1, foram utilizadas para testar o efeito de três formulações químicas de meio de cultura, na presença ou na ausência de carvão ativado, sobre o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas.

Os meios de cultura utilizados foram MS (Murashige e Skoog, 1962), GB₅ (Gambor, 1968) e o adubo comercial Peter's, na formulação 10-30-20 a 3,0 g L⁻¹. Nas formulações de MS e de Peter's adicionaram-se 30 g L⁻¹ de sacarose, na de GB₅ utilizaram-se 20 g L⁻¹ de sacarose. À formulação de Peter's, adicionaram-se 200 mL L⁻¹ de água de coco. Esses três meios de cultura foram testados em combinação com 0 e 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado, em um esquema fatorial 3 x 2. As formulações destes meios se encontra no quadro 1.

Os modos de preparo dos meios de cultura, do cultivo das plântulas, bem como de incubação dos frascos na sala de cultivo foram, em tudo, semelhante ao do item anterior.

O experimento foi realizado no delineamento de blocos ao acaso, com três frascos por unidade experimental e quatro repetições. Foram inoculadas para os dois primeiros blocos, cinco plantas por frasco, com o comprimento superior a 1,0 cm, e nos dois últimos blocos, foram inoculadas seis plantas de comprimento inferior a 1,0 cm.

Após seis meses de cultivo, os dados foram interpretados utilizando-se análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o nível de 5 % de probabilidade. Avaliaram-se a produção de matéria fresca total, número de plantas, folhas e raízes, comprimento das maiores folhas e das maiores raízes.

Quadro 1 – Formulação dos meios de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), GB₅ (Gambor, 1968), Peter's (10-30-20, adubo comercial) e B&G (adubo comercial).

Meios	MS	GB ₅	Peter's 10-30-20	B&G
Macro elementos	mg L⁻¹			
N-total	841	374	200	154
N-NH ₄	289	28	98	49
N-NO ₃	552	346	102	105
P	39	30	131	108
K	783	967	166	134
Ca	120	41	-	151
Mg	36	25	24	26
S	48	71	34	83
Micro elementos				
B	1,08	0,53	0,14	0,63
Fe	5,60	5,62	1,00	6,70
Zn	1,95	0,45	0,05	4,50
Cu	0,01	0,01	0,07	0,25
Mn	5,49	4,29	0,50	2,72
Mo	0,10	0,10	0,02	0,08
∑ nutrientes	2094	1614	557	714
Adit. orgânicos	g L⁻¹			
Sacarose	30	20	30	30
Aminoácidos	mg L⁻¹			
Myo-inositol	100	100	-	-
Vitaminas				
Niacina	0,5	1,0	-	-
Piridoxina	0,5	1,0	-	-
Tiamina	0,1	10	-	-
Adit. Complexos	mL L⁻¹			
Água de coco	-	-	200	-
Solidificante	g L⁻¹			
Ágar	8,0	8,0	8,0	8,0

Fonte: Pierik (1990); George (1993); Rodrigues (2005).

* O meio MS ainda possui 0,63 mg L⁻¹ de I e 0,02 mg L⁻¹ de Co; o meio GB₅, por sua vez possui 0,57 e 0,02 mg L⁻¹ destes nutrientes, respectivamente. Apenas o meio GB₅ possui 22,11 mgL⁻¹ de Na e o B&G 11,02 mg L⁻¹ deste elemento.

2.4. Cultivo de *Cattleya bicolor* em diferentes formulações químicas de meio de cultura

Esse experimento foi igual em tudo ao do item anterior, exceto que a espécie utilizada era *Cattleya bicolor* e as plantas tinham apenas três meses de idade, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento.

Foram inoculadas dez plantas por frasco, no delineamento inteiramente casualizado, com três frascos por unidade experimental e quatro repetições. Após seis meses de cultivo, os dados foram interpretados utilizando-se análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o nível de 5 % de probabilidade. Avaliaram-se a produção de matéria fresca e seca e número de folhas e raízes, comprimento das maiores folhas e das maiores raízes.

2.5. Cultivo de *Laelia anceps* var. semi-alba em diferentes formulações químicas de meio de cultura

2.5.1. Efeito dos meios de cultura na germinação

Diferentes formulações químicas de meios de cultura foram utilizadas para avaliar o efeito do meio de cultura na germinação de sementes de *Laelia anceps* var. semi-alba. As sementes foram obtidas, desinfestadas e inoculadas seguindo-se o método já descrito no item 2.1.

Os meios de cultura utilizados foram GB₅ (Gambor, 1968), adubo solúvel comercial Peter's, na formulação 10-30-20 a 3,0 g L⁻¹ e adubo solúvel B&G *orchidée*¹, também a 3,0 g L⁻¹. No meio GB₅ adicionaram-se 20 g L⁻¹ de sacarose e nas formulação Peter's e B&G adicionaram-se 30 g L⁻¹. No meio Peter's foram adicionados 200 mL L⁻¹ de água de coco. O meio B&G foi testado, ainda, sem ou com adição de carvão ativado, empregando-se 2,0 g L⁻¹. As formulações destes meios encontram-se no quadro 1.

¹ Adubo solúvel desenvolvido e em processo de patenteamento pelo professor do Departamento de Solos, Victor Hugo Alvarez V., na UFV. Este adubo vem sendo utilizado por alguns orquidófilos da região de Viçosa-MG, com ótimos resultados, tanto no aspecto nutricional, como de crescimento de plantas adultas.

O pH das três formulações foi ajustado em $5,7 \pm 0,1$, antes da adição de $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (Merck®, K 30920315-230), sendo distribuídos 30 mL de cada meio em frascos de cultivo de 320 cm^3 , diâmetro externo de 6,8 cm, interno de 6,5 cm e altura de 12,5 cm.

Estes recipientes, contendo o meio de cultivo, foram fechados e esterilizados como já descrito.

Sob condições de câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas seguindo o método utilizado por Stenberg e Kane (1998) e, posteriormente, foram inoculadas nos meios de cultura também estéril, à temperatura ambiente, sob condições de câmara de fluxo laminar, pipetando-se 200 μL da suspensão de sementes, de forma que contivesse entre 80 e 100 sementes por frasco.

Os frascos contendo as plântulas foram transferidos para sala de cultivo e incubados à temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiância média de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W).

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente ao acaso, com um frasco por unidade experimental e cinco repetições. Avaliaram-se o número de dias para germinação de 50 % das sementes em cada frasco, considerando como sementes germinadas, aquelas que apresentavam coloração verde e formato globular, ou seja, na fase de protocórmio. Após o período de nove meses de cultivo, avaliaram-se, ainda, a produção de matéria fresca, número de plantas, número de folhas e raízes totais. Os dados foram interpretados utilizando-se análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 %.

2.5.2. Efeito dos meios de cultura no crescimento das vitroplantas

Plantas de *Laelia anceps* var. semi-alba, com três meses de idade, apresentando aproximadamente 1,0 cm de comprimento e obtidas como no item 2.1, a partir do meio de Peter's, foram utilizadas para avaliar o crescimento *in vitro* de plantas dessa espécie.

Os meios de cultura utilizados foram GB₅ (Gambor, 1968), Peter's, na formulação 10-30-20 a $3,0 \text{ g L}^{-1}$ e adubo solúvel B&G, também a $3,0 \text{ g L}^{-1}$. No meio GB₅ adicionaram-se 20 g L^{-1} de sacarose e nas formulações Peter's e B&G adicionaram-se

30 g L⁻¹. No meio Peter's foram adicionados 200 mL L⁻¹ de água de coco. Todos os meios foram testados com adição de 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. As formulações destes meios encontram-se no quadro 1.

O pH das três formulações foi ajustado como descrito anteriormente, assim como não alteraram o modo de distribuição dos meios de cultura, os tipos de frascos empregados, o fechamento destes e a esterilização.

Sob condições de câmara de fluxo laminar, foram transferidas 15 plantas por frasco de cultivo, frascos que foram, então, fechados como já descrito.

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente ao acaso, com um frasco de cultivo por unidade experimental e cinco repetições. Após cinco meses de cultivo, avaliaram-se número de plantas por frasco, número de plantas que formaram bulbos, número de folha por planta, número de raízes por planta, produção de matéria seca das partes aéreas e radiculares. Os dados foram interpretados utilizando-se análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Em todos os experimentos, as avaliações foram realizadas quando as plantas alcançavam o tamanho considerado ideal para a aclimatização, ou seja, plantas com aspecto vigoroso e com folhas e raízes medindo 2,0 cm ou mais de comprimento, como testado em ensaios preliminares (Ventura et al., 2004).

3. RESULTADOS

3.1. Cultivo de *Cattleya loddigesii* em meio de cultura com diferentes concentrações de sais e de sacarose

Todas as variáveis apresentaram respostas quadráticas positivas para concentrações de sacarose em cada uma das três concentrações de Peter's testadas. Para a produção de matéria fresca de folhas e de raízes, as melhores respostas foram obtidas quando se utilizaram 6,0 g L⁻¹ de sais, combinados com 39,5 g L⁻¹ de sacarose. Ainda se observou que, com o aumento da concentração de sais do meio de cultura, era necessário aumentar a concentração de sacarose, para obter maior crescimento das plantas, em matéria fresca e comprimento de folhas e raízes.

Para produção de matéria fresca de folha (Figura 1), as concentrações de 28,5; 37,5; e 39,5 g L⁻¹ de sacarose foram aquelas que proporcionaram as melhores respostas para esta variável, respectivamente para as concentrações de 2,0; 4,0; e 6,0 g L⁻¹ de sais do meio de cultura Peter's.

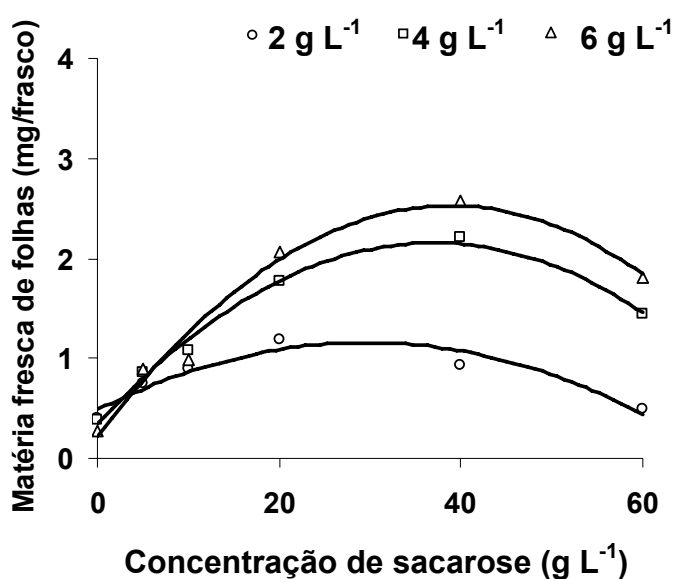


Figura 1- Matéria fresca de folhas de *Cattleya loddigesii* cultivada *in vitro* em função da combinação das concentrações de sacarose e de sais do meio de cultura Peter's, de acordo com as respectivas equações: para 2 g L⁻¹ de Peter's, $\hat{Y} = 0,4853 + 0,0456 * x - 0,0008 * x^2$, $R^2 = 0,9017$; para 4 g L⁻¹, $\hat{Y} = 0,3506 + 0,0975 * x - 0,0013 * x^2$, $R^2 = 0,9899$; e para 6 g L⁻¹, $\hat{Y} = 0,2269 + 0,1186 * x - 0,0015 * x^2$, $R^2 = 0,9731$ (* significativo a 5,0 % de probabilidade pelo teste F).

Em relação à produção de matéria fresca de raízes, os meios de cultura com concentrações de 4,0 e 6,0 g L⁻¹ de sais apresentaram respostas semelhantes (Figura 2), sendo as concentrações de 39,38; 51,17; e 56,09 g L⁻¹ de sacarose, aquelas que resultaram em máximas respostas, respectivamente para as concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 g L⁻¹ de sais do meio de cultura Peter's.

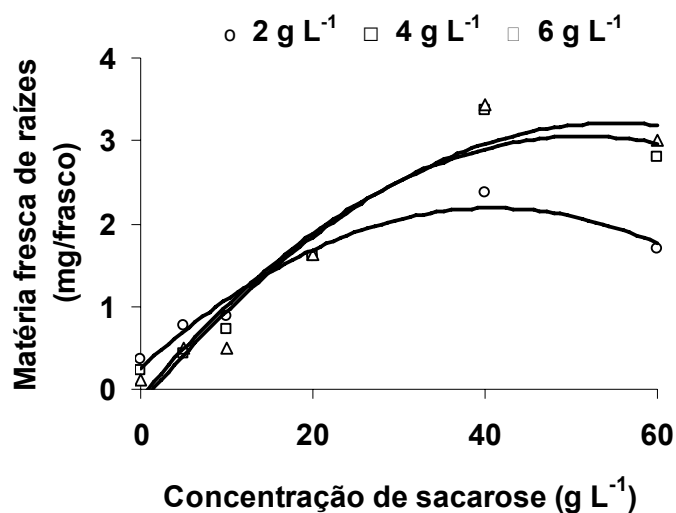


Figura 2- Produção de matéria fresca de raízes de *Cattleya loddgesii* cultivada *in vitro*, em função da combinação das concentrações de sacarose e de sais do meio de cultura Peter's, de acordo com as respectivas equações: para 2 g L⁻¹ de Peter's, $\hat{Y} = 0,2547 + 0,0945 * x - 0,0012 * x^2$, $R^2 = 0,9618$; para 4 g L⁻¹, $\hat{Y} = -0,0972 + 0,1228 * x - 0,0012 * x^2$, $R^2 = 0,9396$; e para 6 g L⁻¹, $\hat{Y} = -0,1804 + 0,1234 * x - 0,0011 * x^2$, $R^2 = 0,9407$ (* significativo a 5,0 % de probabilidade pelo teste F).

Da mesma forma, os resultados de comprimento médio de folhas se aproximaram nas concentrações salinas de 4,0 e 6,0 g L⁻¹, apresentando respostas semelhantes à concentração de sacarose (Figura 3). As concentrações de sacarose que resultaram em maior comprimento de folhas foram 35,44, 44,32 e 40,90 g L⁻¹, e para o maior comprimento de raízes, 45,33; 37,89; e 36,84 g L⁻¹, para as respectivas concentrações salinas 2,0; 4,0; e 6,0 g L⁻¹ de Peter's (Figura 3 e 4, respectivamente).

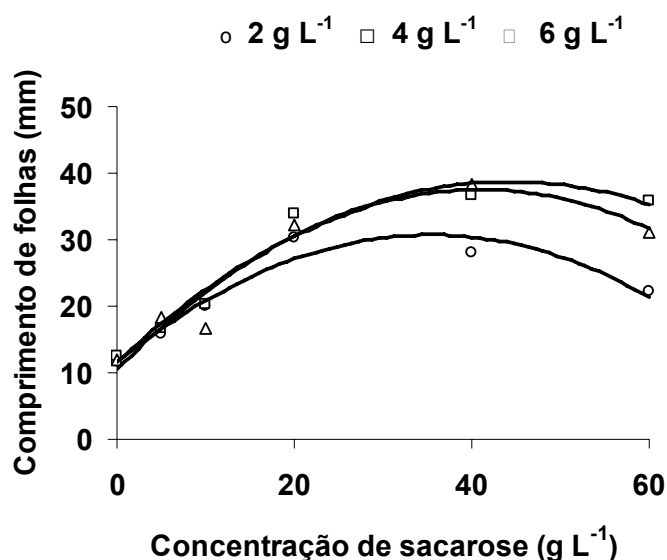


Figura 3- Comprimento de folhas de *Cattleya loddgesii* cultivada *in vitro* em função da combinação das concentrações de sacarose e de sais do meio de cultura Peter's, de acordo com as respectivas equações: para 2 g L⁻¹ de Peter's, $\hat{Y} = -0,0153 * x^2 + 1,0846 * x + 11,545$, $R^2 = 0,9253$; para 4 g L⁻¹, $\hat{Y} = -0,0138 * x^2 + 1,223 * x + 11,642$, $R^2 = 0,9662$; e para 6 g L⁻¹, $\hat{Y} = -0,0161 * x^2 + 1,3169 * x + 10,572$, $R^2 = 0,9321$ (* significativo a 5,0 % de probabilidade pelo teste F).

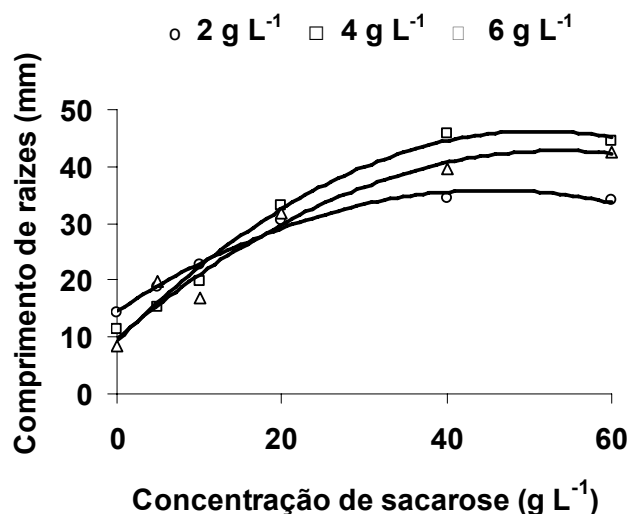


Figura 4- Comprimento de raízes de *Cattleya loddgesii* cultivada *in vitro* em função da combinação das concentrações de sacarose e de sais do meio de cultura Peter's, de acordo com as respectivas equações: para 2 g L⁻¹ de Peter's, $\hat{Y} = 14,598 + 0,9338 * x - 0,0103 * x^2$, $R^2 = 0,9919$; para 4 g L⁻¹, $\hat{Y} = 9,2885 + 1,4462 * x - 0,0141 * x^2$, $R^2 = 0,9872$ e para 6 g L⁻¹, $\hat{Y} = 9,8276 + 1,232 * x - 0,0115 * x^2$, $R^2 = 0,9573$ (* significativo a 5,0 % de probabilidade pelo teste F).

3.2. Cultivo de *Sophronitis coccinea* em diferentes formulações químicas de meio de cultura

Os meios de cultura Peter's, GB₅ e MS apresentaram diferenças significativas nas variáveis produção de matéria fresca, número de plantas por frasco, número e comprimento de raízes, independentemente da adição de carvão ativado (Figura 5).

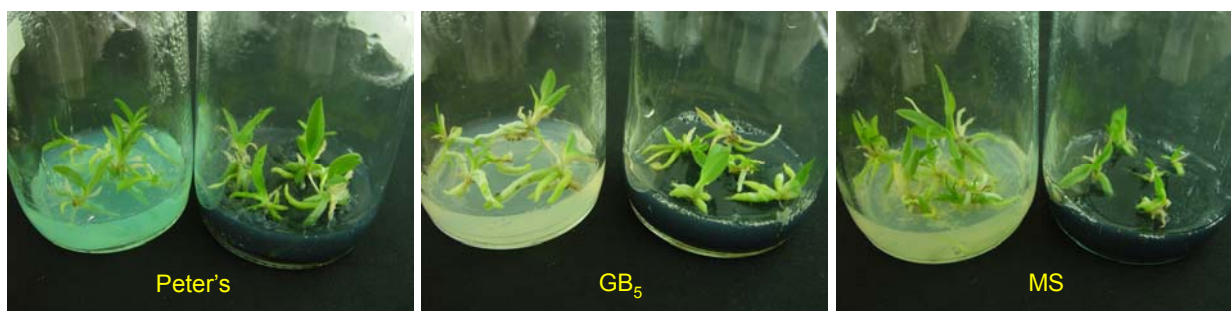


Figura 5- Aspectos visuais de crescimento de vitroplantas de *Sophronitis coccinea*, com seis meses de idade, cultivadas nos meios de cultura Peter's, GB₅ e MS, com 0,0 e 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado.

De acordo com os resultados demonstrados no quadro 2, o meio Peter's proporcionou maior crescimento médio expresso em matéria fresca (6,319 g/frasco), não diferindo do meio GB₅ (4,681 g/frasco), seguido pelo meio MS (3,484 g/frasco). Em relação ao número de vitroplantas por frasco, no meio Peter's também se obteve a maior taxa de multiplicação, apresentando média de 88,3 plantas por frasco, sendo este o meio adequado para o crescimento de parte aérea.

Para as variáveis número e comprimento de folhas não houve diferença significativa entre os meios de cultura utilizados.

Em relação ao número e comprimento de raízes, o meio GB₅ apresentou os melhores resultados, 7,0 raízes por planta e 3,2 cm de raiz, respectivamente, sendo o melhor meio de cultura para o crescimento e desenvolvimento de raízes.

A variável porcentagem de plantas mortas (%PM) apresentou melhor resultado no meio de cultura Peter's (2,41 %), seguida pelo meio GB₅ (12,60 %) e MS (40,00 %).

Quadro 2- Resultados das médias de produção de matéria fresca por frasco (PMF), número de plantas por frasco (NPF), número de folhas por planta (NFP), comprimento de folha (CF), número de raízes por planta (NRP), comprimento de raízes (CR) e porcentagem de plantas mortas (PM) obtidas com a interação de diferentes meios de cultura com 0,0 e 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado.

Variáveis	Adição de carvão	Meios de cultura		
		Peter's	GB ₅	MS
PMF (g)	Sem	3,705	3,518	3,413
	Com	8,933	5,844	3,555
	Média	6,319 A	4,681 AB	3,484 B
NPF	Sem	66,5	40,0	20,7
	Com	110,0	62,3	20,5
	Média	88,3 A	51,1 AB	20,6 B
NFP (g)	Sem	3,8 ^{ns}	3,9 ^{ns}	4,6 ^{ns}
	Com	2,0 ^{ns}	4,7 ^{ns}	3,4 ^{ns}
CF (cm)	Sem	1,9 ^{ns}	1,7 ^{ns}	1,8 ^{ns}
	Com	,6 ^{ns}	2,6 ^{ns}	2,0 ^{ns}
NRP	Sem	6,2	6,8	5,1
	Com	2,3	7,1	3,8
	Média	4,2 B	7,0 A	4,5 B
CR (cm)	Sem	2,9	2,8	1,6
	Com	0,9	3,6	2,0
	Média	1,9 B	3,2 A	1,8 B
PM (%)	Sem	4,25	20,48	32,07
	Com	0,56	4,73	47,92
	Média	2,41 A	12,60 AB	40,00 B

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si, estaticamente, pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05), para cada variável.

3.3. Cultivo de *Cattleya bicolor* em diferentes formulações químicas de meio de cultura

Os melhores resultados foram obtidos com a utilização do meio Peter's com carvão ativado, apresentando um crescimento vigoroso, com elevada formação de raízes (Figura 6).



Figura 6- Aspectos das vitroplantas de *Cattleya bicolor* cultivadas por seis meses nos meios Peter's, GB₅ e MS, com 0,0 e 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado.

De acordo com o quadro 3, no meio Peter's, observaram-se para produção de matéria fresca de folha (MFF) e de raízes (MFR) as respectivas médias 2,124 e 4,591 g/frasco. O maior comprimento médio de folha (CF) foi 3,76 cm, com média de 11,08 raízes por planta (NR), medindo, em média, 6,54 cm (CR).

A variável número de folhas, independentemente do meio utilizado, apresentou diferença significativa referente à adição de carvão. Os meios com carvão apresentaram o maior número de folhas, em média 5,58 folhas por planta.

Os meios de cultura sem carvão ativado não diferiram significativamente para as três variáveis, MFF, MFR e CF, sendo que para o número de raízes por planta (NR) o meio Peter's apresentou melhor resultado (6,42) e para o comprimento de raízes (CR), o meio GB₅ resultou em raízes de 4,30 cm.

Quadro 3- Resultados das médias de matéria fresca de folhas (MFF), matéria fresca de raízes (MFR), comprimento de folha (CF), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) obtidas com a interação de diferentes meios de cultura com 0,0 e 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado.

Variáveis	Adição de carvão	Meios de cultura		
		Peter's	GB ₅	MS
MFF (g)	Sem	0,2915 Ab	0,3790 Ab	0,2200 Ab
	Com	2,1245 Aa	1,3678 Ba	1,0148 Ba
MFR (g)	Sem	0,6430 Ab	0,7395 Ab	0,1320 Aa
	Com	4,5913 Aa	2,2198 Ba	0,8580 Ca
CF (cm)	Sem	1,30 Ab	1,16 Ab	0,93 Ab
	Com	3,76 Aa	2,29 Ba	2,30 Ba
NR	Sem	6,42 Ab	5,42 Ba	3,92 Bb
	Com	11,08 Aa	6,00 Ba	6,50 Ba
CR (cm)	Sem	2,58 Bb	4,30 Aa	1,51 Bb
	Com	6,54 Aa	4,82 Ba	2,60 Ca

Médias seguidas da mesma letra maiúscula, no sentido horizontal, ou da mesma letra minúscula, no sentido vertical, não diferem entre si, estaticamente, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), para cada variável.

3.4. Cultivo de *Laelia anceps* var. semi-alba em diferentes formulações químicas de meio de cultura

3.4.1. Efeito dos meios de cultura na germinação

As sementes desta espécie levaram de 29 a 58 dias para germinar. Este intervalo de tempo foi dependente dos meios de cultura. O meio GB₅, sem carvão ativado, foi o mais rápido para a germinação, apenas 29 dias, seguido do meio B&G com carvão (39 dias), Peter's (48 dias) e B&G sem carvão (58 dias) (Figura 7).

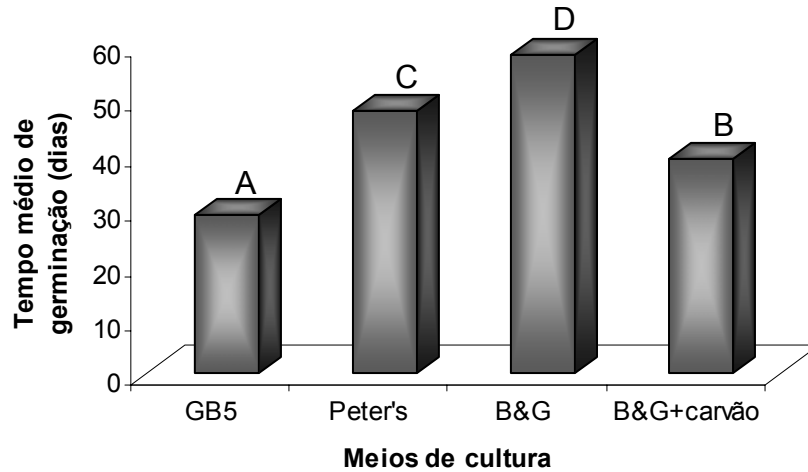


Figura 7 - Tempo médio de germinação *in vitro* de sementes de *Laelia anceps* var. semi-alba, em função dos meios de cultura GB₅, Peter's, B&G sem ou com adição de carvão ativado.

Em relação à produção de matéria fresca, os meios B&G com carvão ativado, GB₅ e Peter's não diferiram entre si, apresentando resultados médios de 5,54, 5,35 e 4,00 g/frasco, respectivamente, para esta variável (Figura 8).

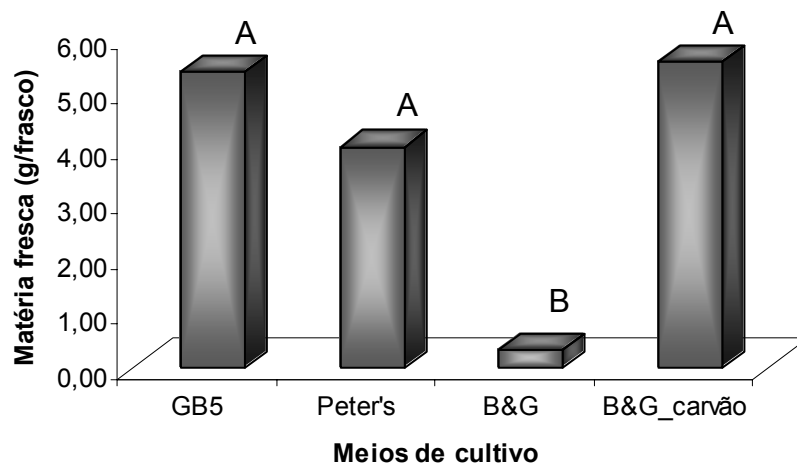


Figura 8 - Produção de matéria fresca de vitroplantas de *Laelia anceps* var. semi-alba, cultivadas em função dos meios de cultura GB₅, Peter's, B&G sem ou com adição de carvão ativado.

Para a variável número total de vitoplantitas por frasco, não houve diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade.

O número total de folhas por frasco apresentou melhores resultados nos meios GB₅ (406) e no meio B&G com carvão (376) (Figura 9).

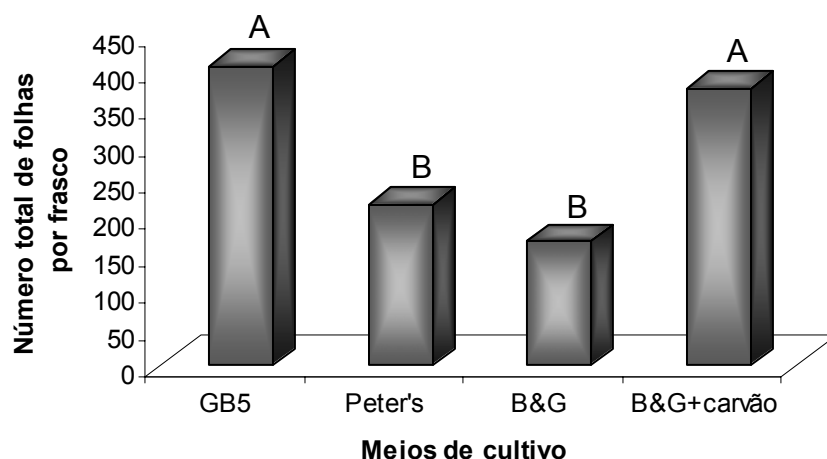


Figura 9 - Número total de folhas por frasco das vitroplantas de *Laelia anceps* var. semi-alba, cultivadas em função dos meios de cultura GB₅, Peter's, B&G sem ou com adição de carvão.

Para o número de raízes, sem diferenciá-las em tamanho, os meios B&G com carvão, Peter's e GB₅ apresentaram maiores respostas, sendo obtido um total de 349, 315 e 267 raízes por frasco, respectivamente. No meio B&G sem carvão houve formação de apenas 10 raízes (Figura 10).

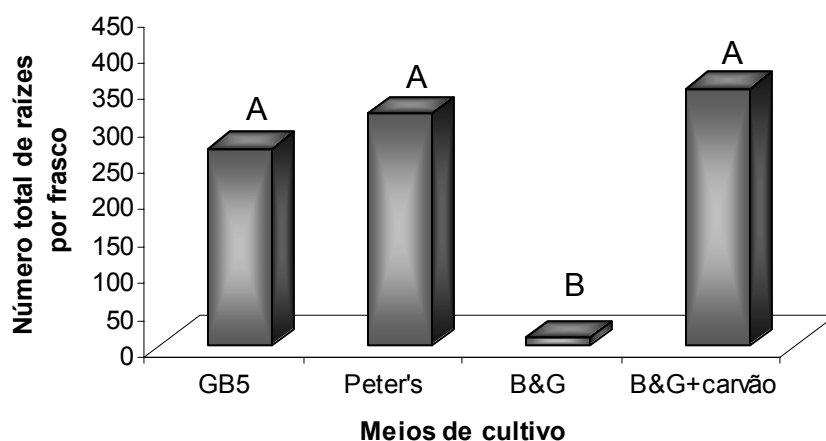


Figura 10 - Número total de raízes de vitroplantas de *Laelia anceps* var. semi-alba, cultivadas em função dos meios de cultura GB₅, Peter's, B&G sem ou com adição de carvão.

3.4.2. Efeito dos meios de cultura no crescimento e desenvolvimento das vitroplantas

As vitroplantas cresceram de maneira satisfatória em todos os meios de cultivo contendo carvão ativado. Entretanto, no meio B&G, as vitroplantas, além de apresentarem crescimento superior, foi observado a formação de pequenos pseudobulbos (Figura 11).

A produção de matéria seca de folhas e de raízes foram maiores no meio B&G, apresentando 0,2390 g e 0,4994g, respectivamente (Figuras 12 e 13).

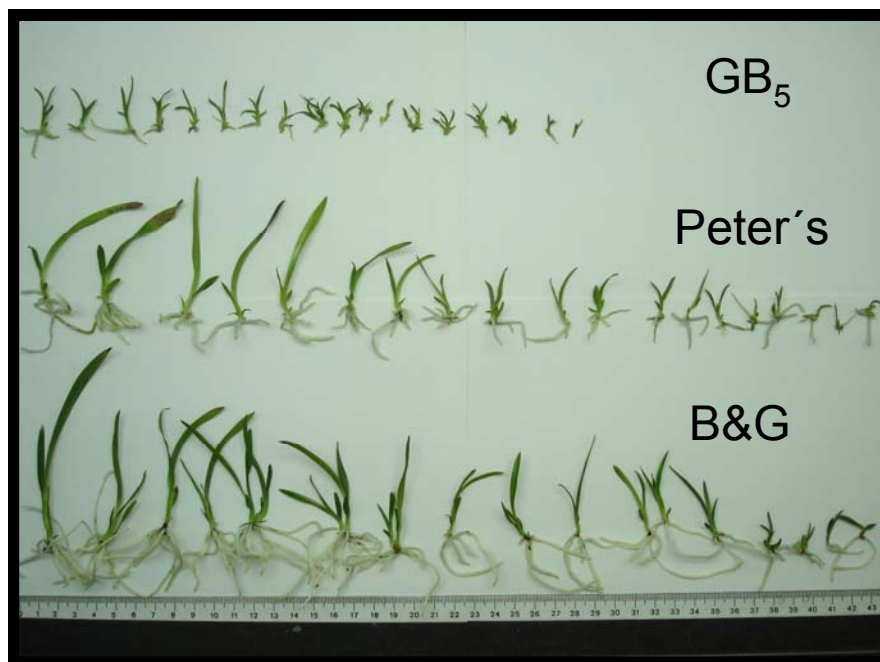


Figura 11 - Aspectos das vitroplantas de *Laelia anceps* variedade semi-alba cultivadas nos meios Peter's, GB₅ e B&G, com adição de carvão ativado em todos os meios.

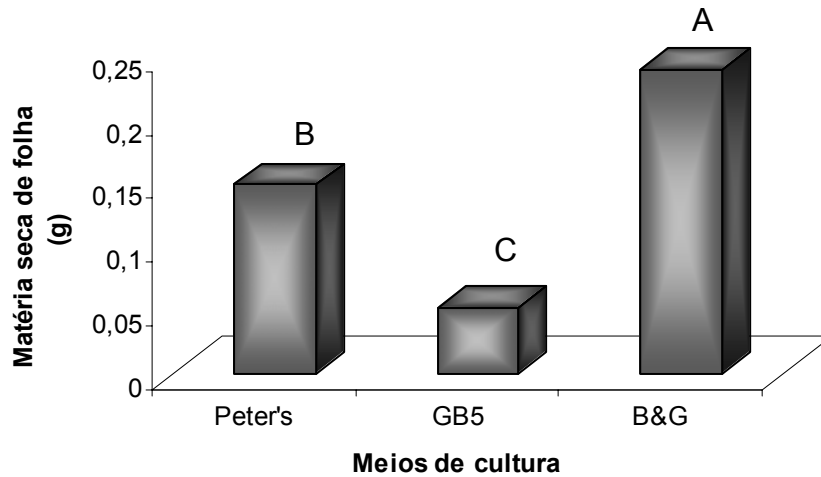


Figura 12 - Matéria seca de folha de vitroplantas de *Laelia anceps* variedade semi-alba, cultivadas em função dos meios de cultura GB₅, Peter's, B&G, todos os meios contendo carvão ativado.

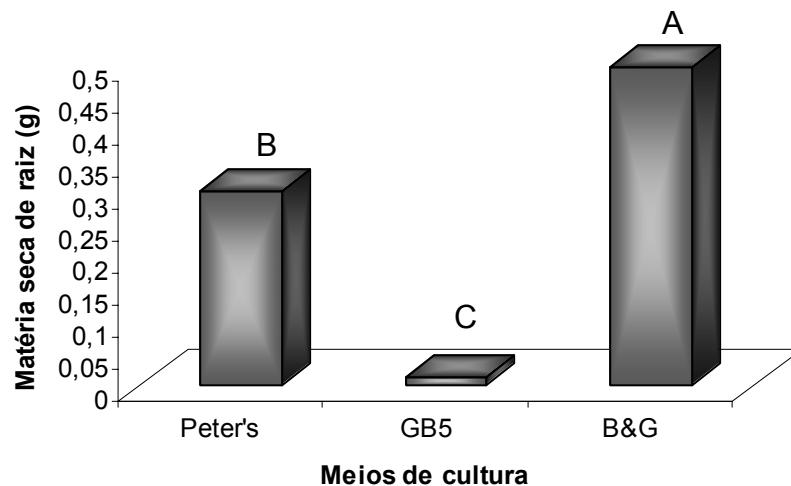


Figura 13 - Matéria seca de raiz de vitroplantas de *Laelia anceps* variedade semi-alba, cultivadas em função dos meios de cultura GB₅, Peter's, B&G, todos os meios contendo carvão ativado.

Observou-se que o número de folhas por planta não variou significativamente, resultando, em média, 4,6 folhas por vitroplanta cultivada no meio GB₅, 4,2 folhas por vitroplanta, quando cultivada no meio B&G e 3,5, no meio Peter's (Figura 14).

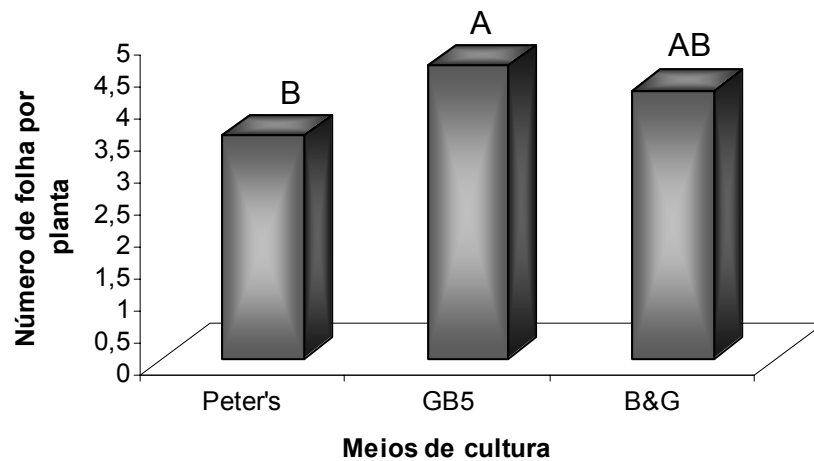


Figura 14 - Número de folha por planta de vitroplantas de *Laelia anceps* variedade semi-alba, cultivadas em função dos meios de cultura GB₅, Peter's, B&G, todos os meios contendo carvão ativado.

Em relação ao número de raízes, observou-se uma grande diferença entre os tratamentos. Nos meios de cultura B&G e Peter's houve formação de maior número de raízes por planta (6,3 e 5,6, respectivamente). No meio GB₅, as vitroplantas apresentaram somente 1,2 raízes por planta (Figura 15).

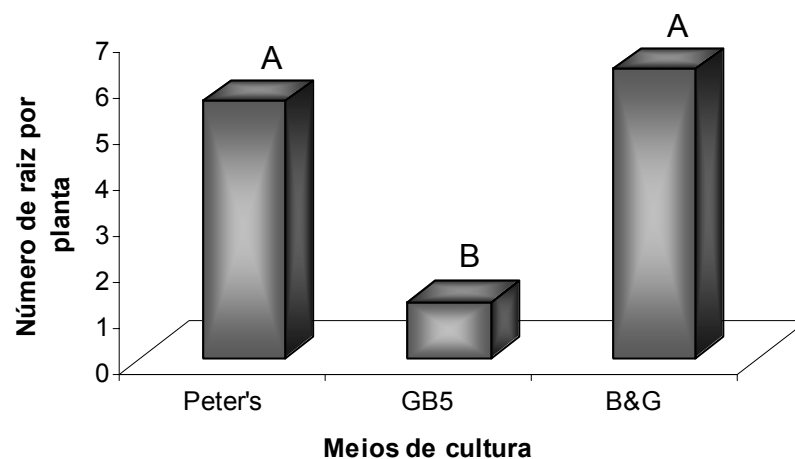


Figura 15 - Número de raízes por vitroplanta de *Laelia anceps* variedade semi-alba, cultivadas em função dos meios de cultura GB₅, Peter's, B&G, todos os meios contendo carvão ativado.

Para avaliar o comprimento de folhas das vitroplantas (Figura 16), foi estabelecida a frequência de plantas que apresentaram o comprimento menor que 2,0 cm, entre 2,0 e 5,0 cm e maior que 5,0 cm. Observou-se que o meio B&G apresentou a maior frequência de plantas com folhas maiores que 5,0 cm (49 %), no mesmo período de cultivo. A frequência de vitroplantas com comprimento de folhas entre 2,0 e 5,0 cm não diferiu estatisticamente entre os tratamentos. O meio de cultura GB₅ apresentou a maior frequência de plantas (62,2 %) com o menor comprimento de folhas.

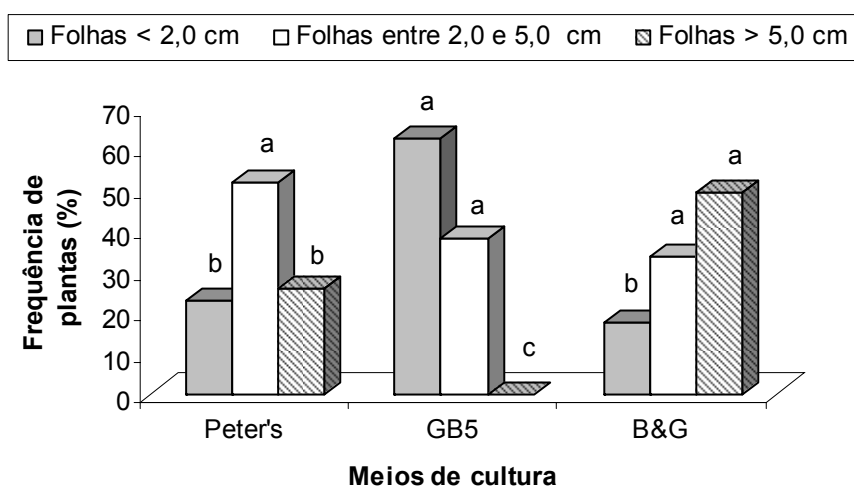


Figura 16 - Frequência de vitroplantas de *Laelia anceps* var. semi-alba com os respectivos comprimentos de folhas, menor que 2,0 cm; entre 2,0 e 5,0 cm; e maiores que 5,0 cm, cultivadas em função dos meios de cultura GB₅, Peter's e B&G.

Da mesma forma, para avaliar o comprimento de raízes (Figura 17), calculou-se a frequência de plantas que apresentaram o comprimento menor que 2,0 cm, entre 2,0 e 4,0 cm e maior que 4,0 cm. Observou-se que o meio B&G apresentou a maior frequência de plantas com raízes maiores que 4,0 cm (60,4 %). A frequência de plantas com comprimento de raízes entre 2,0 e 4,0 cm foi maiores nos meios Peter's (34,3 %) e B&G (23,6 %). O meio de cultivo GB₅ apresentou a maior frequência de plantas com o menor comprimento de raízes (98,8 %).

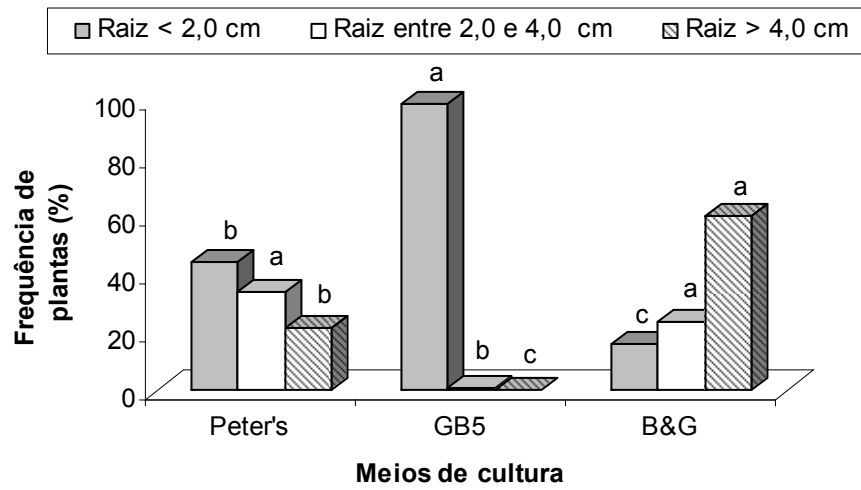


Figura 17 - Frequência de vitroplantas de *Laelia anceps* var. semi-alba com os respectivos comprimentos de raízes, menor que 2,0 cm; entre 2,0 e 4,0 cm; e maiores que 4,0 cm, cultivadas em função dos meios de cultura GB₅, Peter's e B&G.

4. DISCUSSÃO

No primeiro experimento, foi utilizado o meio de cultura composto do adubo Peter's, em três formulações testadas e seis concentrações de sacarose no cultivo de *Cattleya loddigesii*. Observou-se que os melhores resultados foram obtidos com o aumento das concentrações dos sais (até 6,0 g L⁻¹), assim como da de sacarose (até, aproximadamente, 40 g L⁻¹).

Rego-Oliveira et al. (2003) estudaram o efeito de diferentes concentrações e fontes de carbono no crescimento de *Oncidium varicosum*. Utilizaram-se plântulas com 0,8 ± 0,2 cm de comprimento cultivadas no meio MS, metade da força dos macronutrientes, acrescido de sacarose, maltose e glicose, nas concentrações de 0,0; 10,0; 20,0; 60,0; e 90,0 g L⁻¹. Avaliaram-se altura de plantas, número de raízes, maior comprimento de raiz, diâmetro de pseudobulbo e matéria fresca. Concluíram que 60,0 g L⁻¹ de sacarose foi o melhor tratamento para todas as características. As concentrações de 30,0 g L⁻¹ de glicose e 60,0 g L⁻¹ de maltose também foram adequadas, porém o diâmetro de pseudobulbo e a produção de matéria fresca das plantas foram inferiores aos de 60,0 g L⁻¹ de sacarose.

Fráguas et al. (2003) relataram o crescimento *in vitro* de plântulas do híbrido *Cattleya labiata x Laelia itambana* cultivadas no meio Knudson (1946). Empregaram esse meio em cinco formulações (0; 50; 100; 150; e 200 % da formulação original) em combinação com cinco concentração de sacarose (0,0; 10,0; 20,0; 30,0; e 40,0 g L⁻¹). O meio foi acrescido de 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. Concluíram que o meio de Knudson, em sua concentração original e com 20,0 g L⁻¹ de sacarose, proporcionou crescimento satisfatório das plântulas.

Rodrigues (2005) estudou o cultivo de plântulas de *Cattleya walkeriana* em sete concentrações (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; e 10 g L⁻¹) do adubo comercial Peter's, com formulação 10-30-20, acrescido com micronutrientes. Foi obtida máxima produtividade de matéria seca de parte aérea com 5,22 g L⁻¹ daquele fertilizante. Concluiu-se que a relação de massa de raiz/parte aérea decresceu com o aumento da dose do fertilizante. Também, altas concentrações (10 g L⁻¹) de sais no meio demonstraram ser prejudiciais ao crescimento *in vitro* dessa espécie de orquídeas. O autor concluiu ainda que o uso de formulações NPK (10-30-20), contendo impurezas de micronutrientes é tão eficiente, ou, melhor que os meios mais complexos, resultando em crescimentos mais vigorosos das plantas.

No segundo e terceiro experimento, os meios MS (Murashige e Skoog, 1962), GB₅ (Gambor et al., 1968) e Peter's foram testados com a adição ou não de carvão ativado, utilizando plantas de *Sophronitis coccinea* e *Cattleya bicolor*, respectivamente, com parte aérea e raízes bem desenvolvidas, com aproximadamente 1,0 a 2,0 cm de comprimento.

Para o cultivo de plantas de *Sophronitis coccinea*, os meios Peter's, seguido do GB₅ e MS, sem carvão ativado resultaram em maiores produções de matéria fresca e número de plantas. Para o crescimento de raízes, o meio GB₅ sem adição de carvão ativado proporcionaram melhores respostas.

Quando se adicionou carvão ativado ao meio de cultura para o cultivo de *Cattleya bicolor*, observou-se melhor resposta a todas as variáveis avaliadas, destacando-se como melhor o meio Peter's, sem se diferir do meio GB₅, seguido pelo meio MS. As vitroplântulas se beneficiaram claramente com a presença de carvão no meio de cultura, provavelmente devido à adsorção de substâncias fenólicas, exsudadas pelas próprias plantas, e possíveis gases tóxicos, como por exemplo etileno, que em altas concentrações pode causar senescência das folhas e morte das plantas (Faria, 2002; Hinnen et al., 1989).

As duas espécies possuem características morfológicas bem distintas uma da outra. A *C. bicolor* possui maior altura de planta, comprimento de folhas e raízes se comparada com *S. coccinea*, visto que, no início do experimento, as duas espécies possuíam o mesmo tamanho de plantas com diferentes idades, 3 e 9 meses, respectivamente. Após o período de cultivo, as vitroplantas de *C. bicolor* apresentavam maiores médias das variáveis analisadas, demonstrando seu crescimento precoce em relação à *S. coccinea*.

Hinnen et al. (1989) compararam a utilização de macronutrientes dos meios de Murashige e Skoog (1962), Knop (1865), Knudson C (1946) e Gambor B5 (1968) utilizando 0,5; 1,0; e 1,5 força no crescimento *in vitro* de plântulas de híbrido de *Phalaenopsis*. Melhores resultados foram obtidos no meio constituído com os macronutrientes de GB₅ a 1,0 força. Semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho, no qual o meio GB₅ supera o MS e, algumas vezes, não diferindo significativamente.

Moraes et al. (2005) pesquisaram o efeito da adição de carvão ativado no crescimento *in vitro* das orquídeas nativas do Brasil: *Miltonia flavescens*, *Oncidium trulliferum* e *Laelia flava*. Verificaram que a adição de carvão ativado ao meio melhora

tanto o crescimento *in vitro*, como a sobrevivência pós-transplântio. Plântulas com três meses de idade, germinadas *in vitro*, foram transferidas para os meios MS (Murashige e Skoog, 1962), apresentando ½ força e força completa dessa formulação, ambas sendo testadas sem adição de carvão ativado e, também, acrescidas de duas concentrações de carvão ativado (1,0 e 2,0 g L⁻¹). Concluíram que a adição de carvão ativado causou melhor qualidade e sobrevivência das plantas, após o transplântio, das três espécies estudadas. Entretanto, as espécies responderam diferentemente para os meios empregados. Melhores resultados foram observados para *M. flavescens* e para *L. flava*, quando se utilizou o meio ½ força de MS, acrescido de 2,0 g L⁻¹ de carvão; e, para *O. trulliferum*, o meio MS total, adicionado de 1,0 g L⁻¹ de carvão auferiu melhores respostas.

No quarto experimento, do presente trabalho, utilizando-se sementes e plântulas de *Laelia anceps* var. semi-alba, testou-se a germinação de sementes e o crescimento de plantas desta espécie nos meios de cultura Peter's, GB₅ e B&G sem adição de carvão ativado e um tratamento de B&G com adição de carvão.

Características do adubo solúvel B&G Orquídeas já foram mencionadas, anteriormente no sub-item 2.5.2. Testes preliminares com este adubo em meio de cultura demonstraram a possibilidade de utilizá-lo como fonte de nutrientes, resultando em um meio de baixo custo e adequado balanço nutricional.

Foi observado que o meio GB₅ apresentou menor número de dias para a germinação, provavelmente por ser um meio mais rico em nutrientes, com maior concentração salina (1.614 mg L⁻¹), seguido dos meios com concentrações salinas menores, B&G com carvão (714 mg L⁻¹), Peter's (557 mg L⁻¹) e B&G sem carvão. Entretanto, GB₅ e B&G com carvão não apresentaram diferenças estatísticas significativas para as variáveis produção de matéria fresca, número de folhas e de raízes, sendo que o Peter's demonstrou não ser diferente estatisticamente dos dois meios anteriores, em relação à produção de matéria fresca e ao número de raízes. Com relação ao meio B&G sem carvão ativado, observou-se reduzido crescimento e desenvolvimento de protocormos. Em contraste, o meio B&G com adição de carvão ativado beneficiou claramente a germinação e crescimento dos protocormos de *Laelia anceps* var. semi-alba. Esta resposta pode ser explicada, segundo Wannakrairoj e Tanyasonti (1996), pela adsorção química ou física pelo carvão ativado de alguns elementos essenciais, que poderiam estar em altas concentrações, principalmente os micronutrientes, prejudicando a germinação das sementes e o crescimento dos

protocormos. Esta poderia, também, ser a explicação para a eficiente resposta do meio B&G mais carvão ativado, no crescimento e desenvolvimento das vitroplantas da referida espécie, resultando em plantas vigorosas, com intenso crescimento de parte aérea e radicular, desenvolvendo-se pseudobulbos ainda *in vitro*.

Pan e Staden (1998) relataram que a adsorção pelo carvão ativado de minerais e substâncias orgânicas, tais como tiamina, piridoxina, ácido fólico, reguladores de crescimento, ferro quelatizado e zinco, pode resultar em efeitos nocivos ao cultivo *in vitro*; contrariamente, resultaria em efeitos benéficos, em caso de excesso de nutrientes.

A forma do N fornecida às plantas tem grande influência na absorção de nutrientes. O meio GB₅ apresenta maior concentração de nitrogênio total (374 mg L⁻¹), sendo 92,5 % dela na forma nítrica e apenas 7,5 % na forma amoniacal, apresentando ótimo crescimento para as plântulas neste experimento. O meio B&G apresenta bem menos da metade dessa concentração, ou seja, é utilizado 68,2 % de N-NH₄ e 31,8 % N-NO₃, dos 154 mg L⁻¹ de N-total. O meio Peter's é constituído por aproximadamente 50 % das duas formas, nos 200 mg L⁻¹ de N total.

Segundo Sharma e Tandon (1992), embora o NH₄⁺ seja adequado para certas plantas como fonte de N, em pequenas quantidades pode ser essencial para o crescimento. Em outros casos, entretanto, NH₄⁺ pode ser prejudicial ao crescimento. O escurecimento e desidratação de explantes em meios contendo amônio (sulfato de amônio) podem ser devido à toxidez amoniacal que é causada por acúmulo de N, quando NH₄⁺ é utilizado em altas concentrações. Para esses autores, aminoácido fornecido puro ou em mistura não tem beneficiado o crescimento *in vitro* de orquídeas (Sharma e Tandon, 1992).

Majerowicz et al. (2002) relataram que, para o gênero *Catasetum*, fontes NO₃⁻ estimulam a produção de raízes, enquanto as fontes NH₄⁺ parecem restringir o crescimento da parte aérea destas plantas.

O meio B&G, apesar de apresentar uma concentração salina intermediária em relação aos outros dois meios de cultura (GB₅ e Peter's), apresentou maior concentração de Ca, Mg, S, e dos micronutrientes Fe, Zn, B e Cu, proporcionando melhores resultados no crescimento vegetativo.

O meio constituído pelo Peter's apresentou os maiores teores de P (131 mg L⁻¹) e N-NH₄ (98 mg L⁻¹), entretanto, as concentrações de micronutrientes foram reduzidas e ausentes em Ca e S. A deficiência de Ca em orquídeas acarreta morte de regiões de crescimento meristemático, como ápices radiculares e vegetativos, além de tornarem a

planta mais susceptível a pragas e doenças (Marschner, 1995), apresentando sintomas de deficiência no decorrer do período de cultivo *in vitro*. A adição de água de coco, por sua vez, pode amenizar esta deficiência, suprimindo a carência de Ca, como constatado por Rodrigues (2005).

Provavelmente, a água de coco adicionada ao meio de cultura induz a divisão celular e promove o rápido crescimento das plantas. Apresenta em sua composição sais minerais, açúcares, reguladores de crescimento (auxinas, giberelinas e citocininas), proteínas, além de vitaminas e outros componentes orgânicos (George, 1993). Segundo esse autor, a água de coco possui elevada concentração de K e apresenta quantidades de Ca equivalentes às aquelas adicionadas, na forma de cloreto de Ca ao meio GB₅ e a um terço da quantidade adicionada no meio MS.

As plântulas de *Laelia anceps* var. semi-alba, quando cultivadas no meio Peter's, não apresentaram sintomas de deficiência de Ca, sendo verificado um crescimento vegetativo satisfatório, obtendo melhores resultados em comparação com as plantas cultivadas no meio GB₅.

Rego-Oliveira et al. (2005) relataram a utilização de meios de cultura tradicionais e formulações com fertilizantes comerciais no cultivo de plantas *in vitro* de orquídeas brasileiras, *Catasetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaensis*. Esses autores encontraram os melhores resultados com os meios tradicionais diluídos, diferentemente do encontrado pelos experimentos realizados no presente trabalho. Aqueles autores empregaram o meio de cultura de Murashige e Skoog (1962): MS 1,0 força; MS ½ força; e MS ¼ da força dos macronutrientes; e os meios de cultura de Vacin e Went e de Knudson C, além dos adubos comerciais com as formulações NPK (10-5-5), 2,0 mL L⁻¹ e NPK (10-30-20), 3,0 g L⁻¹. Os melhores resultados para o crescimento vegetativo de *C. fimbriatum* foram os meios MS com 1 força e com ¼ dos macronutrientes e, para o número de raízes, o melhor meio de cultura foi o MS modificado com ½ da força. Para *C. paranaensis*, os melhores meios foram o MS modificado com metade da força e ¼ da força, respectivamente para o crescimento da parte aérea e para o enraizamento.

Os diversos experimentos realizados no presente trabalho demonstraram que foi possível obter plantas vigorosas com a utilização de meios alternativos mais simples, com o emprego de fertilizantes hidrossolúveis comerciais em substituição dos meios de cultivo com formulações mais complexas, reduzindo o tempo de cultivo e diminuindo os custos de produção.

5. CONCLUSÕES

- No cultivo de plantas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de sais e de sacarose, melhores respostas de crescimento foram obtidas quando se utilizaram 6,0 g L⁻¹ do adubo comercial Peter's, na formulação 10-30-20, acrescido de aproximadamente 40 g L⁻¹ de sacarose.
- Para o cultivo de plantas de *Sophronitis coccinea* em diferentes formulações químicas de meio de cultura, os meios Peter's, seguido do GB₅ e MS, sem carvão ativado resultaram em maiores produções de matéria fresca e número de plantas. Para o crescimento de raízes, o meio GB₅ sem adição de carvão ativado proporcionaram melhores respostas.
- Em relação ao cultivo de plantas de *Cattleya bicolor* em diferentes formulações químicas de meio de cultura, melhores resultados foram obtidos com a utilização do meio Peter's, acrescido de carvão ativado, com crescimento vigoroso e grande formação de raízes.
- Quando se testou o efeito dos meios de cultura na germinação de *Laelia anceps* variedade semi-alba, os meios de cultura GB₅ e B&G com carvão ativado demonstraram promover maior rapidez na germinação *in vitro* das sementes, além de satisfatório para o crescimento e desenvolvimento de protocormos e vitroplantas.
- Quando se estudou os efeitos dos meios de cultura no crescimento das vitroplantas de *Laelia anceps* variedade semi-alba, concluiu-se que os meios de cultura B&G e Peter's com adição de carvão ativado constituíram-se nos melhores meios, formando plantas vigorosas, com maior comprimento de folhas e raízes, em comparação ao meio tradicional de Gambor.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ARDITTI, J; ERNST, R. Micropropagation of orchids. 1a ed. New York, Chinchester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons, Inc., 1992. 682p.
- FARIA, R.T.; SANTIAGO, D.C.; SARYDAKIS, D.P.; ALBINO, U.B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. Crop Breed. Appl. Biotec., 2: 489-492, 2002.
- FRÁGUAS, C.B.; VILLA, F.; SOUZA, A.V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. Rev. Ceres, 50:719-726, 2003.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutriente requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experim. Cell Res., 50:151-158, 1968.
- GEORGE, E.F. Components of culture media. In:_____. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology. 2a ed. Basingstoke, Exegetics Limited, 1993. p.338-343.
- HINNEN, M.G.J.; PIERIK, R.L.M.; BRONSEMA, F.B.F. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro*. Sci. Hortic., 41, 105-116, 1989.
- MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G.B.; NIEVOLA, C.C.; SUZUKI, R.M. Effects of nitrogen forms on dry matter partitioning and nitrogen metabolism in two contrasting genotypes of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). Environ. Exp. Bot., 47:249-258, 2002.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London, Academic Press. 1995. 888p.
- MORAES, L.M.; FARIA, R.T.; CUQUEL, F.L. Activated charcoal for *in vitro* propagation of brazilian orchids. Acta Hort.. (ISHS) 683:383-390, 2005.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15:473-497, 1962.
- PAN, M.J.; STADEN, J.van. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. Plant Growth Reg., 26:155-163, 1998.
- REGO-OLIVEIRA, L.V.; 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. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 24:265-272, 2003.

- REGO-OLIVEIRA, L.V.; FARIA, R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizant formulations. *Acta Sci. Agron.*, 27:1-5, 2005.
- RODRIGUES, D.T. Nutrição e fertilização de orquídeas *in vitro* e em vasos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 87p. (Tese de Mestrado).
- SHARMA, A.; TANDON, P. *In vitro* of *Dendrobium wardianum* Warner: Morphogenetic effects of some nitrogenous adjuvants. *Indian J. Plant Physiol.*, 35:80-85, 1992.
- STANCATO, G.C.; MAZZAFERA, P.; BUCKERIDGE, M.S. Effect of a drought period on the mobilization of non_structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiol. Bioch.*, 39:1009-1016, 2001.
- STENBERG, M.L.; KANE, M.E. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. erythronioides, and endangered Florida orchid. *Lindleyana*, 13:101-112, 1998.
- VENTURA, G.M. Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 147p. (Tese de Mestrado).
- VENTURA, G. M.; CARVALHO, V. S.; LOCATELLI, M. V.; SOUZA, L. O.; DIAS, J. M. M. Influência de alguns substratos hortícolas na aclimatização de vitroplantas do grupo *Cattleya*. In: IV ENSUB - Encontro Nacional sobre Substrato para Plantas, 2004, Viçosa - MG. Nutrição e adubação de plantas cultivadas em substrato. Viçosa - MG: Editora UFV, 2004. p. 351-351.
- WANNAKRAIROJ, S.; TANYASONTI, P. Micronutrient and pH requeriments for micropropagation of monopodial orchids. *J. Orchid Soc. India*, 10:13-17, 1996
- WATANABE, D. Orquídeas: manual de cultivo: 506 fotos de espécies. São Paulo: AOSP-Associação Orquidófila de São Paulo, 2002. 296 p.

EFEITO DOS NÍVEIS DE IRRADIÂNCIA SOBRE O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Laeliocattleya* ‘Guadalajara’

RESUMO

Recentes pesquisas têm demonstrado os efeitos positivos para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de várias espécies, por meio do aumento da irradiância, entretanto, a absorção excessiva de luz pelas folhas, no ambiente *in vitro*, pode causar distúrbios fisiológicos que, por sua vez, podem limitar o crescimento e a reprodução das plantas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos níveis de irradiância sobre o crescimento *in vitro* do híbrido *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Lc.* ‘Guadalajara’. Utilizaram-se plantas deste híbrido com quatro meses de idade, inicialmente germinadas e mantidas *in vitro*, no meio basal GB₅ (Gambor *et al.*, 1968). Estas plantas foram cultivadas neste mesmo meio acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. O pH dos meios de cultivo foi ajustado em 5,7 ± 0,1, antes da adição de 8 g L⁻¹ de ágar (Merck®). Os frascos contendo os explantes foram incubados na sala de cultivo sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e sob diferentes níveis de irradiância (12; 25; 50; 100 e 150 μmol m⁻² s⁻¹), formando os respectivos tratamentos. Foram inoculadas cinco plantas por frasco, analisados no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Após seis meses de cultivo, avaliaram-se a produção de matéria seca; número de folhas e raízes; concentração da clorofila *a*, *b* e carotenóides, com suas respectivas relações; e fluorescência da clorofila *a*. Este híbrido apresentou grande plasticidade, adaptando-se aos diferentes níveis de irradiância. Para o crescimento das vitroplantas, a irradiância de 65 μmol m⁻² s⁻¹ proporcionou melhores resultados. Observou-se redução na concentração dos pigmentos avaliados com o aumento da irradiância. Pela análise da fluorescência da clorofila *a*, as maiores irradiâncias resultaram em maior taxa de transportes de elétrons, entretanto, com maior dissipação de energia por outros processos que não o fotoquímico, por exemplo, conversão do excesso de excitação em calor ou fluorescência, sendo observada reduzida fotoinibição.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* é uma técnica considerada essencial à multiplicação massal de orquídeas, dado reduzido rendimento dos métodos clássicos de propagação, seminífero ou vegetativo, por meio da divisão de mudas (Arditti e Ernest, 1992; Prakash et al., 1996). Não obstante, muitos aspectos do cultivo *in vitro* dessas plantas ainda são pouco estudados, dentre estes, os fatores nutricionais e ambientais.

As modificações nas condições ambientais na sala de cultivo e, mais específicos, no ambiente interno dos frascos de cultivo, tais como luz, temperatura, umidade relativa do ar, meio de cultura e concentração de gases, como etileno e CO₂, são de extrema importância para a propagação *in vitro*, pois visam aumentar a capacidade fotossintética das vitroplantas e que, em última análise irá favorecer o êxito da fase de aclimatização destas vitroplantas (Gouk et al., 1999).

A maioria dos trabalhos sobre ambiência do cultivo de orquídeas é referentes aos aspectos *ex vitro*. Chen e Wang (1996) estudaram as irradiâncias fotossinteticamente ativas no cultivo *ex vitro* do gênero *Phalaenopsis*; He et al. (1998) relataram a suscetibilidade de folhas e flores de *Dendrobium Sonia* às altas intensidades de luz e temperatura em condições naturais; Gouk et al. (1999) estudaram as mudanças da capacidade fotossintética e da produção de carboidratos em plântulas cultivadas *in vitro* de orquídeas epífitas (*Arachnis hookeriana* x *Ascocenda Madame Kenny*), apresentando metabolismo ácido crassuláceo (CAM) expostas à elevada concentração de CO₂; Stancato et al. (2002) pesquisaram o efeito do estresse luminoso sobre o crescimento *ex vitro* de *Cattleya forbesii* x *Lc. tenebrosa* em ambientes sombreados e sob alta irradiância; e Lin e Hsu (2004) demonstraram a plasticidade fotossintética de *Phalaenopsis amabilis* crescidas em diferentes irradiâncias, também em condições *ex vitro*.

Em condições de cultivo *in vitro*, geralmente ocorre baixa regulação da atividade da Rubisco, devido à fonte de carbono adicionada ao meio de cultura, sugerindo que possa haver inibição da fotossíntese. Condições de excesso de luz e limitado metabolismo do carbono estimulam o aumento da dissipação de energia por outra forma, que não a via fotoquímica, por exemplo, por calor ou fluorescência (Huylenbroeck et al., 1998).

Na prática, a evolução da resposta fotossintética de plantas é avaliada por meio da fluorescência da clorofila *a*. Isto porque tem sido demonstrado, experimentalmente,

que a relação da fluorescência variável (F_v) dividida pela fluorescência máxima (F_m) é indicativo da taxa fotossintética em folhas intactas, medida como fixação de CO_2 ou evolução de O_2 . Esta relação é afetada pelo estresse, particularmente pela fotoinibição, que ocorre principalmente quando as plantas são expostas a altos níveis de irradiância, ou reduzida concentração de CO_2 e, ou, extremos de temperaturas (Bjorkman e Deming, 1987).

Extensa revisão realizada por Arditti e Ernst (1992) sobre o cultivo de orquídeas *in vitro* demonstra que em diferentes laboratórios utilizam-se diversos níveis de irradiância. Entretanto, muitos trabalhos não citam o fotoperíodo, ou mesmo a irradiância, ou o tipo de lâmpadas utilizadas.

Com base na literatura revisada, há poucos trabalhos sobre as irradiâncias que seriam realmente eficientes para elevar as taxas fotossintéticas, resultando em maior crescimento para as vitroplantas. Nenhum trabalho nessa linha de investigação foi levantado quanto à ambiência do cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*.

Este trabalho objetivou avaliar os efeitos de irradiâncias sobre o crescimento *in vitro* do híbrido *Cattleya guttata* 'Leopoldi' x *Lc.* 'Guadalajara'.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das plantas

As sementes maduras de *Cattleya guttata* 'Leopoldi' x *Lc.* 'Guadalajara' foram desinfestadas e inoculadas em condições de câmara de fluxo laminar, da seguinte forma: foram retirados da cápsula aproximadamente 200 mg de sementes, colocados em peneira de 50 μ m, utilizando placa de Petri como suporte. As sementes foram mergulhadas em álcool na concentração de 700 mL L⁻¹ por um min, em seguida, imersas em solução de hipoclorito de sódio, 2,0 g L⁻¹ do produto comercial da marca Globo[®], por 15 min. Em seguida, foram submetidas a três enxaguaduras com água desionizada e autoclavada; e, então, as sementes estéreis foram mantidas em aproximadamente 30 mL de água desionizada e autoclavada, a fim de manter as sementes em suspensão, de acordo com o método utilizado por Stenberg e Kane (1998).

O meio de cultura utilizado para a germinação das sementes foi o meio basal GB₅ (Gambor *et al.*, 1968), acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1,0 mg L⁻¹ de piridoxina e niacina, 10 mg L⁻¹ de tiamina. O pH do meio foi ajustado a 5,7 \pm 0,1, antes da adição de 8 g L⁻¹ de ágar (Merck[®], lote 30920315 230). Aliquotas de 30 mL deste meio foram distribuídas em frascos com capacidade de 320 cm³, diâmetro interno de 6,5 cm e altura de 12,5 cm. Estes recipientes, contendo o meio de cultura, foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme de PVC (Rolopac[®], espessura de 11 a 14 micras) e esterilizados em autoclave à temperatura de 120 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², por 20 min.

As sementes estéreis foram inoculadas no meio de cultura estéril, à temperatura ambiente, sob condições de câmara de fluxo laminar, pipetando-se 200 μ L da suspensão de sementes, de tal forma que contivesse ao redor de 80-100 sementes por frasco. Depois da sementeira, os frascos foram fechados com suas respectivas tampas e suas bordas envolvidas com filme transparente PVC (Rolopac[®]). Os frascos contendo as sementes foram mantidos sob temperatura de 27 \pm 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiância de 40 μ mol m⁻² s⁻¹, fornecidas por tubos fluorescentes, OSRAM[®], luz do dia, com potência de 40 W, por um período de quatro meses.

2.2 Fase de cultivo das plantas

O meio de cultura para as plantas apresentou a mesma constituição química e o mesmo modo de preparo daquele descrito para a germinação de sementes. Utilizou-se inclusive, o mesmo tipo de frasco de cultivo, com a mesma quantidade de meio (alíquota de 30 mL). A exceção foi à adição de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado ao meio de cultura, para a adsorção de substâncias exsudadas pelas vitroplantas, tais como os fenóis.

As plantas com aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram inoculadas nos frascos de cultivo em condições de câmara de fluxo laminar, uma no centro e quatro outras afastadas radial e equidistantemente do centro e a um centímetro da parede do frasco. Os frascos foram fechados com duas camadas de filme transparente de PVC (Rolopac[®]), para não prejudicar a absorção de luz.

Os frascos de cultivo contendo os explantes foram incubados em sala de crescimento, distribuídos nas prateleiras das estantes, à distância de aproximadamente 5,0 cm entre si, de forma a não proporcionar sombra nos mesmos, com controle de temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiâncias de 12; 25; 50; 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As estantes da sala de crescimento foram alteradas de modo a fornecer cada ambiente espectral dos respectivos tratamentos.

Após três meses de cultivo, as vitroplantas foram recultivadas no mesmo meio e sob as mesmas condições ambientais, para evitar exaurir os nutrientes e a desidratação do meio de cultura.

A iluminação nas prateleiras das estantes foi fornecida por conjuntos de tubos fluorescentes, OSRAM[®], luz do dia, com potência de 40 W. Cada conjunto constituiu-se de cinco tubos, distribuídos paralelamente e separados um do outro de 5,0 cm. Um conjunto de tubos fluorescentes foi separado do outro longitudinalmente por 5,0 cm, de modo a obter-se maior uniformidade possível da irradiância ao longo de toda a superfície da estante. Na superfície de abrangência de cada conjunto de tubos fluorescentes, foi necessário medir a intensidade de fluxo de fótons em 65 pontos para se identificar a superfície da estante que apresentasse aproximadamente a mesma irradiância. Esta foi de $55 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, medida por meio do irradiômetro LI-COR, inc. MODELO LI-185B QUANTUM/RADIOMETER/PHOTOMETER, cujo sensor é o LI-COR, inc. SS-3 SENSOR SELETOR. Cada um dos cinco ambientes espectrais foi

projetado utilizando-se dois conjuntos de lâmpadas fluorescentes. Na superfície de todas as prateleiras, foram afixadas placas de isopor, que serviram de isolante térmico, de forma a evitar aquecimento no fundo dos frascos de cultivo.

Cinco irradiâncias foram conseguidas, como descrito a seguir: a) Para o ambiente espectral de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os dois conjuntos de lâmpadas receberam uma proteção dada por um anteparo constituído de duas camadas de tela sombrite (tela de polipropileno) esticada em um quadro de madeira, onde a tela superior apresentava malha capaz de interceptar 70 % de luz e a tela voltada para a base da prateleira, tendo malha capaz de interceptar 50 % de luz; b) No ambiente de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foi utilizado um anteparo da mesma forma anterior, constituído por uma única camada de tela sombrite com capacidade para interceptar 70 % da luz, apresentando ainda, proteção na face frontal da prateleira, mediante uso de tela com capacidade de interceptação de 50 % da luz; c) No ambiente de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o anteparo foi constituído por uma única camada de tela sombrite com capacidade de interceptar 30 %, além disso, procedeu-se o revestimento com papel alumínio da face da prateleira superior, onde se prendem os tubos fluorescentes; d) No ambiente de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, procedeu-se uma proteção na face frontal da prateleira, mediante uso de tela, cuja capacidade de interceptação de luz foi de 50 %, acompanhado do revestimento com papel alumínio da face da prateleira superior, da mesma forma anterior; e) O ambiente de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi conseguido, protegendo, frontal e lateralmente, as prateleiras, na abrangência dos dois conjuntos de tubos fluorescentes, com placas de isopor, tendo estas suas faces voltadas para o interior da estante revestida com papel alumínio. A face da estante voltada para a parede não recebeu qualquer proteção. Utilizou-se, ainda, revestimento com papel alumínio na face da prateleira superior, onde se prendiam os tubos fluorescentes. Para esse nível de irradiância, por se tratar de um ambiente quase hermético, foi necessário a instalação de um motor de geladeira com hélice de rotação invertida, visando à dissipação do calor, de modo a manter nesse ambiente a mesma temperatura da sala de cultivo ($27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) (Figura 1).

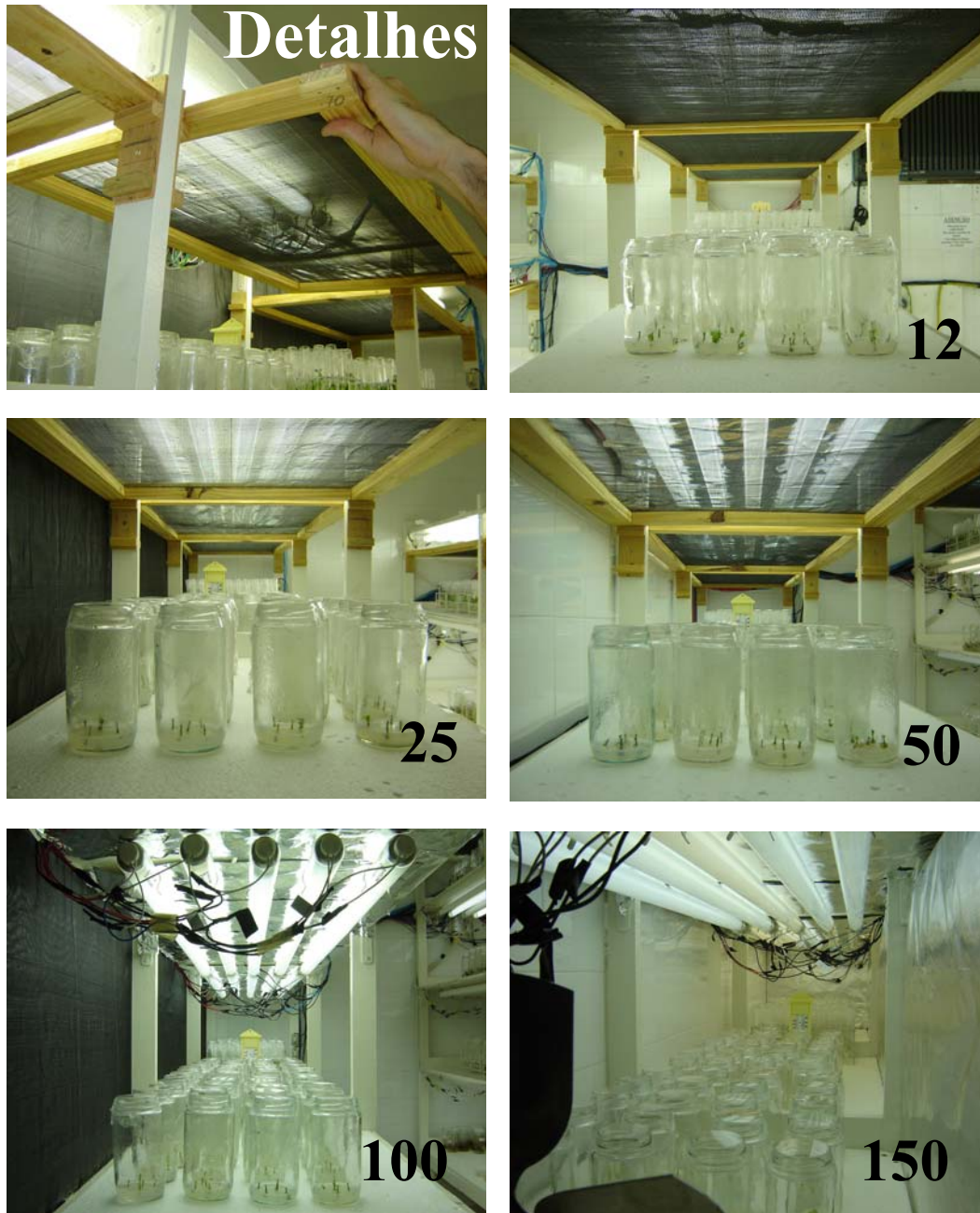


Figura 1- Montagem das prateleiras da sala de cultivo com as cinco irradiâncias (12; 25; 50; 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Em detalhe, anteparo de madeira com sombrite utilizado para reduzir a quantidade de luz nas irradiâncias variando de 12 a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.3. Características avaliadas

2.3.1. Análise de crescimento

Após seis meses de cultivo, foram avaliados os dados de produção de matéria seca total; número de folhas e de raízes por planta; porcentagem de plantas com comprimento de folhas e de raízes menores que 1,0 cm, entre 1,0 a 3,0 cm e maiores que 3,0 cm; e área foliar da primeira folha expandida.

2.3.2. Produção de etileno e de dióxido de carbono

Para a avaliação do acúmulo de etileno e CO₂, cada tratamento foi constituído de cinco frascos de cultivo, contendo, cada um, cinco plantas. Retiraram-se de cada frasco duas amostras de 1,0 mL dos gases liberados pelos tecidos, com auxílio de seringas de mesmo volume. A alíquota amostrada foi injetada em cromatógrafo a gás (Modelo GC – 1413, Shimadzu Kioto), equipado com detector TCD e FID para determinação das concentrações de etileno e CO₂. As temperaturas da coluna (porak-Q), do injetor e do detector foram de, respectivamente, 50, 100 e 135 °C.

A taxa de produção de etileno e de CO₂ foi expressa em nL C₂H₄ g⁻¹ MS h⁻¹ e mmol CO₂ g⁻¹ MS h⁻¹, respectivamente, segundo as equações: $TX = C \times V \times t^{-1} \times p^{-1}$ e $TX = C \times V \times 10 \times t^{-1} \times p^{-1}$, respectivamente, em que C é a concentração do etileno e, ou, de CO₂ no frasco (nL mL⁻¹ e, ou, mmol mL⁻¹, respectivamente; V é o volume da fase gasosa (mL); t é o tempo de acúmulo (h) e p, massa de matéria seca (g).

2.3.3. Determinação dos pigmentos foliares

Para a análise dos pigmentos foliares, foram removidas folhas das plantas formadas e pesadas individualmente até atingirem 0,1 g. Em seguida, as amostras foram maceradas em solução de 20 mL de dietil éter por 24 h, em frascos envolvidos com papel alumínio, como forma de proteção contra luz. O extrato foi colocado em cubeta de quartzo, realizando-se as leituras em espectrofotômetro UV/VIS digital, marca HITACHI, modelo U-2001, cuja densidade ótica das amostras foi lida a 470; 660,6 e 642,2 nm. Foram determinados os teores de clorofilas *a*, *b* e de carotenóides, relações clorofila *a/b* e carotenóides/clorofila total.

2.3.4. Determinação das trocas gasosas

Para a avaliação das trocas gasosas nas vitroplantas, inicialmente o ar de referência foi injetado de uma sacola com concentração de CO₂ conhecida (300 mL m⁻³) para o frasco de cultivo contendo as plantas cultivadas. As plantas, no momento das análises, foram submetidas a um feixe de luz infravermelho (150 μmol m⁻² s⁻¹). O ar de saída ou ar de análise segue dois caminhos: no primeiro, o ar passa pelo sensor de temperatura e umidade, resultando em leituras que são armazenadas no computador; e no segundo, por outro lado, o ar de referência passa pelo IRGA, onde é medida a concentração de CO₂. A diferença entre a concentração de CO₂ do ar de entrada e do ar de saída do tubo de ensaio contendo a plântula é utilizada para o cálculo da taxa fotossintética, ou da taxa respiratória, se a concentração de CO₂ do ar de saída for maior.

2.3.5. Determinação da fluorescência da clorofila *a*

Por meio do fluorômetro portátil modulado, modelo MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), equipado com uma pinça especial para suporte da folha modelo 2030-B (Bilger et al., 1995; Rascher et al., 2000), avaliaram-se a fluorescência inicial (F₀), fluorescência máxima (F_m), rendimento quântico potencial (F_v/F_m = Fluorescência variável/Fluorescência máxima), rendimento quântico efetivo (ΔF/F_m'), a dissipação fotoquímica (qP), a dissipação não-fotoquímica (qN) e a taxa de transporte de elétrons (ETR). O rendimento quântico potencial do fotossistema II (van Kooten & Snel, 1990) foi calculado após 30 min de adaptação ao escuro como F_v/F_m = (F_m-F₀)/F_m, em que F₀ é o rendimento de fluorescência mínima, excitado por uma luz vermelha modulada de baixa intensidade (0,03 μmol m⁻² s⁻¹), e F_m é a fluorescência máxima obtida pela aplicação de um pulso de 0,8 s de luz actínica saturante (> 6000 μmol m⁻² s⁻¹). O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Genty et al., 1989) foi determinado por meio da sobreposição de um pulso de saturação em folhas previamente adaptadas à luz ambiente, sendo calculado como ΔF/F_m' = (F_m'-F)/F_m', em que F é o rendimento de fluorescência antes do pulso de saturação e F_m' a fluorescência máxima durante o pulso de saturação. O ΔF/F_m' foi utilizado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de acordo com Bilger et al. (1995): ETR = ΔF/F_m' x DFF x 0,5 x 0,84,

em que DFF é a densidade de fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha, 0,5 o valor correspondente à fração da energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996), e 0,84 o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981). O coeficiente de extinção não-fotoquímica de Stern-Volmer foi calculado como $\text{NPQ} = (\text{Fm} - \text{Fm}') / \text{Fm}'$ (Bilger e Björkman, 1990).

2.4. Análise estatística

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições (cinco frascos de cultivo), em que os tratamentos foram as cinco irradiâncias, sendo a parcela experimental constituída de cinco plantas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão. Os modelos foram escolhidos baseados no nível de significância dos β 's, utilizando o teste 't', adotando-se o nível de até 10 % de probabilidade. Além disso, considerou-se o valor do coeficiente de determinação ($R^2 = \text{SQ Regressão} / \text{SQ Tratamento}$) e a consistência do modelo de acordo com o comportamento esperado para o fenômeno biológico.

3. Resultados

3.1. Análise de crescimento

Com o aumento dos níveis de irradiância observou-se um modelo quadrático para a produção de matéria seca, sendo a irradiância ideal para a obtenção da produção máxima de matéria seca total (0,455 g) aproximadamente $115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2 A). Este aumento da produção da matéria seca foi influenciado principalmente pelo aumento do número de raízes por planta que apresentou resposta similar, observando-se um modelo quadrático no qual a melhor irradiância foi $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com 1,7 raízes por planta (Figura 2 B).

Entretanto, o número de folhas por planta decresceu linearmente com o aumento da irradiância (Figura 2 C). Isto corresponde com a resposta fisiológica das plantas, as quais, quando expostas às maiores irradiâncias, diminuem o número de folhas por planta e, ou, a área foliar.

Em relação à porcentagem de plantas com comprimento de folhas superior a 1,0 cm, levando em consideração que este tamanho é considerado ideal para retirar as plantas dos frascos de cultivo e submetê-las à fase de aclimatização, houve resposta quadrática, com ponto de máximo com irradiância de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentando a maior porcentagem de plantas (67 %) (Figura 3).

A porcentagem de plantas com comprimento de raízes superior a 1,0 cm (PCR) mostrou comportamento semelhante. Segundo o modelo quadrático, o ponto de máximo foi $68,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, representando 59 % de plantas com comprimento de raiz adequado para a aclimatização (Figura 3).

Observou-se que irradiâncias compreendidas entre 50 e $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionaram maior porcentagem de plantas ideais para aclimatização, com comprimento de folhas maior que 2,0 cm e com raízes vigorosas (Figura 4).

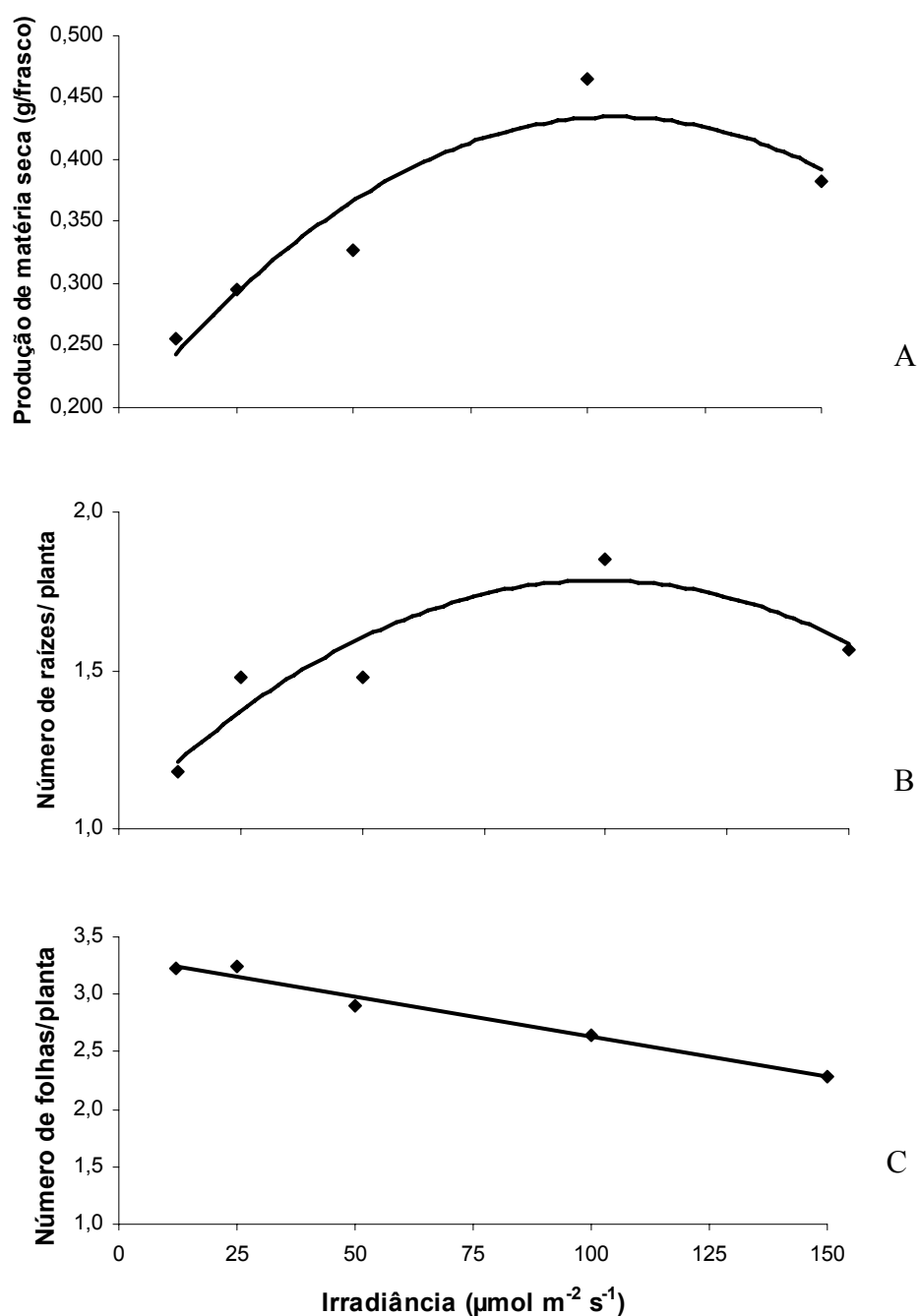


Figura 2 – A- Produção média de matéria seca (g por frasco) ($\hat{Y} = 0,1907 + 0,0046 **x - 0,00002 ***x^2$; $R^2 = 0,89$); B- número médio de raízes por planta ($\hat{Y} = 1,0442 + 0,015 **x - 0,00008 *x^2$; $R^2 = 0,86$); e C- número médio de folhas por planta ($\hat{Y} = 3,3336 - 0,007 ***x$, $R^2 = 0,98$) de *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Lc.* ‘Guadalajara’, cultivada *in vitro* em função das cinco irradiâncias.

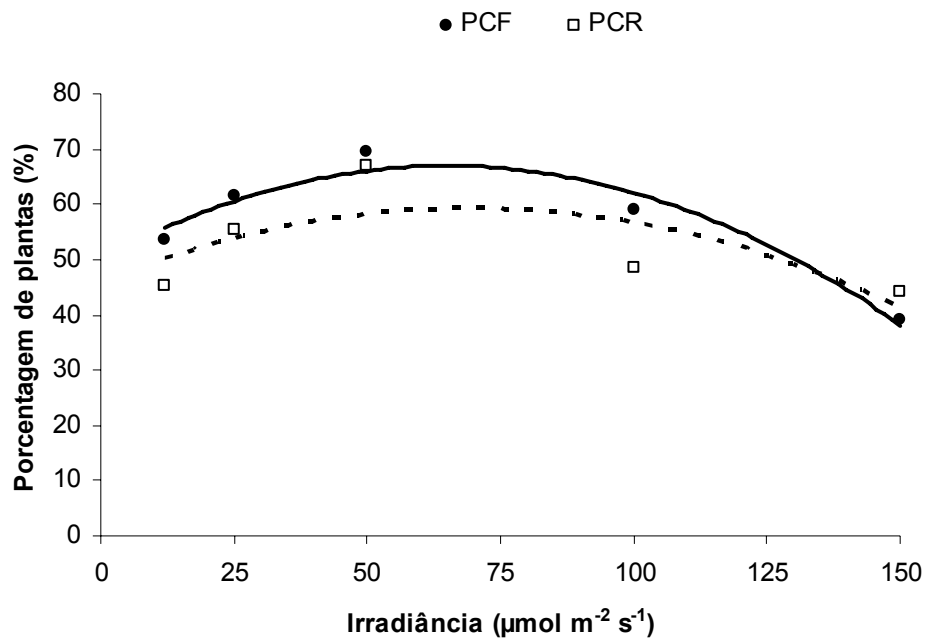


Figura 3 – Porcentagem de plantas com comprimento de folhas maior que 1,0 cm (PCF, $\hat{Y} = 50,031 + 0,5206 * x - 0,004 * x^2$, $R^2 = 0,94$) e da porcentagem de plantas com comprimento de raízes maior que 1,0 cm ($\hat{Y} = 45,945 + 0,384 * x - 0,0028 * x^2$, $R^2 = 0,51$) de *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Lc.* ‘Guadalajara’, cultivada *in vitro* em função dos níveis de irradiância.

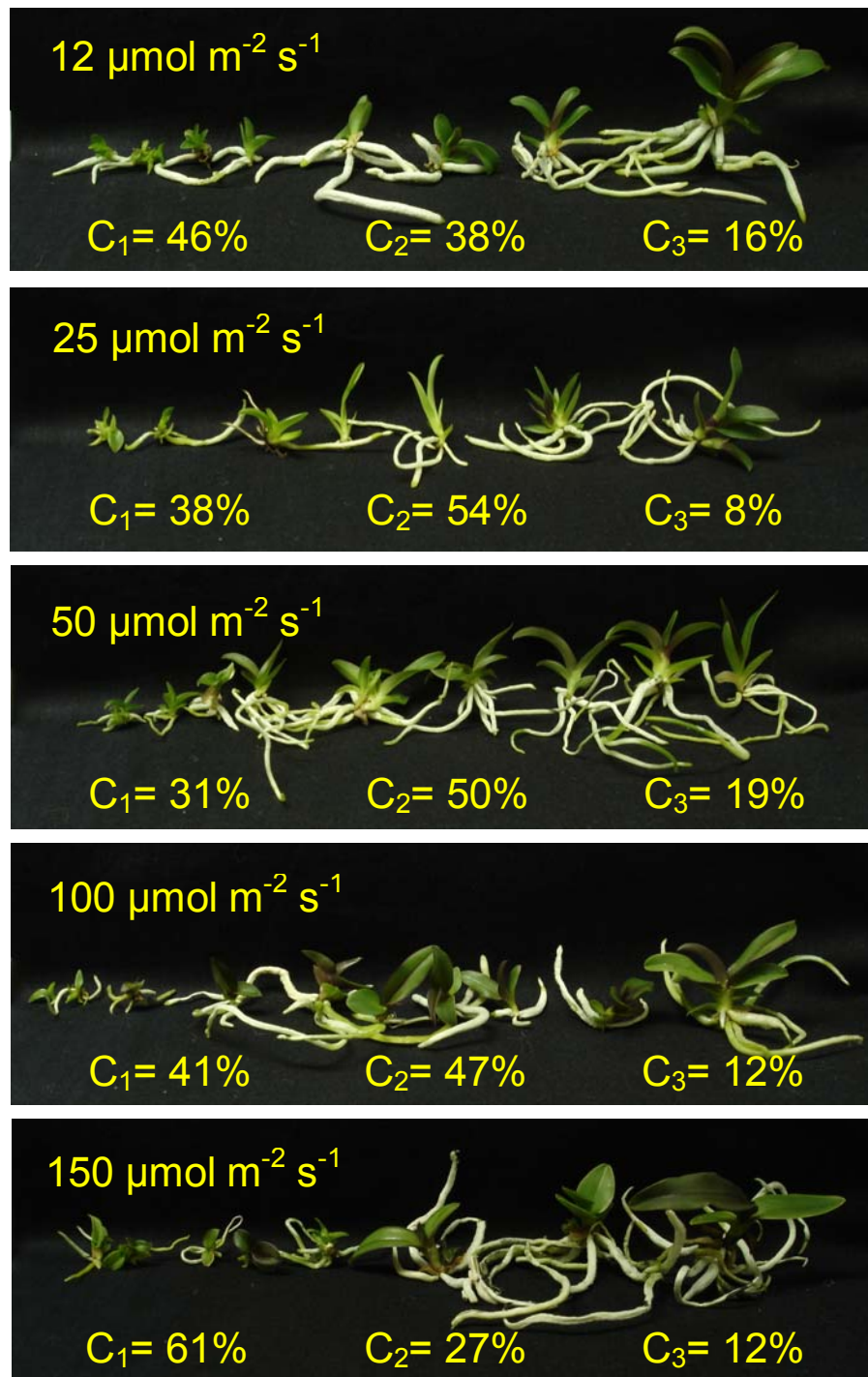


Figura 4 – Aspectos visuais e distribuição percentual de vitroplantas de *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Lc.* ‘Guadalajara’, cultivadas nas irradiâncias de 12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em três classes de tamanho de planta (C₁= menor que 1,0 cm; C₂= entre 1,0 e 3,0 cm; e C₃= maior que 3,0 cm).

3.2. Produção de etileno e de CO₂

Não houve acúmulo de etileno e de CO₂ após três meses de cultivo *in vitro*, período correspondente entre o recultivo e realização das análises. Isto se deveu provavelmente, à reduzida quantidade de gases produzidos pelas vitroplantas neste período, quantidades não detectadas pelo equipamento, ou devido ao reduzido volume do material vegetal em relação ao volume do frasco (320 cm³).

3.3. Análises dos pigmentos foliares

Com o aumento da irradiância, foi observado o decréscimo da clorofila *a*, o que é esperado com a exposição da planta a elevada quantidade de luz. De acordo com o modelo matemático encontrado para explicar a regressão, a concentração máxima da clorofila *a* (15,8114 mg Kg⁻¹ de MF) foi obtida na irradiância de 48 μmol m⁻² s⁻¹ (Figura 5 A)

A concentração de clorofila *b* não variou significativamente com os diferentes níveis de irradiâncias, sendo observado uma média de 5,6116 mg Kg⁻¹ de MF.

A relação clorofila *a/b* variou entre 1,7 e 2,7, com média 2,4 (Figura 5 B).

A concentração de carotenóides apresentou decréscimo linear com o aumento das irradiâncias (Figura 5 C).

A relação carotenóides/clorofila total apresenta tendência a aumentar quando os pigmentos carotenóides estão atuando como fotoprotetores, o que foi observado no experimento (Figura 5 D).

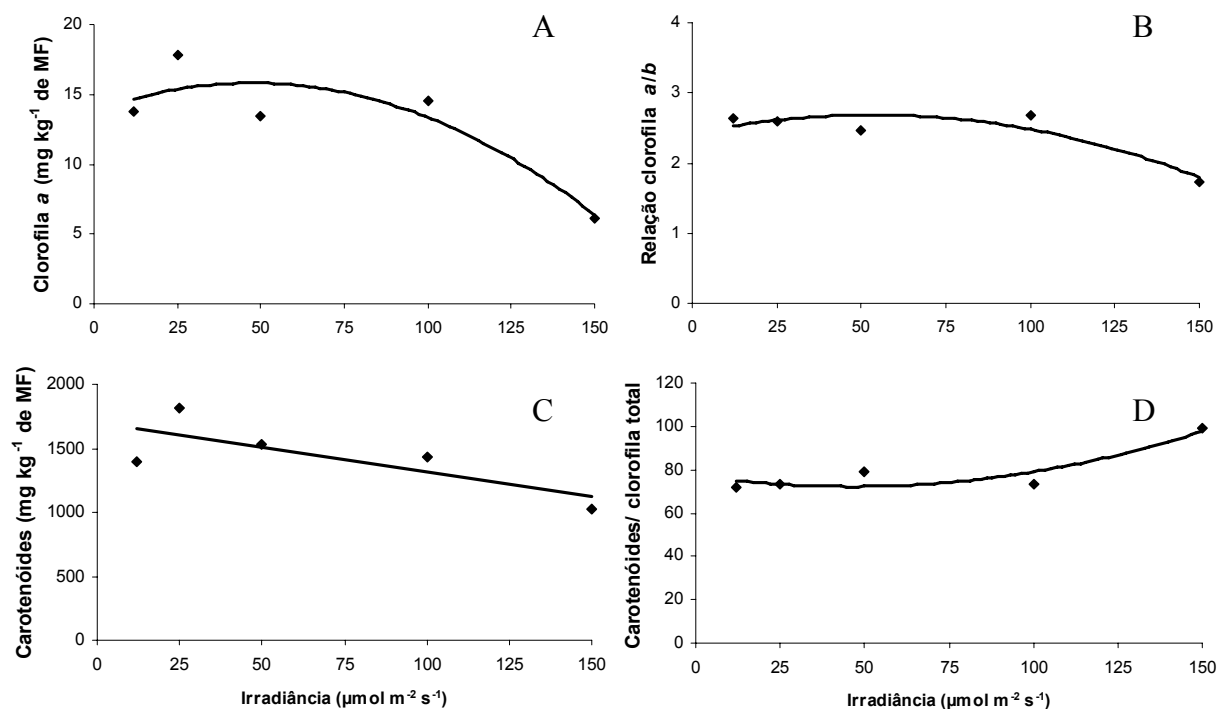


Figura 5 – A- Teores de clorofilas a ($\hat{Y} = 13,805 + 0,085^{ns}x - 0,0009^{***}x^2$, $R^2 = 0,81$); B- relação clorofila a/b ($\hat{Y} = 2,4167 + 0,0102^{ns}x - 0,0001^{***}x^2$, $R^2 = 0,84$); C- teor de carotenóides ($\hat{Y} = 1694,3 - 3,7906x^{***}$, $R^2 = 0,58$); e D- relação carotenóides/clorofila total ($\hat{Y} = 77,36 - 0,2214^{ns}x + 0,0024^{\bullet}$, $R^2 = 0,83$) de *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Lc.* ‘Guadalajara’, cultivada *in vitro* em funções dos níveis de irradiância.

3.4. Determinação das trocas gasosas

Para a determinação das trocas gasosas, foram realizados testes preliminares no escuro e em luz. Realizou-se um teste com cinco frascos de cultivo no período de 18 às 24 h, no escuro, com o auxílio de luz verde, no qual não houve detecção de resposta fotossintética. De forma similar, o teste realizado de 7 às 10 h, também não apresentou resposta.

Provavelmente, quando as plantas são cultivadas *in vitro* podem ocorrer alterações no metabolismo da fixação de C, uma vez que há uma fonte suplementar de C no meio de cultura e as plantas passam a apresentar um comportamento heterotrófico. Outra hipótese pode ser explicada pelo fato de as plantas manterem os estômatos fechados em condições de elevado estresse. Ou, ainda, as taxas fotossintéticas terem

sido tão baixas, que não foram detectadas pelo aparelho, devido à reduzida relação volume de material vegetal e frasco de cultivo.

3.5. Determinação da fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência inicial com as plantas já adaptadas à luz (F_o') tende a apresentar aumento nos seus valores, onde alguns centros de reações do complexo antena já estão fechados e, portanto, com algumas proteínas da cadeia de transporte de elétrons já reduzidas, influenciando a quantidade de energia que é dissipada em forma de fluorescência. Quando ocorre algum dano nos centros de excitação da antena para os centros de reações, o seu valor pode se elevar, caracterizando estado de estresse.

Pelos dados observados (Figura 6), os valores de F_o' não apresentaram este comportamento. Não houve efeito dos níveis de irradiância sobre F_o' , ou seja, não ocorreu fotoinibição nas irradiâncias testadas, obtendo-se valor médio de F_o' igual á 179,48.

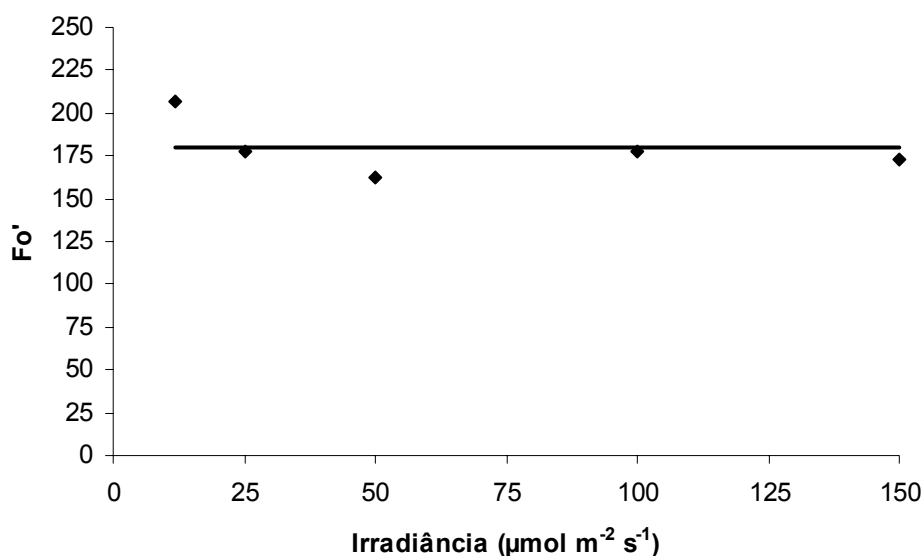


Figura 6 –Fluorescência inicial (F_o') ($\hat{Y} = \bar{Y} = 179,48$) das vitroplantas de *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Lc.* ‘Guadalajara’, cultivadas *in vitro* em função dos níveis de irradiância.

Pela análise da relação da fluorescência variável e fluorescência máxima (F_v/F_m , sendo $F_v =$ Fluorescência máxima - Fluorescência inicial) obtém-se o rendimento quântico potencial do fotossistema II. Esta variável é indicada para mensurar os níveis

de estresse nas plantas, no qual em condições não estressantes este valor é aproximadamente $0,832 \pm 0,004$ (Bjorkman e Demming, 1987). Observou-se que a relação F_v/F_m não foi afetada pelos níveis de irradiância entre 12 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtendo-se um valor médio de 0,76, sugerindo que houve reduzida fotoinibição, caracterizada como dinâmica, para a qual a planta possui mecanismos de proteção, no sentido de reverter o estado de estresse (Figura 7).

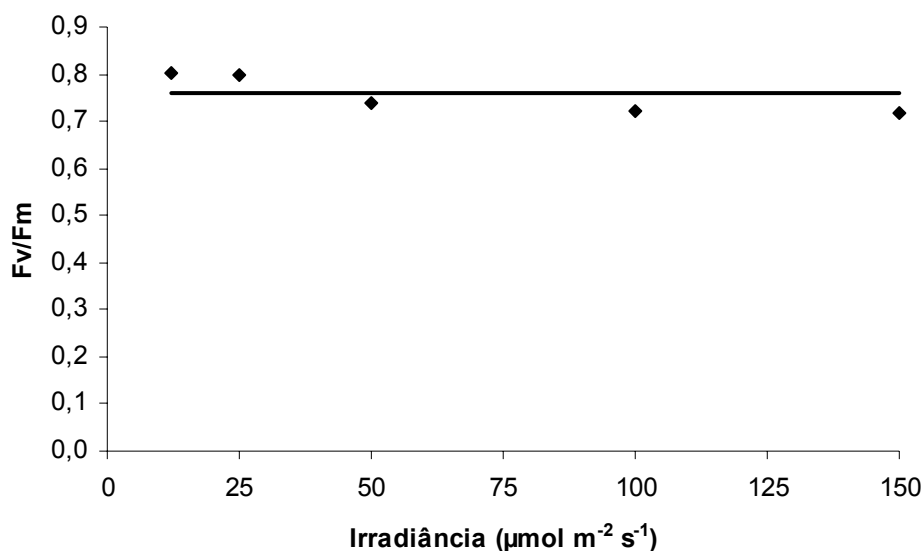


Figura 7 –Rendimento quântico potencial do fotossistema II (ou seja, relação F_v/F_m ,) ($\hat{Y} = \bar{Y} = 0,76$) em vitroplantas de *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Lc.* ‘Guadalajara’ em função dos níveis de irradiância.

O rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m$) representa a proporção de elétrons que são utilizados efetivamente na fase fotoquímica, redução de NAD, sendo um indicador da fotossíntese. Além disso, é utilizado para estimar a taxa de transporte de elétrons em tecidos fotossintetizantes, quando é conhecida a radiação ativamente fotossintética (PAR). Pelas médias dos dados observados, houve tendência de aumento das duas variáveis com o aumento dos níveis de irradiância (Figura 8).

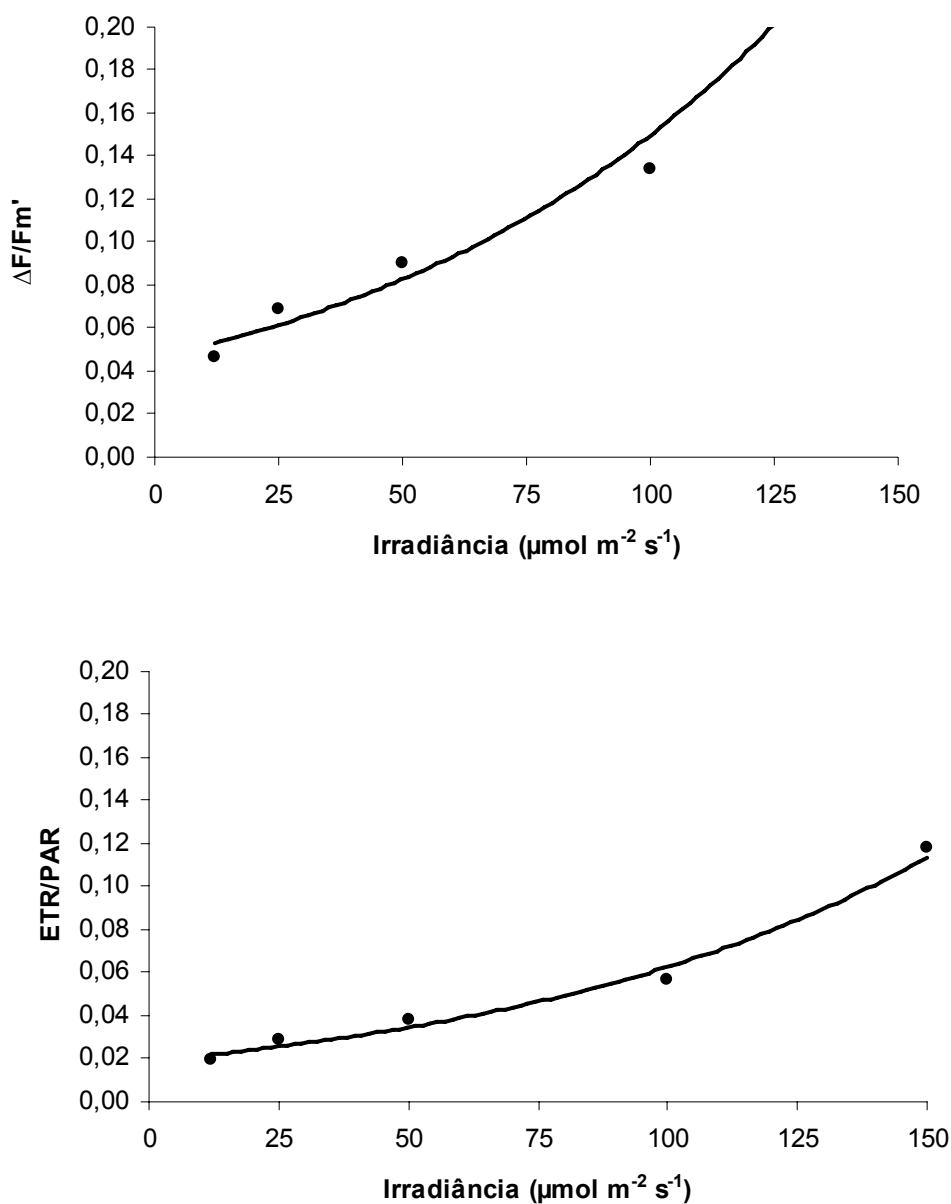


Figura 8 – Rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$, $\hat{Y} = 0,0456^{0,0119*x}$, $R^2 = 0,97$) e taxa de transportes de elétrons (ETR/PAR, $\hat{Y} = 0,0191^{0,0119*x}$, $R^2 = 0,98$) de vitroplantas de *Cattleya guttata* 'Leopoldi' x *Lc. 'Guadalajara'*, em função dos níveis de irradiância.

Pelos fatores analisados anteriormente, há indicação de que não houve dano na cadeia de transportes de elétrons. Entretanto, por meio das análises dos dissipadores de energia ('quenching'), pode-se inferir se toda a energia fornecida pelos níveis de

irradiância foi direcionada para os processos fotoquímicos ou não, se foram perdidos por calor ou fluorescência. Observou-se que houve aumento do ‘quenching’ fotoquímico (qP) com a elevação dos níveis de irradiância e um comportamento quadrático do ‘quenching’ não-fotoquímico (qN) (Figura 9). Entretanto, o qP aumentou até o valor de 0,6 e o qN apresentou valores sempre maiores que este; desta forma, provavelmente, houve maior perda por calor ou fluorescência em relação à energia dissipada para a fotossíntese efetiva.

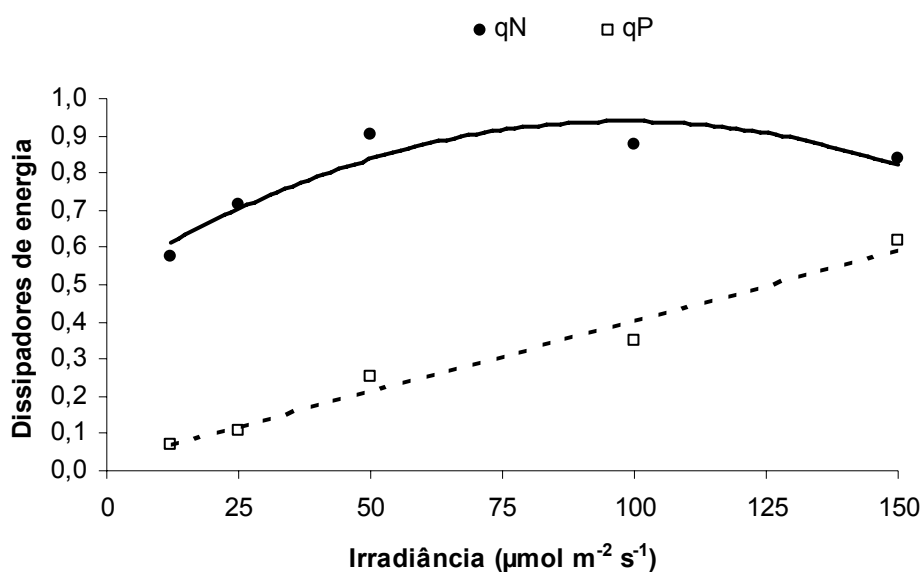


Figura 9 – Dissipadores fotoquímicos (qP, $\hat{Y} = 0,0255 + 0,0038 * x$, $R^2 = 0,97$) e não-fotoquímicos (qN, $\hat{Y} = 0,5159 + 0,0086 * x - 0,00004 * x^2$, $R^2 = 0,86$) de vitroplantas de *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Lc.* ‘Guadalajara’, em função dos níveis de irradiância.

4. DISCUSSÃO

As vitroplantas de *Cattleya guttata* ‘Leopoldi’ x *Lc* “Guadalajara” apresentaram resposta positiva do crescimento com a elevação dos níveis de irradiância. Isso demonstra a elevada plasticidade fotossintética destas plantas, quando cultivadas em diferentes condições luminosas.

Em todos os níveis de irradiância estudados, houve crescimento de plantas vigorosas. Em média, 15 % das vitroplantas, em cada tratamento, apresentaram comprimento de folhas e raízes maior que 3,0 cm. A máxima porcentagem (52 %) de plantas com comprimento de folha entre 1,0 e 3,0 cm seria obtido com a irradiância de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tamanho este ideal para a aclimatização das plantas.

Por meio das análises dos vários fatores obtidos com a fluorescência da clorofila *a*, é possível fazer algumas considerações sobre o estado fisiológico da planta (Van Kooten e Senl, 1990; Snel et al., 1991; Martinez, 1996).

Dados de fluorescência inicial do tecido adaptado à luz (F_0') demonstram o estado fisiológico da planta no que se refere ao dano fotoinibitório mediado por luz no complexo antena. Reflete o estado inicial da clorofila *a* da antena, antes da excitação migrar para os centros de reações (P_{680}) do fotossistema II. Nem sempre, a fluorescência inicial é constante; seu valor pode se elevar, caso os centros de excitação da antena para os centros de reações estejam prejudicados (Martinez, 1996). Os dados de F_0' observados neste trabalho não foram significativamente alterados, indicando que não houve dano na transferência de energia com o aumento dos níveis de irradiância.

A relação entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m) é uma medida que indica a eficiência fotoquímica potencial do fotossistema II. Essa relação é dependente da eficiência na captura e transferência de energia de excitação até o centro de reação. Em situações normais (não extressantes), a relação F_v/F_m , para a maioria das espécies, têm um valor aproximado de $0,832 \pm 0,004$ (Bjorkman e Demming, 1987). No entanto, quando fatores adversos afetam o processo fotossintético, principalmente ao fotossistema II, a relação F_v/F_m sofre decréscimo (Baker, 1991). Como observado neste trabalho, a relação F_v/F_m reduziu de 0,8025 até valores de 0,7172 na menor e maior irradiância respectivamente (12 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Entretanto, esta redução não foi drástica, em casos extremos de fotoinibição, o valor de F_v/F_m aproxima-se de zero (Björkman e Demming, 1987), como observado por Alexandre (2006).

Segundo Baroli e Melis (1998), valores abaixo de 0,725 caracterizam a fotoinibição da fotossíntese, ou seja, a taxa de fotodano excede a de reparo do FSII. No presente trabalho, foram observados valores menores que este, a partir da irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apesar de não serem observados sintomas visuais de fotoinibição, tais como clorose internerval, senescência foliar ou morte de vitroplantas. Com o aumento das irradiâncias apenas se constatou a redução do número de folhas e do teor de pigmentos (clorofila a, clorofila *a/b*, carotenóides e relação carotenóides/clorofila total).

Os carotenóides possuem duplo papel nas plantas: atuam como pigmentos acessórios na captura de energia luminosa e protegem o aparelho fotossintético do dano fotoinibitório (Martinez, 1996). O aumento do teor de carotenóides/clorofila total caracteriza o caráter protetor dos carotenóides relacionados com a fotoinibição. Os carotenóides desativam diretamente o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e extingue as clorofilas triplete (^3Chl), reduzindo indiretamente a formação de $^1\text{O}_2$. Existem três tipos de carotenóides pertencentes ao grupo das xantofilas que atuam na fotoproteção: a violaxantina, a anteroxantina e a zeaxantina. Também se tem a dissipação térmica do excesso de energia no fotossistema II (FSII), processo que requer zeaxantina e que está associado com a transferência de oxigênio da violaxantina para zeaxantina e com o desenvolvimento de um pH trans-tilacoidal (Demming-Adams, 1992).

A intensidade do dano fotoinibitório depende de fatores como a espécie, o estado fisiológico da planta, o tempo de exposição, bem como da eficiência dos mecanismos protetores e dos processos que permitem o reparo e a reversibilidade do dano (Krause e Weis, 1988; Barber e Anderson, 1992), tais como fotorrespiração, mecanismos que minimizam ou impedem a formação de radicais oxidantes (papel protetivo dos carotenóides, como já explicado), minirreciclagem de elétrons dentro do fotossistema II e maior eficiência da ressíntese do polipeptídeo D_1 (Martinez, 1996).

Portanto, provavelmente, as vitroplantas deste híbrido em condições de crescimento em diferentes irradiâncias podem ter sofrido uma fotoinibição dinâmica, para a qual as plantas apresentaram alguns dos mecanismos de fotoproteção que reverteram o estado fotoinibitório, uma vez que os frascos de cultivo estavam sob condições de fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro, ressaltando-se, ademais, que se trata de plantas com elevada capacidade de adaptação a condições adversas do ambiente.

Assim, observou-se que os níveis de irradiância utilizados não foram suficientes para causar a saturação da cadeia de transporte de elétrons e, desta forma, reduzir as

taxas fotossintéticas, visto o aumento do rendimento quântico efetivo do fotossistema II. ($\Delta F/F_m'$) e da taxa de transporte da cadeia de elétrons (ETR/PAR) com o aumento da irradiância.

Entretanto, por meio dos valores dos dissipadores fotossintéticos, é possível inferir se a energia fornecida pelos respectivos tratamentos foi direcionada para os processos fotoquímicos ou não, segundo Martinez (1996). Este autor conceitua a dissipação fotoquímica ou 'quenching' fotoquímico (qP) como a utilização da energia luminosa pelos processos fotoquímicos da fotossíntese (doação de elétrons provenientes da molécula de água para um acceptor NADP). Representa, ainda, a energia dissipada que é utilizada para a formação do poder redutor (NADPH) e da molécula de ATP, os quais serão utilizados na fase bioquímica do processo fotossintético.

A dissipação não fotoquímica ou 'quenching' não-fotoquímico (qN) é a perda da energia por outros processos que não o fotoquímico, principalmente na forma de calor ou fluorescência, estando relacionada com a fotoproteção. A fluorescência (F) é a re-emissão de um fóton de comprimento de onda mais longo, na região do visível (vermelho e vermelho distante), o que foi mensurado. Sob condições saturantes de luz, há maior necessidade de dissipar o excesso de energia de forma a evitar a fotoinibição; por outro lado, sob condições de baixa luminosidade, faz-se necessário maximizar a absorção de luz e a eficiência fotoquímica (Nina Junior et al., 2005).

Desta maneira, as vitrolantãs responderam ao aumento de irradiância, apresentando pequeno acréscimo na produção de matéria seca. Entretanto, nem toda a energia recebida foi utilizada para os processos fotoquímicos. De alguma forma, esta energia foi dissipada por meio da dissipação térmica ou fluorescência, constatado pelos valores obtidos da dissipação fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (qN), aumento de qP até próximo de 0,6 com a elevação das irradiâncias e valores acima de 0,6 para qN. Condições de excesso de luz e limitado metabolismo do carbono induzem ao processo do aumento do 'quenching' não fotoquímico (qN), como citado por Huylenbroeck et al. (1998).

Grout (1988) postula que para muitas espécies, folhas formadas *in vitro* provavelmente nunca se tornam completamente autotróficas. Em cultivos *in vitro*, os mecanismos de sinalização e transporte, associados ao metabolismo dos carboidratos, são interrompidos, onde pode não haver cloroplastos completamente funcionais, impedindo a expressão e regulação das enzimas específicas CAM (Cushman e Bohnert, 1999). Isto poderia, assim, explicar porque não houve neste trabalho, resposta de trocas

gasosas, acúmulo de etileno ou de CO₂. Huylenbroeck et al. (1998) citam que em condições de cultivo *in vitro*, ocorre baixa atividade da regulação da Rubisco, devido à fonte externa de C no meio, sugerindo que cause inibição da fotossíntese.

Stancato et al. (2002) estudaram o estresse luminoso sobre o crescimento *ex vitro* de *Cattleya forbesii* x *Lc. tenebrosa*, orquídea epífita e metabolismo CAM, em ambiente sombreado com 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e sob irradiância de 1650 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Observaram que em alta luminosidade houve redução do crescimento e desenvolvimento desta orquídea. Observaram também variação do volume do pseudobulbo, sugerindo que a água e as reservas armazenadas nos pseudobulbos mais velhos foram transferidas para os mais novos. Avaliaram-se a resistência difusa, a taxa de transpiração e os níveis de fluorescência da clorofila *a* nas plantas mantidas nestas irradiâncias e em plantas transferidas da menor para maior irradiância. Em relação à resistência estomática, os estômatos das plantas submetidas a 22,5 % da irradiância fotossinteticamente ativa (RAF) atingiram sua maior abertura à noite, enquanto nas plantas sob 90 % de RAF a maior abertura ocorreu ao amanhecer.

Neste mesmo experimento, após a transferência das plantas da menor para maior irradiância, a razão F_v/F_m diminuiu de aproximadamente 0,8 para 0,7. Isto sugere a restrição dos mecanismos de fotoproteção na folha e os resultados observados, após a transferência para maiores irradiâncias reforçam a possibilidade de que a fotoinibição implicou diminuição na taxa de crescimento. A área foliar total aumentou após 60 dias, sendo que sob as maiores irradiâncias as plantas apresentaram menor área foliar.

Lin e Hsu (2004) estudaram a plasticidade fotossintética de *Phalaenopsis* crescidas em diferentes ambientes de luz. Plantas adultas de *Phalaenopsis amabilis*, fisiologia tipo CAM, com autosombreamento foram reaclimatizadas, expondo suas folhas inferiores a irradiância de 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, amarrando as folhas superiores e colocando espelhos para refletir maior quantidade de luz. Análise de fluorescência da clorofila *a* nestas folhas resultaram em um valor de F_v/F_m em torno de 0,8, típicos de plantas não fotoinibidas, sugerindo que todo o fotossistema II funciona normalmente, independente das condições luminosas. Estes autores observaram, também, que nas folhas expostas a maiores irradiâncias, houve aumento na taxa de transporte da cadeia de elétrons (ETR/PAR) e aumento do ‘quenching’ fotoquímico, seguido da conseqüente redução do ‘quenching’ não fotoquímico, demonstrando a capacidade de adaptação desta espécie em condições de alta irradiância.

Segundo Chen e Wang (1996), as plantas de *Phalaenopsis* crescem geralmente com RFA em torno de 280 a 380 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, estudos demonstram que há saturação da fotossíntese, expressa em densidade de fluxo fotossintetizante, em torno de 130 a 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e que exposição acima de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resulta em significativa fotoinibição (Lin e Hsu, 2004).

Alexandre (2006), cultivando ápices caulinares do maracujazeiro, *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. *in vitro*, sob os mesmos níveis de irradiância utilizados neste trabalho (12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), observou melhor adaptação das vitroplantas e maior eficiência no processo morfogênico nas menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Da mesma forma, quando esse autor cultivou ápices caulinares do maracujazeiro, nessas mesmas irradiâncias, obtiveram-se plantas mais alongadas, com maior número de folhas, maior massa de matéria fresca e seca da parte aérea nas menores irradiâncias (12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Maior comprimento da parte aérea foi obtido na irradiância de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; entretanto, com menor número de folhas e maior área foliar, enquanto o maior número de folhas e menor área foliar foram observados em 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O autor ainda observou menores teores dos pigmentos analisados, clorofila *a*, *b* e carotenóides, relação clorofila *a/b* e carotenóides/clorofila total com o aumento da irradiância, respostas semelhantes a deste trabalho. Em relação à fluorescência da clorofila *a*, foi observado aumento da fluorescência inicial (F_0) e redução dos valores de F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, ETR e qP, concluindo que níveis de irradiância a partir de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram deletérios para o crescimento de ápices caulinares do maracujazeiro amarelo, resultando em estresse fotoinibitório crônico, caracterizado pelos sintomas visuais de clorose, senescência foliar e morte de plantas.

Randman et al. (2001) estudaram a influência da densidade de fluxo luminoso, na qualidade de plantas propagadas *in vitro* de *Gypsophyla paniculata*, utilizando irradiâncias de 70,7, 188,0 e 377,0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Não encontraram diferença significativa para o número de brotos e entrenós por broto. Nas plantas cultivadas na menor irradiância obteve-se o maior comprimento de entrenós.

Kadleček et al. (2003), ao cultivarem plantas de *Nicotiana tabaco in vitro* em condições fotoautotróficas (meio com ausência de sacarose), sob dois níveis de irradiância (80 e 380 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), verificaram a ocorrência de fotoinibição das plantas crescidas sob a maior irradiância. Observaram-se o aumento da dissipação não fotoquímica (qN), o decréscimo da clorofila *a*, *b* e total, além da redução da relação F_v/F_m e $\Delta F/F_m'$, indicadores do estresse fotoquímico.

5. CONCLUSÕES

- O híbrido *Cattleya guttata* 'Leopoldi' x *Lc.* 'Guadalajara' apresenta grande plasticidade, adaptando-se às diferentes irradiâncias (12; 25; 50; 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);
- Observou-se fotoinibição reduzida e dinâmica com irradiância maior ou igual a 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$;
- Irradiâncias superiores a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionam maior taxa de transportes de elétrons; entretanto, com maior dissipação de energia na forma de calor e fluorescência, que na forma fotoquímica (ATP);
- Níveis de irradiância de 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resultam em melhores respostas no crescimento das vitroplantas deste híbrido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, R.S. Germinação de sementes e fatores de estresse na propagação *in vivo* e *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2006. 166 p. (Tese de Doutorado)
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Micropropagation of orchids. 1^a ed. New York, Chinchester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley e Sons, Inc., 1992. 682p.
- BAKER, N. A possible role for photosystem II in environmental perturbation of photosynthesis. *Physiol. Plant.*, 81: 563-570, 1991.
- BARBER, J.; ANDERSEN, B. Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. *Trends Bioch. Sci.*, 17:61-66, 1992.
- BAROLI, I.; MELIS, A. Photoinhibitory damage is modulated by the rate of photosynthesis and by the photosystem II – light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta*, 205:288-96, 1998.
- BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photos. Res.*, 25:173-185, 1990.
- BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia*, 102:425-432, 1995.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMING, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:489-504, 1987.
- CHEN, W.H.; WANG, Y.T. *Phalaenopsis* orchid culture. *Taiwan Sugar*, 43:11-16, 1996.
- CUSHMAN, J.C.; BOHNERT, H.J. Crassulacean acid metabolism: molecular genetics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50:305-332, 1999.
- DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Mol. Biolog.*, 43:599-626, 1992.
- EHLERINGER, J. Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. *Oecologia*, 102:366-370, 1981.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50:151-158, 1968.

- GENTY, B.; BRIANTAIS, J-M.; BARKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Bioch. Bioph. Acta*, 990:87-92, 1989.
- GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stresses of transplanting. *Acta Hort.*, 230:129-135, 1988.
- GOUK, S.S.; HE, J.; HEW, C.S. Changes in photosynthetic capability and carbohydrate production in an epiphytic CAM orchid plantlet exposed to super-elevated CO₂. *Environ. Exp. Bot.*, 41:219-230, 1999.
- HE, J.; KHOO, G.H.; HEW, C.S. Susceptibility of CAM *Dendrobium* leaves and flowers to high light and high temperature under natural tropical conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 40:255-264, 1998.
- HUYLENBROECK, J.M. VAN; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Sci.*, 134:21-30, 1998.
- KADLEČEK, P.; RANK, B.; TICHÁ, I. Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* grown plantlets. *J. Plant Physiol.*, 160:1017-1024, 2003.
- KRAUSE, G.; WEIS, E. The photosynthetic apparatus and chlorophyll fluorescence. An introduction. In: LITHTENTHALER, H.K. ed., *Applications of chlorophyll fluorescence*. Klumer Academic Publisher. 3-11, 1988.
- LAISK, A.; LORETO, F. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.*, 110:903-912, 1996.
- LIN, M.J.; HSU, B.D. Photosynthetic plasticity of *Phalaenopsis* in response to different light environments. *J. Plant Physiol.*, 161:1259-1268, 2004.
- MALDA, G.; SUZÁN, H.; BACKHAUS, R. *In vitro* culture as a potencial method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Sci. Hortic.*, 81:71-87, 1999.
- MARTINEZ, C.A. Fotoinibição da fotossíntese. Viçosa-Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa, 1996, 73p. 1996
- NINA JÚNIOR, A.R.; CHEVREUIL, L.R.; SANTOS JUNIOR, U.M.; PANDO, S.C.; GONÇALVES, J.F.C. Eficiência fotoquímica do fotossistema II e índice de conteúdo de clorofilas em plantas jovens de mogno (*Swietenia macrophylla* King) e copaíba (*Copaifera multijuga* Hyne) submetidas a dois ambientes de luz. In:

- Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife, PE, CD-ROM dos Anais do 10º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005.
- PRAKASH, L.; LEE, C.L.; GOH, C.J. *In vitro* propagation of commercial orchids: An assessment of current methodologies and development of a novel approach – Thin section culture. *J. Orchid Soc. India*, 10:31-41, 1996.
- RANDMANN, E.B.; BRAGA, E.J.B.; KARAN, M.A.L.; POSADA, M.A.C.; PETERS, J.A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. *Rev. Bras. Agroc.*, 7:171-175, 2001.
- RASCHER, U.; LIEBIG, M.; LUTTGE, U. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant Cell and Environ.*, 23:1397-1405, 2000.
- SNEL, J.; VAN KOOTEN, O.; VAN HOLE, L. Assesment of stress in plants by analysis of photosynthetic performance. *Trends in Anal Chemic*, 10:26-30, 1991.
- STANCATO, G.C.; MAZZAFERA, P.; BUCKERIDGE, M. Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. x *Laelia tenebrosa* Rolfe. *Rev. Bras. Bot.*, 25:229-235, 2002.
- STENBERG, M.L.; KANE, M.E. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, and endangered Florida orchid. *Lindleyana*, 13:101-112, 1998.
- VAN KOOTEN, O.; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photos. Res.*, 25:147-150, 1990.
- WHITE, P.R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 2:231-244, 1951.

CONCLUSÕES GERAIS

- Para germinação de sementes de *Laelia purpurata* variedade carnea, *Cattleya amethystoglossa* e *Laelia anceps* variedade semi-alba, o meio de cultura GB₅ sem adição de carvão ativado proporciona menor tempo (aproximadamente 30 dias) e maior porcentagem de germinação (80%), além de maior formação de protocormos verdes. Estes com primórdios radiculares, cultivados em meio de cultura com adição de carvão ativado são beneficiados quanto ao crescimento, gerando plantas mais vigorosas.
- Formulações de meios, como as de MS e GB₅, utilizadas com frequência nos trabalhos científicos podem ser substituídas por outras mais simples, empregando fertilizantes NPK, normalmente comercializados como adubo de plantas *ex vitro*. Por exemplo, o adubo Peter's e B&G *orchidée*, ambos na concentração de 3,0 gL⁻¹, como demonstrado no presente trabalho.
- A irradiância de 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ é a mais indicada para o crescimento vegetativo do híbrido *Cattleya guttata* 'Leopoldi' x *Lc.* 'Guadalajara'.
- Irradiâncias superior a 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resultam em reduzida fotoinibição, sendo essa reversível, demonstrando a plasticidade do híbrido estudado nas diferentes irradiâncias.