

ANDRÉ FERREIRA SANTOS

**COMPOSIÇÃO MINERAL DO MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya walkeriana***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

ANDRÉ FERREIRA SANTOS

**COMPOSIÇÃO MINERAL DO MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya walkeriana***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2009.

---

Prof. Roberto Ferreira de Novais  
(Co-orientador)

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Co-orientador)

---

Prof. Roberto de Aquino Leite

---

Prof. José Cambraia

---

Prof. Víctor Hugo Álvarez V.  
(Orientador)

Aos meus queridos pais, Wanderley Santos e Adélia Soares Ferreira Santos, pelo amor, dedicação e exemplo de vida.

À minha amada esposa, Luiza Borges Fonseca Santos, pelo amor, compreensão e dedicação.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, e a Deus somente agradeço!

Pela oportunidade da realização deste curso.

Pela educação a mim dada pelos meus maravilhosos e amorosos pais Wanderley e Adélia.

Pelo imensurável amor, ajuda, e amizade de minha esposa Luiza.

Pelo companheirismo e amizade de meu irmão Guilherme.

Pelo apoio de minha avó Maria e orações de minha avó Dulce.

Pelos grandes amigos e companheiros Paulo Afonso, Karina, Dalton, Helton, Michelle Bayerl, Michelle Demolinari, Marcus, Marcelo Magalhães, Gizella Ventura, Roberto Lanna, Marcelo Soares e Mariana.

Pela orientação e, também, educação dos professores Victor Hugo, Novais e Wagner a mim dada durante todo o meu mestrado.

Pelo apoio que os funcionários, técnicos e estagiários do Departamento de Solos/UFV, em especial a Aline, deram para que este trabalho fosse realizado.

Pelos amigos e companheiros da pós-graduação: Amanda, Bruno, Daniel, David, Fernando, Henrique, Hugo, Igor, Jarbas e Joaquin.

Pelo maravilhoso grupo de convivência da Igreja Presbiteriana de Viçosa e suas orações.

Por todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuíram para a execução deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ANDRÉ FERREIRA SANTOS, filho de Wanderley Santos e Adélia Soares Ferreira Santos, nasceu em 30 de junho de 1983, em Belo Horizonte, MG.

Em Outubro de 2006, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2007, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Victor Hugo Alvarez V.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	4
2.1. Formulação de novo meio de cultura para orquídeas .....	4
2.2. Produção, suprimento nutricional e resposta morfogênica de <i>Cattleya walkeriana</i> .....	5
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	8
3.1. Formulação de novo meio de cultura para orquídeas .....	8
3.2. Produção, suprimento nutricional e resposta morfogênica de <i>Cattleya walkeriana</i> .....	9
4. CONCLUSÕES .....	21
5. BIBLIOGRAFIA .....	22

## RESUMO

SANTOS, André Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009.  
**Composição mineral do meio de cultura para crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana*.** Orientador: Victor Hugo Alvarez V. Co-orientadores: Roberto Ferreira de Novais e Wagner Campos Otoni.

A família orquídeas possui cerca de 30.000 espécies espalhadas por quase todo o globo terrestre. Dentre as orquídeas, o grupo das catléias tem grande importância no mercado mundial de flores. Uma das principais formas de produção dessas plantas é o semeio assimbiótico *in vitro*. Muitos têm sido os meios de cultura utilizados para o semeio e crescimento de orquídeas; no entanto, esses meios parecem não suprir totalmente as exigências nutricionais das plantas. Há, portanto, grande interesse em se desenvolverem novos meios de cultura com composição nutricional que supra adequadamente, durante o período de cultivo, a demanda da cultura, promovendo produção de tecidos e resposta morfogênica desejada. O que constitui o objetivo deste trabalho. Para ajustar as concentrações dos nutrientes do meio de cultura adequado para o crescimento de plântulas de catléia foram considerados os teores de referência em seus tecidos, a produção de matéria seca, o volume de meio de cultura por frasco e as taxas de recuperação dos nutrientes por essa cultura. Este meio foi denominado de meio Suprimento (S). Para a comparação desse meio de cultura com outros, protocormos de *Cattleya walkeriana* foram cultivados, durante 51, 94, 139 e 190 d, nos meios MS, B<sub>5</sub>, B&G (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante B&G *Orchidées*<sup>®</sup>), Peters (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante Peters<sup>®</sup> 10-30-20) e S, sendo testadas diferentes concentrações dos sais deste último (0,55; 0,73; 1,00 e 1,45 vez a concentração dos sais). O meio S, proposto neste trabalho, ofereceu a melhor condição de suprimento nutricional para a produção de plântulas de *Cattleya walkeriana* quando comparado com os demais meios. A concentração que proporcionou a máxima produção de plântulas completas foi de 1,125 vez a concentração original de sais do meio S. Os meios contendo maiores concentrações de N e menores de P levaram ao aumento na relação entre os teores de N e P ( $T_N/T_P$ ) nos tecidos da cultura, a qual apresentou elevada correlação positiva com a relação entre a produção de matéria seca de calo e total. Alta relação  $T_N/T_P$  induziu a redução na produção de raízes. A relação entre a produção de raízes e folhas aumentou quando a concentração dos nutrientes no meio foi reduzida, seja pelo consumo da cultura ou pela redução na concentração dos sais no meio S.

## ABSTRACT

SANTOS, André Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2009.  
**Mineral composition of the culture medium for *in vitro* growth of *Cattleya walkeriana*.** Adviser: Victor Hugo Alvarez V. Co-advisers: Roberto Ferreira de Novais and Wagner Campos Otoni.

The orchid family has about 30,000 species spread throughout most of the globe. Among the orchids, the group of *Cattleya* has great importance in the world flower market. One of the main forms of production of these plants is the *in vitro* assymbiotic seeding. Many have been the culture media used for sowing and growing orchids, however, these methods do not seem to fully supply the nutritional requirements of plants. There is, therefore, great interest in developing new culture media with nutritional composition that supplies properly the demand of the culture during the growing period promoting the production of tissues and the morphogenic response wanted. That was the aim of this work. To adjust the nutrient concentrations in the culture medium suitable for the growth of cattleya seedlings were considered the reference content in their tissues, the dry matter yield production, the volume of culture medium per vial and recovery rates of the nutrients by this culture. This medium was called the medium Supply (S). To compare this medium with others, *Cattleya walkeriana* protocorms were cultured for 51, 94, 139 and 190 d in MS medium, B<sub>5</sub>, B & G ( 3 g L<sup>-1</sup> of fertilizer Orchidées B&G<sup>®</sup>), Peters (3 g L<sup>-1</sup> of fertilizer Peters<sup>®</sup> 10-30-20) and S, and tested different concentrations of salts of the latter (0.55, 0.73, 1.00 and 1.45 as the concentration of salts). The medium S, proposed in this work, offered the optimum nutrient supply for the production of seedlings of *Cattleya walkeriana* when compared with other media. The concentration that provided maximum production of complete seedling was 1.125 time the original concentration of salts of the medium S. The media containing higher concentrations of N and lower P led to the rise in the levels of N and P (T<sub>N</sub>/T<sub>P</sub>) in tissue culture, which correlated positively with the ratio of dry matter yield of corn and total. High ratio T<sub>N</sub>/T<sub>P</sub> induced reduction in the production of roots. The relationship between the production of roots and leaves increased when the concentration of nutrients in the medium was reduced, because of the consumption of the culture or by reducing the concentration of salt in the medium S.



## 1. Introdução

A família orquídeas possui, aproximadamente, 30.000 espécies (Cronquist, 1981), sendo 2.350 destas encontradas no Brasil (Menezes, 1987). O grupo das catléias é muito expressivo no cenário comercial brasileiro (Kumairia & Tandon, 2001; Ventura, 2002). Esse grupo engloba as espécies dos gêneros *Cattleya*, *Laelia*, *Brassavola* e *Sophranitis* e seus híbridos inter- e intra-genéricos (Eigeldinger & Murphy, 1972; Black, 1973).

As catléias são heterozigóticas e propagam-se na natureza, principalmente, por meio de sementes. Elas podem produzir até 300.000 sementes por fruto, mas em condições naturais menos de 5 % dessas germinam, pois possuem embrião reduzido, cotilédones não-diferenciados e não apresentam endosperma desenvolvido (tecido de reserva) (Corrie & Tandon, 1993). Durante a germinação ocorre associação com fungos micorrízicos que fornecem energia (na forma de açúcares) para o crescimento inicial das plântulas (Arditti & Ernst, 1992; Sheehan, 1992; Corrie & Tandon, 1993).

A propagação de orquídeas por meio da divisão de mudas, a partir de plantas adultas, é muito limitada, e, na maioria dos casos, inviável para produção comercial (Sheehan, 1992). A propagação seminífera assimbiótica *in vitro* possibilita sua produção em larga escala (Arditti & Ernst, 1992; Nayak et al., 2002). Assim, é possível conseguir-se grande número de mudas a partir de uma única planta em tempo mais curto do que aquele necessário para produzir o mesmo número de mudas por divisão de planta.

Muitos são os fatores abióticos que interferem no crescimento e desenvolvimento de células, tecidos e órgãos vegetais em condições *in vitro* (George et al., 2008). Dentre esses, os componentes do meio de cultura exercem grande influência sobre a germinação e o crescimento de plântulas de orquídeas, como: carvão ativado (Faria et al., 2002; Ventura, 2007), concentração de açúcares (Ventura, 2007) e composição dos nutrientes (Knudson, 1951; Rodrigues, 2005; Ventura, 2007).

A utilização de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado no meio de cultura proporciona melhores condições de crescimento para plântulas de catléia em relação a meios sem carvão ativado (Faria et al., 2002; Ventura, 2007).

A maioria dos meios de cultura utilizados para a propagação de orquídeas tem a sacarose como fonte de C, em concentrações variando de 15 a 30 g L<sup>-1</sup> (Arditti & Ernst, 1992; Ventura, 2002; Novais & Rodrigues, 2004; Rodrigues, 2005; Ventura, 2007). Entretanto, concentrações maiores que 30 g L<sup>-1</sup> podem proporcionar maior crescimento de plântulas, principalmente quando se utilizam concentrações maiores dos nutrientes minerais no meio de cultura (Ventura, 2007). Ventura (2007) demonstrou que a produção de *Cattleya loddgesii*, em resposta à concentração de sacarose, apresentou comportamento quadrático com pontos de máxima produção de folhas e raízes para as concentrações de 39,5 e 56,1 g L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente.

Muitos têm sido os meios de cultura utilizados para o semeio e crescimento de orquídeas. Dentre eles destacam-se: VW (Vacin & Went, 1949), KC (Knudson, 1951), MS (Murashige & Skoog, 1962), B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968), e MN (Rodrigues, 2005) (Arditti & Ernst, 1992; Ventura, 2002; Ventura, 2007). Nem todos, entretanto, foram desenvolvidos especificamente para orquídeas.

Em trabalhos mais recentes foi sugerida a utilização de adubos comerciais, formulados especificamente para orquídeas, como fonte de nutrientes no meio de cultura (Rego-Oliveira & Faria, 2005; Rodrigues, 2005; Ventura, 2007). Rodrigues (2005) e Ventura (2007) obtiveram maior produção de plântulas de orquídeas ao utilizarem formulações NPK de fertilizantes comerciais, como Peters<sup>®</sup> (nas formulações 10-30-20 + micronutrientes e 30-10-10 + micronutrientes) e B&G Orchidées<sup>®</sup>, quando comparados a outros meios tradicionais para o cultivo *in vitro* de orquídeas. No entanto, algumas dessas formulações não possuem Ca, acarretando problemas de sua deficiência nas plântulas. Todavia, a utilização de 200 mL L<sup>-1</sup> de água de coco no meio de cultura pode suprir, parcialmente, esse requerimento (Rodrigues, 2005).

Spaargaren (1996) propôs que o meio de cultura ideal deve conter a mesma composição mineral da célula, tecido ou órgão de uma planta cultivada neste meio. Monteiro et al. (2000), Bouman (2001), Nas & Read (2004) e Staikidou et al. (2006) obtiveram aumento no crescimento do material vegetal cultivado em meios que tinham a proporção entre os nutrientes (ou para alguns dos nutrientes) semelhante àquela encontrada nos tecidos das espécies por eles utilizadas.

Bouman (2001) utilizou os teores dos macronutrientes de folhas de plantas adultas de gérbera para adequar o suprimento desses nutrientes em um meio de cultura para esta espécie (meio GAM). Nesse meio, foi obtida maior produção de matéria fresca de plantas em relação aos meios DKW (McGranahan et al., 1987) e MS. O meio GAM teve apenas as concentrações dos macronutrientes ajustadas, mantendo-se as mesmas concentrações dos micronutrientes do meio MS (Bouman, 2001). Além disso, Bouman (2001) adaptou a proporção dos macronutrientes em relação àquela encontrada nas folhas de plantas adultas. Entretanto, esses teores podem diferir daqueles de tecidos do material em condições *in vitro*, e, ainda, diferir de outros tecidos das plantas que não os foliares.

Outro aspecto importante na elaboração da composição nutricional de um meio de cultura, e não levado em conta por Bouman (2001), Monteiro et al. (2000), Nas & Read (2004) e Staikidou et al. (2006), é a quantidade de cada nutriente extraída dos meios de cultura pelo material vegetal em crescimento, ou seja, esses autores não consideraram as taxas de recuperação dos nutrientes pelas plântulas.

A composição mineral do meio de cultura, além de suprir a demanda da cultura, deve contribuir para uma resposta morfogênica desejada (George et al., 2008). Poucos estudos examinaram o efeito direto da nutrição mineral *in vitro* sobre a morfogênese em plantas; no entanto, diversos trabalhos evidenciam esse efeito (Cousson & Tran Thanh Van, 1993; Ramage, 1999; Ramage & Williams, 2002). Ramage & Williams (2002) demonstraram que a maioria dos trabalhos a respeito de nutrição mineral e resposta morfogênica *in vitro* enfatizam o efeito do N, P e Ca sobre esta resposta.

A composição nutricional ideal de um meio de cultura, portanto, deve ser aquela que consiga suprir adequadamente, durante o período de cultivo, a demanda da cultura, promovendo sua produção satisfatória, e que contribua para uma resposta morfogênica desejada.

O objetivo deste trabalho foi, portanto, desenvolver um novo meio de cultura que supra a demanda nutricional de plântulas de orquídeas do grupo das catléias e avaliar a produção, o suprimento nutricional e a resposta morfogênica dessas plântulas durante o seu cultivo nesse novo meio e compará-lo com outros meios tradicionalmente utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Formulação do novo meio de cultura

Para se estabelecer a formulação dos nutrientes no meio de cultura, proposto neste trabalho, foram considerados os teores nutricionais de referência ( $TN_j$ ) (Quadro 1) obtidos nos tecidos de plântulas de duas variedades de *C. walkeriana* e uma de *C. nobilior*. Esses teores foram estabelecidos utilizando-se apenas plântulas que não apresentaram, visualmente, nenhum tipo de sintoma de deficiência nutricional e aquelas que se destacaram pela maior produção de matéria fresca nos frascos. Essas plântulas foram cultivadas em meio contendo 3 g L<sup>-1</sup> de sais do fertilizante B&G Orchidées<sup>®</sup>, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (Vetec<sup>®</sup>), 7 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck<sup>®</sup>) e 200 mL L<sup>-1</sup> de água de coco.

As concentrações dos nutrientes nesse novo meio de cultura foram estabelecidas considerando-se, também, uma produção de matéria seca esperada, as taxas de recuperação dos nutrientes pelas plântulas e o volume do meio de cultura utilizado por frasco, o qual permite estabelecer as concentrações dos nutrientes no meio. Para isto foi utilizada a seguinte equação:

$$CN_j = (TN_j \times MS) / ((V \times TR) / f) \quad (1)$$

em que  $CN_j$  é a concentração do nutriente j no meio de cultura (mg L<sup>-1</sup>),  $TN_j$  é o teor de referência do nutriente j nos tecidos das plântulas (g kg<sup>-1</sup> e mg kg<sup>-1</sup> para macro e micronutrientes, respectivamente),  $MS$  é a produção de matéria seca esperada (g/frasco),  $V$  é o volume de meio de cultura (mL/frasco),  $TR$  é a taxa de recuperação (%) do nutriente j pelas plântulas em crescimento e  $f$  é o fator de correção (100.000 e 100 para macro e micronutrientes, respectivamente).

**Quadro 1.** Teores de referência de nutrientes ( $TN_j$ ) e taxas de recuperação ( $TR$ ) dos nutrientes pelas plântulas de orquídeas utilizados para a formulação do meio de cultura Suprimento (S)

	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Mn	B	Cu	Mo
$TN_j$	15	6,0	38	9,0	2,3	3,86	150	80	150	100	10	2,0
$TR$	80	70	70	80	80	60	40	70	80	80	70	80

Foram considerados, para os cálculos, um  $V$  de 40 mL/frasco e uma produção de  $MS$  de 0,7 g/frasco para um período de 190 d de cultivo. Esta produção foi estimada a partir de dados obtidos para plântulas de diferentes espécies do grupo das catléias cultivadas entre 9 e 12 meses em condições *in vitro* (Rodrigues, 2005; Ventura, 2007 e em trabalhos prévios - resultados não apresentados). Os valores utilizados para as  $TRs$  dos nutrientes (Quadro 1) foram estimados a partir de dados obtidos por Rodrigues (2005). Este novo meio foi denominado de meio Suprimento (S).

## 2.2. Produção, suprimento nutricional e resposta morfogênica

Para este estudo foi conduzido um experimento utilizando protocormos recém germinados (três meses após os semeio) de *C. walkeriana* var. *coerulea* × self, com aproximadamente 4 mm de altura. Estes protocormos foram obtidos a partir de sementes colhidas de frutos maduros e germinadas, assimbioticamente, em meio de cultura contendo os sais do meio  $B_5$  (Gamborg et al., 1968), 30 g  $L^{-1}$  de sacarose e 7 g  $L^{-1}$  de ágar (Merck®). As sementes foram desinfetadas superficialmente utilizando-se solução de 100 mL  $L^{-1}$  de água sanitária comercial (Candura® – 20 a 25 mL  $L^{-1}$  de hipoclorito de sódio) por 10 min (Ventura, 2007) e, posteriormente, enxaguadas duas vezes em água destilada e autoclavada.

Os protocormos foram recultivados em meios de cultura contendo sais do meio  $MS$  (Murashige & Skoog, 1962); meio  $B_5$ ; meio Suprimento (S); fertilizante solúvel comercial Peters®<sup>(1)</sup> 10-30-20 (3,0 g  $L^{-1}$ ), denominado: meio Peters e fertilizante solúvel comercial B&G Orchidées®<sup>(1)</sup> (3,0 g  $L^{-1}$ ), denominado: meio B&G . Nos meios  $MS$  e  $B_5$  foram utilizados apenas seus sais. Neste experimento foram utilizadas quatro concentrações dos sais do meio S: 0,55; 0,73; 1,00 e 1,45 vez a concentração dos sais do meio S ( $S_{0,55}$ ,  $S_{0,73}$ ,  $S_{1,00}$  e  $S_{1,45}$ , respectivamente). As concentrações dos sais desse meio foram determinadas como descrito anteriormente. O transplântio dos protocormos foi realizado com o objetivo de manter constante o número inicial de explantes (20 protocormos/frasco).

Para o preparo de cada um dos tratamentos foram utilizados 30 g  $L^{-1}$  de sacarose, 2 g  $L^{-1}$  de carvão ativado (Vetec®) e os sais nas concentrações referentes a cada tratamento (Quadro 2). O pH dos meios foi ajustado em  $5,7 \pm 0,1$ , antes da

---

<sup>1</sup> Mais informações sobre esses fertilizantes podem ser encontradas nos sites: [www.begflores.com.br](http://www.begflores.com.br) e [www.petersabc.com/products\\_2D.php](http://www.petersabc.com/products_2D.php)

adição de 7 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck®). A esterilização do meio de cultura deu-se em autoclave a 121 °C, pressão de 1,05 kg cm<sup>-2</sup>, durante 20 min.

Os frascos com os protocormos foram incubados em sala de cultivo com temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 : 8 h luz / escuro e irradiância média de 48 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Os frascos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®).

Com o intuito de avaliar o crescimento, suprimento nutricional e resposta morfogênica dessas plântulas ao longo do tempo, foram realizadas avaliações aos 51, 94, 139, e 190 d de recultivo dos protocormos. Foram avaliados: produção de matéria seca da parte aérea [ $MS_{PA}$  = matéria seca de folha ( $MS_F$ ) + matéria seca de calo ( $MS_C$ )], da raiz ( $MS_R$ ) e total ( $MS_T = MS_{PA} + MS_R$ ), relação R/PA ( $MS_R/MS_{PA}$ ) e os teores e conteúdos de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn e Cu nas plântulas. Para auxiliar na avaliação da resposta morfogênica foram avaliadas, também, aos 190 d, a produção de  $MS_F$ ,  $MS_C$  e de plântulas completas ( $MS_P = MS_F + MS_R$ ) e as relações C/T ( $MS_C/MS_T$ ) e R/F ( $MS_R/MS_F$ ).

A determinação dos teores dos nutrientes nos tecidos das plântulas foi realizada após digestão nítrico-perclórica (3:1). Cálcio, Mg, S, Fe, Zn, Mn, e Cu foram analisados por espectrofotometria de emissão óptica em plasma induzido. O P foi analisado por colorimetria, utilizando-se o método da vitamina C modificado por Braga & Defilipo (1974), o K por fotometria de chama e o N total pelo método Kjeldahl (Jackson, 1976).

Por ser acrescido ágar, sacarose e carvão ativado aos meios de cultura, com nutrientes na sua composição, foram determinados, também, os teores totais dos nutrientes nesses componentes. Essa determinação foi realizada após digestão nítrico-perclórica (3:1) das amostras de cada um desses componentes (três repetições). Cálcio, Mg, S, Fe, Zn, Mn, Cu, P, K, e N foram analisados conforme os métodos citados anteriormente.

O experimento, com arranjo fatorial 8 × 4 (tratamentos<sup>1</sup> × tempos de cultivo), perfazendo 32 tratamentos, foi montado em blocos casualizados, com três repetições. A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro de 340 mL, contendo 40 mL de meio de cultura e 20 plântulas.

---

<sup>1</sup> Tratamentos correspondem a matriz fatorial (4 × 1) + (1 × 4) [(meios × concentrações) + (meio Suprimento × concentrações)]

Após a análise de variância, foram testados os contrastes:  $C_1 \rightarrow MS + B_5 + Peters + B\&G$  vs  $S_{1,00}$ ;  $C_2 \rightarrow MS + B_5$  vs  $Peters + B\&G$ ;  $C_3 \rightarrow MS$  vs  $B_5$  e  $C_4 \rightarrow Peters$  vs  $B\&G$ . Além desses, foram testados os contrastes adicionais:  $C_A \rightarrow MS + B_5$  vs  $S_{1,00}$  e  $C_B \rightarrow Peters + B\&G$  vs  $S_{1,00}$ .

Para os meios MS, B<sub>5</sub>, Peters, B&G e S, com a produção de MS<sub>PA</sub>, MS<sub>R</sub> e MS<sub>T</sub>, relação R/PA e os conteúdo dos nutrientes foram ajustadas curvas de resposta em função do tempo, nesses ajustes foram utilizados, também, as médias dessas variáveis obtidas no início do recultivo (tempo = 0 d). Para o meio S, com a produção de MS<sub>F</sub>, MS<sub>PA</sub>, MS<sub>R</sub>, MS<sub>C</sub>, MS<sub>P</sub> e MS<sub>T</sub> foram ajustadas, com os dados obtidos aos 190 d de recultivo dos protocormos, curvas de resposta em função da concentração dos sais.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Formulação do novo meio de cultura

As concentrações dos nutrientes (Quadro 2), definidas pelo método proposto neste trabalho, no meio de cultura S estiveram sempre entre o maior e o menor valor de concentração dos nutrientes nos meios MS, B<sub>5</sub>, Peters e B&G (Quadro 2). A variação da concentração dos nutrientes entre os meios MS, B<sub>5</sub>, Peters, B&G e S foi muito grande e diferenciada entre os nutrientes (Quadro 2), indicando que a resposta dos explantes, quanto à produção de matéria seca, suprimento nutricional e morfogênese, será diferenciada entre esses meios. A concentração dos sais utilizados para preparar o meio S são apresentadas no Quadro 3.

**Quadro 2.** Concentração dos nutrientes nos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968), Peters (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante Peters<sup>®</sup> 10-30-20), B&G (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante B&G<sup>®</sup>) e Suprimento (S)

Nutriente	MS	GB <sub>5</sub>	Peters	B&G	S
	mg L <sup>-1</sup>				
N	841	375	300	240	328
P	39	30	393	124	150
K	783	967	498	181	950
Ca	120	41	-	228	197
Mg	36	25	36	52	50
S	48	71	51	120	113
Fe	5,60	5,62	1,50	13,26	6,56
Zn	1,95	0,45	0,08	13,26	2,00
Mn	5,49	4,29	0,75	3,81	3,28
B	1,08	0,53	0,20	6,63	2,19
Cu	0,01	0,01	0,11	1,89	0,250
Mo	0,10	0,10	0,03	0,63	0,044

**Quadro 3.** Concentração dos sais no meio de cultura Suprimento (S)

Sais	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	KNO <sub>3</sub>	KCl	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O
	mg L <sup>-1</sup>											
Concentração	1160	510	886	976	214	557	10,0	10,7	7,0	26,1	786	64,4



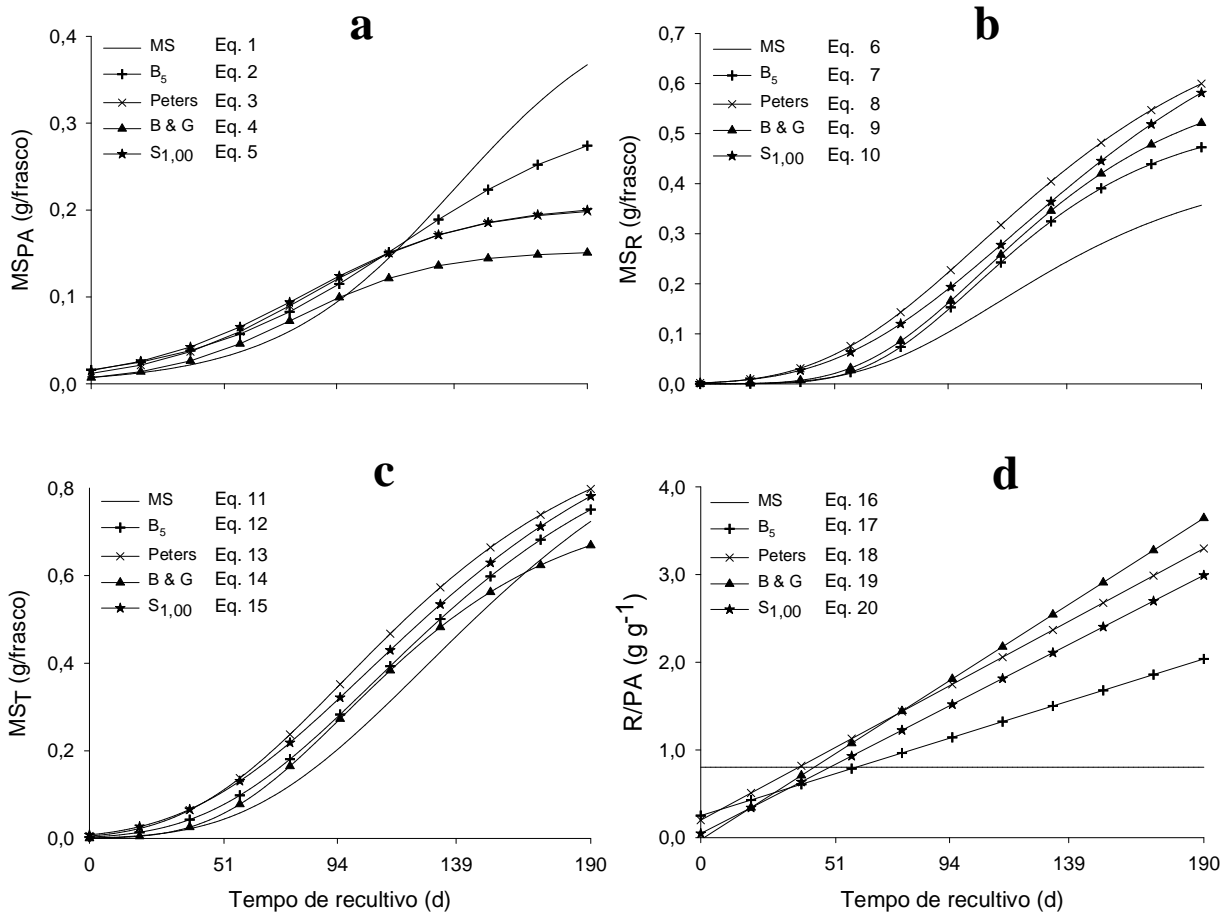
### 3.2. Produção, suprimento nutricional e resposta morfogênica

As produções de matéria seca total e de raiz das plântulas de *Cattleya walkeriana* nos meios MS, B<sub>5</sub>, Peters, B&G e S<sub>1,00</sub>, em função do tempo, ajustaram-se ao modelo de crescimento de Gompertz e a produção de matéria seca da parte aérea ao modelo logístico (Figura 1). Esses modelos refletem o comportamento de crescimento de organismos vivos em ambiente com recursos limitados, seja esse espacial, hídrico, nutricional, dentre outros (Vannderplank, 1963; Hunt, 1972).

Os conteúdos dos nutrientes nas plântulas, ao longo do tempo, demonstraram que o conteúdo dos nutrientes adicionados ao meio, via sais minerais, não seria capaz de suprir a demanda nutricional dessas durante os 190 d de cultivo (Figura 2 e Quadro 4). Assim, durante o crescimento dessas plântulas ocorreu limitação na sua nutrição mineral, sendo essa limitação diferenciada entre os meios de cultura com relação ao nutriente e à época em que ocorreu o déficit entre a quantidade de nutriente adicionada, via sais minerais, e o extraído pela cultura (Figura 2).

Todos os meios apresentaram déficit para, pelo menos, três nutrientes (Quadro 4). Ao considerar as quantidades dos nutrientes adicionadas aos meios via carvão ativado, ágar e sacarose, e os déficits, percebe-se que a cultura foi suprida, em parte, por nutrientes constituintes desses componentes do meio de cultura (Quadro 4). Os meios Peters e B<sub>5</sub> tiveram o maior número de nutrientes deficitários (6 de 10 nutrientes avaliados).

Cálcio, Mg e Mn apresentaram déficit em todos os meios, com a exceção do Mg no meio B&G (Quadro 4). No meio Peters o Ca absorvido pelas plântulas foi suprido durante todo o cultivo pelo Ca constituinte dos outros componentes do meio de cultura, que não os sais minerais, principalmente do carvão ativado (3,55 mg/frasco de Ca), e os conteúdos de Zn, Mn e Cu tiveram, respectivamente, apenas 24; 18 e 5 % suprido pelos sais. O meio S<sub>1,00</sub> foi o que apresentou menor número de nutrientes deficitários, apenas três, sendo esses os mesmos que apresentaram déficit nos demais meios (Ca, Mg e Mn) (Quadro 4). Isto sugere que o meio de cultura S<sub>1,00</sub> ofereceu a melhor condição de suprimento nutricional durante a fase de recultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* quando comparado aos meios MS, B<sub>5</sub>, Peters e B&G, tradicionalmente utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas.



Eq. 1:  $\hat{y} = 0,450^{**}/(1 + (60,1 e^{-0,0294^* t}))$ ;  $R^2 = 0,9983$

Eq. 2:  $\hat{y} = 0,320^{**}/(1 + (19,0 e^{-0,0249^* t}))$ ;  $R^2 = 0,9950$

Eq. 3:  $\hat{y} = 0,204^{**}/(1 + (16,0 e^{-0,0333^* t}))$ ;  $R^2 = 0,9947$

Eq. 4:  $\hat{y} = 0,153^{**}/(1 + (20,7 e^{-0,0384^* t}))$ ;  $R^2 = 0,9652$

Eq. 5:  $\hat{y} = 0,207^{**}/(1 + (12,6 e^{-0,0309^* t}))$ ;  $R^2 = 0,9887$

Eq. 6:  $\hat{y} = 0,443^* e^{(-e^{(2,249^* - (0,0199^* t))})}$ ;  $R^2 = 0,9943$

Eq. 7:  $\hat{y} = 0,537^{**} e^{(-e^{(2,518^* - (0,0241^* t))})}$ ;  $R^2 = 0,9934$

Eq. 8:  $\hat{y} = 0,763^{**} e^{(-e^{(1,807^{**} - (0,0170^{**} t))})}$ ;  $R^2 = 1,0000$

Eq. 9:  $\hat{y} = 0,618^{**} e^{(-e^{(2,316^{**} - (0,0215^* t))})}$ ;  $R^2 = 0,9972$

Eq. 10:  $\hat{y} = 0,820^{**} e^{(-e^{(1,801^{**} - (0,0151^* t))})}$ ;  $R^2 = 0,9999$

Eq. 11:  $\hat{y} = 1,064^* e^{(-e^{(1,756^{**} - (0,0162^* t))})}$ ;  $R^2 = 0,9949$

Eq. 12:  $\hat{y} = 0,980^{**} e^{(-e^{(1,934^{**} - (0,0152^* t))})}$ ;  $R^2 = 0,9878$

Eq. 13:  $\hat{y} = 0,973^{**} e^{(-e^{(1,651^{**} - (0,0172^* t))})}$ ;  $R^2 = 0,9994$

Eq. 14:  $\hat{y} = 0,773^{**} e^{(-e^{(2,016^{**} - (0,0208^* t))})}$ ;  $R^2 = 0,9912$

Eq. 15:  $\hat{y} = 1,035^{**} e^{(-e^{(1,581^{**} - (0,0150^* t))})}$ ;  $R^2 = 0,9995$

Eq. 16:  $\hat{y} = \bar{y} = 0,8029$

Eq. 17:  $\hat{y} = 0,251 + 0,009^{**} t$ ;  $R^2 = 0,9030$

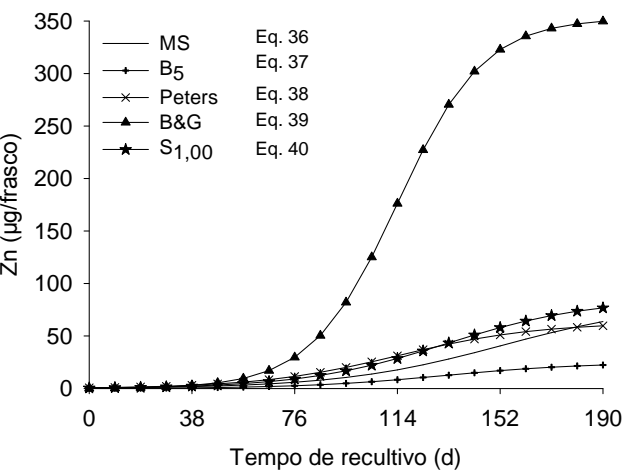
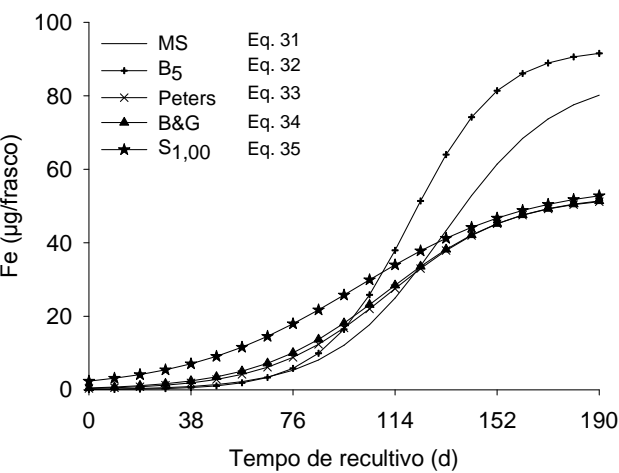
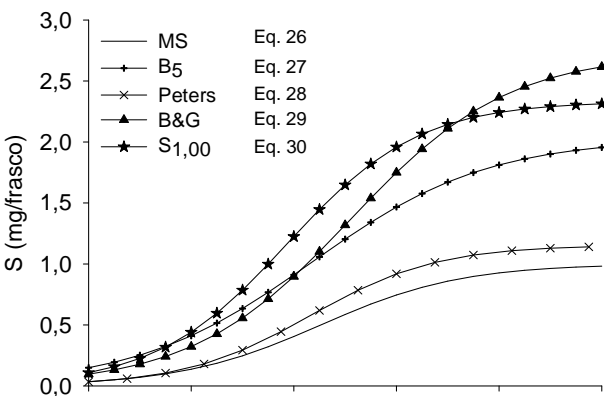
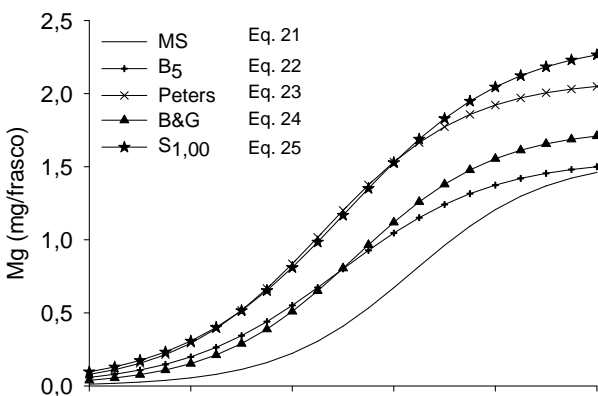
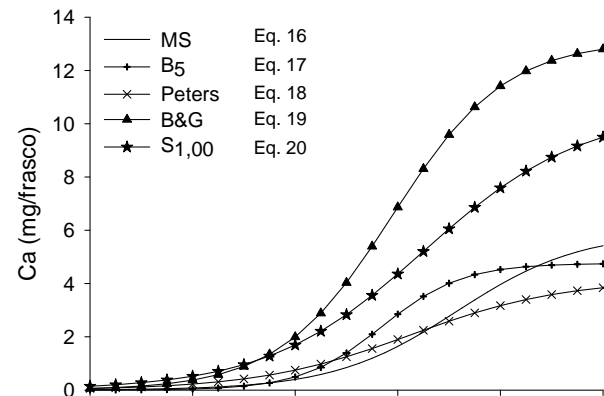
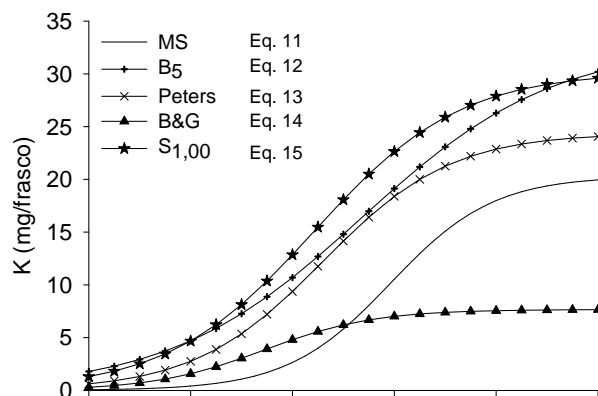
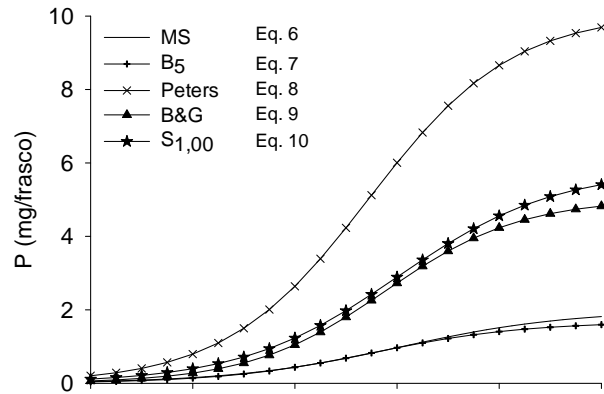
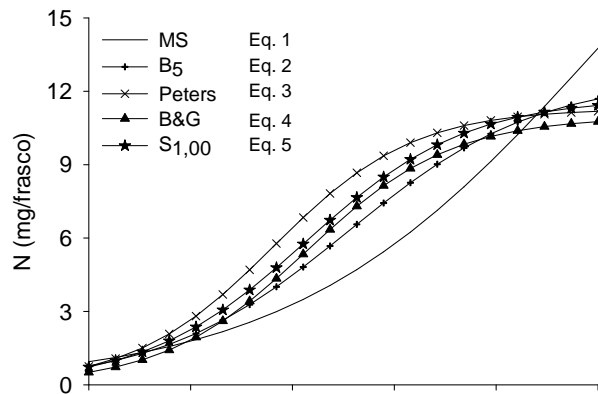
Eq. 18:  $\hat{y} = 0,200 + 0,016^{**} t$ ;  $R^2 = 0,9695$

Eq. 19:  $\hat{y} = -0,024 + 0,019^{**} t$ ;  $R^2 = 0,9971$

Eq. 20:  $\hat{y} = 0,047 + 0,016^{**} t$ ;  $R^2 = 0,9883$

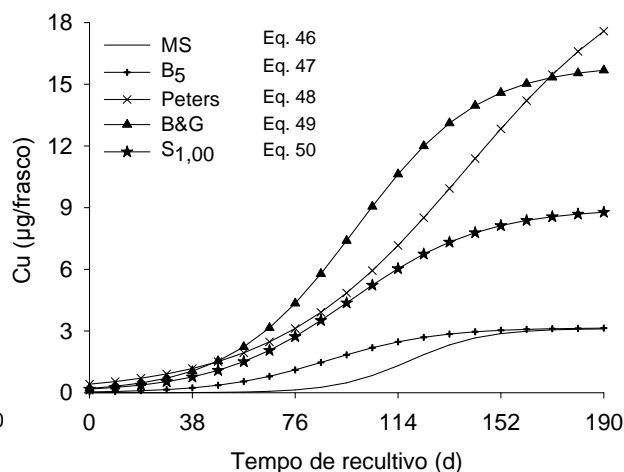
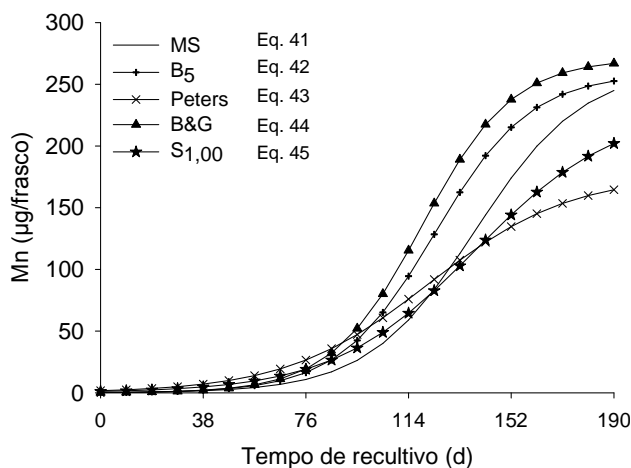
“, °, \*, \*\* Significância a 15, 10, 5 e 1 % pelo teste F.

**Figura 1.** Produção de matéria seca da parte aérea ( $MS_{PA}$  = matéria seca de folha + calo) (a), de raiz ( $MS_R$ ) (b) e total ( $MS_T = MS_{PA} + MS_R$ ) (c) e relação entre matéria seca de raiz e parte aérea (R/PA) (d) de *Cattleya walkeriana*, recultivada nos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962),  $B_5$  (Gamborg et al., 1968), Peters (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante Peters® 10-30-20), B&G (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante B&G®) e Suprimento ( $S_{1,00}$ ), em função do tempo de recultivo .



Continua...

Continuação



- Eq. 1:  $\hat{y} = 27,33^{**}/(1 + (27,88^{\circ} e^{-0,03176^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9943$   
 Eq. 2:  $\hat{y} = 12,53^{**}/(1 + (15,42^{\circ} e^{-0,02832^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9887$   
 Eq. 3:  $\hat{y} = 11,29^{**}/(1 + (13,99^{\circ} e^{-0,03835^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9927$   
 Eq. 4:  $\hat{y} = 10,95^{**}/(1 + (20,40^{\circ} e^{-0,03709^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9972$   
 Eq. 5:  $\hat{y} = 11,72^{**}/(1 + (15,07^{**} e^{-0,03348^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9941$   
 Eq. 6:  $\hat{y} = 1,983^*/(1 + (39,88 e^{-0,03194^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9998$   
 Eq. 7:  $\hat{y} = 1,673^{**}/(1 + (42,83 e^{-0,03569^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9886$   
 Eq. 8:  $\hat{y} = 10,07^{**}/(1 + (4851^{\circ} e^{-0,03747^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9995$   
 Eq. 9:  $\hat{y} = 5,024^{**}/(1 + (77,75 e^{-0,03971^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9986$   
 Eq. 10:  $\hat{y} = 5,815^{**}/(1 + (50,31 e^{-0,03427^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9887$   
 Eq. 11:  $\hat{y} = 20,31^{**}/(1 + (347,3 e^{-0,05194^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9929$   
 Eq. 12:  $\hat{y} = 32,76^{**}/(1 + (17,28^{\circ} e^{-0,02796^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9956$   
 Eq. 13:  $\hat{y} = 24,39^{**}/(1 + (38,61^{\circ} e^{-0,04187^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9995$   
 Eq. 14:  $\hat{y} = 7,663^{**}/(1 + (24,96^{\circ} e^{-0,04915^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9846$   
 Eq. 15:  $\hat{y} = 30,19^{**}/(1 + (22,08^{\circ} e^{-0,03679^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9971$   
 Eq. 16:  $\hat{y} = 5,931^{**}/(1 + (384,0 e^{-0,04376^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9997$   
 Eq. 17:  $\hat{y} = 4,760^{**}/(1 + (1463 e^{-0,06745^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9938$   
 Eq. 18:  $\hat{y} = 4,153^{**}/(1 + (66,73 e^{-0,03534^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9961$   
 Eq. 19:  $\hat{y} = 13,11^{**}/(1 + (209,3 e^{-0,04771^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9991$   
 Eq. 20:  $\hat{y} = 10,47^{**}/(1 + (70,85 e^{-0,03441^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9994$   
 Eq. 21:  $\hat{y} = 1,554^{**}/(1 + (123,4 e^{-0,03986^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9979$   
 Eq. 22:  $\hat{y} = 1,551^{**}/(1 + (25,54 e^{-0,03481^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9866$   
 Eq. 23:  $\hat{y} = 2,094^{**}/(1 + (25,36^{\circ} e^{-0,03715^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9933$   
 Eq. 24:  $\hat{y} = 1,764^{**}/(1 + (45,02 e^{-0,03824^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9966$   
 Eq. 25:  $\hat{y} = 2,367^{**}/(1 + (24,45^{\circ} e^{-0,03293^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9975$

- Eq. 26:  $\hat{y} = 1,000^{**}/(1 + (27,19 e^{-0,03841^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9974$   
 Eq. 27:  $\hat{y} = 2,028^{**}/(1 + (12,60^{\circ} e^{-0,03065^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9936$   
 Eq. 28:  $\hat{y} = 1,154^{**}/(1 + (33,78 e^{-0,04285^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9996$   
 Eq. 29:  $\hat{y} = 2,725^{**}/(1 + (27,32^{\circ} e^{-0,03414^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9991$   
 Eq. 30:  $\hat{y} = 2,332^{**}/(1 + (20,37^{\circ} e^{-0,04099^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9936$   
 Eq. 31:  $\hat{y} = 85,16^{**}/(1 + (582,3 e^{-0,04813^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9945$   
 Eq. 32:  $\hat{y} = 92,78^{**}/(1 + (1593 e^{-0,06144^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9878$   
 Eq. 33:  $\hat{y} = 52,78^{**}/(1 + (147,0 e^{-0,04454^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9901$   
 Eq. 34:  $\hat{y} = 53,22^{**}/(1 + (104,0 e^{-0,04194^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9973$   
 Eq. 35:  $\hat{y} = 50,98^{**}/(1 + (22,66 e^{-0,03119^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9995$   
 Eq. 36:  $\hat{y} = 82,47^{\circ}/(1 + (159,8 e^{-0,03317^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9999$   
 Eq. 37:  $\hat{y} = 24,74^{**}/(1 + (153,5 e^{-0,03829^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9945$   
 Eq. 38:  $\hat{y} = 62,83^{**}/(1 + (85,32 e^{-0,03889^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9975$   
 Eq. 39:  $\hat{y} = 352,7^{**}/(1 + (1280 e^{-0,06274^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9995$   
 Eq. 40:  $\hat{y} = 85,31^{**}/(1 + (150,1 e^{-0,03795^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 1,0000$   
 Eq. 41:  $\hat{y} = 263,7^{**}/(1 + (1064 e^{-0,05022^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9998$   
 Eq. 42:  $\hat{y} = 258,6^{**}/(1 + (1099^{**} e^{-0,05659^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9990$   
 Eq. 43:  $\hat{y} = 176,6^{**}/(1 + (102,6^{\circ} e^{-0,03814^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9979$   
 Eq. 44:  $\hat{y} = 270,8^{**}/(1 + (1228 e^{-0,05978^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9997$   
 Eq. 45:  $\hat{y} = 230,0^{**}/(1 + (204,4^{\circ} e^{-0,03841^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9997$   
 Eq. 46:  $\hat{y} = 3,119^*/(1 + (5625 e^{-0,07298^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9709$   
 Eq. 47:  $\hat{y} = 3,161^{**}/(1 + (81,85 e^{-0,04987^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9998$   
 Eq. 48:  $\hat{y} = 21,75^{**}/(1 + (5124 e^{-0,02829^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9973$   
 Eq. 49:  $\hat{y} = 15,96^{**}/(1 + (75,92 e^{-0,04403^{**} t}))$ ;  $R^2 = 0,9981$   
 Eq. 50:  $\hat{y} = 8,968^{**}/(1 + (50,26 e^{-0,04069^{\circ} t}))$ ;  $R^2 = 0,9996$

°, °, \*, \*\* Significância a 20, 10, 5 e 1 % pelo teste F.

**Figura 2.** Conteúdos de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn e Cu acumulados nos tecidos de *Cattleya walkeriana*, recultivadas nos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968), Peters (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante Peters® 10-30-20), B&G (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante B&G®) e Suprimento (S<sub>1,00</sub>), em função do tempo de recultivo.

**Quadro 4.** Quantidades dos nutrientes adicionadas, via sais minerais, aos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968), Peters (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante Peters® 10-30-20), B&G (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante B&G®) e Suprimento (S<sub>1,00</sub>) e as acumuladas nas plântulas de *Cattleya walkeriana* durante 190 d de recultivo

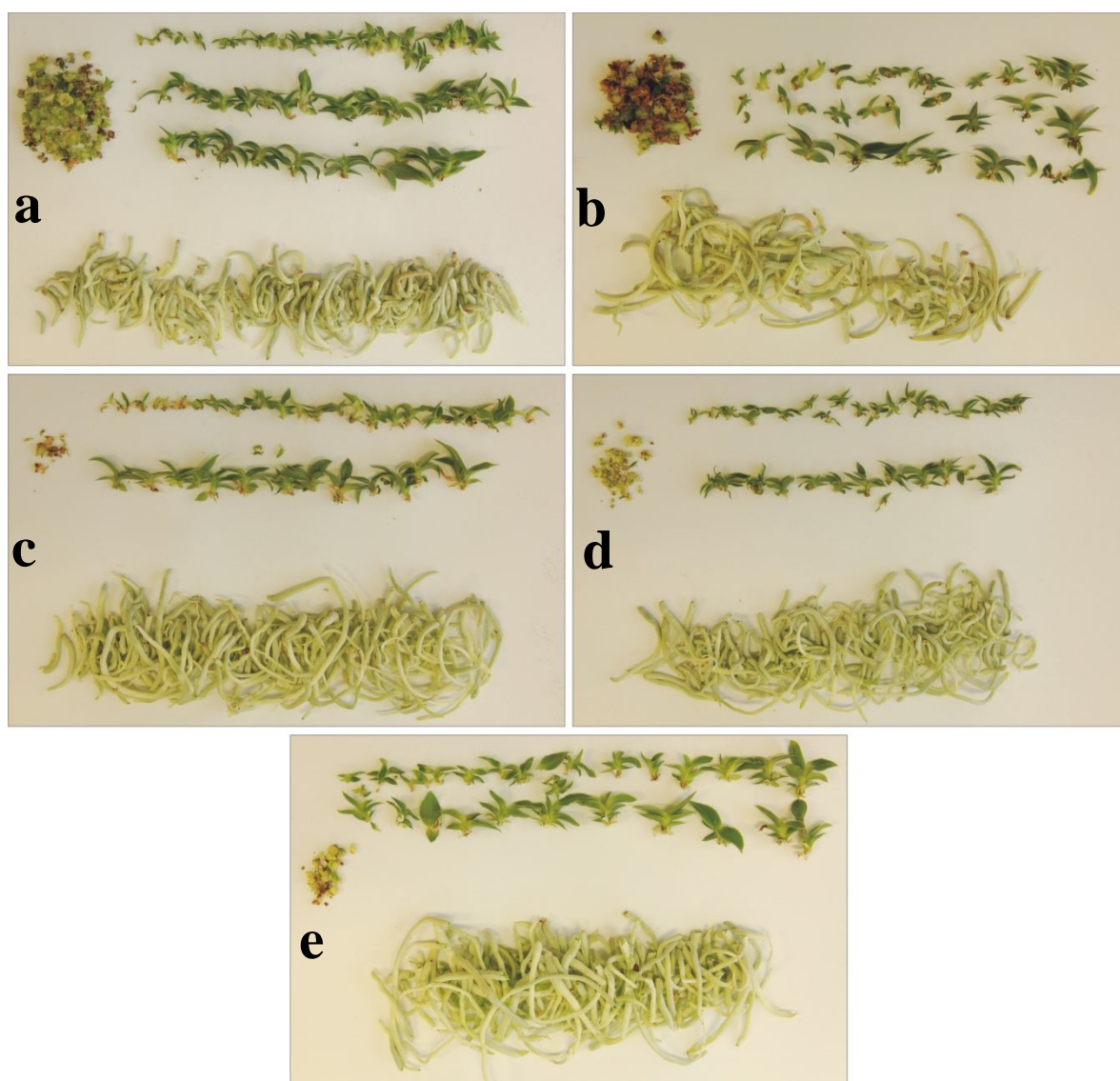
Nutriente	Quantidade	MS	B <sub>5</sub>	mg/frasco		
				Peters	B&G	S <sub>1,00</sub>
<b>N (1,2)<sup>(1)</sup></b>	Adicionada	33,6	15,0	12,0	9,6	13,1
	Acumulada	25,4	11,6	11,5	<b>10,7<sup>(2)</sup></b>	11,5
<b>P (0,40)</b>	Adicionada	1,6	1,2	15,7	5,0	6,0
	Acumulada	<b>1,8</b>	<b>1,6</b>	9,7	4,8	5,4
<b>K (4,4)</b>	Adicionada	31,3	38,7	19,9	7,2	38,0
	Acumulada	19,8	30,2	<b>23,9</b>	<b>7,2</b>	29,2
<b>Ca (3,9)</b>	Adicionada	4,8	1,6	0,0	9,1	7,9
	Acumulada	<b>5,4</b>	<b>4,7</b>	<b>3,9</b>	<b>12,8</b>	<b>9,5</b>
<b>Mg (0,59)</b>	Adicionada	1,4	1,0	1,6	2,1	2,0
	Acumulada	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>2,1</b>	1,7	<b>2,3</b>
<b>S (1,6)</b>	Adicionada	1,9	2,8	2,0	4,8	4,5
	Acumulada	0,8	2,0	1,1	2,6	2,4
				µg/frasco		
<b>Fe (737)</b>	Adicionada	224,0	224,8	60,0	530,4	262,5
	Acumulada	80,0	91,2	50,5	51,0	47,0
<b>Zn (35)</b>	Adicionada	78,0	18,0	30,0	530,4	80,0
	Acumulada	63,8	<b>22,3</b>	<b>60,1</b>	349,2	76,8
<b>Mn (152)</b>	Adicionada	219,6	171,6	30,0	152,4	131,3
	Acumulada	<b>244,9</b>	<b>252,4</b>	<b>165,3</b>	<b>266,8</b>	<b>202,1</b>
<b>Cu (22)</b>	Adicionada	0,2	0,2	15,0	75,6	10,0
	Acumulada	<b>3,1</b>	<b>3,2</b>	<b>17,6</b>	15,9	8,8

<sup>(1)</sup> Os valores dentro dos parênteses representam a quantidade de cada nutriente adicionada ao meio pelo ágar, carvão ativado e sacarose (mg/frasco e µg/frasco para macro e micronutrientes respectivamente). <sup>(2)</sup> Os valores em negrito indicam, para cada meio de cultura, aqueles que tiveram a quantidade acumulada nas plântulas maiores ou iguais àquela adicionado ao meio de cultura via sais minerais.

A produção de MS<sub>T</sub> ao longo do tempo foi semelhante entre os tratamentos; no entanto, para produção de MS<sub>R</sub> e MS<sub>PA</sub> o comportamento foi diferenciado, mostrando resposta morfogênica diferenciada entre tratamentos (Figuras 1 e 3). Os meios MS e B<sub>5</sub> apresentaram maior crescimento de parte aérea ao final do cultivo em relação aos outros meios, os quais proporcionaram maior produção de MS<sub>R</sub>, durante todo o cultivo, quando comparados com os meios MS e B<sub>5</sub> (Figuras 1 e 3).

O efeito do meio de cultura e do tempo sobre a resposta morfogênica do explante pode ser avaliado ao se observar o comportamento da relação R/PA em função do tempo (Figura 1d). A relação R/PA aumentou com o passar do tempo em

todos os meios de cultura, com exceção para o meio MS, demonstrando que a redução na concentração dos nutrientes no meio de cultura, no decorrer do cultivo, induziu os explantes a se adequarem a essa nova condição, mantendo a produção de  $MS_R$  (Figura 1b) e reduzindo a produção de  $MS_{PA}$ , bastante drástica para os explantes crescidos nos meios Peters, B&G e  $S_{1,00}$  (Figura 1a).

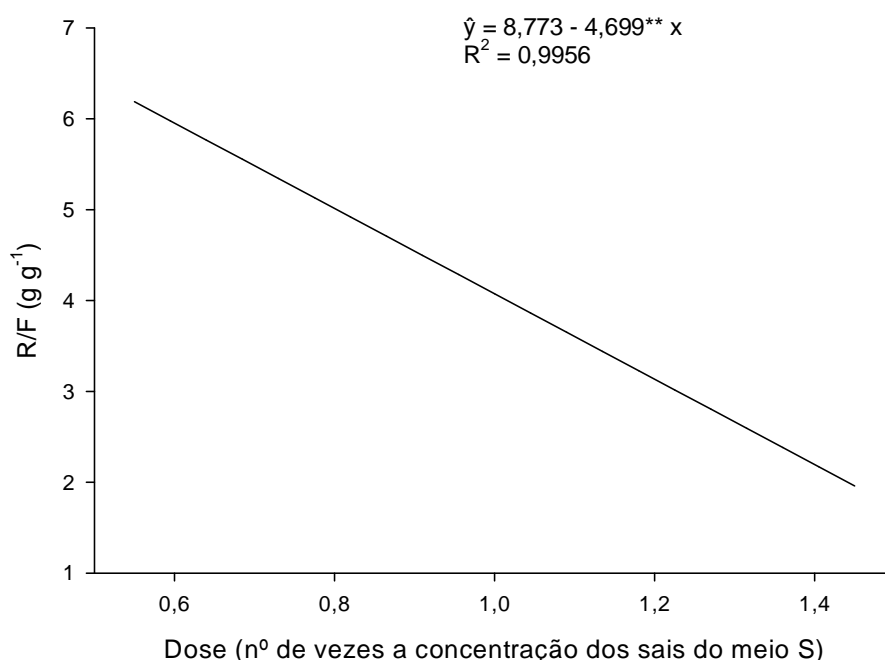


**Figura 3.** Aspecto visual da produção de folha, calo e raiz obtida nos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) (a),  $B_5$  (Gamborg et al., 1968) (b), Peters ( $3 \text{ g L}^{-1}$  do fertilizante Peters® 10-30-20) (c), B&G ( $3 \text{ g L}^{-1}$  do fertilizante B&G®) (d) e Suprimento ( $S_{1,00}$ ) (e) aos 190 d de recultivo dos protocormos de *Cattleya walkeriana*.

A relação R/F diminuiu com o aumento da concentração dos sais do meio S (Figura 4). Essa resposta demonstra, mais uma vez, a capacidade das plântulas de se adaptarem às condições de baixo suprimento nutricional. Rodrigues (2005) demonstrou o mesmo padrão de resposta morfogênica ao estudar o efeito da

concentração dos sais de diferentes meios de cultura sobre a relação R/F em plântulas de *Cattleya walkeriana* e *C. dolosa*, no qual a relação R/F aumentou com a redução da concentração dos sais, independente do meio ou espécie.

Para comparar os efeitos dos meios sobre a resposta morfogênica do explante pode-se analisar as taxas de aumento da relação R/PA em função do tempo (Figura 1d). As declividades para os meios Peters e S<sub>1,00</sub> foram semelhantes (0,016 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e menores que a declividade no meio B&G (0,019 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Já no meio de cultura B<sub>5</sub> a declividade foi de 0,009 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, enquanto que a relação R/PA no meio MS manteve-se inalterada.



**Figura 4.** Efeito da concentração dos sais do meio Suprimento (S) sobre a relação entre a produção de matéria seca de raízes e folhas (R/F) após 190 d de recultivo dos protocormos de *Cattleya walkeriana*. \*\* Significância a 1 % pelo teste F.

Uma análise mais detalhada, feita aos 190 d de recultivo dos protocormos, para a produção de matéria seca e a sua partição em diferentes compartimentos da cultura, evidencia, ainda mais, o efeito da composição nutricional no meio de cultura sobre a resposta morfogênica dos explantes (Quadros 5 e 6 e Figura 3).

O meio S<sub>1,00</sub> proporcionou uma produção de MS<sub>T</sub> (0,779 g/frasco) maior que a produtividade esperada (0,7 g/frasco de MS<sub>T</sub>) e semelhante aos meios tradicionais, MS e B<sub>5</sub>, (C<sub>A</sub>) e aos meios contendo adubos comerciais como fonte de nutrientes, Peters e B&G (C<sub>B</sub>). No entanto, os meios MS e B<sub>5</sub> proporcionaram maior produção

de  $MS_C$  quando comparados com os meios Peters e B&G ( $C_2$ ) e  $S_{1,00}$  ( $C_A$ ) (Figura 3). A produção de  $MS_C$  foi igual para estes meios ( $C_4$  e  $C_B$ ). Dentro do grupo dos meios tradicionais a produção de  $MS_C$  no meio MS foi 137 mg/frasco maior que no meio  $B_5$  ( $C_2$ ) (Quadros 5 e 6 e Figura 3).

**Quadro 5.** Produção de matéria seca de folha ( $MS_F$ ), calo ( $MS_C$ ), raiz ( $MS_R$ ), parte aérea ( $MS_{PA} = MS_F + MS_C$ ), plântula completa ( $MS_P = MS_F + MS_R$ ) e total ( $MS_T = MS_F + MS_C + MS_R$ ) e relação raiz/folha (R/F) obtidas nos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962),  $B_5$  (Gamborg et al., 1968), Peters (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante Peters® 10-30-20), B&G (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante B&G®) e Suprimento ( $S_{1,00}$ ) aos 190 d de recultivo dos protocormos de *Cattleya walkeriana*

Tratamento	$MS_F$	$MS_C$	$MS_R$	$MS_{PA}$	$MS_P$	$MS_T$	R/F
	g/frasco						g g <sup>-1</sup>
<b>MS</b>	0,136	0,230	0,354	0,366	0,490	0,720	2,62
<b><math>B_5</math></b>	0,148	0,126	0,465	0,274	0,614	0,739	3,15
<b>Peters</b>	0,138	0,056	0,599	0,195	0,737	0,793	4,36
<b>B&amp;G</b>	0,103	0,038	0,517	0,141	0,620	0,658	5,11
<b><math>S_{1,00}</math></b>	0,160	0,036	0,583	0,196	0,742	0,779	3,69

Quando comparado com os demais meios de cultura ( $C_1$ ), o meio  $S_{1,00}$  proporcionou maior produção de matéria seca de plântulas completas ( $MS_P$ ) ao final do cultivo, que é o principal objetivo deste tipo de propagação de orquídeas, visto que o número de plântulas obtidas via sementes é muito grande, não havendo, então, a necessidade de multiplicação destas por meio de calogênese. A produção de  $MS_P$  nos meios Peters e B&G foi 126,5 mg/frasco maior que nos meio MS e  $B_5$  ( $C_2$ ), sendo que no meio  $B_5$  essa produção foi 123,3 mg/frasco maior que no meio MS ( $C_3$ ), e no meio Peters foi 116,7 mg/frasco maior que no meio B&G ( $C_4$ ). Apesar do meio  $S_{1,00}$  ter proporcionado maior produção de  $MS_P$  em relação à média dos demais meios, esta diferença torna-se mais evidente quando esse meio é comparado com os meios MS e  $B_5$  ( $C_A$ ); no entanto, quando o meio  $S_{1,00}$  é comparado com os meios Peters e B&G ( $C_B$ ) essa diferença não é mais percebida (Quadros 5 e 6).

Ventura (2007) obteve produções de matéria seca de plântulas de *Laelia anceps* cultivadas no meio Peters (3 g L<sup>-1</sup> da formulação 10-30-20) e B&G (3 g L<sup>-1</sup>) maior que no meio  $B_5$ . Para *C. bicollor*, esse autor obteve produção de matéria fresca de plântulas maior no meio Peters (3 g L<sup>-1</sup> da formulação 10-30-20) em relação aos meios MS e  $B_5$ .



A relação R/F das plântulas obtidas nos meios MS, B<sub>5</sub>, Peters, B&G e S<sub>1,00</sub> foi muito variada (Quadro 5). Os meios MS e B<sub>5</sub> resultaram em menor relação R/F quando comparados com os meios Peters e B&G. Já a relação R/F no meio S<sub>1,00</sub> (3,69 g g<sup>-1</sup>) foi 1,05 g g<sup>-1</sup> menor que a obtida nos meios Peters e B&G e 0,80 g g<sup>-1</sup> maior que a obtida nos meios MS e B<sub>5</sub> (Quadros 5 e 6).

A resposta morfogênica foi, também, diferenciada em relação à concentração dos sais do meio S (Figura 5). Além da relação R/PA, a produção de MS<sub>C</sub> reduziu com o aumento da concentração. Como o objetivo desse sistema de cultivo é a produção de plântulas completas, utilizou-se a curva de produção de MS<sub>P</sub>, obtida aos 190 d de recultivo dos protocormos, para determinar a concentração ótima desses. Assim, a concentração estimada para a máxima produção de MS<sub>P</sub> (0,744 g/frasco) foi de 1,125 vez a concentração original do meio S.

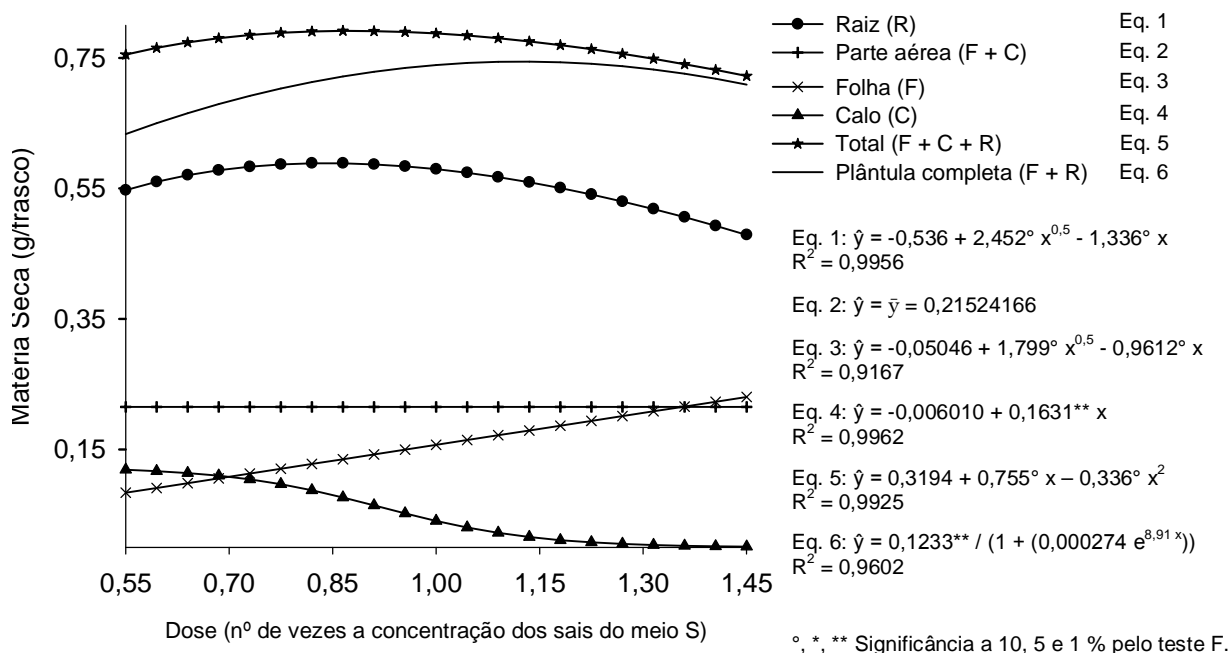
**Quadro 6.** Contraste médio para produção de matéria seca de folha (MS<sub>F</sub>), calo (MS<sub>C</sub>), raiz (MS<sub>R</sub>), parte aérea (MS<sub>PA</sub> = MS<sub>F</sub> + MS<sub>C</sub>), plântula completa (MS<sub>P</sub> = MS<sub>F</sub> + MS<sub>R</sub>) e total (MS<sub>T</sub> = MS<sub>F</sub> + MS<sub>C</sub> + MS<sub>R</sub>) e relação raiz/folha (R/F) obtidas nos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968), Peters (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante Peters<sup>®</sup> 10-30-20), B&G (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante B&G<sup>®</sup>) e Suprimento (S<sub>1,00</sub>) aos 190 d de recultivo dos protocormos de *Cattleya walkeriana*

Contraste	MS <sub>F</sub>	MS <sub>C</sub>	MS <sub>R</sub>	MS <sub>PA</sub>	MS <sub>P</sub>	MS <sub>T</sub>	R/F
	mg/frasco						g g <sup>-1</sup>
<b>C1</b>	28,4°	-73,2°	98,9*	-44,8	127,3*	54,1	-0,12
<b>C2</b>	-21,8	-137,0**	148,3**	-158,8**	126,5**	-10,5	1,85**
<b>C3</b>	11,9	-104,5*	111,4*	-92,6°	123,3°	18,8	0,52
<b>C4</b>	-35,4°	-31,3	-81,4	-66,6	-116,7°	-148,0°	0,75*
<b>C<sub>A</sub></b>	17,5	-141,7**	173,0**	-124,2**	190,6**	48,8	0,80*
<b>C<sub>B</sub></b>	39,3*	-4,7	24,7	34,6	64,0	59,3	-1,05**

C1 → Outros vs S<sub>1,00</sub>; C2 → MS + B<sub>5</sub> vs Peters + B&G; C3 → MS vs B<sub>5</sub> e C4 → Peters vs B&G. Contrastes adicionais: C<sub>A</sub> → MS + B<sub>5</sub> vs S<sub>1,00</sub> e C<sub>B</sub> → Peters + B&G vs S<sub>1,00</sub>.

°, \*, \*\* Significância a 10, 5 e 1 % pelo teste F.

Como não foi utilizada qualquer fonte exógena de reguladores de crescimento nos meios de cultura e os tratamentos ficaram sob as mesmas condições de cultivo, pode-se atribuir a resposta morfogênica dos explantes ao efeito da composição mineral dos meios de cultura e, ou, sobre os teores dos nutrientes nos tecidos, os quais podem induzir o explante a respostas morfogênicas diferenciadas.



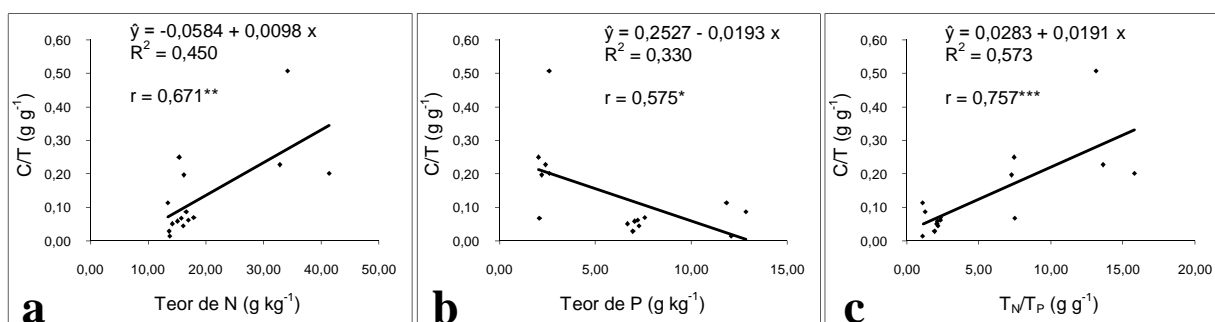
**Figura 5.** Produção de matéria seca aos 190 d de recultivo dos protocormos de *Cattleya walkeriana* em função da concentração dos sais do meio Suprimento (S).

Os teores de N ( $T_N$ ) nos tecidos de todo o material vegetal produzido, aos 190 d de recultivo, nos meios B<sub>5</sub>, Peters, B&G e S<sub>1,00</sub> foram semelhantes entre si (Quadro 7) e próximos ao  $TN_N$  (15,0 g kg<sup>-1</sup>), enquanto que no meio MS o teor de N foi 2,4 vezes maior que este (36,1 g kg<sup>-1</sup>). Este meio foi o que proporcionou maior formação de calos e maior relação R/PA (Quadro 5). Os meios MS e B<sub>5</sub> foram os que induziram maior formação de MS<sub>C</sub> e ambos promoveram o crescimento de plântulas completas e calo com os menores teores de P ( $T_P$ ) em seus tecidos (Quadro 7). A influência dos teores de N e P, e da interação entre eles sobre a resposta morfogênica dos explantes torna-se mais evidente pela análise das correlações entre a relação C/T e  $T_P$ , C/T e  $T_N$  e C/T e  $T_N/T_P$  (Figura 6), que demonstram que a relação entre os teores de N e P nos tecidos do explante é mais importante para a resposta à formação de calo, que apenas os teores de N ou de P, pois o coeficiente de correlação entre C/T e  $T_N/T_P$  é maior que os coeficientes das correlações entre C/T e  $T_P$  e C/T e  $T_N$ . É importante ressaltar que a composição mineral do meio MS foi elaborada originalmente para a produção de calos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Murashige & Skoog, 1962). Os meios MS e B<sub>5</sub>, também, proporcionaram os maiores teores de Fe e os menores de Cu em relação aos demais meios.

**Quadro 7.** Teores nutricionais de referência (TN) e nos tecidos de calos e plântulas obtidos nos meios MS, B<sub>5</sub>, Peters, B&G e S<sub>1,00</sub> aos 190 d de recultivo dos protocormos de *Cattleya walkeriana*

Meio	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Mn	Cu
TN <sub>j</sub>	15,0	6,0	38,0	9,0	2,3	4,5	300	80	150	10,0
MS	36,1 a	2,54 c	26,4 b	7,2 c	1,98 c	1,16 c	103 a	86 b	320 a	4,1 c
B <sub>5</sub>	15,7 b	2,12 c	40,7 a	6,3 c	1,98 c	2,68 b	123 a	30 c	341 a	4,3 c
Peters	14,6 b	12,25 a	30,1 b	4,9 d	2,67 b	1,36 c	63 b	76 b	207 b	22,5 a
B&G	16,3 b	7,30 b	11,0 c	19,4 a	2,58 b	4,02 a	77 b	530 a	405 a	24,2 a
S <sub>1,00</sub>	14,9 b	6,95 b	37,7 a	12,2 b	2,95 a	3,05 b	60 b	98 b	253 b	11,1 b

Valores dos teores de cada nutriente seguidos pela mesma letra não se diferenciam pelo teste Scott-Knott a 5 %.



\*, \*\*, \*\*\* Significância a 5, 1 e 0,1 %.

**Figura 6.** Relações entre a razão matéria seca de calo / matéria seca total (C/T) e os teores de N (T<sub>N</sub>) (a) e P (T<sub>P</sub>) (b) e a razão T<sub>N</sub>/T<sub>P</sub> (c) para os dados obtidos aos 190 d de recultivo dos protocormos de *Cattleya walkeriana* nos meios MS, B<sub>5</sub>, Peters, B&G e S<sub>1,00</sub>.

Rodrigues (2005), ao estudar a produção *in vitro* de plântulas de *C. dolosa* e os teores nutricionais nos tecidos dessas plântulas em meios contendo 2,25 g L<sup>-1</sup> do fertilizante Peters® nas formulações 10-30-20 (Peters<sub>10-30-20</sub>) e 30-10-10 (Peters<sub>30-10-10</sub>), obteve, respectivamente, maior e menor relações R/PA e T<sub>N</sub>/T<sub>P</sub> nas plântulas cultivadas no meio Peters<sub>10-30-20</sub> quando comparadas com as relações R/PA e T<sub>N</sub>/T<sub>P</sub> nas plântulas obtidas no meio Peters<sub>30-10-10</sub>. A relação N/P no meio Peters<sub>30-10-10</sub> (6,87 g g<sup>-1</sup>) é maior que no meio Peters<sub>10-30-20</sub> (0,76 g g<sup>-1</sup>), assim como a relação N/P nos meios MS e B<sub>5</sub> (21,65 e 12,5 g g<sup>-1</sup>, respectivamente), os quais levaram a menor relação R/PA e a maior relação T<sub>N</sub>/T<sub>P</sub> neste experimento, é maior que nos meios Peters, B&G e S.

O meio MS e B<sub>5</sub> possuem maiores concentrações de N na forma nítrica que os demais meios. Scheible et al. (1997a, b) mostraram evidências do papel do NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

na regulação da morfogênese de plantas. Usando mutantes de tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia*) deficientes em redutase do nitrato, esses autores mostraram correlação entre o acúmulo de nitrato nos brotos e a drástica redução no crescimento de raízes, obtendo, assim, plântulas com menor relação R/PA.

De forma geral o meio S<sub>1,00</sub> proporcionou o crescimento de plântulas com os teores nutricionais mais próximos aos teores nutricionais de referência ( $TN_i$ ), com exceção para os teores de Fe e Mn, os quais foram menor e maior, respectivamente, que seus  $TN$ , isto se repetiu para todos os outros meios, indicando assim, que os  $TN_{Fe}$  e  $TN_{Mn}$  não seriam adequados para plântulas de catlêia cultivadas *in vitro* (Quadro 7). O teor de K nos tecidos obtidos no meio B&G foi muito baixo quando comparado com os obtidos nos demais tratamentos e com o  $TN_K$ . Além disso, nesse mesmo tratamento, os teores de Zn e Mn foram muito elevados em relação aos demais (Quadro 7). O meio Peters, apesar de promover um bom crescimento de plântulas completas, apresentou teores de Ca e S, nos tecidos dessas plântulas, muito a baixo dos demais tratamentos e do  $TN_{Ca}$  e  $TN_S$ , enquanto o teor de P foi muito elevado e maior que os demais tratamentos e o  $TN_P$ .

## 4. Conclusões

- Foi estabelecido um novo meio de cultura para o recultivo de plântulas de *Cattleya walkeriana*, o qual foi denominado de meio Suprimento (S);
- O meio S ofereceu a melhor condição de suprimento nutricional para a produção de plântulas de *Cattleya walkeriana* quando comparado com os meios MS (Murashige & Skoog, 1962), B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968), Peters (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante Peters<sup>®</sup> 10-30-20) e B&G (3 g L<sup>-1</sup> do fertilizante B&G<sup>®</sup>);
- A concentração que proporcionou a máxima produção de plântulas completas foi de 1,125 vez a concentração original de sais do meio S;
- Os meios contendo maiores concentrações de N e menores de P levaram ao aumento na relação entre os teores de N e P ( $T_N/T_P$ ) nos tecidos da cultura, a qual apresentou elevada correlação positiva com a relação entre a produção de matéria seca de calo e total;
- Alta relação  $T_N/T_P$  induziu a redução na produção de raízes;
- A relação entre a produção de raízes e folhas aumentou quando a concentração dos nutrientes no meio foi reduzida, seja pelo consumo da cultura ou pela redução na concentração dos sais no meio S.

## 5. Bibliografia

- ARDITTI, J. & ERNST, R. Micropropagation of orchids. 1.ed. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1992. 682p.
- BLACK, P.McK. Orquídeas. 1.ed. Hamlyn Publishing Group Limited. Tradução Maria Adelaide Freitas Soares. Rio de Janeiro, Livro Técnico S/A. 1973. 128p.
- BOUMAN, H.M.B.T.A. Development of new tissue culture media, using the relation between mineral composition of plant and medium. Acta Hort., 560:373-376, 2001.
- BRAGA, J.M. & DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extrato de solos e material vegetal. R. Ceres, 21:73-85, 1974.
- 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. Exp. Bot, 31:61-64, 1993.
- COUSSON, A. & TRAN THANH VAN, K. Influence of ionic composition of the culture medium on *de novo* flower formation in tobacco thin cell layers. Can. J. Bot., 71:506–511, 1993.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. 1.ed. New York, Columbia University Press, 1981. 1262p.
- EIGELDINGER, O. & MURPHY, L.S. Orchids – A complete guide to cultivation. 1.ed. London, John Gifford Ltda, 1972. p.154-167.
- 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 Breed. Appl. Biotech., 2:489-492, 2002.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50:151-158, 1968.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A. & DE KLERK, G.J. Plant propagation by tissue culture. v.1 The Background, 3.ed. Springer, Dordrecht, 2008.501 p.
- HUNT, T. Plant growth analysis. London, Edward Arnold, 1978. 67p.
- JACKSON, M.L. Soil chemical analysis. Advanced course. 2.ed. Madison, 1979. 895p.

- JONES JR, J.B; WOLF, B. & MILLS, H.A. Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide. Athens, Georgia: Micro-Macro Publishing Inc., 1991. p.89-127.
- KNUDSON, L. Nutrient solutions for orchids. Bot. Gaz., 112:528-532, 1951.
- KUMARIA, S. & TANDON, P. Asymbiotic germination of *Dendrobium fimbriatum* var. *oculatum* Hk. F. seeds on different media. Proc. Indian Natl. Sci. Acad., 57:277-279, 1991.
- LUMSDEN, P. J.; PRYCE, S. & LEIFERT, C. Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of *in vitro* cultured plants. In: NIJKAMP, H. J. J.; VAN DER PLAS, L. H. W. & VAN AARTIJK, J. eds. Plant cell and molecular biology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1990. p.108–113.
- McGRANAHAN, G. H.; DRIVER, J. A. & TULECKE, W. Tissue culture of *Juglans*. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D. J. eds. Cell and tissue culture in forestry: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, v.3, p.261-271.
- MENEZES, L.C. *Cattleya labiata* Lindley. Orquídeas brasileiras. 1.ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 1987. 112 p.
- MONTEIRO, A.C.B.D.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N. & RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. F-flavicarpa Deg.). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 36:527-531, 2000.
- MURASHIGE, T & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15:473-497, 1962.
- NAS, M.N. & READ, P.E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. Sci. Hort., 101:189-200, 2004.
- 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. Hort., 94:107-116, 2002.
- 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.

- RAMAGE, C. M. The role of mineral nutrients in the regulation of plant development *in vitro*. The University of Queensland, 1999. 454 p. (Ph.D. Thesis)
- RAMAGE, C.M. & WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38:116–124, 2002.
- REGO-OLIVEIRA, L.V. & FARIA, R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers 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)
- SHEEHAN, T.J. Orchids. In: LARSON, R.A. ed. Introduction to floriculture. 2.ed. San Diego, Academic Press, 1992. p.13-142.
- SCHEIBLE, W. R.; GONZALEZ-FONTES, A.; LAUERER, M.; MULLER-ROBER, B.; CABOCHE, M. & STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*, 9:783-798, 1997a.
- SCHEIBLE, W. R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E. D.; CABOCHE, M. & STITT, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot–root allocation in tobacco. *Plant J.*, 11:671-691, 1997b.
- SPAARGAREN, D.H. The design of culture media based on elemental composition of biological material. *J. Biotech.*, 45:97–102, 1996.
- STAIKIDOU, I.; SELBY, C. & HANKS, G.R. Development of a medium for *in vitro* culture of *Galanthus* species based on the mineral composition of bulbs. *J. Hort. Sci. Biotech.*, 81:537-545, 2006.
- VACIN, E.T. & WENT, F.W. pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.*, 110:605-613, 1949.
- VANDERPLANK, J. E. Plant diseases: Epidemics and control. New York, Academic Press, 1963. 349p.
- VENTURA, G.M. Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2002. 147p. (Dissertação de Mestrado)
- VENTURA, G.M. Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiância. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2007. 110p. (Tese de Doutorado)