

LETÍCIA DE MENEZES GONÇALVES

EFEITO DE DIFERENTES SUPLEMENTOS ADICIONADOS NO CULTIVO *IN VITRO* DO HÍBRIDO *LAELIACATTLEYA*

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
JULHO – 2010**

LETÍCIA DE MENEZES GONÇALVES

EFEITO DE DIFERENTES SUPLEMENTOS ADICIONADOS NO CULTIVO *IN VITRO* DO HÍBRIDO *LAELIACATTLEYA*

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
JULHO - 2010**

LETÍCIA DE MENEZES GONÇALVES

**EFEITO DE DIFERENTES SUPLEMENTOS ADICIONADOS AO MEIO
NUTRITIVO PARA O CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em:

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que sempre esteve do meu lado dando-me muita calma, nos momentos de nervosismo e ansiedade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora, professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, que me ajudou muitíssimo na conclusão desse trabalho, tendo uma paciência imensa comigo durante a orientação.

À professora doutora Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre, pela oportunidade de estágios, trabalhos apresentados em vários Encontros Científicos de Biologia, pela disponibilidade dos laboratórios, materiais para produção desse trabalho e de tantos outros.

À minha família, pela compreensão e auxílio, ajudando-me no que estava ao alcance de todos.

Ao meu namorado, Felipe Leone, que sempre me ajudou, nos momentos de desânimo, a me reerguer.

À Secretaria do Programa de Pós-graduação em Agronomia, em especial, à Érica, que sempre me auxiliou no que precisei.

A todos os meus amigos, em especial, à Ângela, Renata, ao Lúcio, Rogeriús, Ulisses e Evandro, pelos incentivos.

A todos os amigos do Programa, em especial às minhas amigas Ellen K. Piffer e Josiele Carneiro, por sempre estar ao meu lado, com verdadeira amizade e auxílio durante os anos de convivência.

BIOGRAFIA

LETÍCIA DE MENEZES GONÇALVES, filha de José Joaquim Gonçalves Melo e Ivone de Menezes Gonçalves, nasceu em 15 de fevereiro de 1981, em Paranavaí – PR.

Graduou-se em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia na Universidade Paranaense (UNIPAR), campus Toledo – PR, em 2005.

Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia na área de Produção Vegetal, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Estado do Paraná, concluindo em dezembro de 2006.

Em março de 2007, iniciou o curso de Doutorado também no programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá.

Em julho de 2010, submeteu-se à banca para defesa da Tese.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos gerais da cultura	4
2.2. Os gêneros <i>Cattleya</i> e <i>Hadrolaelia</i> (CHIRON & CASTRO, 2002) (= <i>Laelia purpurata</i> LINDLEY & PAXTON, 1852)	6
2.3. Obtenções de plântulas por micropropagação	8
2.4. Meios de cultura	10
2.4.1. Componentes dos meios de cultura	11
2.4.1.1. Macronutrientes e micronutrientes	12
2.4.1.2. Carboidratos	12
2.4.1.3. Água de coco	13
2.4.1.4. Polpa de banana	15
2.4.1.5. Reguladores de crescimento	17
2.4.1.5.1. Auxinas	17
2.4.1.5.2. Citocininas	18
2.4.2. pH	19
2.4.3. Iluminação	20
2.4.4. Temperatura	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Efeitos de reguladores de crescimento, banana e água de coco no crescimento e desenvolvimento do híbrido <i>Laeliacattleya</i> (<i>Hadrolaelia purpurata</i> Lindl. (Chiron; Castro) x <i>Cattleya intermedia</i> Grah.)	23
3.2. Conduções dos experimentos e coleta de dados	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Efeito da adição de reguladores de crescimento, água de coco e polpa de banana, em meio “KC” para o desenvolvimento de raízes e folhas em plântulas do híbrido <i>Laeliacattleya</i> (<i>Hadrolaelia purpurata</i> Lindl. (Chiron; Castro) x <i>Cattleya intermedia</i> Grah.)	25
4.2. Efeito da adição de reguladores de crescimento, água de coco e polpa de banana, em meio “KC” para o desenvolvimento de brotos em plântulas do híbrido <i>Laeliacattleya</i> (<i>Hadrolaelia purpurata</i> Lindl. (Chiron; Castro) x <i>Cattleya intermedia</i> Grah.), e análise das variações de pH dos meios de cultura	31
4.3. Processo de aclimação e desenvolvimento das plântulas do híbrido <i>Laeliacattleya</i> (<i>Hadrolaelia purpurata</i> Lindl. (Chiron; Castro) x <i>Cattleya intermedia</i> Grah.) <i>ex vitro</i>	34
5. CONCLUSÕES	38
6. REFERÊNCIAS	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Meio básico – formulação “C” de Knudson (KNUDSON, 1946) ...	11
Tabela 2 -	Análise de variância para as características NR (número de raízes), NF (número de folhas), comprimento das raízes (CR), e comprimento de folha (CF) de plântulas do híbrido <i>Laeliacattleya</i> , cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas de 0,0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg · L ⁻¹ de IBA x 6-BA, IBA x KIN, NAA x 6-BA, NAA x KIN, com 100 ml de água de coco, e com 90 mg · L ⁻¹ de polpa de banana, após 8 meses da inoculação	25
Tabela 3 -	Teste de média para as variáveis NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento de folha), das plântulas do híbrido <i>Laeliacattleya</i> , cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas de 0,0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg · L ⁻¹ de IBA x 6-BA, IBA x KIN, NAA x 6-BA, NAA x KIN, com 90 g · L ⁻¹ de polpa de banana e 100 mL de água de coco, após 8 meses da inoculação	27
Tabela 4	Análise de variância para a característica NB (número de brotos) formados nas plântulas do híbrido <i>Laeliacattleya</i> , cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas de 0,0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg · L ⁻¹ de IBA x 6-BA, IBA x KIN, NAA x 6-BA, NAA x KIN, com 90 mg · L ⁻¹ de polpa de banana e 100 ml · L ⁻¹ de água de coco, e variação do pH do meio após 8 meses da inoculação	32
Tabela 5 -	Teste de média para as variáveis NB (número de brotos) e pH, das plântulas do híbrido <i>Laeliacattleya</i> , cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas de 0,0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg · L ⁻¹ de IBA x 6-BA, IBA x KIN, NAA x 6-BA, NAA x KIN, com 90 g · L ⁻¹ de polpa de banana e 100 mL de água de coco, após 8 meses da inoculação	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Flores de <i>Cattleya intermedia</i>	7
Figura 2 - Flores de <i>Hadrolaelia purpurata</i>	8
Figura 3 - Flores de <i>LC schilleriana</i> (<i>Laelia purpurata</i> X <i>Cattleya intermedia</i>)	22
Figura 4 - Cultura do híbrido <i>Laeliacattleya</i> (<i>Hadrolaelia purpurata</i> x <i>Cattleya intermedia</i>) em meio KC sem suplementos (A), suplementado com água de coco ($100\text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$) (B), polpa de banana ($90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) (C) e reguladores de crescimento NAA x KIN ($1,0 - 1,0 \cdot \text{mg L}^{-1}$) (D)	28
Figura 5 - Plantas aclimatadas, a cinco meses, de <i>Laeliacattleya</i> , cultivadas <i>in vitro</i> em meio KC suplementado com polpa de banana ($90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) (A), plântulas que foram cultivadas <i>in vitro</i> em meio KC suplementado com IBA x 6-BA ($1,5 - 0,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (B) e as que foram suplementadas com ANA x KIN ($1,0 - 0,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (C)	35

RESUMO

GONÇALVES, Letícia de Menezes, MSc. Universidade Estadual de Maringá, Julho de 2010. **Efeito de diferentes suplementos adicionados no cultivo *in vitro* do híbrido de *Laeliacattleya***. Orientadora: Professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

A proposta do presente estudo foi verificar os efeitos da adição de diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento e de diferentes suplementos adicionados ao meio nutritivo, para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de um híbrido de orquídea, *Laeliacattleya*, obtido pelo cruzamento das espécies *Hadrolaelia purpurata* Lindl. (Chiron; Castro) x *Cattleya intermedia* Grah., na expectativa de encontrar efeitos equivalentes de algum dos suplementos adicionados com combinações dos reguladores de crescimento. As plântulas com 6 meses de idade foram inoculadas em meio de cultura KC suplementados com água de coco (100 ml.L^{-1}), polpa de banana (90 g.L^{-1}) e combinações dialélicas (0,0; 0,5; 1,0; $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$) de reguladores de crescimento (ANA, IBA, KIN e 6-BA). Após 8 meses de cultivo, foi observado que a adição de polpa de banana reproduz os efeitos da adição de auxinas (IBA ou NAA) no meio de cultivo KC para o desenvolvimento das plântulas, enquanto a adição de água de coco simula os efeitos da adição das citocininas (6BA e KIN). As combinações de IBA ou NAA com KIN foram mais adequadas para promover o desenvolvimento *in vitro* das plântulas no meio KC, do que as combinações das referidas auxinas com 6-BA. Por outro lado, a composição da polpa de banana ou da água de coco mostrou um efeito adicional que potencializa os efeitos dos reguladores de crescimento, de modo a induzir maior número de raízes, folhas, brotos e de promover o maior crescimento das raízes e folhas. O efeito marcante da adição de água de coco foi evidente para estimular a formação de brotos e de maior número de folhas e para garantir uma menor variação do pH do meio de cultura. Portanto, a forma mais adequada para estimular o crescimento e desenvolvimento completo de plântulas do híbrido *Laeliacattleya in vitro*, usando procedimentos que podem ser reproduzidos, é adicionar diferentes fontes de auxina e citocinina e com

finalidades comerciais é suplementar o meio KC com polpa de banana e com água de coco, combinados ou usados separadamente.

Palavras-chave: Híbrido, *Cattleya intermedia*, *Hadrolaelia purpurata*, água de coco, polpa de banana, reguladores de crescimento

ABSTRACT

ONÇALVES, Letícia de Menezes, MSc. Universidade Estadual de Maringá, July 2010. **The effect of different supplements added for the *in vitro* culture of *Laeliacattleya* hybrid.** Supervisor: Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

The effects caused by the addition of different combinations and concentrations of growth regulators and of different supplements added to the nutrition medium for *in vitro* growth and development of plants of the orchid hybrid, *Laeliacattleya*, from species crossing of *Hadrolaelia purpurata* Lindl. (Chiron; Castro) x *Cattleya intermedia* Grah. are provided. Research aims at discovering effects which are equivalent to added supplements with combinations of growth regulators. Six-month-old plants were inoculated in KC culture medium and supplemented with coconut water (100 ml.L⁻¹), banana pulp (90 g.L⁻¹) and diallelic combinations (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg.L⁻¹) of growth regulators (ANA, IBA, KIN and 6-BA). After 8 months of culture, the addition of banana pulp reproduced the effects of auxins (IBA or NAA) in KC culture medium for the plants' development and the addition of coconut water simulated the effects of cytokinines addition (6BA and KIN). IBA or NAA combinations with KIN were more adequate to enhance *in vitro* plant development in KC medium than the combinations of auxins with 6-BA. On the other hand, composition made up of banana pulp or coconut water demonstrated an additional effect which potentializes the effects of growth regulators and thus triggers a higher number of roots, leaves and buds and enhances a greater growth in roots and leaves. Addition of coconut water stimulated the production of buds and a greater number of leaves and warranted a low pH in the culture medium. Results show that the most adequate form in stimulating the complete *in vitro* growth and development of *Laeliacattleya* hybrid plant by reproducible procedures is the addition of different auxins and cytokinines and, in the case of commercial outputs, the supplementation of KC medium with banana pulp and coconut water, together or in separate.

Key words: hybrid, *Cattleya intermedia*, *Hadrolaelia purpurata*, coconut water, banana pulp, growth regulators

1. INTRODUÇÃO

Segundo Dressler (1993), a família Orchidaceae é uma das maiores entre as fanerógamas, sendo altamente especializadas dentre as monocotiledôneas e encontrando-se distribuída em praticamente todas as regiões da Terra, com grande representação no Brasil.

Devido à sua diversidade, as orquídeas vêm atraindo cada vez mais colecionadores e pesquisadores e o comércio de produtos de floricultura vem se expandindo. Segundo Soncin et al. (2010), as exportações brasileiras de flores chegaram a 25 milhões de dólares em 2004, com crescimento anual de 25%. Junqueira e Peetz (2004) relataram que o setor de mudas de plantas ornamentais foi responsável pelos maiores valores de exportações em 2004, na ordem de US\$11,387 milhões, representando 48,46% do total exportado pela floricultura do país. As mudas de orquídeas, por sua vez, acumularam vendas de US\$122,919 mil, com resultado superior em 55,43% aos verificados no ano de 2003. Kiyuna et al. (2005) destacaram, no ano de 2004, a exportação de plantas ornamentais, como as flores frescas (87,2%), mudas de orquídeas (55,4%), mudas de plantas ornamentais, exceto orquídeas (18,0%), além dos bulbos, tubérculos e rizomas (16,9%).

Quanto à produção de mudas de orquídeas por sementes, Hadley (1982) relatou que Bernard, em 1904, foi o primeiro a descrever uma simbiose entre as sementes de orquídeas e fungos micorrizicos, para que a semente se utilizasse da digestão enzimática desses fungos simbiotes como meio alternativo para a obtenção de compostos orgânicos necessários para a sua germinação, fenômeno denominado micotrofismo, utilizando-se de um híbrido de *Cypripedium* L. e *Bletia hyacinthina* (Sm.) R. Br. Assim, após Lewis Knudson, em 1922, relatar que o fungo não era necessário para a germinação das sementes de orquídeas, os métodos para a germinação simbiótica em orquídeas foram substituídos pelo procedimento de germinação não-simbiótica, caso fossem semeadas em meio de cultura que contém ágar, sais apropriados e açúcar (GRIESBACH, 2002). Um grande avanço na agricultura foi, sem dúvida, o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e com a tecnologia da germinação assimbiótica, milhares de plântulas puderam chegar

à maturidade a partir de um único fruto. Das várias fórmulas nutritivas propostas por Knudson, a mais conhecida é a fórmula “C” (KC) de 1946, sendo um meio apropriado para a maioria das espécies de orquídeas (GRIESBACH, 2002).

Atualmente, a cultura assimiótica, ou semeadura *in vitro*, constitui um método da biotecnologia vegetal relevante do ponto de vista comercial e ecológico, pois, devido à beleza e à diversidade de flores das orquídeas, que atraem colecionadores e pesquisadores há séculos, o consumo de flores e plantas ornamentais, pelo mundo, tem aumentado gradativamente (SANTANA, 1997; CLARO et al., 1999) e, conseqüentemente, a ação predatória do homem na natureza com o extrativismo destas espécies remanescentes de florestas nativas. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos biotecnológicos para germinar sementes de orquídeas é um investimento prioritário.

Vários são os aditivos ou suplementos que podem ser adicionados ao meio de cultura de forma empírica, com o objetivo de aumentar a produção das mudas, obter plantas vigorosas e saudáveis, reduzir o tempo de cultivo e os custos de produção. Embora diferentes aditivos ou suplementos adicionados aos meios de cultivo sejam recomendados para o subcultivo das plântulas de orquídeas após a germinação das sementes (ARDITTI e ERNST, 1993; VILLALOBOS et al., 1994), o meio “C”, formulado por Knudson (1946), vem sendo, até o presente, recomendado para a germinação da maioria das espécies de orquídeas, possibilitando que milhares de sementes, de uma cápsula, consigam chegar ao estágio de plântulas autotróficas.

Diversos aditivos, tais como: água de coco (endosperma líquido de *Cocos nucifera*); carvão ativado; polpa de frutas, em especial a banana, dentre outros, são de baixo custo e fácil obtenção para os produtores de mudas. Estes aditivos são usados em quantidades e interações aleatórias, mas com evidências de resultados positivos (MORALES, 2004; MORALES et al., 2006; FREITAS et al., 2006; GONÇALVES et al., 2006; PRIZÃO et al., 2006). No entanto a adição desses suplementos ao meio de cultura é um aspecto polêmico do ponto de vista fisiológico, devido à indeterminação de sua composição química.

A maioria dos estudos não discute a interferência desses tipos de suplementos usados, em relação aos resultados obtidos. Além disso, no

mercado de plantas ornamentais existe um déficit de informações sobre o cultivo *in vitro* de muitas espécies e/ou híbridos de orquídeas nativas brasileiras ou exóticas de grande importância comercial. Devido ao mercado ser altamente competitivo e haver interesse econômico das empresas de micropropagação, as informações relacionadas à composição dos meios de cultura são escassas na literatura.

Neste sentido, a proposta do presente estudo foi verificar os efeitos da adição de diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento e de diferentes suplementos adicionados ao meio nutritivo, para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de um híbrido de orquídea, na expectativa de encontrar efeitos equivalentes de algum dos suplementos adicionados com combinações dos reguladores de crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da cultura

Orchidaceae é a maior família fanerógama e taxonomicamente a mais especializada entre as monocotiledôneas (Silva, 2003). Esta família contém aproximadamente de 600 a 800 gêneros e de 25.000 a 35.000 espécies, que totalizam 7% das plantas ornamentais do mundo (FRÁGUAS et al., 2003). As orquídeas exibem uma grande diversidade em tamanho, forma e de cores de suas flores, sendo conhecidas também por terem flores muito belas e de longa duração (SAIPRASAD e POLISETTY, 2003).

Os membros dessa família são plantas perenes com morfologia diversificada, devido principalmente ao habitat onde elas se desenvolvem, podendo ser epífitas (constituem a maioria das espécies) habitando em diversas alturas dos troncos das árvores; terrestres (vivendo no solo), rupícolas (vivem diretamente sobre rochas), e saxícolas (habitam fendas de rochas ou do solo). Algumas são erroneamente chamadas de parasitas, por utilizar árvores como suporte (McCONNELL e CRUZ, 1996). O caule pode ser simpodial ou monopodial, muitas vezes rizomatoso, mais raramente são cormos e possui os internós freqüentemente formando pseudobulbos. As folhas são alternas, raramente opostas, dísticas ou espiraladas, simples, inteiras, com nervação geralmente paralelinérvea (DRESSLER, 1993).

Uma das singularidades da família Orchidaceae é a produção de milhares de pequenas sementes em cada fruto (DRESSLER, 1993), denominados de cápsulas. Nas cápsulas ocorre a produção de aproximadamente 1.300 a 4.000.000 sementes e estas sementes possuem pouquíssima ou nenhuma reserva nutritiva, o que dificulta sua germinação na natureza ou *in vivo*. Assim, a germinação de tais sementes, na natureza, ocorre depois de instalada a simbiose com os fungos micorrizos. Esses fungos são estritamente saprófitas e essenciais à realização do ciclo de vida das orquídeas, atuando após a sua colonização na semente. Quando ocorre a infecção, há a formação de uma estrutura intracelular denominada pelotão. A partir daí, os produtos advindos da digestão enzimática desta estrutura são utilizados para o desenvolvimento do protocórmio (PETERSON et al., 1998;

PEREIRA et al., 2003). Esses eventos caracterizam o fenômeno do micoheterotrofismo, ou seja, o protocórmio é totalmente dependente de um fungo simbiote para o seu desenvolvimento até tornar-se plântula autotrófica (PEREIRA et al., 2003). Esse fenômeno não é exclusivo da família Orchidaceae, sendo também relatado em outras famílias de monocotiledôneas (PEREIRA et al., 2005).

De acordo com Rego e Faria (2002), no Brasil, as orquídeas ocorrem em todos os Estados e em maior quantidade na Mata Atlântica, que vai de Pernambuco até o Rio Grande do Sul. No seu ambiente natural de crescimento, a maioria das espécies é de hábitos epífitos (PAULA e SILVA, 2002).

As orquídeas apresentam cerca de 18.500 espécies distribuídas em 788 gêneros e mais de 100.000 híbridos (PAULA e SILVA, 2002). No Brasil, já foram identificadas mais de 3.500 espécies de orquídeas, mas muitas destas estão correndo risco de extinção, devido à destruição de seu *habitat* e às coletas predatórias (COLOMBO et al., 2004). O elevado número de espécies e híbridos de orquídeas possibilita a ocorrência de grande variabilidade de formas, tamanhos e cores de folhas e flores. Graças à beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas destacam-se como importante planta ornamental de grande interesse econômico e botânico (ARAUJO, 2004).

Assim, a beleza e diversidade das orquídeas atraem cada vez mais colecionadores e pesquisadores. Segundo Claro et al. (1999), o consumo de flores e plantas ornamentais pelo mundo vem aumentando ao longo dos anos. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil e China, a demanda tem crescido significativamente. De acordo com Santana (1997) e Claro et al. (1999), no Brasil, a área de produção de flores e plantas ornamentais é de 4.500 hectares. Dados apresentados por Debergh (1994) mostraram que 500 milhões de plantas são micropropagadas anualmente no mundo e a maioria é ornamental.

Existem vários sistemas de propagação de orquídeas. Os mais simples são variações de algum processo de propagação assexuada, podendo ser por divisão de touceiras; divisão de pseudobulbos; divisão de bulbos velhos e indução de brotamento a partir de hastes florais (BACH e CASTRO, 2004), e

também a propagação por multiplicação vegetativa *in vitro* (ARDITTI e ERNEST, 1990).

2.2. Os gêneros *Cattleya* e *Hadrolaelia* (CHIRON & CASTRO, 2002) (= *Laelia purpurata* LINDLEY & PAXTON, 1852)

As espécies dos gêneros *Cattleya* e *Laelia* (*Hadrolaelia*) constituem dentre as orquídeas as mais utilizadas para ornamentação e também as mais conhecidas. A facilidade do cultivo, baixo custo, condições artificiais aliada à beleza das suas flores nas espécies e híbridos tornaram-nas plantas muito procuradas por colecionadores, orquidófilos e para fins comerciais (BICALHO, 1980).

O gênero *Cattleya* Lindl. compreende aproximadamente 50 espécies, 27 das quais são encontradas no Brasil (SMIDT et al., 2006). Os estudos que examinam a biologia floral e polinização em populações naturais de *Cattleya* mostraram que a polinização é feita por abelhas das subtribos *Euglossina* e *Meliponina*. Este gênero de orquídea se estende através do México e América Central e se ramifica ao longo das encostas dos Andes Orientais por um lado e por outro lado desce pelas áreas da Colômbia, Venezuela, Amazônia brasileira e Mato Grosso, também se estendendo pela Mata Atlântica e segue até o Rio Grande do Sul (MILLER e WARREN, 1996). As orquídeas apresentam grandes variações no colorido e no formato das flores, especialmente no labelo. O tamanho, dependendo da região que ela habita, também pode sofrer alterações. Suas flores normalmente são lilás-róseas e com formato estrelado, o labelo é encrespado nas bordas e com um tom cor-de-vinho na parte interna (Figura 1). Elas são numerosas e despontam no final do inverno e início da primavera; são herbáceas perenes, epífitas, são nativas da Mata Atlântica do Brasil, característica de clima tropical e subtropical quente (ROMAHN, 2007).

De acordo com Blossfeld (1999), as espécies de *Laelia* brasileiras são epífitas, dentre elas: *Laelia purpurata* (= *Hadrolaelia purpurata*), que contém muitas variedades e habita a vasta área entre os Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, e as espécies *L. tenebrosa*, *L. grandis*, *L. xanthina*, *L. perrinii* e a *L. harpophylla* que procedem do Espírito Santo.

O gênero *Laelia* foi dividido em vários outros gêneros por diversos autores, a partir das observações morfológicas. Um estudo recente, baseado

na análise molecular de um fragmento de DNA ribossomal, confirma a existência de dois grupos bem distintos: as espécies mexicanas (as verdadeiras *Laelia*) e as espécies brasileiras (*Hadrolaelia*). Devido à semelhança entre os caracteres morfológicos, ecológicos e moleculares especulou-se em devolvê-las ao gênero *Hoffmannseggella* H. G. Jones, as espécies rupícolas classificadas anteriormente como *Laelia* e por fim reconhecer o caráter único de *Laelia lundii* Rchb. f., criando assim outros dois gêneros para as espécies de *Laelia* restantes (CHIRON e CASTRO, 2002).

A espécie *Hadrolaelia purpurata* também apresenta uma grande variação, principalmente no colorido (Figura 2). Normalmente com até 20 cm de diâmetro, elas são perfumadas e despontam excepcionalmente no início do inverno e no início da primavera; são herbáceas perenes, epífitas, típica de clima tropical e subtropical quente. As plantas de *H. purpurata* podem ser cultivadas em sol pleno ou em meia-sombra; suas regas podem ser diárias ou a cada dois dias (ROMAHN, 2007).



Figura 1 - *Cattleya intermédia*.

Fonte: www.sborchid.com/pic_capt.php?src=/orchidphotos/cattleya/c_intermedia.

O gênero *Cattleya* e afins, como *Laelia* Lindl., *Sophronitis* Lindl., *Epidendrum* L., *Brassavola* R. Br. e *Encyclia* Hook (Laeliinae de grande porte)

são muitas vezes sinônimos de orquídeas para consumidores leigos. Espécies e híbridos intragenéricos e intraespecíficos de *Cattleya* e *Laelia* são de interesse comercial em razão da beleza e do tamanho de suas flores (MORALES, 2004). Segundo Greisbach (2002), a produção de híbridos reflete na preferência dos consumidores.



Figura 2 - *Hadrolaelia purpurata* var. *cárnea*.
Fonte: www.pbs.org/.../orchid/images/gall_laelia.jpg.

2.3. Obtenções de plântulas por micropropagação

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* viabiliza a clonagem de várias espécies, permitindo a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta matriz (SOUZA e JUNGHANS, 2006). Os princípios teóricos desta técnica foram propostos ainda no século XIX, com as teorias de totipotência de

células vegetais, mas só no início do século XX, em 1902, é que realmente apareceram trabalhos de Haberland, com o cultivo de tecidos somáticos de várias espécies de plantas (KERBAUY, 1997).

A técnica de micropropagação *in vitro* oferece vantagens. Os indivíduos com características genéticas superiores, muitas vezes genótipos raros, quimeras naturais, híbridos estéreis e espécies em vias de extinção, são alguns exemplos de plantas que são propagadas vegetativamente, via cultura de tecidos (TERMIGNONI, 2005). Em termos gerais, a cultura *in vitro* permite propagação em larga escala de plantas com qualidade superior (milhares ou mesmo bilhões), sem destruir a planta-mãe; obtenção de plantas fáceis de transportar para diversos países, sem preocupação com introdução de novas doenças; ou ainda, recuperação de espécies em vias de extinção (OLIVEIRA, 2000). A utilização da micropropagação em âmbito comercial é realidade em diversos países do mundo, com destaque para os países da Europa Ocidental e os Estados Unidos. Eles trabalham com o objetivo de satisfazer às necessidades internas de material de propagação livre de doenças, ou de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa. Um menor número de empresas trabalha exclusivamente com a produção de plantas *in vitro* para abastecimento de viveiros de terceiros (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Essencialmente a micropropagação consiste em separar uma porção da planta, o explante, e proporcionar-lhe artificialmente as condições físicas e químicas apropriadas para que as células expressem seu potencial intrínseco ou induzido (ROCA e MROGINSKI, 1991; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; SÁ et al., 2000).

Em orquídeas, os métodos de germinação simbiótica foram substituídos pelo procedimento de germinação não-simbiótica, após Lewis Knudson, em 1922, relatar que o fungo não era necessário para a germinação das sementes de orquídeas, se a semente fosse realizada em meio de cultura contendo ágar, sais apropriados e açúcar. A partir deste período, os métodos biotecnológicos, na cultura de tecido, para aumentar a germinação assimbiótica e o desenvolvimento das plântulas, têm sido um investimento prioritário na utilização dessa técnica. Para as orquídeas, a grande importância da semente *in vitro* é a diminuição do tempo de produção dessas mudas, pois algumas espécies que atingem maturidade com o primeiro florescimento

em cinco a sete anos podem florescer com três a quatro anos de idade. A cultura assimiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes, muitas vezes, espécie-específicos (ALTAFIN et al., 2003), e também diminui a destruição de seu habitat, por danosas práticas de colheita e exploração para fins comerciais nos países tropicais (LO et al., 2004a). Desse modo ocorre uma reposição em lugares já destruídos, aumentando a comercialização entre os compradores, que antes predavam os ambientes naturais dessas plantas.

2.4. Meios de cultura

A composição dos meios de cultura é importante para a germinação da semente e para o crescimento da planta, sendo geralmente constituídos de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, sacarose e agente gelificante (SORACE et al., 2008). A maioria dos meios usados para a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de diversas espécies é mais concentrado do que no cultivo *in vitro* de orquídeas, principalmente em espécies epífitas na natureza. As orquídeas epífitas geralmente germinam bem nestes meios, mas um bom número de espécies terrestres germina muito melhor em meios menos concentrados de sais. Isto demonstra que a concentração do meio é um importante fator na germinação de orquídeas. No entanto, devido à limitada informação disponível, não existe padrões definidos para todas as espécies (POOLE e SHEEHAN, 1982).

Devido a esses padrões não definidos para utilização de um melhor meio de cultivo para determinada espécie, há preocupação no cultivo de orquídeas, pois elas possuem uma imensa diversidade bioquímica, fisiológica e genética e não possuem uma mesma diversidade de meios de cultura designada para a multiplicação de suas diferentes espécies (REGO-OLIVEIRA e FARIA, 2005).

O fator que freqüentemente determina o sucesso da micropropagação é o meio nutritivo onde se desenvolveram. Assim, vários estudos vêm sendo feitos, para que esse sucesso seja o maior possível, adequando o meio de cultura a espécies para obter maior produtividade (GONÇALVES, 2006). Para

os gêneros *Cattleya*, *Cymbidium*, *Oncidium*, *Laelia*, *Vanda*, dentre outros diversos gêneros populares, é usado o meio Knudson “C” (Tabela 1) ou com algumas modificações na formulação original (ARDITTI et al., 1982).

Tabela 1 – Meio básico – formulação “C” de Knudson (KNUDSON, 1946)

Nitrato de cálcio – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	$1 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Fosfato monobásico de potássio – KH_2PO_4	$0,25 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Sulfato de magnésio – $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$0,25 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Sulfato de amônia – $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	$0,50 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Sulfato ferroso – $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$0,025 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Sulfato de manganês – $\text{Mn}(\text{SO}_4) \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	$0,0075 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Sacarose	$20 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

2.4.1. Componentes dos meios de cultura

Dezessete elementos são considerados essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas: carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni) e zinco (Zn). Alguns elementos são classificados como benéficos para algumas plantas, como o sódio (Na), silício (Si), selênio (Se) e o cobalto (Co). Os nove primeiros, exceto o potássio, participam da formação dos tecidos vegetais e representam, aproximadamente, 99% da sua massa (DECHEN e NACHTIGALL, 2007).

Os nutrientes têm sido classificados de acordo com a quantidade exigida pelas plantas. Os macronutrientes são exigidos em grandes quantidades (N, P, K, Ca, Mg e S) e os micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo e o Ni) são requeridos em quantidades bem pequenas (KEBAUY, 2008). Na maioria das vezes, os meios são selecionados em razão da espécie e tipo ou estágio da cultura que está sendo efetuado, uma vez que a formulação mais apropriada de meio pode variar dentro de uma mesma espécie (PASQUAL et al., 1997). Trabalhos como o de Unemoto et al. (2007) têm buscado desenvolver diferentes formulações de meios de cultura, na tentativa de se obter meios eficazes e de protocolo simplificado, por meio da adição de

substâncias alternativas, como água de coco e extratos de frutas e legumes. Outros compostos, como as auxinas, o suco de tomate, suco de abacaxi e a banana homogeneizada, têm sido freqüentemente utilizados para estimular a germinação e crescimento das plantas *in vitro* (HADLEY e HARVAIS, 1968).

2.4.1.1. Macronutrientes e micronutrientes

Os macronutrientes são os elementos minerais exigidos em maiores quantidades para o crescimento de plantas, sendo incluídos nos meios nutritivos na forma de sais inorgânicos. O nitrogênio e o enxofre podem ser adicionados, juntamente com suplementos orgânicos (aminoácidos, proteínas, por exemplo) (CALDAS et al., 1998). O efeito positivo dos aminoácidos é como fonte de nitrogênio. Neumann et al. (2009) relatam que suplementos de nitrato (NaNO_3) em plantas intactas de tomate estimula a regulação de 115 genes, incluindo as proteínas transportadoras de nitrato, as nitrato e nitrito redutases, e de genes de proteínas envolvidas com o metabolismo primário geral (malato desidrogenase, transaldolases, transcetolases, asparagina sintase, histidina descarboxilase). Em *Arabidopsis* isso também foi observado, mostrando como em uma pequena molécula o nitrato pode desencadear a expressão de uma família de genes com funções diferentes. Em orquídeas, todos os macronutrientes, como o cálcio (Ca), magnésio (Mg), nitrogênio [N na forma de amônia (NH_3), nitrato (NO_3^-) ou uréia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$], fósforo (P), potássio (K), enxofre (S usado geralmente na forma de SO_4^{2-}) são utilizados nos meios nutritivos (ARDITTI e ERNST, 1993).

Os micronutrientes são considerados como importantes para o desenvolvimento de plantas intactas (no ambiente natural) e para induzir o crescimento de células e tecidos em cultura *in vitro*. Os micronutrientes Fe, Mn, e Mo combinados são descritos como elementos que promovem o maior crescimento de tecidos e plantas do que quando são somados seus efeitos individuais (Neumann et al., 2009).

2.4.1.2. Carboidratos

A fonte de carbono (sacarose, glicose ou frutose) é um componente muito importante no meio de cultura *in vitro* (FARIA et al., 2004). A sacarose é

o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, porque determina as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. A concentração de sacarose também é um fator muito importante para se obter um crescimento ótimo, dependendo do explante. A concentração de sacarose mais utilizada é 3% (p/v) (CALDAS et al., 1998).

A sacarose também é o açúcar mais comumente utilizado na cultura de sementes e mudas de orquídeas. Ela confere o suporte para crescimento, igualmente quando autoclavada ou em filtro de esterilização, mas seus efeitos podem variar dependendo das concentrações. A proliferação de protocormos é fortalecida por altos níveis de sacarose, enquanto a organogênese é melhorada com concentrações abaixo do ideal (ARDITTI e ERNST, 1984).

2.4.1.3. Água de coco

A água de coco é muito utilizada no Brasil para consumo *in natura*, principalmente na região nordeste do país. Dos frutos de coco, é possível obter alguns produtos comerciais, tais como leite de coco, água de coco e coco ralado, que são utilizados no preparo de produtos alimentícios. A água de coco começa a ser produzida na fruta um mês e meio após a formação da flor, sendo que a melhor época para recolher o fruto é no sexto mês de crescimento, quando o volume máximo de água é alcançado, correspondendo a aproximadamente 25% do peso do fruto. Nesta fase, a água de coco é saborosa e rica em nutrientes, apresentando baixos níveis de gordura e, por essa razão, considerada uma excelente bebida isotônica (RICHTER et al. 2005).

Os resultados do trabalho de Santoso et al. (1996) indicam que a água do coco *kopyor* (coco com formação anormal durante seu desenvolvimento devido a uma mutação), coco jovem, ou a água do coco maduro, pode ser considerada uma bebida melhor do que a água pura, pois contém vários nutrientes. A água do coco *kopyor* contém sacarose e aminoácidos em maiores quantidades do que na água do coco maduro. Os teores de sacarose, glicose, frutose, ácido cítrico e málico foram superiores na parte comestível, endosperma sólido, dos cocos maduros.

Devido a estes importantes nutrientes que contém a água de coco, ela se tornou útil para o cultivo *in vitro*. Entre os compostos importantes encontrados na água de coco, está o mio-inositol e citocininas, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (CALDAS et al., 1998). Kerbauy (1984) e Morales (2004) aconselham a utilização da água de coco para várias espécies de orquídeas cultivadas *in vitro*.

Estudos feitos por Lakshmanan et al. (1995) mostraram que na concentração de 15% de água de coco, adicionada à formulação nutritiva VW (VACIN e WENT, 1949) proporcionou a formação de grupos de PLBs (*protocorms-like bodies*), nas plântulas do híbrido *Aranda Deborah* no período de 8 a 10 semanas. Gonçalves (2006) conclui que, para estimular a organogênese na germinação assimbiótica de culturas *in vitro* de *Enciclia randii* é recomendado a adição de polpa de banana ou de água de coco ao meio de cultura KC e manter o cultivo com iluminação contínua, a fim de aumentar a produção inicial de mudas dessa espécie.

Roy e Banerjee (2003) demonstraram em seu trabalho que, para manutenção de calos, meios contendo quantidades substanciais de auxina e citocinina, suplementados com água de coco, não promoveram efeito significativo no crescimento de PLBs e na capacidade de regeneração de calos. Por outro lado, os efeitos da água de coco na indução de calos foram também examinados por Ishii et al. (1998), em meios de cultura básicos complementados com $200 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$, com ou sem $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarose, e estes autores obtiveram o maior número de calos formados em meios contendo água de coco e sacarose. Estes resultados demonstraram que a indução de calos foi devido à sacarose no meio e a indução foi reforçada pela adição da água de coco e reguladores de crescimento. Assim, a água de coco e os reguladores de crescimento tiveram o mesmo efeito.

Em estudo realizado com *Cymbidium* por Huan et al. (2004), ocorreu formação de PLBs com meio de cultura livre de regulador de crescimento e suplementado com água de coco ($200 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$), mas os PLBs formados eram desuniformes. Lo et al. (2004a) verificaram em seu trabalho que o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com água de coco poderia promover o crescimento de folhas (cerca de 3,5 folhas por planta).

Na propagação *in vitro* de *Epidendrum radicans* foi verificado que o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) enriquecido com 15% de água de coco, e reguladores de crescimento, aumentam a sobrevivência dessas plântulas *ex vitro* (PATELI et al., 2003).

2.4.1.4. Polpa de banana

A banana é considerada uma excelente fonte de carboidratos, minerais, aminoácidos, ácidos graxos, niacina, vitaminas, celulose, fibras alimentares, entre outras substâncias. Novas substâncias muito importantes para a cultura de tecidos, encontradas recentemente na banana (*Musa* spp.), foram as citocininas (GE et al., 2008).

De acordo com Arditti et al. (1982), a banana homogeneizada pode melhorar o crescimento de plântulas e plantas de orquídeas, dependendo do meio de cultivo, de sua homogeneização, e do estágio de desenvolvimento do fruto, ou seja, se o fruto é verde, intermediário ou maduro. O reforço no crescimento pode variar, também, de acordo com a variedade da banana utilizada, mas essas diferenças não são tão preocupantes. Normalmente, utilizam-se de bananas nem muito maduras nem verdes (ARDITTI et al., 1982). Outro fato relatado por Arditti et al. (1982) foi que a polpa de banana pode inibir a germinação das sementes de orquídeas, mas para a fase de plântula, com folhas e raízes, ela pode ser acrescentada ao meio.

Alguns produtores homogeneizam a polpa da banana com seus meios de cultura, tornando-os mais escuros, enquanto outros simplesmente submergem fatias de banana nos frascos contendo o meio (SILVA et al., 2005). Muitos meios contendo misturas complexas, principalmente leite de coco e banana homogeneizada, têm sido utilizados para a obtenção de PLB (*protocorm-like-bodies*), ou raízes vindas posteriormente de plântulas (CHEN e CHANG, 2001).

Vyas et al. (2009) têm argumentado que o uso de reguladores de crescimento para as plantas é caro, por isso estes podem ser substituídos por aditivos naturais com custo baixo, sendo uma fonte natural de minerais, bem como aminoácidos, vitaminas, açúcares e hormônios de crescimento. Assim, o extrato de banana é um aditivo natural e muito conhecido por promover o

crescimento de plântulas de *Cattleya* e também de *Dendrobium tosaense* (ISLAM et al., 2000; LO et al., 2004a).

Os estudos feitos por Lo et al. (2004b) mostraram que em três espécies de plantas medicinais de *Dendrobium* sp. importantes, os aditivos orgânicos, tais como o leite de coco, a banana e a batata homogeneizada, acrescentados ao meio de cultura promoveu um maior crescimento de plântulas e brotos.

Os resultados do trabalho de Gnasekaran et al. (2010) realizado com suplementação de extratos orgânicos de quatro cultivares diferentes de bananas, entre outros extratos, mostrou que nos meios 1/2 MS suplementados com as bananas (10%), ocorreu máxima proliferação de PLB em *Phalaenopsis violacea*.

Efeitos de diferentes aditivos no meio de cultura para crescimento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium tosaense* foram verificados em estudos preliminares utilizando, além de outros suplementos, a banana homogeneizada (8%), obtendo uma resposta de crescimento vigoroso no diâmetro do caule, aumento da altura e peso fresco das plântulas (LO et al., 2004a).

Silva (2003) conclui em seu trabalho que a utilização de polpa de banana ($75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), combinada com carvão ativado ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), promove a formação de maior número de brotos, maior comprimento médio do sistema radicular e maior peso da matéria fresca das plântulas de *Brassiocattleya* PASTORAL x *Laeliocattleya* AMBER GLOW.

O efeito positivo da adição da polpa de banana também foi observado em estudos com *Laelia tenebrosa*, obtendo-se o maior conteúdo de matéria seca (STANCATO et al., 2008).

Islam et al. (2000) observaram em seus resultados com *Cattleya* que a banana homogeneizada aumentou a germinação e o crescimento de plântulas.

Devido à banana interferir diretamente na composição do meio de cultura básico, de um modo imprevisível, devido a sua própria composição ser diferente em relação a seus frutos, Huang et al. (2001) observaram que a suplementação do meio MS suplementado com polpa de banana estimulou a formação apenas de gemas caulinares e não de raízes nas plântulas de *Paphiopedilum*.

Torres et al. (2001) afirmam que a adição de polpa de banana promove diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, tais como espessamento do sistema radicular, desenvolvimento da parte aérea e emissão de brotos adventícios.

2.4.1.5. Reguladores de crescimento

Os principais reguladores de crescimento utilizados no cultivo *in vitro* de plantas são as auxinas, citocininas, giberelinas e como um inibidor o ácido abscísico e o etileno (SANTOS–SEREJO et al., 2006).

Na cultura de tecidos, as auxinas e as citocininas são classes de reguladores de crescimento mais utilizados na formação de raiz, parte aérea e calo, sendo o crescimento regulado pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (SKOOG e MILLER, 1957).

No trabalho realizado por Kalimuthu et al. (2007), eles registram que o meio MS com determinadas concentrações de reguladores de crescimento vegetal influenciou positivamente a germinação de sementes, produção de protocormos, multiplicação de brotos e iniciação de raiz de *Oncidium* sp.

2.4.1.5.1. Auxinas

As auxinas pertencem ao grupo de substâncias mais conhecidas entre os reguladores do crescimento, estando relacionadas ao ácido 3-indolacético (AIA), que é naturalmente sintetizado pelas plantas. As auxinas naturais ou sintéticas se caracterizam por favorecer o alongamento celular, modificando a plasticidade das paredes celulares (HINOJOSA, 2000).

As várias auxinas (AIA, IBA, NAA, e 2,4-D, entre outras) apresentam respostas diferentes *in vitro*. O AIA é considerado uma auxina instável, que se degrada facilmente pela luz ou pela atividade microbiana que a transforma em triptofano. Essa instabilidade, aliada à sua inativação ou destruição metabólica nas células, a torna uma auxina relativamente “fraca” comparada com o 2,4-D, por exemplo (CALDAS et al., 1998).

Geralmente, as auxinas, tais como o ácido indolacético (AIA), o ácido indolbutírico (IBA) e o ácido naftalenoacético (NAA), aumentam a germinação de sementes e o crescimento de plântulas de orquídeas (ARDITTI e ERNST, 1984). Em estudos feitos por Hadley e Harvais (1968), estes autores

mostraram que o AIA sozinho, em todas as concentrações utilizadas (0,25; 0,5 e $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), impediu a germinação, retardou o crescimento e reduziu a sobrevivência de *Orchis purpurella*. Mas, em relação aos protocolos, ocorreu um maior alongamento dessas estruturas nos níveis mais elevados de AIA.

O crescimento e a proliferação de rizomas de *Cymbidium aloifolium* foram estimulados pela adição de auxinas (NAA, IBA e AIA) no meio, sendo que a auxina NAA ($5.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) foi a que mais estimulou a proliferação de rizomas, e o AIA foi a auxina que menos estimulou (NAYAK et al., 1998).

Krapiec et al. (2003) obtiveram como resultado na utilização de combinações de auxina e citocininas (IBA e 6-BA), maior frequência de indução de brotos, sendo a combinação de IBA com 6-BA a mais efetiva para a multiplicação *in vitro* de *Cattleya walkeriana*, usando plântulas como explantes.

No trabalho realizado por Chen e Chang (2001), foi mostrado que as auxinas utilizadas (AIA, IBA, NAA, e 2,4-D) para formação de embriões em explantes foliares retardaram esta formação em *Oncidium* 'Gower Ramsey'.

Kerbaui (1983), utilizando a auxina ANA, peptona, tiamina e água de coco, em *Catsetum*, verificaram que, em quaisquer dos meios testados, o NAA apresentou forte tendência à indução de calos, sendo estes verde-amarelados, apresentando um efeito sensível sobre a indução, principalmente na presença de água de coco (15%) e peptona ($1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.4.1.5.2. Citocininas

As citocininas são reguladores vegetais que participam ativamente dos processos de divisão e diferenciação celular, particularmente em experimentos de cultura de tecidos (CID, 2000). Em células de animais, algumas citocininas são relatadas como anti-carcinogênicas e antienvelhecimentos, além de efeitos antitrombóticos (Ge et al., 2008).

Utilizando algumas citocininas, tais como: N^6 -2-isopentenil-adenina (2ip), Z {6 [4-hidroxi-3-metilbut-trans-2-enil] aminopurina} (zeatina), N^6 -furfurilaminopurina (cinetina), N^6 -benziladenina (6-BA) e N-fenil-N- 1,2,3 – thidiazol-5-il uréia (Thidiazuron, TDZ), Chen e Chang (2001) verificaram que todas elas promoviam formação de embrião em explantes foliares, sendo seu maior número em meio de cultura contendo $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de TDZ.

A influência das citocininas no crescimento e proliferação de rizomas de *Cymbidium aloifolium* foi consideravelmente reduzida quando as auxinas substituíam as citocininas, sendo que, das duas citocininas testadas (BA, KIN), BA foi mais efetiva na indução de diferenciação de brotos (NAYAK et al., 1998).

Em meios de cultura suplementados unicamente com BA ou ANA, foi observado aumento do número de explantes de *Cymbidium*, o qual produziu PLB em altas concentrações de ambos os tipos de reguladores de crescimento (BEGUM et al., 1994). O efeito benéfico da citocinina sobre a formação de protocormóides, ou protocormos, parece ocorrer após períodos prolongados de cultura, ocasião em que estas apresentam nítidos sintomas de senescência *in vitro* (KERBAUY, 1993).

2.4.2. pH

O pH é a medida do potencial hidrogeniônico em uma solução aquosa, podendo interferir na integridade celular e conseqüentemente na disponibilidade dos nutrientes e substâncias reguladoras de crescimento. Também pode interferir nas propriedades gelificante, restringindo a sua faixa de uso em 5,0 – 6,5 (TORRES et al., 2001). O ajuste do pH do meio nutritivo normalmente é realizado com HCl ou NaOH, após a adição de todos os componentes no meio de cultura (CALDAS et al., 1998).

Arditti et al. (1982) e Pasqual (2001) argumentam que o pH do meio de cultura é responsável pela manutenção da solubilidade dos sais. Normalmente, o pH apropriado para a germinação de sementes de orquídeas deve ser entre 4,8 e 5,5. O meio pode não ser solidificado em pH muito abaixo de 4,0 e, além disso, o crescimento das plântulas pode ser inibido quando o pH é menor que 4,0 ou maior que 8,0.

Nos mais variados tipos de meios de cultura utilizados para o cultivo de orquídeas, observa-se uma grande variação nos valores de pH, ajustados antes da autoclavagem ou esterilização por filtração (MORALES, 2004).

Pierik et al. (1988), ao analisarem diferentes pHs (5,5; 6,0; 6,5; e 7,0), verificaram bom desenvolvimento de *Paphiopedilum ciliolar* Pfitz em pH menor que 7,0 e observaram a inibição do crescimento no pH 7,0, provavelmente por

esse valor chegar próximo ao valor de pH 8,0, que inibe o crescimento das plântulas.

Skirvin et al. (1986) relataram em seu trabalho que existem diferenças significativas entre os valores iniciais de pH e os valores de pH após a autoclavagem, estando especialmente na faixa de 5,7 a 8,5, sendo esse efeito observado com ou sem ágar. Além disso, os autores relataram também que, com o passar do tempo, o pH do meio de cultura sofre alteração para a faixa ácida do pH.

Ao utilizar sementes de um híbrido de *Cattleya* e de *Cattleya skinneri*, Knudson (1951) concluiu que, se o pH inicial da solução do meio de cultura estiver abaixo de pH 4,5, as sementes de *Cattleya* não irão germinar e, certamente, no pH inicial abaixo de 4,0, as sementes de muitos gêneros podem ser mortas, em razão desse pH muito ácido.

2.4.3. Iluminação

O período de exposição diária à luz, ou fotoperíodo, é necessário para o ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Para a maioria das espécies, o fotoperíodo de 16 horas tem se mostrado satisfatório, utilizando-se de lâmpadas fluorescentes branca-fria ou gro-lux e, para Murashige (1977), a iluminação contínua não é recomendada para a maioria das espécies (TORRES et al., 2001).

Poole e Seeley (1977), trabalhando com pequenas plantas de *Cattleya*, *Cymbidium* e *Phalaenopsis*, concluíram em seu trabalho que o efeito da intensidade da iluminação parece ser mais importante do que a fonte de luz ou até algumas práticas culturais. Assim, a fonte de luz e a qualidade pode se tornar mais importante que outras práticas.

As orquídeas podem crescer em presença de luz ou no escuro contínuo, ou ainda em períodos de luz (fotoperíodo) de várias durações. O fotoperíodo apropriado deve ser testado experimentalmente para gêneros e espécies que não tenham sido trabalhados antes (ARDITTI et al., 1982; ARDITTI e ERNST, 1993).

Erig e Schuch (2005), procurando determinar um possível tipo mais ativo de luz, do que a luz branca, de forma a aumentar a eficiência da

multiplicação *in vitro* de framboeseira “Batum”, testaram cinco tipos diferentes de luz: luz– branca (controle), vermelha, amarela, azul e verde, observando que a multiplicação é aumentada com a luz verde, embora a luz branca seja a mais utilizada na cultura de tecidos.

De acordo com Torres et al. (2001), a adequação do fotoperíodo das culturas é necessária para o ótimo crescimento e desenvolvimento dos explantes *in vitro*. O início de determinado processo morfogênético é manifestado quando as culturas são expostas a uma duração adequada de comprimento do dia.

2.4.4. Temperatura

Vários estudos indicam que os processos morfogênicos exigem flutuação diurna/noturna de temperaturas. Em geral, as salas de crescimento são mantidas em temperatura de 25 °C e 27 °C, por meio de ar condicionado. Em muitos laboratórios, espécies tropicais e subtropicais são mantidas em temperatura pouco mais elevadas, em torno de 27 °C e 29 °C, que as de clima temperado, que são mantidas em 20 °C e 22 °C (TORRES et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi constituído de um experimento com plântulas do híbrido *Laeliacattleya*, obtido pelo cruzamento espécies (*Hadrolaelia purpurata* Lindl. (Chiron; Castro) x *Cattleya intermedia* Grah.)(Figura 3), realizado no Laboratório de Cultura de orquídeas do Museu Dinâmico Interdisciplinar (bloco O – 33) da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná.

As plântulas, com seis meses de idade, foram obtidas de sementes germinadas *in vitro* do híbrido de *Laeliacattleya*, em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com a concentração reduzida pela metade ($\frac{1}{2}$ MS) e contendo 0,3% de carvão ativado. A germinação destas sementes foi realizada no Orquidário do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, estado do Paranaá.



Figura 3 - *LC schilleriana* (*Laelia purpurata* X *Cattleya intermedia*).

Fonte: <http://www.sborchid.com/plantdisplay.php?ocode=CCA2312>.

O meio de cultura básico utilizado para a inoculação das plântulas de *Laeliacattleya* foi a formulação “C” de Knudson (KUNUDSON, 1946). Este meio

KC foi suplementado com reguladores de crescimento, em combinações dialélicas de auxinas, ácido naftalenoacético (NAA) e ácido indol-3-butírico (IBA), com as citocininas, N⁶-benziladenina (6BA) e N⁶-furfurilaminopurina (KIN); a polpa de banana, da variedade “nanica” e a água de coco *in natura* também foram usadas como suplementos no meio KC, para a análise do crescimento e desenvolvimento de plântulas do híbrido *Laeliacattleya*.

3.1. Efeitos de reguladores de crescimento, banana e água de coco no crescimento e desenvolvimento do híbrido *Laeliacattleya* (*Hadrolaelia purpurata* Lindl. (Chiron; Castro) x *Cattleya intermedia* Grah.)

Para analisar o efeito dos reguladores de crescimento no desenvolvimento das plântulas do híbrido *Laeliacattleya*, os reguladores foram utilizados nas concentrações de zero, 0,5; 1,0 e 1,5 mg·L⁻¹, nas combinações dialélicas (auxina x citocininas) (IBA) x (6BA); (IBA) x (KIN); (NAA) x (6BA); (NAA) x (KIN). A polpa de banana foi usada na concentração de 90 g · L⁻¹, e a água de coco foi usada na concentração 100 ml · L⁻¹.

O meio básico de Knudson “C” (1946) (meio KC) foi o meio utilizado para a adição dos reguladores de crescimento, polpa de banana, água de coco, com 50 ml de meio por vidro. O número de réplicas foi quatro e o número de plântulas por réplica foi dez. Foram analisadas quarenta plântulas por tratamento. No ensaio proposto, o pH de todos os meios de cultura foi ajustado com KOH (1N) ou HCl (50%) para 5,3 antes da adição de 6,5 g · L⁻¹ de ágar e 20 g · L⁻¹ de sacarose.

Os meios foram autoclavados por 20 minutos sob pressão de 1 atm. Ao término do período do experimento (oito meses), foram verificados os valores de pH final alcançados pelos meios nutritivos onde foram cultivadas as plântulas.

A polpa de banana adicionada foi homogeneizada no liquidificador, com 50 ml de água destilada, e acrescentada em 950 ml do meio KC. A adição de água de coco é feita em 900 ml do meio KC. A polpa de banana foi acrescentada ao meio e a água de coco substituiu 100 ml de água do meio KC.

Após a transferência das plântulas, as réplicas foram mantidas em sala climatizada, com temperatura de 25 ± 2 °C, sob luz contínua, usando lâmpadas fluorescentes.

3.2. Condições dos experimentos e coleta de dados

Após oito meses, foi medido os valores do pH final dos meios nutritivos das plântulas do híbrido *Laeliacattleya*. Foram observadas as seguintes variáveis: número de folhas (NF) e de raízes (NR), comprimento das maiores folhas (CF) e maiores raízes (CR) e o número de brotos (NB).

Posteriormente ao período do experimento, as plântulas foram aclimatadas em garrafas pets (Tereftalato de polietileno), contendo areia no fundo e lã de rocha entre as plântulas, inicialmente no Orquidário da Universidade Estadual de Maringá, em temperatura ambiente.

O delineamento experimental foi em blocos e os dados foram analisados estatisticamente, utilizando o programa SAS (*System for Windows V8*) em nível de 1% e 5% de probabilidade, pelo teste F e o Teste de Tukey com 5% da probabilidade de erro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da adição de reguladores de crescimento, água de coco e polpa de banana, em meio “KC” para o desenvolvimento de raízes e folhas em plântulas do híbrido *Laeliacattleya* (*Hadrolaelia purpurata* Lindl. (Chiron; Castro) x *Cattleya intermedia* Grah.)

A adição de diferentes concentrações de reguladores de crescimento, a água de coco e a polpa de banana em meio “KC”, estimulou positivamente as plântulas do híbrido de *Laeliacattleya* após o primeiro mês de cultivo *in vitro*. Nos demais meses, foi observado um maior crescimento e desenvolvimento das plântulas em meio contendo a polpa de banana e em alguns meios contendo reguladores de crescimento como NAA x KIN.

A análise das culturas assimbióticas de plântulas do híbrido *Laeliacattleya* revelou que a suplementação por reguladores de crescimento (ANA; 6-BA; KIN; IBA), água de coco e polpa de banana ao meio de cultura KC, interferiu de forma significativa nas características morfológicas analisadas: número de raízes (NR), número de folhas (NF), comprimento de raízes (CR) e comprimento de folhas (CF) (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise de variância para as características NR (número de raízes), NF (número de folhas), comprimento das raízes (CR), e comprimento de folhas (CF) de plântulas do híbrido *Laeliacattleya*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas de 0,0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg · L⁻¹ de IBA x 6-BA, IBA x KIN, NAA x 6-BA, NAA x KIN, com 100 ml de água de coco, e com 90 g · L⁻¹ de polpa de banana, após 8 meses da inoculação

Fontes de Variação	GL	NR	NF	CR	CF
Concentração	17	42,5595**	22,0963**	107,3482**	6,0354**
Tipo de suplemento	3	157,5811*	101,9126**	878,8767**	11,2468**
Concentração x Tipo de suplemento	42	11,9831**	3,0739**	24,4916**	0,8415**
Resíduo	24	2,2898	1,0199	4,5113	0,1947
CV (%)		29,24	21,99	50,76	31,22

** Significativo em nível de 1 % de probabilidade, teste F. NS: não significativo.

* Significativo em nível de 5 % de probabilidade, teste F. NS: não significativo.

O efeito dos reguladores de crescimento bem como água de coco e polpa de banana no meio KC para o cultivo *in vitro* do híbrido *Laeliacattleya*,

para as variáveis NR, NF, CR, e CF, determinou diferentes valores no teste de média em nível de 5% de probabilidade (Tabela 3).

O número de raízes das plântulas do híbrido *Laeliacattleya*, representado pela variável NR foi superior nas plântulas que se desenvolveram em meio de cultura KC suplementado com polpa de banana, indicando que a adição da polpa de banana promoveu a indução de um maior número de raízes (Tabela 3). Vyas et al. (2009) verificaram que, utilizando a polpa de banana (12,5%) no cultivo de brotos de *Dendrobium lituiflorum*, levou à multiplicação, ao alongamento e a um vigoroso enraizamento. O efeito positivo da adição de polpa de banana para a indução de raízes no híbrido *Laeliacattleya* é um resultado contrastante com as evidências descritas para espécies de orquídeas terrestres do gênero *Paphiopedilum*, em que a adição de polpa de banana ao meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) determinou o desenvolvimento de gemas caulinares, mas não de raízes (HUANG et al., 2001). Isso indica que o efeito positivo da adição de polpa de bananas em meios de cultivo de orquídeas é dependente da espécie de orquídea.

A utilização da polpa de banana no cultivo *in vitro* de orquídeas também tem sido relacionada a processos de inibição da germinação de sementes (ARDITTI et al., 1982). É recomendada apenas na fase de plântulas para o desenvolvimento de partes aéreas e radiculares (SHIAU et al., 2002).

O efeito da adição da água de coco mostrado na Figura 5 indicou que a adição deste suplemento ao meio KC estimulou a produção de folhas (NF = 7,30; Tabela 3). Arditti et al., 1982 justificam o efeito positivo da adição de água de coco ao meio de cultura, devido à presença da zeatina ribosídeo identificado por Kobayashi et al. (1997), com efeitos análogos ao de citocinina. Em seu trabalho, Lo et al. (2004a) observaram que o meio MS suplementado com água de coco poderia promover aumento no número de folhas (cerca de 3,5 folhas por planta), fato também observado nas plântulas *Laeliacattleya* no presente estudo.

A Tabela 3 mostra também que em relação às outras características (NR, CR, CF) a suplementação com água de coco determinou valores menores que os encontrados no meio básico (KC). Assim, a adição de água de coco aos meios de cultura parece simular um efeito de adição de citocinina que inibe a formação de raízes e a dominância apical e pode estimular o crescimento de

partes aéreas, resultando na formação de múltiplos brotos (TRIGIANO e GRAY, 2005). A ação da água de coco também tem sido apontada como estando relacionada simplesmente a uma ação antioxidante deste aditivo complexo, evitando o escurecimento e a morte dos tecidos em consequência da liberação de fenóis e/ou quinonas produzidos pelos explantes (DIXON, 1985; OLIVEIRA et al., 1995). Segundo Mantena et al. (2003), esta propriedade antioxidante, verificada principalmente na água de coco *in natura*, diminui drasticamente com os tratamentos térmicos, ácidos ou alcalinos e com o grau de maturação dos frutos. Assim, essa atividade protetora da água de coco pode ser em parte atribuída à presença da vitamina C em sua composição, embora mais de um princípio ativo possa estar envolvido (CARVALHO, et al., 2006).

Tabela 3 - Teste de média para as variáveis NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento de folhas), das plântulas do híbrido *Laeliacattleya*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialéticas de 0,0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg · L⁻¹ de IBA x 6-BA, IBA x KIN, NAA x 6-BA, NAA x KIN, com 90 g · L⁻¹ de polpa de banana e 100 mL de água de coco, após 8 meses da inoculação

Concentrações (g · L ⁻¹)	NR	NF	CR	CF
0,0 x 0,0	5,7750 ^b	4,30 ^{bcd}	6,10 ^b	1,6850 ^b
0,0 x 0,5	5,3 ^{bcde}	4,2625 ^{cd}	3,9725 ^{ef}	1,3063 ^d
0,0 x 1,0	4,9813 ^{cde}	4,40 ^{bcd}	3,6169 ^f	1,3582 ^{cd}
0,0 x 1,5	4,9375 ^e	4,1625 ^d	3,6660 ^f	1,3025 ^d
0,5 x 0,0	5,8575 ^b	4,7250 ^{bc}	4,9850 ^{cde}	1,5458 ^{bc}
0,5 x 0,5	4,80 ^e	4,6750 ^{bc}	3,9535 ^f	1,2805 ^d
0,5 x 1,0	4,9188 ^e	4,6813 ^{bc}	3,5556 ^f	1,2974 ^d
0,5 x 1,5	4,7063 ^e	4,4875 ^{bcd}	3,5815 ^f	1,2754 ^d
1,0 x 0,0	5,1250 ^{bcde}	4,6375 ^{bcd}	5,0867 ^{bcd}	1,7403 ^b
1,0 x 0,5	5,70 ^{bc}	4,4688 ^{bcd}	4,2532 ^{def}	1,2754 ^d
1,0 x 1,0	5,1938 ^{bcde}	4,7750 ^b	3,8775 ^f	1,3308 ^d
1,0 x 1,5	5,15 ^{bcde}	4,5063 ^{bcd}	3,7283 ^f	1,3418 ^{cd}
1,5 x 0,0	5,6750 ^{bcd}	4,70 ^{bc}	5,2763 ^{bc}	1,7573 ^b
1,5 x 0,5	4,9938 ^{cde}	4,45 ^{bcd}	4,1269 ^{def}	1,3884 ^{cd}
1,5 x 1,0	4,9588 ^{de}	4,6188 ^{bcd}	4,0139 ^{ef}	1,3931 ^{cd}
1,5 x 1,5	5,2875 ^{bcde}	4,7563 ^b	3,9919 ^{ef}	1,3431 ^{cd}
90g de polpa banana	7,35 ^a	4,50 ^{bcd}	8,6525 ^a	2,4450 ^a

Tabela 3, cont...

100 ml água de coco	2,60 ^f	7,30 ^a	2,0750 ^g	1,3375 ^{cd}
Tipo de suplemento				
Meio KC	5,7750 ^b	4,30 ^{cd}	6,10 ^b	1,6850 ^b
IBA x 6-BA	4,5967 ^d	4,0067 ^d	3,0147 ^{de}	1,2926 ^d
IBA x KIN	5,8033 ^b	4,4983 ^c	5,5712 ^{bc}	1,5275 ^{bc}
NAA x 6-BA	4,975 ^{cd}	4,7417 ^{bc}	3,2277 ^d	1,2576 ^d
NAA x KIN	5,3117 ^{bc}	4,9883 ^b	4,6495 ^c	1,4937 ^{bc}
Polpa de banana	7,35 ^a	4,50 ^c	8,6525 ^a	2,4450 ^a
Água de coco	2,60 ^e	7,30 ^a	2,0750 ^e	1,3375 ^{cd}

Médias seguidas pelas letras não diferem entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

O menor número de raízes foi observado no meio de cultura suplementado com água de coco (NR = 2,6), enquanto a adição de polpa de banana estimulou a formação (NR) e o crescimento (CR) de raízes e também o crescimento das folhas (CF). O efeito positivo da água de coco foi observado apenas para a formação de folhas (NF) nas plântulas do híbrido *Laeliacattleya*.

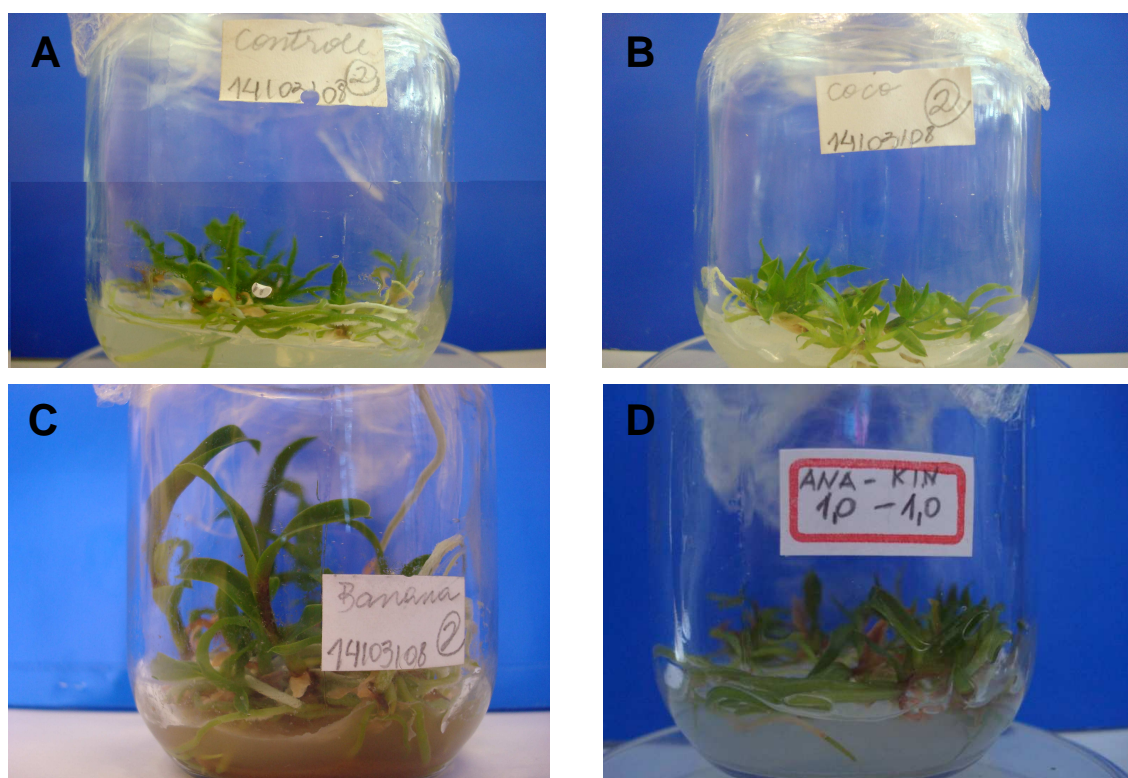


Figura 4 - Cultura do híbrido *Laeliacattleya* (*Hadrolaelia purpurata* x *Cattleya intermedia*) em meio KC sem suplementos (A), suplementado com água de coco (100ml· L⁻¹) (B), polpa de banana (90 g · L⁻¹) (C) e reguladores de crescimento NAA x KIN (1,0 – 1,0 · mg L⁻¹) (D).

As figuras 4a, b, c e d ilustram os diferentes crescimentos e desenvolvimentos das plantas do híbrido *Laeliacattleya* nos distintos meios: “KC” na ausência de suplemento; em meio “KC” suplementado com água de coco; em meio “KC” suplementado com polpa de banana; e em meio suplementado com reguladores de crescimento, respectivamente.

A adição de diferentes concentrações de IBA e KIN também estimulou a indução de raízes e o crescimento das raízes e das folhas nas plântulas do híbrido *Laeliacattleya*. No trabalho realizado por Nayak et al. (1997), dentre as auxinas testadas para a indução de raízes, IBA foi o mais eficiente, induzindo o enraizamento em 96% dos brotos. Embora as combinações de IBA e KIN tenham estimulado o desenvolvimento das plântulas no mesmo sentido do observado para o efeito da adição de polpa de banana no meio básico KC, os efeitos das combinações dos reguladores de crescimento obtiveram menores valores que os efeitos da adição de polpa de banana. Nos meios nutritivos suplementados com polpa de banana para o desenvolvimento de três espécies de orquídeas, Stancato et al. (2008) também observou que nesses meios ocorreram o maior crescimento, com maior acúmulo de matéria seca total.

O número de raízes formadas, o comprimento das raízes e das folhas nas plântulas do híbrido *Laeliacattleya* foram maiores no meio de cultura contendo polpa de banana do que o observado no meio contendo as combinações dos reguladores de crescimento IBA e KIN, IBA e 6BA, NAA e KIN, ou NAA e 6BA. A adição de 0,5; 1,0 e 1,5 mg · L⁻¹ de auxina (IBA ou NAA) na ausência de citocinina (KIN e 6BA), estimulou a formação de raízes e promoveu o crescimento das raízes e das folhas, mas este efeito não foi considerado como significativamente maior quando comparado com o desenvolvimento das plântulas no meio KC sem a adição de qualquer tipo de suplemento. Auxinas estimulam a formação de raízes, mas podem inibir o crescimento destas durante a cultura porque altas concentrações de auxinas podem ser tóxicas por estimular a produção de etileno, que inibe o crescimento (TRIGIANO e GRAY, 2005). Nas plântulas de *Laeliacattleya* mantidas em meio KC contendo IBA, na ausência de citocinina, também há uma indicação de que concentrações mais altas do que 0,5 mg · L⁻¹ de IBA inibe a formação de raízes. A concentração mais alta de IBA (1,5 mg · L⁻¹), na ausência de KIN ou 6BA, parece estimular somente o crescimento das partes aéreas (CF).

As auxinas IBA e NAA foram igualmente eficientes para promover o crescimento das raízes nas plântulas de *Laeliacattleya*, nas 3 concentrações usadas (1,0 – 0,0 mg · L⁻¹). Mas IBA parece mais eficiente do que NAA para induzir a formação de raízes e para promover o crescimento das folhas, enquanto o NAA foi mais eficiente do que IBA para induzir a formação das partes aéreas. Em outra espécie de orquídea, *Cymbidium aloifolium*, altas concentrações de NAA (5,0 mg · L⁻¹) tem sido apontada como efetiva para induzir a formação de raízes (NAYAK et al., 1998). Estas evidências contrastantes mostram o efeito diferencial de concentrações de NAA em espécies diferentes de orquídeas; o efeito de altas concentrações de NAA é dependente da espécie de orquídea considerada.

A adição de citocininas (KIN e 6BA) na ausência de auxinas (IBA e NAA) promoveu um desenvolvimento menor do que o verificado no meio KC sem a adição de suplementos. No meio suplementado com KIN foi verificado maior número de raízes e folhas que o verificado no meio suplementado com 6BA e também maior crescimento destas estruturas nas 3 concentrações, mas estes valores não foram maiores do que o verificado nas plântulas mantidas no meio KC na ausência das auxinas e citocininas. Estas evidências sustentam a proposição de um efeito negativo de citocininas para a formação e crescimento de raízes em plântulas cultivadas *in vitro* (TRIGIANO e GRAY, 2005). Reski et al. (2006) descreveram que, em meios contendo altas concentrações de KIN, as células são estimuladas a transitar mais rapidamente da fase G1 para S no ciclo celular, de forma que a síntese de várias proteínas no período G1 deixam de ser sintetizadas. Estas proteínas sintetizadas no final da fase G1 tem sido descritas como estando relacionadas a processos de diferenciação celular. A falta destas proteínas faz diminuir a chance de ocorrer diferenciação celular em tecidos formados por células expostas em concentrações altas de KIN (RESKI et al., 2006). Em células meristemáticas de *Datura innoxia* e *Daucus carota*, a fase G1 ocorre num tempo menor quando se adiciona KIN no meio, enquanto as fases S, G2 e M continuam inalteradas. Nestas células o ciclo celular é mais rápido e diminui o número de células (de 30 para 10%) que se diferenciam retardando, por exemplo, os eventos de rizogênese.

A diminuição da síntese de proteínas no período G1 de células em presença de KIN tem sido justificada como sendo devido à interferência de

micro RNAs de interferência (mi RNA) que suprimem ou inativam RNAs após a sua transcrição (WINKLER, 2005; THORE et al., 2006). De acordo com Thore et al. (2006), pequenas moléculas efetores podem se ligar em sítios de moléculas de mRNA, provocando uma alteração estrutural destes mRNA. Os efetores que se ligam ao mRNA podem ser metabólitos semelhantes a aminoácidos, vitaminas, nucleotídeos, coenzimas, reguladores de crescimento, tais como IAA ou KIN. Quando um destes metabólitos se liga, ocorre uma alteração na estrutura do mRNA que impede a ligação dos efetores da tradução na sequência sinal de expressão do mRNA, impedindo a produção da proteína.

O efeito positivo de citocininas tem sido descrito por Trigiano e Gray (2005) como estado relacionado com a formação de brotos. Em orquídeas, Duan et al. (1996) também verificou utilizando BA na propagação de *Phalaenopsis*, que o tratamento com BA aumentou em 3,7 o número de gemas formadas por explantes e promoveu o alongamento de caule em 37% quando comparado com os seus controles. Em outra espécie de orquídea, *Cymbidium aloifolium*, a suplementação de meio de cultura com BA também foi positiva para induzir a formação e diferenciação de brotos (NAYAK et al., 1998).

4.2. Efeito da adição de reguladores de crescimento, água de coco e polpa de banana, em meio “KC” para o desenvolvimento de brotos em plântulas do híbrido *Laeliacattleya* (*Hadrolaelia purpurata* Lindl. (Chiron; Castro) x *Cattleya intermedia* Grah.), e análise das variações de pH dos meios de cultura

A análise da variância para comparar o efeito da adição de reguladores de crescimento, água de coco e polpa de banana, no meio KC, para o desenvolvimento de brotos em plântulas do híbrido *Laeliacattleya* e para as variações de pH nos meios de cultura mostrou que as diferenças no número de brotos e de valores de pH foram significativas em nível de 1% de probabilidade, pelo teste F (Tabela 4).

O número de brotos formados nas plântulas do híbrido *Laeliacattleya* foi maior no meio KC contendo combinações de auxinas e citocininas e adição dos suplementos água de coco e polpa de banana (Tabela 5). O menor número de brotos foi observado nas plântulas mantidas no meio KC sem a adição de suplementos. O número médio de brotos formados foi maior nas plântulas inoculadas no meio KC suplementado com combinações de NAA e 6BA, de

NAA e KIN, e nas plântulas mantidas em meio contendo água de coco e polpa de banana. Estes resultados indicam que, enquanto as combinações de IBA e KIN foram efetivas para induzir e promover o crescimento de raízes e o crescimento de folhas nas plântulas do híbrido *Laeliacattleya*, as combinações de NAA x 6BA, e NAA x KIN foram adequadas para induzir a formação de brotos. O maior número de brotos foi verificado nas plântulas mantidas em meio KC contendo as combinações 1,0 mg · L⁻¹ de NAA x 0,5 mg · L⁻¹ de 6BA ou KIN, 1,0 mg · L⁻¹ de NAA x 1,5 mg · L⁻¹ de 6BA ou KIN, 1,5 mg · L⁻¹ de NAA x 1,0 mg · L⁻¹ de 6BA ou KIN, ou em meio KC contendo 0,5 mg · L⁻¹ de 6BA ou KIN, sem a adição de auxinas (Tabela 5). Nayak et al. (1997) observou que a adição de uma citocinina (KIN, 6BA) foi essencial para induzir a formação de brotos nos explantes de *Acampe praemorsa*, sendo que a combinação de ANA e 6BA promoveu o crescimento dos brotos, bem como a expansão foliar. O efeito positivo da adição de KIN ao meio de cultivo para regeneração de plantas de uma espécie de *Dendrobium*, estudado por Khosravi et al. (2008), também pode ser estendido para o crescimento das raízes e desenvolvimento (indução e crescimento) das partes aéreas nas plântulas de *Laeliacattleya*.

O efeito da adição de ANA x 6-BA para a variável número de brotos (NB = 5,5167) foi maior do que o observado com a adição de combinações de NAA x KIN, IBA x KIN, ou IBA x 6BA (Tabela 5). Parvin et al. (2009) encontrou em *Dendrobium* sp. maiores números de brotos com a utilização de de 0,1mg · L⁻¹ de ANA (NB = 8,83).

Tabela 4 - Análise de variância para a característica NB (número de brotos) formados nas plântulas do híbrido *Laeliacattleya*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas de 0,0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg · L⁻¹ de IBA x 6-BA, IBA x KIN, NAA x 6-BA, NAA x KIN, com 90 mg · L⁻¹ de polpa de banana e 100 ml · L⁻¹ de água de coco, e variação do pH do meio após 8 meses da inoculação

Fonte de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS	
		NB	pH
Concentração	17	8,6685**	1,2953**
Suplementos	3	229,8486**	16,4859**
Concentração X Suplementos	42	9,6456**	1,2953**
Resíduo	251	3,4563	0,0754
CV (%)		59,37	7,97

** Significativo em nível de 1 % de probabilidade, teste F.

A análise das concentrações na combinação ANA x 6BA, comparadas à adição de banana e água de coco, mostrou que o número de brotos foi maior nas plântulas de *Laeliacattleya* mantidas no meio contendo água de coco (3,25) e banana (3,25) e nos meios contendo apenas as concentrações de 0,5 e 1,5 mg · L⁻¹ de 6BA (1,75 brotos/plântula), sem a adição de ANA, indicando também que a adição de auxinas pode ser dispensável para induzir brotações nos híbridos de *Laeliacattleya*. Por outro lado, fica evidente o efeito positivo e pronunciado da adição de água de coco para induzir a formação de brotos nos híbridos de *Laeliacattleya*.

O maior valor de pH foi detectado no meio de cultura suplementado com água de coco (4,6025) e o de menor magnitude foi suplementado com polpa de banana (2,7450) (Tabela 5). Desta forma, as variações de pH no meio suplementado com água de coco foram menores do que as variações registradas no meio de cultura KC contendo as diferentes concentrações de auxinas e citocininas, ou contendo polpa de banana, ou na ausência de qualquer um dos suplementos (Tabela 5). Devido ao pH inicial ser de 5,3, quanto mais próximo desse valor menor a sua variação.

Tabela 5 - Teste de média para as variáveis NB (número de brotos) e pH, das plântulas do híbrido *Laeliacattleya*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas de 0,0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg · L⁻¹ de IBA x 6-BA, IBA x KIN, NAA x 6-BA, NAA x KIN, com 90 g · L⁻¹ de polpa de banana e 100 mL de água de coco, após 8 meses da inoculação

Concentrações (g · L ⁻¹)	NB	pH
0,0 x 0,0	1,0000 ^d	2,7525 ^d
0,0 x 0,5	2,8750 ^{ab}	3,4525 ^{bc}
0,0 x 1,0	4,3750 ^a	3,4913 ^{bc}
0,0 x 1,5	2,500 ^{ab}	3,4613 ^{bc}
0,5 x 0,0	3,1875 ^{ab}	2,8913 ^d
0,5 x 0,5	3,6875 ^{ab}	3,5488 ^b
0,5 x 1,0	3,0000 ^{ab}	3,6231 ^b
0,5 x 1,5	2,5625 ^{ab}	3,5144 ^{bc}
1,0 x 0,0	2,4375 ^{ab}	3,0988 ^{cd}
1,0 x 0,5	4,5625 ^a	3,4681 ^{bc}
1,0 x 1,0	3,1250 ^{ab}	3,7456 ^b
1,0 x 1,5	3,8750 ^a	3,7125 ^b
1,5 x 0,0	2,4375 ^{ab}	3,0969 ^{cd}
1,5 x 0,5	3,8750 ^a	3,6094 ^b
1,5 x 1,0	2,3125 ^{ab}	3,5031 ^{bc}

Tabela 5, cont...

1,5 x 1,5	2,7500 ^{ab}	3,5381 ^b
90g polpa banana	3,2500 ^{ab}	2,7450 ^d
150 ml água de coco	3,7800 ^{ab}	4,6025 ^a
Tipo de suplemento		
Meio KC	1,0000 ^d	2,7525 ^d
IBA x 6-BA	1,8833 ^{bcd}	3,8452 ^b
IBA x KIN	1,2500 ^{cd}	2,7540 ^d
NAA x 6-BA	5,5167 ^a	3,8638 ^b
NAA x KIN	3,9667 ^{ab}	3,3383 ^c
Polpa de banana	3,500 ^{abcd}	2,7450 ^d
Água de coco	3,7500 ^{abc}	4,6025 ^a

Médias seguidas pelas letras não diferem entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

As variações de pH no meio suplementado com as diferentes combinações de auxinas e citocininas também foram menores do que a variação observada no meio KC sem a adição de suplementos. As maiores variações de pH no meio de cultura foram verificadas nos meios de cultura sem suplementos ou contendo polpa de banana, ou nas combinações de IBA e KIN.

De acordo com Vacin e Went (1949), os meios de cultura geralmente utilizados para germinação assimbiótica de sementes de orquídeas são fracamente tamponados, tanto que, quando se inicia o crescimento das plantas, o valor do pH cai abaixo do nível ótimo para o crescimento, provavelmente devido à liberação de compostos, pela própria planta, para talvez conseguir obter maior aproveitamento dos minerais disponíveis. Mesmo ajustado, o pH após a autoclavagem, pode influenciar diretamente no desenvolvimento dos tecidos vegetais *in vitro* (ARDITTI e ERNST, 1993).

4.3. Processo de aclimação e desenvolvimento das plântulas do híbrido *Laeliacattleya* (*Hadrolaelia purpurata* Lindl. (Chiron; Castro) x *Cattleya intermedia* Grah.) *ex vitro*.

A sobrevivência no processo de aclimação do híbrido *Laeliacattleya* foi aproximadamente 90% nas plântulas desenvolvidas em meio contendo polpa de banana, mantidas em temperatura ambiente (Figura 7a). Essas plântulas foram aclimatadas em areia e lã de rocha, mantidas com 50% de sombreamento, sendo irrigadas com água da chuva três vezes por semana durante o período de um mês, devido a não aplicação de nutrientes nessas

plântulas. Após esse período, as plântulas receberam água de torneira e aplicações do adubo Vitaplan, a cada quinze dias, na dose de 10-10-10 de N-P-K (nitrogênio, fósforo e potássio) na concentração de 2 g·L.

As plântulas cultivadas em meio contendo $1,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de IBA também apresentaram uma taxa de sobrevivência que pode ser considerada promissora, porque cerca de 70% destas plântulas sobreviveram no processo de aclimação, nas mesmas condições descritas acima (aclimatadas em areia e lã de rocha e regadas com água da chuva durante o primeiro mês). (Figura 7b).

As plântulas cultivadas nas diferentes concentrações de IBA x KIN também apresentam um índice de sobrevivência acima de 50%, mas as plântulas cultivadas nos meios de cultura contendo ANA apresentaram um índice de sobrevivência inferior a 50% (Figura 7c).

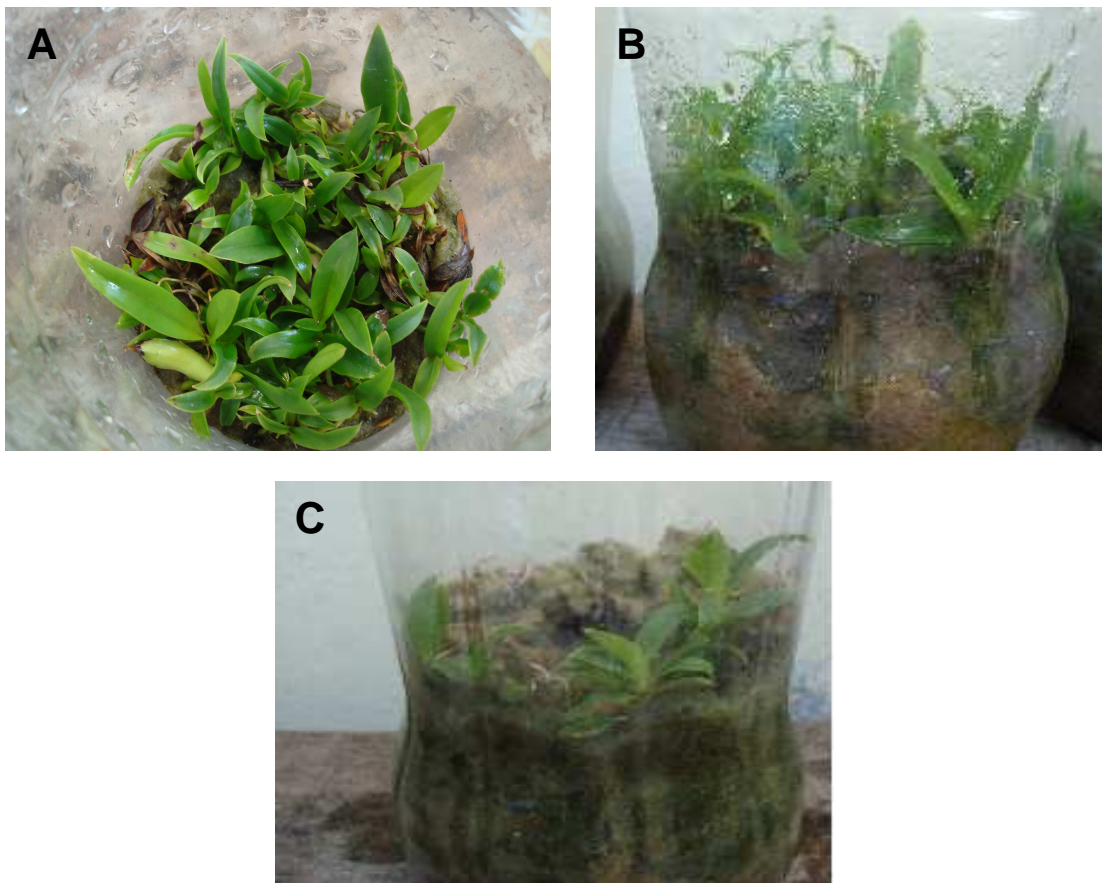


Figura 5 - Plantas aclimatadas, a cinco meses, de *Laeliacattleya*, cultivadas *in vitro* em meio KC suplementado com polpa de banana (90 g·L) (A), plântulas que foram cultivadas *in vitro* em meio KC suplementado com IBA x 6-BA ($1,5 - 0,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (B) e as que foram suplementadas com ANA x KIN ($1,0 - 0,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (C).

No presente estudo com as plântulas de *Laeliacattleya*, não foi feita uma análise de características morfológicas ou fisiológicas destas plântulas durante o processo da aclimação, mas os diferentes índices de plantas sobreviventes verificados indicam que processo da aclimação parece estar relacionado com o meio de cultura usado para o crescimento *in vitro* das plântulas. Os maiores índices de plantas sobreviventes foram verificados naquelas mantidas nos meios contendo polpa de banana e contendo concentrações altas de IBA, e os menores índices foram observados nas plântulas cultivadas em meio contendo concentrações de ANA.

Apesar da análise superficial que foi feita, considerando-se apenas o índice de plantas sobreviventes após a retirada destas dos seus respectivos meios de cultura, os resultados do presente estudo são importantes e merecem uma investigação mais minuciosa no futuro, porque num estudo com a orquídea *Bletia purpúrea*, o desenvolvimento das plantas no processo da aclimação não foi dependente do meio de cultura usado para obter as plântulas *in vitro* (Dutra et al., 2008). Na literatura especializada, a aclimação de orquídeas, expressa por medidas de parâmetros morfológicos (desenvolvimento de folhas e raízes) e fisiológicos (taxa de fotossíntese), tem sido descrita como dependente de intensidades de luz diferentes (Jeon et al., 2005), dependente da atividade de enzimas antioxidantes em resposta à intensidade de luz diferentes (Ali et al., 2005; Li et al., 2006) e dependente do substrato usado (Lone et al., 2008) para a manutenção *ex vitro*.

Experimentos com substratos alternativos ao xaxim desfibrado, considerado como adequado para a manutenção *ex vitro* de orquídeas no processo da aclimação, mostraram que a fibra de coco e a casca de pinus misturada com a fibra de coco (1:1) têm sido indicadas como substratos alternativos para o uso do xaxim desfibrado na aclimação da espécie *Cattleya intermedia* (Lone et al., 2008). A inoculação de plântulas de orquídeas com fungos (*Trichoderma harzianum*), após a retirada das condições *in vitro* (Gutiérrez-Miceli et al., 2008), e a exposição de plântulas ainda *in vitro*, antes de serem transferidas para o ambiente (aclimação *in vitro*), a agentes químicos (uniconazole) que retardam o crescimento destas, mas garantem a produção de plantas saudáveis e bem adaptadas na aclimação *ex vitro*, também

têm sido relatadas (Cha-um et al., 2009) como alternativas para se conseguir um processo de aclimatação adequado para orquídeas propagadas *in vitro*.

Na aclimatação das plântulas de *Laeliacattleya*, não foram testados substratos diferentes nem intensidades de luz variadas, mas a taxa de sobrevivência das plântulas cultivadas *in vitro* em meio contendo polpa de banana, transferidas para a mistura dos substratos areia e lã de rocha e regadas com água da chuva durante o período o primeiro mês, foi equivalente à taxa de sobrevivência descrita para as condições consideradas como as mais adequadas nos experimentos com outras espécies de orquídeas. Desta forma, considerando que a aclimatação é uma etapa importante e crítica para o sucesso da micropropagação de *Laeliacattleya*, a suplementação do meio de cultura KC com polpa de banana também foi mais adequado para garantir a maior taxa de sobrevivência (90%) das plântulas desenvolvidas nas condições *in vitro*.

5. CONCLUSÕES

- a) A adição de polpa de banana reproduz os efeitos da adição de auxinas (IBA ou NAA) no meio de cultivo KC para o desenvolvimento das plântulas do híbrido *Laeliacattleya*, enquanto a adição de água de coco simula os efeitos da adição das citocininas (6BA e KIN). Mas a composição dos nutrientes da polpa de banana ou da água de coco parece ter um efeito adicional que potencializa os efeitos dos reguladores de crescimento, de modo a induzir maior número de raízes, folhas, brotos e de promover o maior crescimento das raízes e folhas.
- b) O efeito marcante da adição de água de coco foi evidente para estimular a formação de brotos e de maior número de folhas nas plântulas de *Laeliacattleya* e para garantir uma menor variação do pH do meio de cultura e, se for usada juntamente com a polpa de banana, esta combinação pode ser promissora para o desenvolvimento global das plântulas.
- c) A adição de concentrações ($0,5 - 1,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de IBA ou de NAA no meio KC é uma forma eficiente e recomendável para promover o desenvolvimento *in vitro* de plântulas, por se tratar de um protocolo que pode ser reproduzível. Mas a adição de polpa de banana e/ou de água de coco é um procedimento mais adequado e conveniente para os produtores de orquídeas por apresentar um efeito positivo destacado no desenvolvimento das plântulas e por determinar um custo reduzido em relação ao uso de reguladores de crescimento.
- d) As combinações de IBA ou NAA com KIN são mais adequadas para promover o desenvolvimento *in vitro* de plântulas no meio KC que as combinações das referidas auxinas com 6-BA.
- e) O uso de reguladores de crescimento para promover o maior desenvolvimento de plântulas do híbrido *Laeliacattleya in vitro* é um procedimento adequado. Porém, é complexo porque requer tipos diferentes de auxinas e citocininas para determinar o maior desenvolvimento global destas plântulas, no que se refere ao número de brotos, raízes, folhas e ao crescimento de raízes e partes aéreas destas plântulas.
- f) A forma mais adequada para estimular o crescimento e desenvolvimento global de plântulas do híbrido *Laeliacattleya in vitro* com finalidades comerciais

é suplementar o meio KC com polpa de banana e com água de coco, combinados ou usados separadamente;

g) A forma adequada para a micropropagação e para estimular o crescimento e desenvolvimento global de plântulas do híbrido *Laeliacattleya in vitro*, utilizando procedimentos que podem ser reproduzidos, é adicionar tipos diferentes de auxinas e citocininas.

6. REFERÊNCIAS

ALI, M.B.; HAHN, E-J.; PAEK, K-Y.. Effects of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micropropagated *Phalaenopsis* plantlet. **Environmental and Experimental Botany**, 54:109–120, 2005.

ALTAFIN, V.L.; MENEZES, M.O.F.; LIMA, R.R.; PITOMBO, L.M. Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal. Espírito Santo do Pinhal: Unipinhal, 2003. 14p. (Boletim Técnico nº 7).

ARAÚJO, A.G. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídeas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 73p. Dissertação (Mestrado).

ARDITTI, J.; CLEMENTS, G.; FAST, G.; HADLEY, G.; NISHIMURA, G.; ERNST, R. Orchid seed germination and seedling culture – manual. In: ARDITTI, J.; CLEMENTS, G.; FAST, G.; HADLEY, G.; NISHIMURA, G.; ERNST, R (eds.). **Orchid biology: Reviews and Perspective II**. New York: Cornell University, 1982. 390p.

ARDITTI J. **Fundamentals of orchid biology**. New York Wiley-Interscience. 1992. 691p.

ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti, J. (ed). **Orchid Biology: Reviews and Perspectives III**. Ithaca: Cornell University Press. 1984. p. 179-222.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: Wiley Interscience, 1993. 704p.

BACH, E.E.; CASTRO, O.L. Germinação de sementes de *Cattleya sp.* (ORCHIDACEAE) em cultura de tecido visando produção de mudas. **Arq. Inst. Biol.**, 71:1-749, 2004.

BATCHELOR, S.R. Orchid culture - 7 - Nutrition. **American Orchid Society Bulletin**, 50:1087-1091, 1981.

BEGUM, A.A.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through *in vitro* culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. J. Japan. **Soc. Hort. Sci.**, 63: 663-673, 1994.

BICALHO, H.D. Aspectos ornamentais e taxionômicos das orquídeas gênero *Cattleya* no continente sul-americano. In: CONGRESSO DA ESCOLA SUPERIOR AGRONÔMICA LUIZ DE QUEIROZ, 1980. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1980, p.157-168.

- BLOSSFELD, A. **Orquidologia, orquidofilia e orquicultura**. Rio Claro: Funep, 1999. 89p.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq. 1998, p. 87-132.
- CARVALHO, M.J.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; MAIA Jr., G.A. Água de coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina**, 27:437-452, 2006.
- CID, L.P.B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180p.
- CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 36:16-21, 2001.
- CLARO, D.P.; SANTOS, A.C.; ALENCAR, E.; ANTONIALLI, L.M.; LIMA, J.B.O complexo agroindustrial das flores do Brasil e suas peculiaridades. **Revista de Administração da UFLA**, 1:17-30, 1999.
- CHA-UM, S.; PUTHEA, O.; KIRDMANEE, C. An effective in-vitro acclimatization using uniconazole treatments and ex-vitro adaptation of *Phalaenopsis* orchid. **Scientia Horticulturae**, 121:468-473, 2009.
- CHEN, J. – T.; CHANG, W.-C. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’. **Plant Growth Regulation**, 34:229-232, 2001.
- CHIRON, G.R., CASTRO V.P.N. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. **Richardiana**, 2:4-28, 2002.
- COLOMBO L.A.; FARIA R.T.; CARVALHO, J.F.R.P.; ASSIS, A.M.; FONSECA, I.C.B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, 6:253-258, 2004.
- DEBERGH, P. *In vitro* culture of ornamentals. In: VASIL, I.K.; THORPE, T. A. (Ed). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1:561-573, 1994.
- DECHEN, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2007, p. 91-132.
- DIXON, R.A. (ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL, 1985. 256p.

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

DUAN, J. -X.; CHEN, H.; YAZAWA, S. In Vitro Propagation of *Phalaenopsis* via Culture of Cytokinin – Induced Nodes. **J. Plant Growth Regul.**, 15:133-137, 1996.

DUTRA, D.; JOHNSON, T.R.; KAUTH, P.J.; STEWART, S.L.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 94:11-21, 2008.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) "BATUM". **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27:488-490, 2005.

FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA, L.V.R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, 22:76-95, 2004.

FRÁGUAS, C.B.; VILLA, F.; SOUZA, A.V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, 50:719-726, 2003.

FREITAS, A. GONÇALVES, L.M. MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Efeito do meio de cultura no desenvolvimento das plântulas de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae) provenientes de sementes estocadas. SEMANA DA BIOLOGIA, 21º ENCONTRO MARINGAENSE DE BIOLOGIA, 2006, Maringá. **Resumos...** Maringá: UEM, p. 59, 2006.

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

GNASEKARAN, P.; RATHINAM, X.; SINNIAN, U.R.; SUBRAMANIAM, S.A. Study on the Use of Organic Additives on the Protocorm-like Bodies (PLBs) Growth of *Phalaenopsis violacea* (Orchid). **Journal of Phytology**, 229-33, 2010.

GONÇALVES, L.M. **Efeito da adição de suplementos e aditivos indeterminados na organogênese das plântulas de *Laelia purpurata* (Lindl) e *Encyclia randii* (Barb. Rodr.) (Orchidaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 34p. Dissertação de Mestrado.

GONÇALVES, L. M. PRIZÃO, E. C. MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Influência da composição do meio de cultura sobre a germinação das sementes de duas espécies de orquídeas brasileiras mantidas estocadas por 4 anos. SEMANA DA BIOLOGIA, 21º ENCONTRO MARINGAENSE DE BIOLOGIA, 2006, Maringá. **Resumos...** Maringá: UEM, p. 55, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998, p.183-260.

GRIESBACH, R.J. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. **Trends in new crops and new uses**. West Lafayette, 2002. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/griesbach.pdf>. Acesso em: 16, outubro, 2009.

GUTIÉRREZ-MICELI, F.A.; AYOLA-TALAVERA, T.; ABUD-ARCHILA, M.; SALVADOR-FIGUEROA, M.; ADRIANO-ANAYA, L.; ARIAS-HERNÁNDEZ, M.L.; DENDOOVEN, L. Acclimatization of micropropagated orchid *Guarianthe skinnerii* inoculated with *Trichoderma harzianum*. **Asian Journal of Plant Sciences**, 7:327-330, 2008.

HADLEY, G.; HARVAIS, G. The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. **New Phytologist**, 67:441-445, 1968.

HADLEY, G. Orchid mycorrhiza. In: Arditti, J. (ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives**, II. Ithaca and London: Cornell University, 1982, p. 84-118.

HINOJOSA, G.F. Auxinas. In: CID, L.P.B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, p. 15-53.

HUANG, L. -C.; LIN, C. -J.; KUO, C. -I; HUANG, B. -L.; MURASHIGE, T. *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 91:111-121, 2001.

HUAN, LE VAN, T.; TAKAMURA, T.; TANAKA, M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. **Plant Science**, 166:1443-1449, 2004.

ISHII, Y.; TAKAMURA, T.; GOI, M.; TANAKA, M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports**, 17:446-450, 1998.

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

JEON, M-W.; ALI, M.B.; HAHN, E-J.; PAEK, K-Y. Effects of photon flux density on the morphology, photosynthesis and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. **Plant Growth Regulation**, 45:139-147, 2005.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Análise conjuntural das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil. **Ibraflor**, jan./dez. 2004.

KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; VIJAYAKUMAR, S. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). **African Journal of Biotechnology**, 6:1171-1174, 2007.

KERBAUY, G.B. Clonacão *in vitro* de *Catasetum* (ORCHIDACEAE) a partir de ápices radiculares. In: **XXXVI CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA**. São Paulo, 1983. Resumos Expandidos... São Paulo: UNESP, 1983, p. 465-471.

KERBAUY, G.B. Indução *in vitro* de protocormóides em raízes de *Oncidium varicosum*: Efeitos de fontes nitrogenadas, auxinas e citocininas. **Revista Brasileira de Botânica**, 16:1-8, 1993.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, 1:30-33, 1997.

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

KHOSRAVI, A.R.; KADIR, M.A.; KAZEMIN, S.B.; ZAMAN, F.Q.; DE SILVA, A.E. Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium* cv. Serdang Beauty. **African Journal of Biotechnology**, 7:4093-4099, 2008.

KIYUNA, I.; ANGELO, J.A.; COELHO, P.J. **Floricultura**: comportamento do comércio exterior brasileiro no primeiro semestre de 2004. Instituto de Economia Agrícola, 2004. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1420>>. Acesso em: 20, janeiro, 2010.

KIYUNA, I.; ANGELO, J.A.; COELHO, P.J.; ASSUMPÇÃO, R. de. **Floricultura**: desempenho do comércio exterior em 2004. Instituto de Economia Agrícola, 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1742>> Acesso em: 20, janeiro, 2010.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, 15:214-217, 1946.

KNUDSON, L. Nutrient solutions for orchids. **Botany Gazette**, 112:538-532, 1951.

KOBAYASHI, H.; MORISAKI, N.; TAGO Y.; HASHIMOTO Y.; IWASAKI S.; KAWACHI, E.; NAGATA R.; SHUDO K. Structural identification of major cytokinin in coconut milk as 14-O-(3-O-[beta-D-galactopyranosyl-(1-2)-alpha-D-galactopyranosyl-(1→3)-alpha-L-arabinofuranosyl]-4-O-(alpha-L-arabinofuranosyl)-beta-d-galactopyranosyl)-trans-zeatin riboside. **Chemical Pharmacology Bulletin**, 45:260-264, 1997.

KRAPIEC, P.V.; MILANEZE, M.A.; MACHADO, M.F.P.S. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum**, 25:179-182, 2003.

LAKSHMANAN, P.; LOH, C.-S.; GOH, C.-J. An *in vitro* method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda Deborah* using thin section culture. **Plant Cell Reports**, 14:510-514, 1995.

LI, Y.; IMAI, K.; ONWONA-AGYEMAN, S.; OHNO, H.; MATSUI, S. Effects of light intensity during acclimatization on antioxidative enzyme activities and growth in mericlone plantlets of a *Cattleya* hybrid. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, 75:243–248, 2006.

LONE, A.B.; BARBOSA, C.M.; TAKAHASHI, L.S.A.; FARIA, R.T. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, 30:465-469, 2008.

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

LO S-F.; NALAWADE, S.M.; MULABAGAL, V.; MATTHEW, S.; CHEN, C-L.; KUO C-L.; TSAY, H-S. *In Vitro* Propagation by Asymbiotic Seed Germination and 1,1–Diphenyl 2-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activity Studies of Tissue Culture Raised Plants of Three Medicinally Important Species of *Dendrobium*. **Biol. Pharm. Bull.**, 27:731-35, 2004b.

MANTENA, S.K.; JAGADISH; BADDURI, S.R.; SIRIPURAPU, K.B.; UNNIKISHNAN, M.K. *In vitro* evaluation of antioxidant properties of *Cocos nucifera* Linn. water. **Nahrung, Germany**, 2:126-131, 2003.

McCONNELL, J.; CRUZ, F. **Growing Orchids on Guam**. Guam: Horticulturists - College of Agriculture and Life Sciences, 1996. 24p.

MILLER, D.; WARREN, R. Orquídeas do Alto da Serra da Mata Atlântica pluvial do sudeste do Brasil. **Salamandra Consultoria Editorial Ltda.**, 1996. 256p.

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

MORALES, S.; MILANEZE, M.A.G.; MACHADO, M.F.P.S. Effect of Activated Charcoal for Seedling Development of *Catasetum fibriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Journal of Plant Sci.**, 1:388-391, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, 15:473-497, 1962.

MURASHIGE, T. Clonal crops through tissue culture. In: BARZ, W.; EINHARD, E.; ZENCK, M.H. (eds). *Plant tissue culture and its biotechnological application*, New York, **Springer-Verlag**, 1977, p. 392-406.

NAYAK, N.R.; PATNAIK, S.; RATH, S.P.; Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter an McCann. **Plant Cell Reports**, 16:583-586, 1997.

NAYAK, N.R.; CHAND, P.K.; RATH, S.P.; PATNAIK, S.N. Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. Seed-derived rhizomes *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 34:185-188, 1998.

NEUMANN, K-H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. 330p.

OLIVEIRA, S.A.; MACHADO, M.F.P.S., PRIOLI, A.J.; MANGOLIN, C.A. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 31:47-50, 1995.

OLIVEIRA, M.M. Aplicações e avanços na área da biotecnologia vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, 22:22-27, 2000.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 75p.

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

PATELI, P.; PAPAFOU, M.; CHRONOPOULOS, J. Influence of *in vitro* culture medium on *Epidendrum radicans* seed germination, seedling growth and *ex vitro* establishment. **Acta Hort.**, 616:189-192, 2003.

PARVIN, M. S.; HAQUE, M. E.; AKHTER, F.; MONIRUZZAMAN; KHALDUN, A. B. M. Effect of different levels of NAA on *in vitro* growth and development of shoots of *Dendrobium* orchid. Bangladesh. **J. Agril. Res**, 34:411-16, 2009.

PAULA, C.C.; SILVA, H.M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. Viçosa: UFV, 2002. 63p.

PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L.; KASUYA, M.C.M. Association des mycorhizies dans les orchidees – perspectives d'utilisation dans les programmes de propagation symbiotique. **Orchidees**, 55:24-27, 2003.

PEREIRA, O.L.; KASUYA M.C.M.; ROLLEMBERG, C.L.; BORGES, A.C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Rev. Bras. Ci. Solo**, 29:199-206, 2005.

PETERSON, R.L.; UETAKE, Y.; ZELMER, C. Fungal symbiosis with orchid protocorms. **Symbiosis**, 25:29-55, 1998.

PIERIK, R.L.M.; SPRENKELS, P.A.; VAN DER HARST. B.; VAN DER MEYS, Q.G. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 34:139-153, 1988.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

POOLE, H.A.; SEELEY, J.G. Effects of artificial light sources, intensity, watering frequency and fertilization practices on growth of *Cattleya*, *cymbidium* and *Phalaenopsis* orchids. **Bulletin of American Orchid Society**, 52:923-929, 1977.

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

PRIZÃO, E.C.; GONÇALVES, L.M.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MACHADO, M.F.P.S. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado e de grafite sobre o desenvolvimento inicial de *Cattleya bicolor* Lindl. E do híbrido 'BLC Pastoral Inocence' (Orchidaceae). IN: **XXI SEMANA DA BIOLOGIA, VII ENCONTRO MARINGAENSE DE BIOLOGIA**, Maringá, 2006. **Resumos... Maringá: UEM, 2006, p. 55–56.**

RADMANN, E.B.; FACHINELLO, J.C.; PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *In vitro* de porta-enxertos de macieira 'M - 9'. **Rev. Bras. Frutic.**, 24:624-628, 2002.

REGO, I. V.; FARIA, R.T. Interação genótipo x meio nutritivo na propagação *in vitro* de orquídeas nativas do Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Resumos**. Goiânia: SBMP, 2003, p. 1-3.

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

RICHTER, E.M.; JESUS, D.P.; MUÑOZ, R.A.A.; LAGO, C.L.; ANGNES, L. Determination of Anions, Cations, and Sugars in Coconut Water by Capillary Electrophoresis. **J. Braz. Chem. Soc.**, 16:1134-1139, 2005.

ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. 66p.

ROMAHN, V. **Orquídeas e bromélias: enciclopédia ilustrada**, 2200 plantas e flores. São Paulo: Europa, 2007.177p.

ROY, J.; BANERJEE, N. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fibriatum* Lindl. Var. *oculatum* Hk. f. **Sci. Hortic.**, 97:333- 340, 2003.

- SÁ, M.E.L.; CANÇADO, G.M.A.; SOUZA, C.M. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, 21:116–123, 2000.
- SAIPRASAD, G.V.S.; POLISETTY, R. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 39:42-48, 2003.
- SANTOS – SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; SOARES, T.L.; SILVA, K.M. Meios Nutritivos para Micropropagação de Plantas. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.
- SANTOSO, U.; KUBO, K.; OTA, T.; TADOKORO, T.; MAEKAWA, A. Nutrient composition of *kopyor* coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food Chemistry**. v. 57. p. 299 – 304, 1996.
- SANTANA, E. Nem tudo são rosas. **Revista Tecnológica**, 22:18-24, 1997.
- SHIAU, Y.–J.; SAGARE, A. P.; CHEN, U.–C.; YANG, S.–R.; TSAY, H.–S. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 43:123-130, 2002.
- SILVA, E.F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya* ‘Pastoral’ X *Laeliocattleya* ‘Amber Glow’**. Lavras: Universidade Federal de Lavras 2003. 62p. Dissertação (Mestrado).
- SILVA, E.F.; PASQUAL, M.; PAIVA, P.D.O.; SILVA, A.B.; NOGUEIRA, D.A. Polpa de banana e vitaminas do Meio MS no cultivo *in vitro* de orquídea. **Plant Cell Culture & Micropopagation**, 1:8-12, 2005.
- SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T.W. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Report**, 5:292-294, 1986.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ. 1998, p. 183-260.
- SMIDT, E.C.; SILVA-PEREIRA, V.; BORBA, E.L. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, 21:85–9, 2006.
- SONCIN, C.A.; NETO, W.L.; SOUZA, D.; TELHADO, S.F.P.; FILHO, J.V.C. **Logística de exportação de flores no Brasil**. Disponível em www.sober.org.br/palestra/12/01P062.pdf. Acesso em: 20, janeiro de 2010.

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

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

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

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005. 182p.

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

TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. **Plant development and biotechnology**. CRC Press LLC, 2005. PAGINAS Trigiano, R.N.; Gray, D.J.(eds.). Boca Raton: Plant Development and Biotechnology, 2005, 357p.

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

VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, 1:605-613, 1949.

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

VYAS, S.; GUHA, S.; BHATTACHARYA, M.; RAO, I.U. Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. **Scientia Horticulturae**, 121:32-37, 2009.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

G635e Gonçalves, Letícia de Menezes
 Efeito de diferentes suplementos adicionados no cultivo in vitro do híbrido Laeliacattleya. / Letícia de Menezes Gonçalves. -- Maringá, 2010.
 x, 49 f. : il. color., figs., tabs.

 Orientadora : Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Pires da Silva Machado.
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2010.

 1. Cattleya intermedia x Hadrolaelia purpurata - Híbrido. 2. Cattleya intermedia x Hadrolaelia purpurata - Cultivo - Água de coco. 3. Cattleya intermedia x Hadrolaelia purpurata - Cultivo - Polpa de banana. 4. Cattleya intermedia x Hadrolaelia purpurata - Reguladores de crescimento. 5. Laelia purpurata x Cattleya intermedia - Híbrido. 6. Regulador de crescimento - NAA, IBA, KIN, 6-BA. 7. Cattleya intermedia x Hadrolaelia purpurata - Cultivo - Iluminação contínua. I. Machado, Maria de Fátima Pires da Silva, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed. 584.4