

**GUILHERME RODRIGUES**

**CULTIVO *IN VITRO* DE DUAS ESPÉCIES DE *Cattleya L.*(*ORCHIDACEAE*),  
COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AUXINA E CITOCININAS**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
ABRIL - 2009**

GUILHERME RODIGUES

**CULTIVO *IN VITRO* DE DUAS ESPÉCIES DE *Cattleya* L.(*ORCHIDACEAE*),  
COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AUXINA E CITOCININAS**

Dissertação 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 Mestre.

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
ABRIL – 2009**

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

R696c Rodrigues, Guilherme, 1985-  
Cultivo *in vitro* de duas espécies de *Cattleya*, com diferentes concentrações de auxina e citocininas / Guilherme Rodrigues. -- Maringá, 2009.  
xiii, 32 f. : figs., tabs.

Orientador : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2009.

1. *Cattleya* - Cultivo *in vitro*. 2. Orquídea - Reguladores de crescimento. 3. Orquídea - Cultivo *in vitro*. 4. *Cattleya* - Micropropagação. 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. 635.9344

GUILHERME RODRIGUES

**CULTIVO *IN VITRO* DE DUAS ESPÉCIES DE *Cattleya* L.(*ORCHIDACEAE*),  
COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AUXINA E CITOCININAS**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 17 de abril de 2009.

---

**Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Pires da Silva Machado**  
(Orientadora)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Lourival e Soili, por todo apoio e confiança depositada em mim, as minhas irmãs Caroline e Camila, pela compreensão e paciência que tiveram a minha ausência, ao meu primo Bruno, por todo apoio a ajuda, e em especial a minha noiva Caroline Rückl por ter me esperado todo esse tempo em que estive dedicado aos estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que esteve presente em todos os momentos das minhas conquistas.

A Prof. Dr. Maria de Fátima Pires da Silva Machado, por sua atenção, orientação e disposição para me ajudar sempre que precisei.

A Prof. Dr. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre, pela oportunidade de estágio, e pelo grande incentivo que deposita em todos os alunos.

À Universidade Estadual de Maringá e pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Aos Funcionários do PGA, que sempre nos tiveram orientando.

Aos meus amigos conquistados aqui em Maringá, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, em especial para Jean Carlos Penatti de Mello, que se demonstrou um grande irmão.

## BIOGRAFIA

GUILHERME RODRIGUES, filho de Jose Lourival Rodrigues e Soili Cubas Batista Rodrigues, nasceu em Rio Negrinho, Estado de Santa Catarina, em 16 de maio de 1985.

Em dezembro de 2006, graduou-se no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, pela Faculdade Ingá – UNINGÁ, na cidade de Maringá, Estado do Paraná.

Em março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia na área de Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá, no estado do Paraná.

No dia 17 de abril de 2009, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Aspectos gerais da família das orchidaceae.....	5
2.2 Aspectos gerais das espécies do gênero <i>Cattleya</i> .....	6
2.3 <i>Cattleya bicolor</i> .....	7
2.4 <i>Cattleya intermédia var. alba</i> .....	8
2.5 Propagação de orquídeas por meio assimbiótico.....	8
2.6 Adição de reguladores de crescimento ao meio nutritivo.....	10
2.7 Condições de manutenção do cultivo <i>in vitro</i> .....	11
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
4.1. Efeito da adição de combinações de IBA e KIN no desenvolvimento de raízes e de partes aéreas em plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> e <i>Cattleya intermedia var. alba</i> .....	17
4.2. Efeito da adição de combinações de IBA e 6-BA no desenvolvimento de raízes e de partes aéreas em plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> e <i>Cattleya intermedia var. alba</i> .....	22
4.3 Alterações de pH do meio de cultura suplementado com combinações de IBA e KIN, e de IBA e 6-BA, após 6 meses de cultivo das plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> e <i>Cattleya intermédia var. alba</i> .....	27
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>



## LISTA DE TABELAS

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

**Tabela 2** Análise de variância para as características NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas) das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas (0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) de IBA e KIN, e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.

**Tabela 3** Teste de média para as variáveis NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas), das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba*, cultivadas em meio KC contendo combinações dialélicas (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) de IBA e KIN.

**Tabela 4** Análise de variância para as características NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas) das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas (0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) de IBA e 6-BA, e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.

**Tabela 5** Teste de média para as variáveis NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas), das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba*, cultivadas em meio KC contendo combinações dialélicas (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) de IBA e 6BA.

**Tabela 6** Valores médios de pH registrados no meio KC suplementos com combinações dialélicas (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L) de IBA e KIN, e de IBA e 6BA, após 6 meses de cultivo das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** Plântulas de *Cattleya intermédia var. alba* utilizadas como plântulas inoculados em meio KC suplementados com combinação dialética de auxina (IBA) e citocininas (KIN ou 6-BA).

**Figura 2** Plântulas de *Cattleya bicolor* utilizadas como plântulas inoculados em meio KC suplementados com combinação dialética de auxina (IBA) e citocininas (KIN ou 6-BA).

**Figura 3** Plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermédia var. alba* após 3 meses em meio KC, na ausência e citocininas.

**Figura 4** Plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermédia var. alba* após 3 meses em meio KC suplementados com 0,0mg/L de IBA e 0,5 mg/L de 6-BA.

## RESUMO

RODRIGUES, Guilherme, Universidade Estadual de Maringá, abril de 2009.  
**CULTIVO *IN VITRO* DE DUAS ESPÉCIES DE *Cattleya L.*(*ORCHIDACEAE*),  
COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AUXINA E CITOCININAS.**  
Professora Orientadora. Dr. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.  
Professora conselheira: Dr. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

A proposta do presente estudo foi verificar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de duas espécies do gênero *Cattleya*: *C. intermédia var. alba* e *C. bicolor*, em diferentes combinações de reguladores de crescimento vegetal, utilizando o ácido 3-Indolbutílico (IBA) como auxina e 6 – furfurilamino – purina (KIN) e 6-Benzilaminopurina (6-BA) como citocininas. As culturas assimióticas foram mantidas em meio nutritivo Knudson (KC), suplementado com combinações dialélicas de auxinas e citocininas nas concentrações de 0,5 – 1,0 – 1,5mg/L, e mantidas sob influência de luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas, no período de seis meses. Na presença de IBA na ausência de KIN ou 6-BA houve um maior desenvolvimento das plântulas de *Cattleya bicolor* em comparação as plântulas de *C. intermedia var. alba*; as plântulas de *C. intermédia var. alba* apresentaram um desenvolvimento eficiente de raízes e partes aéreas no meio KC na ausência de qualquer combinação de IBA com KIN ou com 6-BA; uma estabilidade no pH foi observada nas combinações de IBA com 6-BA determinando a presença de 6-BA no meio de cultura uma maior estabilidade do pH; quando as plântulas inoculadas inicialmente no meio suplementado com 0,5 mg/L de IBA combinado com 1,0 mg/L de KIN, promovem o desenvolvimento de novas raízes em *Cattleya bicolor* e *C. intermédia var. alba*; e para o desenvolvimento *in vitro*, de plântulas de *C. intermédia var. alba* estas podem ser inoculadas em meio KC sem a adição de IBA ou 6-BA, e após a indução de raízes e folhas, as plântulas serão transferidas para o meio KC contendo somente 1,0 mg/L de IBA.

**Palavras-chaves:** *Cattleya*, auxinas, citocininas.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Guilherme, Universidade Estadual de Maringá, April 2009. ***In vitro* culture of two *Cattleya*'s species with different auxin and cytokinin concentrations.** Guideline teacher. Dr. Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Counselor teacher: Dr. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

The purpose of this study was the verification of the *in vitro* development of seedlings of two *Cattleya* species: *Cattleya intermedia* var. *alba* and *Cattleya bicolor*, in different combinations of plant growth regulators, using the acid-3 – Indolbutilico (IBA) as auxin and 6-fururilamino-purina (KIN) and 6-Benzylaminapurine (6-BA) as cytokinins. The assimbióticas cultures were kept in Knudson nutritive environments (KC), supplemented by dial combinations of auxins and cytokinins with concentrations of 0,5 – 1,0 – 1,5 mg/L and kept under the continues light influence or photoperiod of 14 hours, during six months. With IBA presence and KIN or 6-BA absence occurred a bigger development of *Cattleya bicolor* compared to *C. intermédia* var. *alba*; the *C. intermédia* var. *alba* presented an efficient development of roots and air parts in KC environment with the absence of any IBA with KIN or 6-BA combinations, determining the presence of 6-BA with a bigger pH stability in the culture environment; when the inoculated seedlings supplemented with 0,5 mg/L of IBA and 1,0 mg/L of KIN, these seedlings promoted the development of new *Cattleya bicolor* and *C. intermedia* var. *alba* roots; and for the *in vitro* development of *C. intermedia* var. *alba* seedlings these can be inoculated in KC environment without 6-BA combinations determining the presence the addition of IBA or 6-BA and after the induction of roots and leaves, the seedlings can be transferred to KC, containing only 1,0 mg/L of IBA.

**Keys – words:** *Cattleya*, auxin, cytokinin.

## 1. INTRODUÇÃO

As orquídeas são plantas de extrema beleza que constituem a maior família botânica, contendo cerca de 800 gêneros e 35.000 espécies e vários híbridos, (MILLER & WARREN, 1996, ARDITTI, 1966). A família *Orchidaceae* são altamente especializadas, e as mais evoluídas dentre as monocotiledôneas (DRESSLER, 1993), tendo-se originado na área fitogeográfica conhecida por Malásia, durante o período cretáceo quando as famílias das angiospermas se diferenciaram (GARAY, 1972). As orquídeas estão distribuídas em todas as regiões da terra, bem mais representada nas regiões tropicais e subtropicais, com uma ampla diversidade no território brasileiro, foram identificadas cerca de 190 gêneros e 3.500 espécies (MELLO, 2000). As orquídeas podem crescer como epífitas ou rupícolas, poucas são terrestres, algumas habitam os brejos ou o subsolo (PABST; DUNGS, 1975; COLOMBO *et al.*, 2004).

Uma das singularidades da família *Orchidaceae* é a produção de milhares de pequenas sementes em cada fruto (DRESSLER, 1993). Para Stoutamire (1964), as sementes das orquídeas estão entre as de menor tamanho produzidas entre as fanerógamas e abrangem dimensões inferiores a 0,3 mm, sendo raras aquelas com mais de 2 mm. Estimou-se que o número de sementes por cápsulas nas orquídeas tropicais é de aproximadamente 3,7 milhões, mas não como regra geral, uma vez que em algumas espécies foram encontradas cápsulas com apenas 376 sementes (WITHNER, 1959). O grande número de sementes produzidas por tal família, tem sido considerado como uma resposta as diversas pressões seletivas do ambiente, podendo ocorrer tanto em plantas terrestres quanto em epífitas (ACKEMAN, 1983). As sementes de orquídeas se diferenciam da maioria das outras espécies por não possuírem reservas nutritivas para promover a germinação (RAMOS, 1969). A germinação de tais sementes, na natureza, só ocorre depois de instaladas a simbiose com os fungos micorrizos, devido à ausência de endosperma funcional, podendo germinar em troncos de árvores, sob rochas, sob solo, e em fendas de rochas e solo, de onde obtém a energia necessária para se desenvolverem. Tal simbiose se mostra bastante delicada, podendo não ocorrer frente à aplicação

de agrotóxicos ou em condições adversas (PAULA e SILVA, 2002; SINGH, 1988).

As orquídeas são apreciadas comercialmente devido as diversidades de tamanho, forma e cor das flores de rara beleza e durabilidade e da longevidade mantida por várias semanas (SILVA, 1986). Devido a diminuição gradativa de seu habitat natural, a coleta predatória, e a comercialização indiscriminada de espécies com valor comercial, há uma crescente ameaça de erosão genética ou extinção dos germoplasmas. Este problema se agrava ainda mais devido ao desenvolvimento lento e seletivo das orquídeas na natureza, e da germinação das sementes até a fase adulta (PIERIK, 1990). As orquídeas vem atraindo cada vez mais a atenção de colecionadores e pesquisadores, há séculos, e o consumo de flores e plantas ornamentais pelo mundo inteiro vem aumentando ao longo dos anos. Nos países em desenvolvimento como Brasil e China, a demanda tem crescido significadamente, tendo no Brasil áreas de produção de flores e plantas ornamentais com cerca de 4.500 hectares (CLARO *et al.*, 1999; SANTANA, 1997).

Alguns gêneros com elevado valor econômico, como *Cattleya*, são gêneros apreciados no mercado brasileiro e internacional (SINGH, 1992). Nos Estados Unidos as orquídeas se tornaram popular nas casas, sendo a segunda planta ornamental mais comercializada, movimentando cerca de U\$ 128 milhões, no ano de 2005 (PHILIP *et al.*, 2006).

O gênero *Cattleya*, denominado como rainha dentre as orquídeas (SILVA, 1986), engloba cerca de 70 espécies e inúmeras variedades e híbridos, constituindo um dos mais belos ornamentos, tornando-se o mais popular e o mais cultivado gênero da família das orquídeas. O gênero *Cattleya* representa uma atividade de grande importância econômica no agronegócio florícola mundial, devido, principalmente a grande capacidade de combinação genética e a beleza e forma de suas flores (ZANENGA-GODOY e COSTA, 2003; RAPOSO, 1993).

A propagação de orquídeas pode ser tanto vegetativa ou assexuada (um processo mais lento para obtenção do número de mudas), quanto por reprodução sexuada, onde são utilizadas sementes. Devido à grande demanda pela procura de orquídeas, alguns pesquisadores norte-americanos,

(KNUDSON, 1946; VANCIN e WENT, 1949), conseguiram formular meios de cultura apropriados para germinação de sementes de orquídeas *in vitro* assimbioticamente (na ausência de fungo). Desta forma, a expectativa dos autores era de atender a demanda crescente do mercado consumidor, podendo obter um número elevado de plantas em um curto período de tempo, e/ou a reposição de mudas na natureza, contribuindo assim para salvar muitas espécies de orquídeas em extinção (KNUDSON, 1922; STANCATO *et al.*, 2001). O cultivo *in vitro* também tem sido considerado como uma ferramenta biotecnológica importante na obtenção de plantas livres de doenças e pragas, além de propiciar a produção de um número significativo de novas mudas uniformes (DAMASCO, 1996; DREW, 1990; VUYLSTEKE, 1996).

A micropropagação ou propagação *in vitro* tem sido utilizada no Brasil, há pouco mais de 25 anos, para aumentar, principalmente a produção de mudas de alta qualidade genética e, conseqüentemente para reduzir o custo das mudas, (STANCATO *et al.*, 2001).

Os meios nutritivos, tem sido utilizados no cultivo *in vitro* para dar suporte ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Knudson (1922) mostrou que as sementes de orquídeas podem germinar em meio de cultura contendo apenas sacarose como fonte de carboidrato, aminoácidos, vitaminas e proteínas específicas, e posteriormente ele aperfeiçoou este meio com a aplicação de sais inorgânicos. A sacarose tem sido considerado como um fator determinante na promoção de crescimento e desenvolvimento das plântulas, e é necessário determinar a concentração ótima de nutrientes para cada variedade de orquídea, (BUTCHER; INGRAM, 1976; DIXON, 1985).

Para o sucesso do cultivo *in vitro*, o fator determinante tem sido o meio nutritivo usado na micropropagação (DIXON, 1985). Embora diferentes meios de cultivo sejam recomendados para o subcultivo das plântulas de orquídeas, o meio "KC", formulado por Knudson (1946), vem sendo o mais recomendado até o presente para a germinação da maioria das espécies de orquídeas.

Diversos são os aditivos ou suplementos que podem ser adicionados ao meio de cultura conhecidos como "suplementos indeterminados", tais como: água de coco (endosperma líquido de *Cocos nucifera*) carvão ativo, polpa de frutas, em especial a banana, dentre os outros "suplementos determinados" tais como, reguladores de crescimento.

Na utilização dos reguladores de crescimento nas culturas *in vitro*, as auxinas e citocininas têm como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nas plântulas, estimulando respostas como crescimento e alongamento, enraizamento ou multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Dependendo das variações genéticas dentro da família *Orchidaceae*, diferentes respostas quanto ao uso de reguladores de crescimento vegetais são visíveis no desenvolvimento, e nem sempre se obtém respostas positivas. Por isso, torna-se importante investigar os diferentes reguladores na espécie que se pretende produzir *in vitro*.

Assim a proposta do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento de plântulas de duas espécies do gênero *Cattleya*: *C. intermédia* var. *alba* e *C. bicolor*, em diferentes combinações de reguladores de crescimento vegetal, utilizando o ácido 3-Indolbutílico (IBA) como auxina e 6 – furfurilamino – purina (KIN) e 6-Benzilaminopurina (6-BA) como citocininas, nas concentrações de 0,5 – 1,0 – 1,5mg/L.

Na literatura especializada não existem registros de formulações adequadas utilizando combinações de auxinas e citocininas nos meios de cultivo para estimular o desenvolvimento de plântulas destas duas espécies de *Cattleya*, que têm sido alvo de interesse comercial. É possível que a adição de determinadas concentrações de IBA e de um ou dos dois tipos de citocininas (KIN e 6-BA) promovam a indução de brotos, de raízes, e o maior desenvolvimento das raízes e de partes aéreas das plântulas.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais da família das orchidaceae

As orquídeas estão no grupo básico das Fanerógamas, são plantas diferentes das outras e constituem umas das maiores famílias de Angiosperma, totalizando cerca de 10% delas (BERG, 1998). A grande maioria das plantas dentro dessa imensa família são epífitas, estão divididas em ordem sistemática e morfológica de aproximadamente 35.000 espécies naturais (além das variedades e dos híbridos).

A família Orchidaceae está presente em todas as áreas com vegetação no planeta, e sua maior diversidade está nas regiões tropicais (BERG, 1998). De acordo com Rego e Faria (2002), no Brasil, as orquídeas se desenvolvem em todos os estados, e em maior quantidade na Mata Atlântica, que vai de Pernambuco até o Rio Grande do Sul.

Na classificação das orquídeas, o grande responsável foi o botânico e orquidólogo alemão Rudolf Schlechter, que se baseou na classificação de Pfitzer (Botânico Alemão); ele reorganizou e reclassificou essa família em duas subfamílias, duas divisões, cinco tribos, duas séries, duas subséries, 88 subtribos, 65 grupos e aproximadamente 1.500 gêneros. As duas subfamílias são as Diandrae e as Monandrae, onde as Diandrae englobam as espécies com duas anteras férteis, e as Monandrae englobam todas as demais orquídeas existentes, cujas espécies possuem apenas uma antera fértil (BLOSSFELD, 1999).

As orquídeas também são classificadas conforme seus hábitos vegetativos; elas podem ser classificadas como epífitas, saprófitas, terrestres e rupícolas. As epífitas no conceito de Olatunji e Nengim (1980), representam o grupo de plantas mais especializado sob o ponto de vista ecológico, uma vez que requerem adaptações morfológicas e funcionais que lhes permitem sobreviver em ambientes xerofíticos, garantindo-lhes a absorção e a conservação eficiente de nutrientes e água. Estas espécies possuem raízes aéreas, grossas, cilíndricas e suculentas (com muito velame), com as quais se prendem aos troncos e galhos das árvores hospedeiras, não se tornando

parasitas, pois nada extrai das árvores para sua sobrevivência. As plantas epífitas utilizam o oxigênio do ar, absorvem a água da chuva, do orvalho ou neblina e absorvem os resíduos acumulados de folhas e insetos em decomposição. Os nutrientes metabolizados são armazenados nos seus pseudobulbos e servem para a sobrevivência das orquídeas em condições desfavoráveis.

As orquídeas terrestres são europeias e também são encontradas em partes do continente asiáticas de clima frio. A forma mais segura de se distinguir uma orquídea terrestre é através do seu sistema radicular, sendo ele delicado e fino; possuem apenas uma camada e tênue de velame e por isso são mais sensíveis ao ressecamento (BLOSSFELD, 1999).

O grupo das orquídeas saprófitas é muito grande, em seu habitat natural encontramos as orquídeas saprófitas sobre troncos e galhos caídos (matéria orgânica em decomposição), seu sistema radicular é mais fino e menos carnosa, e conforme as raízes envelhecem e vão secando, adquirem resistência e tornam-se ásperas e penetram nos intertícios da madeira. Devido a seus hábitos vegetativos, os cultivos de orquídeas saprófitas se tornam mais difíceis.

As plantas de orquídeas rupícolas ou rupestres são as que vivem sobre rochas, fixadas nos líquens e folhagens decompostas acumuladas nas fendas e partes rebaixadas da pedra, formando touceirinhas compactas, fáceis de serem cultivadas, necessitando de poucos nutrientes (NETO, 2003).

## **2.2 Aspectos gerais das espécies do gênero *Cattleya* L.(ORCHIDACEAE)**

As orquídeas do gênero *Cattleya* são nativas do Brasil (BICALHO, 1980), e apresentam ocorrência no México, América Central e América do Sul. As espécies de *Cattleya* são muito utilizadas no mundo inteiro como plantas ornamentais pela beleza de suas flores (BECHTEL *et al.*, 1992), o que lhe confere considerável importância econômica. O gênero *Cattleya*, com cerca de 60 espécies de epífitas que vivem nas matas (PABST e DUNGS, 1975), têm características muito especializadas, que lhes confere elevado poder de adaptação a diferentes ambientes (BENZING *et al.*, 1982) e suas flores exibem particularidades marcantes que desempenham importante papel na atração do

agente polinizador o que, conseqüentemente, favorece a polinização cruzada (DRESSLER, 1993). As plantas de *Cattleya* se dividem em três grupos básicos: plantas monofolias de flor grande, plantas monofolia de flor média, e as plantas de *Cattleya* bifólias.

### **2.3 *Cattleya bicolor***

O nome *Cattleya bicolor*, foi usado por se tratar de uma planta cujas flores possuem, acentuadamente, duas cores: afora a coluna do labelo que vai do branco ao roxo, sendo o labelo da cor púrpura. Esta espécie ocorre nos estados do Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Brasília. O aspecto vegetativo é de planta bifoliada, apresentando, as vezes, três folhas. Os bulbos se assemelham muito com os da *Cattleyas amethystoglossa*, *C. guttata* e *C. leopoldii*, em forma de cana, chegando a mais de um metro de comprimento. As folhas são alongadas, semi-rígidas, e as espatas são simples, (<http://www.delfinadearaujo.com/datacent/catcor44.htm>).

. As flores de *C. bicolor* se apresentam em grande quantidade e, se bem cultivada a planta, chega a ultrapassar uma dúzia por haste floral. As flores apresentam diversidade na coloração das tépalas (pétalas+sépalas), indo do marrom/ocre ao verde. Os labelos variam do branco ao roxo; suas flores possuem de 7 a 10 cm de diâmetro.

As flores são duráveis, apresentando-se em boas condições por cerca de 18 a 20 dias. Atualmente estão registradas três variedades de *C. bicolor*: *C. bicolor* var. *bicolor*, *C. bicolor* var. *minasgeraisensis* e *C. bicolor* var. *brasiliensis* (<http://www.delfinadearaujo.com/datacent/catcor44.htm>).

A época predominante da floração das plantas de *C. bicolor* é o mês de março, podendo adiantar ou atrasar a floração por cerca de um mês, dependendo do local e do cultivo. A flor da *Cattleya bicolor* apresenta uma particularidade, não encontrada nas demais espécies de *Cattleya* bifoliadas: o seu labelo não apresenta lóbulos laterais, e toda a coluna fica exposta. Outra característica importante para hibridadores é a “força genética” da planta, que leva o labelo conhecido como “língua de gato” para a descendência (<http://www.delfinadearaujo.com>).

## **2.4 *Cattleya intermédia* var. *alba***

A *C. intermédia* var. *alba* é nativa do Brasil, ocorrendo na floresta Atlântica costeira, e em geral cresce, como uma epífita, mas também podem ser encontradas crescendo como terrestre. Esta espécie apresenta muitas variações de cor, a planta de porte médio é bifoliada com 3-9 flores grandes.

As plantas da espécie *C. intermédia* var. *alba* crescem em temperaturas quentes (min 15 °C), e o seu habitat natural necessita de grande quantidade de luz, sua floração ocorre no outono. (<http://wsbeorchids.org.uk/wp-content/uploads/2009/01/Cattleya%20intermedia%20alba.pdf>).

## **2.5 Propagação de orquídeas por meio assimbiótico**

A propagação de plantas *in vitro* tem atraído a atenção dos pesquisadores desde o início de século onde Haberlandt em 1902 foi o primeiro a cultivar de tecidos somáticos de várias espécies de plantas em soluções nutritivas (KRIKORIAN E BERQUAM, 1969).

Inicialmente nenhum sucesso foi obtido, pois foram observados ausência de divisão celular. O motivo deste insucesso foi atribuído à ausência de “fitormônios” no meio nutritivo, compostos ainda não conhecidos na época o pesquisador Hanning (1904), utilizando embriões de crucíferas, observou a necessidade da suplementação do meio nutritivo com sacarose, para promover a germinação de tais embriões.

Posteriormente o professor Lewis Knudson (1992), propôs a cultura assimbiótica de orquídeas, *in vitro* (que significa a propagação de orquídeas sem o auxílio do fungo micorrizo presente na natureza) e também observou que a sacarose era muito importante para o desenvolvimento dos embriões *in vitro* (TORRES *et al.*, 1998).

Com a função de fornecerem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos embriões, baseando-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, os meio nutritivos foram gradativamente aperfeiçoados. Sendo, após várias fórmulas propostas por Knudson, a mais conhecida e utilizada no cultivo de várias espécies de orquídeas é a formula “C” (KC), de 1946, fórmula esta que é composta de sacarose e ainda

suplementos minerais (Tabela 1). De acordo com Griesbach (2002) pode a fórmula KC modificada, se adequando as necessidades das diferentes espécies de orquídeas.

Geralmente, um meio basicamente simples é recomendado às orquídeas porque estas não exigem altas quantidades de minerais (PIERIK, 1990). Para a maioria das espécies dos gêneros *Cattleya*, *Cymbidium*, *Oncidium*, *Laelia*, *Vanda* entre diversos outros gêneros populares têm sido usado o meio Knudson "C" ou com algumas modificações na formulação original (ARDITT *et al.*, 1982).

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

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

De acordo com Arditti e Ernest (1993), além dos constituintes do meio de cultura, o pH do meio de cultura alcançado após o processo de autoclavagem, também pode influenciar diretamente o desenvolvimento dos tecidos vegetais sob cultivo *in vitro*. O pH é um ator responsável pela manutenção da solubilidade dos sais, influência a absorção de nutrientes e reguladores de crescimento, e conseqüentemente o desenvolvimento pode estimular ou inibir o crescimento das plântulas. A maioria dos tecidos cultivados *in vitro* são inoculados em pH de 5,2 a 5,8 (SKIRVIN, 1986).

Entretanto, alterações têm sido observadas no pH durante o período em que as plântulas ficam inoculadas. Vacin e Went (1949), ao medir o pH do meio contendo *Epidendrum brineanum* ao final de cem dias, observaram uma alteração de 5,46 para 3,78, na ausência de plântulas os autores verificaram que o pH foi pouco alterado. Skirvin (1986) também afirmou que a presença dos tecidos de plantas pode afetar o pH final do meio de cultura.

## 2.6 Adição de reguladores de crescimento ao meio nutritivo.

Atualmente sabe-se que o crescimento e o desenvolvimento vegetal dependem de sinais internos e exógenos, realizado por mensageiros químicos chamados de hormônios, termo que denota ou expressa estimulação. Os hormônios ou fitormônios, são substâncias orgânicas naturais, biologicamente ativas em concentrações muito baixas, mas responsáveis por respostas na planta de magnitude grande, (EMBRAPA, 2000).

Diferentes dos hormônios, os reguladores de crescimento vegetal são sintetizados exogenamente fora da planta, e compartilham com os hormônios determinado a maioria de suas características e efeitos dentro da planta. A composição hormonal no meio são fatores determinantes do crescimento e desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura *in vitro*, onde certos tecidos necessitam totalmente dos reguladores exógenos no meio, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam (CALDAS *et al.*, 1990).

Dentre os reguladores de crescimento utilizados para o cultivo *in vitro* de vegetais destacam-se as auxinas e as citocininas. As auxinas são amplamente utilizadas comercialmente na agricultura e na horticultura há mais de 50 anos, sendo o 2,4 – D (ácido 2.4 – diclorofenoacético) uma das auxinas sintéticas mais comuns. Segundo Taiz e Zeiger (2006) o 2.4 – D é bastante eficiente, uma vez que esta substância não é metabolizada pela planta tão rapidamente quanto o fitormônio ácido indol-3-acético (AIA) por exemplo.

No cultivo das orquídeas, diversas auxinas de origens natural ou sintética são utilizadas, tanto para a cultura de tecidos quanto para incrementar a germinação e o desenvolvimento das plântulas mantidas assimbioticamente (MARTINI *et al.*, 2001).

As auxinas, sintéticas, podem ser necessárias no meio de cultura para complementar o teor endógeno sintetizado nas gemas, e diferentes concentrações de auxinas estimulam diferentes respostas, quantidades excessivas de auxina podem estimular a produção de calos e indução de enraizamento em plantas *in vitro* (BARRUETO, 2000). O ácido indolbutírico (IBA - ácido indolbutírico) tem sido considerado como eficaz na indução de enraizamento, porém, é entre as auxinas, a menos estável em meio de cultura,

devido à foto-oxidação e a ação da oxidação de IAA que se dá nos tecidos dos explantes (CASTRO *et al.*, 2002).

A suplementação dos meios de cultura com citocininas também tem sido considerado como favorável ou necessária para estimular brotações, e para o crescimento vegetal, (TAIZ e ZEIGER, 2006). A cinetina (KIN) tem sido usada para estimular o crescimento normal, sem brotações múltiplas, e a 6-benziladenina (6-BA ou 6-Benzilaminopurina) para induzir a formação de grande número de brotações e altas taxas de multiplicação em sistema de micropropagação (CALDAS *et al.*, 1990).

A utilização de citocininas também tem sido necessária para a quebra de dominância apical e indução de gemas axilares, onde o 6-BA tem sido eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies induzindo a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias (HASEGAWA, 1980; HU e WANG, 1983; ZAERR e MAPES, 1985).

Nayak (1997) utilizando *Acampe praemorsa* (epífita) em meio de cultura MS, obteve um alongamento nos brotos das plântulas utilizando uma combinação de auxinas e citocininas (2,0 mg/L de NAA (Ácido naftalenacético) e 0,5 mg/L de BAP (6-Benzilaminopurina). O uso de citocinina estimula uma maior produção de partes aéreas, mas o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pelo demasiado número de folhas, e vitrificação generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento (LANE, 1979; LESHEM *et al.*, 1988).

Praxedes *et al.*, (2000) relatou que utilizando as espécies *C. bicolor* e *C. walkeriana* em meio MS, verificou que em uma combinação de carvão ativo e BAP, ambas espécies obtiveram ganho de altura, devido o fato do carvão ativo absorver compostos orgânicos do meio de cultura até mesmo o regulador de crescimento BAP diminuindo assim o seu efeito de toxidez sobre a plântula.

## **2.7 Condições de manutenção do cultivo *in vitro***

De acordo com os autores Pasqual (2001) e Torres *et al.*, (2001), a luz é uma forma de radiação eletromagnética cujo crescimento e desenvolvimento das plantas são dependentes para processos como fotossíntese (conversão de energia luminosa em energia química), fotomorfogênese (desenvolvimento de

estruturas ou de formas induzidas pela luz) e fototropismo (resposta em crescimento das plantas induzidas pela luz).

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 GOR-lux. Para Pasqual (2001), as lâmpadas fluorescentes têm a vantagem de proporcionar iluminação sem gerar muito calor, e para Murashige (1977), a iluminação contínua não é recomendada (TORRES *et al.*, 2001). Pienk *et al.*, (1988) mostram em seu trabalho com *Paphiopedium ciliolare*, que sua cultura, na ausência de iluminação nas primeiras fases de seu desenvolvimento induz à organogênese de *protocormos* e aumenta o vigor de suas plântulas ao serem transferidas para a luz.

Milaneze (1997), também observou resultados similares analisando as espécies *Prescottia rodeiensis*, *Ponnera strata*, e *Bifrenária magnicalcarata*. Zeigler *et al.*, (1967), ao testar três tipos de fotoperíodos (12, 16 e 20 horas) em *Cattleya enid alba x Laelia anceps var. veitchii*, observaram um aumento no crescimento de acordo com o aumento do comprimento do fotoperíodo, isto por causa do aumento da atividade fotossintética, resultante ao longo período de iluminação.

A utilização de película de polivinilcloreto (PVC) para tampar frascos de cultura é uma prática comum em vista da facilidade de manipulação, outra vantagem da película é a maior penetração de luz em comparação com outros tipos de tampas, o influenciando na fotossíntese realizada pelos explantes (TORRES *et al.*, 1998).

O outro fator importante relacionado com as condições de manutenção de uma cultura *in vitro* é a temperatura. Vários estudos indicam que os processos morfológicos exigem flutuação diurna/noturna de temperaturas. Em geral, nas salas de crescimento são mantidas em temperatura de 25°C e 27°C. Para espécies tropicais e subtropicais, em muitos laboratórios, as plantas 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. Temperaturas acima de 30° C são consideradas como desfavoráveis porque aumentam a



evaporação de água do meio, tornando o meio mais concentrado, o que pode resultar em toxidez.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos com as plântulas das espécies *Cattleya intermedia* var. *alba* e *Cattleya bicolor*, foram realizados no Laboratório de Cultura de orquídeas do Museu Dinâmico interdisciplinar (bloco O-33) da Universidade Estadual de Maringá – PR.

O meio de cultura básico utilizado foi à formulação “C” de Knudson (KNUDSON, 1946), modificado pela adição de 6 g de agar (HIMEDIA, “Agar Agar, Type 1”). O meio KC foi suplementado com reguladores de crescimento vegetal; à fórmula original foram adicionadas combinações dialéticas de auxinas, IBA (ácido indolbutírico), e das citocininas KIN (6-furfurilaminopurina) e 6-BA (6-benziladenina) nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup>, de modo a obter 30 tratamentos para cada espécie. O pH do meio foi ajustado com KOH (1 N) ou HCl (50%) para  $5,56 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem por 20 minutos com 1 atm.

As plântulas foram inoculadas em frascos de vidro contendo o meio de cultivo nos dias 5 e 6 de dezembro de 2007, utilizando uma câmara de fluxo laminar. Em cada frasco foram inoculados 10 plântulas e 4 réplicas foram preparadas para cada combinação de auxina/citocinina testada. As plântulas foram obtidas no Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), produzidas pelo método de cultivo assimbiótico de sementes e mantidas por 6 meses e ½ MS suplementado com carvão ativo.

As mudas de *C. bicolor* (Figura 2) se apresentavam mais desenvolvidas, e a cada 5 plântulas, uma apresentava raiz e com um número médio de 2,08 folhas por plântula, e todas apresentavam protocormo. Por outro lado, as plântulas de *C.intermedia* var. *alba* (Figura 1) estavam menos desenvolvidas, todas as plântulas apresentam protocormo; em cada 10 plântulas uma apresentava raiz, e uma média de 0,35 folhas por plântula.

Após a inoculação os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura aproximada de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , e com iluminação contínua proporcionada por lâmpadas fluorescentes “luz do dia”, de 40 Watts, com intensidade luminosa de  $14,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após 3 meses as culturas foram

hidratadas com 10 mL de água destilada, permanecendo nas mesmas condições descritas acima (Figura 3, Figura 4).

Após 6 meses mantidas *in vitro*, foram analisadas quanto ao comprimento das folhas e raízes, e número de folhas e raízes formadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado nas 3 repetições, e os dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa SAS (System for Windows V8). Foi também realizado o teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

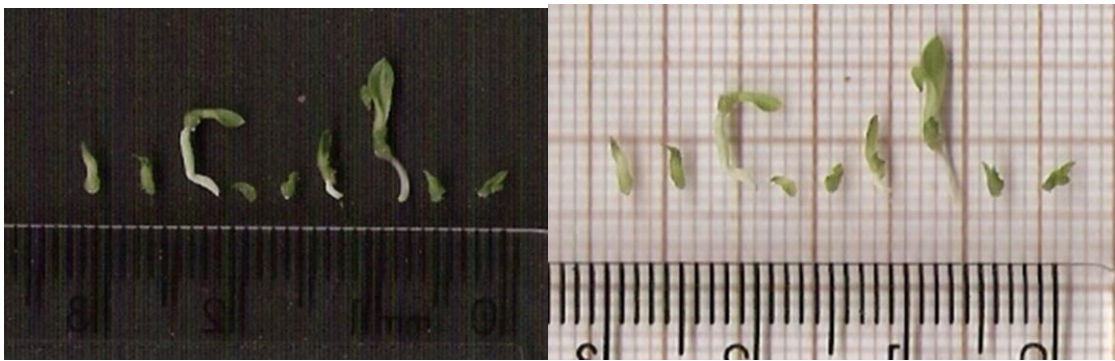


Figura 1. Plântulas de *C. intermedia* var. *alba* utilizadas como plântulas inoculadas em meio KC suplementados com combinação dialélica de auxina (IBA) e citocininas (KIN ou 6-BA).

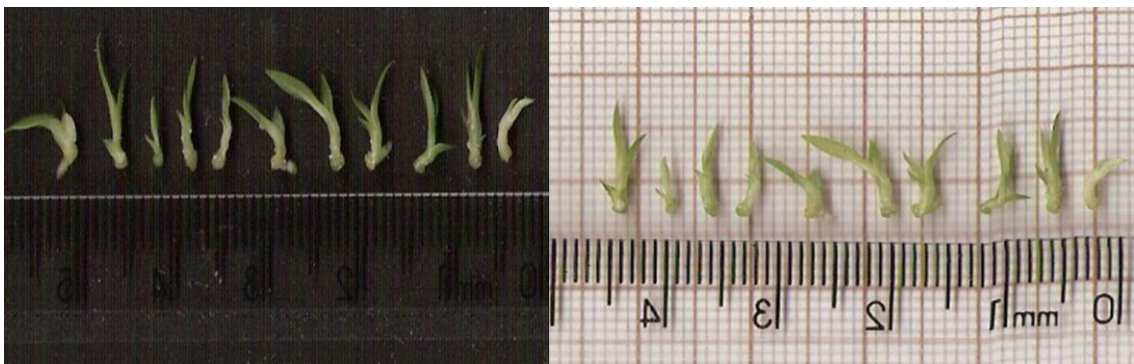


Figura 2. Plântulas de *C. bicolor* utilizadas como plântulas inoculadas em meio KC suplementados com combinação dialélica de auxina (IBA) e citocininas (KIN ou 6-BA).



Figura 3. Plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba* após 3 meses da em meio KC, na ausência e citocininas.

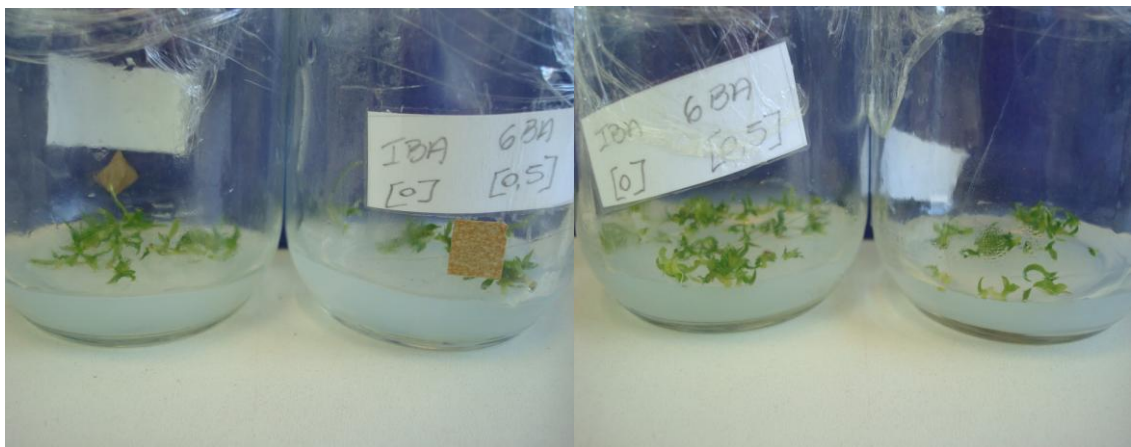


Figura 4. Plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba* após 3 meses da em meio KC suplementados com 0,0mg/L de IBA e 0,5 mg/L de 6-BA.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Efeito da adição de combinações de IBA e KIN no desenvolvimento de raízes e de partes aéreas em plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermédia var. alba*.

A adição de diferentes combinações de IBA e KIN ao meio de cultura KC estimulou a produção de raízes nas plântulas de ambas as espécies de *Cattleya* (*C. bicolor* e *C. intermedia var. alba*), mas diversas combinações destes reguladores de crescimento não foram eficientes de forma significativa para estimular a formação de partes aéreas (folhas) nas plântulas das referidas espécies (Tabelas 2 e 3).

O número de raízes nas plântulas de *C. bicolor* foi maior no meio de cultura contendo 0,5 ou 1,0 mg/L de IBA combinado com 0,5; 1,0 ou 1,5 mg/L de KIN, e nas plântulas de *C. intermedia var. alba* o número de raízes foi maior no meio suplementado com 0,5 ou 1,5 mg/L de IBA combinado com 1,0 mg/L de KIN (Tabela 3). O menor número de raízes em plantas de *C. bicolor* foi verificado na ausência dos reguladores de crescimento IBA e KIN.

Nas plântulas de *C. intermédia var. alba* o menor número de raízes não foi verificado na ausência dos reguladores de crescimento, indicando que as combinações dos respectivos reguladores estimulam de forma diferencial a formação de raízes nas duas espécies do gênero *Cattleya*. Os efeitos diferenciais significativos das diferentes combinações de IBA e KIN e a interação significativa entre as diferentes combinações para a produção de raízes nas plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia var. alba* (Tabela 2).

A comparação do número de folhas formadas nas plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia var. alba* evidência que a suplementação do meio KC com diferentes combinações de IBA e KIN é uma estratégia dispensável para estimular a produção de partes aéreas nestas plântulas (Tabela 3). Nas plântulas de *C. intermedia var. alba* por exemplo, o maior número de folhas foi observado nas plântulas cultivadas na ausência de ambos reguladores de crescimento. O efeito diferencial das combinações de IBA e KIN para as duas

espécies de *Cattleya* também foi evidente na indução de partes aéreas das plântulas (Tabela 3).

Tabela 2. Análise de variância para as características NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas) das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas (0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) de IBA e KIN, e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação

Fontes de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		NR	NF	CR	CF	pH
Combinação de IBA e KIN	15	48,31**	62,71**	1,0249**	0,5543**	4,2920**
Espécies	1	62,44**	172,38**	5,3882**	44,0673**	67,850**
IBA e KIN x Espécie	15	39,52 <sup>ns</sup>	38,26 <sup>ns</sup>	0,8127**	0,1899 <sup>ns</sup>	2,7704**
Resíduo	1245	9,93	16,97	0,1729	0,0967	0,0491
CV (%)		27,74	23,58	36,05	32,77	7,09

\*\* Significativo em nível de 1 % de probabilidade, teste F  
 NS Não significativo.

Tabela 3. Teste de média para as variáveis NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas), das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba*, cultivadas em meio KC contendo combinações dialéticas (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) de IBA e KIN

Combinações de IBA x KIN	<i>C. bicolor</i>				<i>C. intermedia alba</i>			
	NR	NF	CR	CF	NR	NF	CR	CF
<b>0,0 x 0,0</b>	3,60 <sup>c</sup>	4,25 <sup>abcd</sup>	0,95 <sup>f</sup>	1,19 <sup>abcd</sup>	3,85 <sup>ab</sup>	<b>4,20<sup>a</sup></b>	<b>1,35<sup>a</sup></b>	0,68 <sup>bc</sup>
<b>0,0 x 0,5</b>	3,98 <sup>abc</sup>	4,48 <sup>ab</sup>	<b>1,67<sup>a</sup></b>	1,08 <sup>abcd</sup>	3,83 <sup>ab</sup>	3,40 <sup>b</sup>	1,24 <sup>ab</sup>	0,84 <sup>abc</sup>
<b>0,0 x 1,0</b>	4,10 <sup>abc</sup>	3,90 <sup>bcd</sup>	1,21 <sup>bcde</sup>	1,01 <sup>bcd</sup>	3,83 <sup>ab</sup>	3,40 <sup>b</sup>	1,08 <sup>bcde</sup>	0,71 <sup>bc</sup>
<b>0,0 x 1,5</b>	4,15 <sup>abc</sup>	4,45 <sup>abc</sup>	1,29 <sup>bc</sup>	1,26 <sup>ab</sup>	3,75 <sup>abc</sup>	3,13 <sup>b</sup>	1,23 <sup>abc</sup>	0,69 <sup>bc</sup>
<b>0,5 x 0,0</b>	3,75 <sup>bc</sup>	4,20 <sup>abcd</sup>	1,10 <sup>cdef</sup>	1,28 <sup>ab</sup>	2,90 <sup>c</sup>	3,15 <sup>b</sup>	1,13 <sup>bcde</sup>	0,84 <sup>ab</sup>
<b>0,5 x 0,5</b>	4,28 <sup>abc</sup>	4,23 <sup>abcd</sup>	1,20 <sup>bcde</sup>	1,20 <sup>abcd</sup>	3,80 <sup>ab</sup>	3,50 <sup>b</sup>	1,07 <sup>bcde</sup>	0,84 <sup>ab</sup>
<b>0,5 x 1,0</b>	4,55 <sup>ab</sup>	4,05 <sup>abcd</sup>	1,20 <sup>bcde</sup>	1,22 <sup>abc</sup>	3,98 <sup>a</sup>	3,53 <sup>ab</sup>	1,10 <sup>bcde</sup>	0,79 <sup>abc</sup>
<b>0,5 x 1,5</b>	<b>4,73<sup>a</sup></b>	3,73 <sup>d</sup>	1,18 <sup>cde</sup>	1,19 <sup>abcd</sup>	3,60 <sup>abc</sup>	3,15 <sup>b</sup>	0,99 <sup>def</sup>	0,77 <sup>abc</sup>
<b>1,0 x 0,0</b>	4,20 <sup>abc</sup>	<b>4,60<sup>a</sup></b>	1,04 <sup>ef</sup>	1,14 <sup>abcd</sup>	3,45 <sup>abc</sup>	3,60 <sup>ab</sup>	1,11 <sup>bcde</sup>	<b>0,91<sup>a</sup></b>
<b>1,0 x 0,5</b>	4,40 <sup>ab</sup>	4,33 <sup>abcd</sup>	1,16 <sup>cde</sup>	1,10 <sup>abcd</sup>	3,90 <sup>ab</sup>	3,45 <sup>b</sup>	0,95 <sup>ef</sup>	0,76 <sup>abc</sup>
<b>1,0 x 1,0</b>	4,38 <sup>abc</sup>	4,28 <sup>abcd</sup>	1,24 <sup>bcd</sup>	1,10 <sup>abcd</sup>	3,55 <sup>abc</sup>	3,70 <sup>ab</sup>	0,80 <sup>f</sup>	0,70 <sup>bc</sup>
<b>1,0 x 1,5</b>	3,95 <sup>abc</sup>	3,80 <sup>bcd</sup>	1,08 <sup>def</sup>	0,96 <sup>cd</sup>	3,85 <sup>ab</sup>	3,50 <sup>b</sup>	0,90 <sup>ef</sup>	0,75 <sup>abc</sup>
<b>1,5 x 0,0</b>	4,38 <sup>abc</sup>	4,18 <sup>abcd</sup>	1,20 <sup>cde</sup>	<b>1,30<sup>a</sup></b>	3,10 <sup>bc</sup>	3,55 <sup>ab</sup>	1,21 <sup>abcd</sup>	0,85 <sup>ab</sup>
<b>1,5 x 0,5</b>	4,20 <sup>abc</sup>	4,23 <sup>abcd</sup>	1,40 <sup>b</sup>	1,20 <sup>abcd</sup>	3,88 <sup>ab</sup>	3,50 <sup>b</sup>	1,20 <sup>abcd</sup>	0,71 <sup>bc</sup>
<b>1,5 x 1,0</b>	4,25 <sup>abc</sup>	4,00 <sup>abcd</sup>	1,30 <sup>bc</sup>	1,02 <sup>bcd</sup>	<b>4,00<sup>a</sup></b>	3,15 <sup>b</sup>	1,07 <sup>bcde</sup>	0,65 <sup>c</sup>
<b>1,5 x 1,5</b>	4,10 <sup>abc</sup>	3,78 <sup>cd</sup>	1,27 <sup>bcd</sup>	0,93 <sup>d</sup>	3,68 <sup>abc</sup>	3,30 <sup>b</sup>	1,00 <sup>cdef</sup>	0,74 <sup>abc</sup>

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



As Tabelas 2 e 3 mostram os efeitos significativos e contrastantes da adição de IBA e KIN no crescimento das raízes de *C. bicolor* e de *C. intermédia* var. *alba*. Nas plântulas de *C. bicolor* a formação de raízes foi estimulada pela presença do IBA (0,5 e 1,0 mg/L) combinado com KIN (0,5; 1,0 ou 1,5 mg/L), mas o crescimento destas parece ser maior na ausência de IBA e com a menor concentração de KIN usada (0,5 mg/L). Deste modo, para promover o desenvolvimento de plântulas de *C. bicolor* em meio KC usando os reguladores de crescimento IBA e KIN, uma estratégia que pode ser recomendada, é que as plântulas sejam inoculadas inicialmente no meio suplementado com 0,5 mg/L de IBA combinado com 1,0 ou 1,5 mg/L de KIN, e após a formação de novas raízes estas plântulas sejam transferidas para meio KC contendo concentrações igual ou menor que 0,5 mg/L de KIN. A concentração de 0,5 mg/L de KIN na ausência de IBA também foi eficiente para induzir a formação e para promover o crescimento das folhas nas plântulas de *C. bicolor* (Tabelas 2 e 3).

Nas plântulas de *C. intermédia* var. *alba*, embora as combinações de IBA e KIN tenham mostrado um efeito diferencial menos pronunciado na indução de raízes (o número de raízes formadas no meio KC sem a adição dos reguladores de crescimento foi igual ou maior que o número de raízes formadas no meio suplementado com diversas combinações de IBA e KIN), o crescimento das raízes também foi maior na ausência dos reguladores de crescimento, ou no meio contendo somente KIN na concentração igual a 0,5 mg/L. Desta forma, o procedimento sugerido para o desenvolvimento de raízes (indução e crescimento) nas plântulas de *C. bicolor* também pode ser aplicado para o cultivo *in vitro* de *C. intermedia* var. *alba*.

Combinações de IBA e KIN têm sido pouco usadas para o cultivo *in vitro* de orquídeas. Ao contrário do que foi observado nas plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia* var. *alba*, na espécie *Acampe praemorsa*, KIN tem sido usado para induzir brotamento, e quando combinado com outras auxinas (NAA ou IAA) estimulam a alongação de caules e a expansão de folhas, e também de raízes (NAYAK *et al.*, 1997). Por outro lado, na espécie *Cymbidium aloifolium* e em duas espécies de *Dendrobium* (*D. aphyllum* e *D. moschatum*), IBA foi usado para promover o enraizamento de plântulas regeneradas em meio contendo diferentes combinações de NAA e 6-BA (NAYAK *et al.*, 1997).

Outra evidência do efeito diferencial de IBA dependendo da espécie de orquídea considerada foi verificado por Peres *et al.*, (1999), na espécie *Catasetum fimbriatum*, onde a adição de IBA estimulou o crescimento de raízes e retardou a formação de partes aéreas. Em outra espécie de *Dendrobium* (cv. Serdang Beauty), Khosravi *et al.*, (2008) usou 1,5 mg/L de IBA para induzir calos a partir de PLBs, e em seguida adicionou KIN ao meio de cultivo dos calos para a regeneração de plantas.

Apesar das concentrações diferentes de IBA ou de KIN, e dos diversos tipos de plântulas utilizadas nos experimentos registrados na literatura especializada, é possível verificar que a adição de IBA em meio de cultura KC estimula a formação de raízes, mas é dispensável para crescimento destas, e para o desenvolvimento (indução e crescimento) de folhas em plântulas de *C. bicolor* e *C. intermédia var. alba*, conforme foi verificado para a espécie *C. fimbriatum* (PERES *et al.*, 1999).

O efeito positivo da adição de KIN ao meio de cultivo para a regeneração de plantas de uma espécie de *Dendrobium*, registrado 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 *C. bicolor* e *C. intermédia var. alba*.

#### **4.2. Efeito da adição de combinações de IBA e 6-BA no desenvolvimento de raízes e de partes aéreas em plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia var. alba***

As diferenças significativas no número de raízes e folhas formadas nas plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia var. alba* cultivadas em meio KC suplementado com diferentes concentrações e combinações de IBA e 6-BA, e o efeito positivo da adição de 0,5; 1,0 ou 1,5 mg/L de IBA na ausência de 6-BA para a indução de raízes e folhas nas plântulas de *C. bicolor* estão indicados (Tabelas 4 e 5).

Nas plântulas de *C. intermedia var. alba*, o número maior de raízes e de folhas foi verificado na ausência destes reguladores de crescimento ou nas plântulas cultivadas em meio suplementado com 1,5 mg/L de IBA e na ausência de 6-BA. Também não há diferença significativa no número de folhas

formadas na ausência dos reguladores de crescimento e no meio contendo 1,5 mg/L de IBA e zero mg/L de 6-BA (Tabela 5).

Tabela 4. Análise de variância para as características NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas) das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermédia* var. *alba*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas (0; 0,5; 1,0;1,5 mg/L) de IBA e 6-BA, e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação

Fontes de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		NR	NF	CR	CF	pH
<b>Combinação de IBA e 6BA</b>	15	554,41**	190,18**	10,3064**	3,4851**	23,3586**
<b>Espécies</b>	1	115,17**	129,14**	1,9466**	8,8445**	72,6757**
<b>IBA e 6BA x Espécie</b>	15	119,77**	74,94**	0,7959**	0,6577**	8,3702**
<b>Resíduo</b>	1245	5,36	14,58	0,0953	0,0479	0,1070
<b>CV (%)</b>		40,88	28,36	44,91	35,09	7,97

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

Tabela 5. Teste de média para as variáveis NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas), das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermedia* var. *alba*, cultivadas em meio KC contendo combinações dialélicas (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) de IBA e 6BA

Combinações de IBA x 6BA	<i>C. bicolor</i>				<i>C. intermedia alba</i>			
	NR	NF	CR	CF	NR	NF	CR	CF
<b>0,0 x 0,0</b>	3,58 <sup>bcd</sup>	4,25 <sup>ab</sup>	0,95 <sup>c</sup>	1,19 <sup>ab</sup>	<b>3,85<sup>a</sup></b>	<b>4,20<sup>a</sup></b>	<b>1,35<sup>a</sup></b>	0,68 <sup>cd</sup>
<b>0,0 x 0,5</b>	3,08 <sup>cd</sup>	3,15 <sup>de</sup>	0,65 <sup>de</sup>	0,61 <sup>cd</sup>	2,55 <sup>bc</sup>	3,33 <sup>bc</sup>	0,65 <sup>c</sup>	0,37 <sup>e</sup>
<b>0,0 x 1,0</b>	1,70 <sup>f</sup>	3,98 <sup>abc</sup>	0,54 <sup>ef</sup>	0,54 <sup>cd</sup>	1,68 <sup>def</sup>	2,63 <sup>cde</sup>	0,43 <sup>def</sup>	0,52 <sup>de</sup>
<b>0,0 x 1,5</b>	2,05 <sup>ef</sup>	3,10 <sup>de</sup>	0,38 <sup>g</sup>	0,48 <sup>d</sup>	1,40 <sup>ef</sup>	2,60 <sup>de</sup>	0,36 <sup>ef</sup>	0,51 <sup>de</sup>
<b>0,5 x 0,0</b>	4,13 <sup>ab</sup>	4,20 <sup>ab</sup>	<b>1,56<sup>a</sup></b>	1,17 <sup>ab</sup>	<b>3,58<sup>a</sup></b>	3,08 <sup>bcde</sup>	1,17 <sup>b</sup>	0,76 <sup>ab</sup>
<b>0,5 x 0,5</b>	3,78 <sup>bc</sup>	3,53 <sup>bcde</sup>	0,73 <sup>d</sup>	0,60 <sup>cd</sup>	2,35 <sup>cd</sup>	2,78 <sup>cde</sup>	0,59 <sup>cd</sup>	0,47 <sup>de</sup>
<b>0,5 x 1,0</b>	2,78 <sup>de</sup>	3,30 <sup>cde</sup>	0,57 <sup>ef</sup>	0,55 <sup>cd</sup>	2,18 <sup>cde</sup>	2,63 <sup>cde</sup>	0,50 <sup>cde</sup>	0,51 <sup>de</sup>
<b>0,5 x 1,5</b>	2,05 <sup>ef</sup>	3,70 <sup>abcd</sup>	0,45 <sup>fg</sup>	0,50 <sup>d</sup>	1,60 <sup>def</sup>	2,78 <sup>cde</sup>	0,66 <sup>c</sup>	0,56 <sup>dc</sup>
<b>1,0 x 0,0</b>	<b>4,63<sup>a</sup></b>	<b>4,38<sup>a</sup></b>	<b>1,44<sup>a</sup></b>	<b>1,27<sup>a</sup></b>	3,20 <sup>ab</sup>	3,28 <sup>bcd</sup>	<b>1,34<sup>a</sup></b>	0,77 <sup>ab</sup>
<b>1,0 x 0,5</b>	3,53 <sup>bcd</sup>	3,93 <sup>abc</sup>	0,77 <sup>d</sup>	0,70 <sup>c</sup>	1,43 <sup>ef</sup>	2,73 <sup>cde</sup>	0,33 <sup>f</sup>	0,40 <sup>e</sup>
<b>1,0 x 1,0</b>	2,75 <sup>de</sup>	3,60 <sup>bcde</sup>	0,48 <sup>fg</sup>	0,49 <sup>d</sup>	1,25 <sup>f</sup>	2,38 <sup>e</sup>	0,33 <sup>f</sup>	0,41 <sup>e</sup>
<b>1,0 x 1,5</b>	1,58 <sup>f</sup>	2,90 <sup>e</sup>	0,35 <sup>g</sup>	0,44 <sup>d</sup>	1,45 <sup>ef</sup>	2,78 <sup>cde</sup>	0,41 <sup>ef</sup>	0,46 <sup>de</sup>
<b>1,5 x 0,0</b>	4,10 <sup>ab</sup>	4,00 <sup>abc</sup>	1,17 <sup>b</sup>	1,00 <sup>b</sup>	<b>3,93<sup>a</sup></b>	3,68 <sup>ab</sup>	1,05 <sup>b</sup>	<b>0,90<sup>a</sup></b>
<b>1,5 x 0,5</b>	3,13 <sup>cd</sup>	3,00 <sup>de</sup>	0,45 <sup>fg</sup>	0,52 <sup>cd</sup>	1,60 <sup>def</sup>	2,85 <sup>cde</sup>	0,30 <sup>f</sup>	0,43 <sup>de</sup>
<b>1,5 x 1,0</b>	3,33 <sup>bcd</sup>	3,73 <sup>abcd</sup>	0,47 <sup>fg</sup>	0,62 <sup>cd</sup>	1,83 <sup>cdef</sup>	2,98 <sup>cde</sup>	0,29 <sup>f</sup>	0,47 <sup>de</sup>
<b>1,5 x 1,5</b>	2,80 <sup>de</sup>	3,53 <sup>bcde</sup>	0,50 <sup>fg</sup>	0,60 <sup>cd</sup>	1,50 <sup>ef</sup>	2,85 <sup>cde</sup>	0,29 <sup>f</sup>	0,45 <sup>de</sup>

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

Desta forma, para efeitos práticos, as combinações de IBA e 6-BA nas concentrações testadas no presente estudo, podem ser consideradas como dispensáveis para a indução de raízes e folhas em plântulas de *C. intermédia var. alba*.

Nas plântulas de *C. intermédia var. alba*, o comprimento das raízes também foram maiores no meio KC na ausência de IBA e 6-BA (Tabela 5), mas a adição de IBA foi efetiva para promover um crescimento maior das folhas. Assim, a adição de 0,5; 1,0 ou 1,5 mg/L de IBA parece ser importante somente para promover maior crescimento das partes aéreas nas plântulas de *C. intermédia var. alba* (Tabela 5).

Desta forma, para estimular o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *C. intermedia var. alba*, estas podem ser inicialmente inoculadas em meio KC sem a adição de IBA ou 6-BA, e após um período que poderá ser determinado (tempo suficiente para a indução de raízes e folhas), as plântulas poderão ser transferidas para o meio KC contendo somente 1,0 ou 1,5 mg/L de IBA (Tabela 5).

Para as plântulas de *C. bicolor*, onde a adição de IBA parece importante para induzir raízes e partes aéreas, a adição de 0,5 ou 1,0 mg/L de IBA também foi efetiva para promover o crescimento das raízes. O crescimento das folhas nas plântulas de *C. bicolor* foi igualmente efetivo no meio contendo somente 1,0 mg/L de IBA e na ausência de IBA e 6-BA, mas uma vez que a suplementação do meio KC com 1,0 mg/L de IBA estimulou a indução e crescimento de raízes, e a indução de folhas, é possível recomendar a adição de 1,0 mg/L de IBA ao meio KC para induzir raízes e partes aéreas e para o crescimento destas no cultivo *in vitro* das plântulas de *C. bicolor*. Desta forma, a ação diferencial das combinações de IBA e 6-BA dependentes da espécie de *Cattleya* (Tabela 5) determinam um procedimento diferencial para o cultivo *in vitro* de *C. intermedia.var. alba* e *C. bicolor* em meio KC.

Em outras espécies do gênero *Cattleya*, a adição de IBA ao meio de cultura também tem sido um procedimento recomendado. Para a multiplicação *in vitro* de híbridos de *Cattleya*, o IBA foi usado para a indução de brotos (KERBAUY, 1991). Para a espécie *C. walkeriana*, a adição de 1,0 ou 1,5 mg/L de IBA sozinho ou combinado com 6-BA foi considerado como a forma mais

efetiva para induzir o brotamento e o desenvolvimento de plantas (partes aéreas e raiz) (KRAPIEC, *et al.*, 2003).

A adição de 6-BA para o cultivo *in vitro* de espécies de *Cattleya*, ou de outras espécies de orquídeas, tem sido usual, principalmente para estimular o brotamento em diferentes tipos de plântulas. Para o cultivo *in vitro* de *Acampe praemorsa* (NAYAK *et al.*, 1997), de *Dendrobium aphyllum* e *D. moschatum*, e de *Cymbidium aloifolium* (NAYAK *et al.*, 1997; 1998), e de *D. fimbriatum* (ROY e BANERIJEE, 2002), o 6-BA sozinho ou combinado com a auxina NAA foi considerado como efetivo.

O 6-BA tem sido usado também para a indução de calos e formação de PLBs em *D. chrysotoxum* (ROY *et al.*, 2007), para a formação direta de PLBs em segmentos nodais de caules de *D. densiflorum* (LUO *et al.*, 2008), ou para a indução de calos a partir de PLBs (KHOSRAVI *et al.*, 2008). Em *Coelogyne suaveolens*, combinações de 6-BA com NAA foram usadas para o desenvolvimento de partes aéreas a partir de PLBs (SUNGKUMLONG, 2008). Desta forma, as evidências registradas na literatura especializada, destacam o efeito de 6-BA na indução de brotos de diferentes espécies de orquídeas, mas não registram o efeito desta citocinina na indução e/ou crescimento de raízes e partes aéreas em plântulas de espécies de orquídeas.

#### **4.3 Alterações de pH do meio de cultura suplementado com combinações de IBA e KIN, e de IBA e 6-BA, após 6 meses de cultivo das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermédia var. alba*.**

As variações de pH no meio suplementado com as diferentes concentrações de IBA e de KIN foram maiores do que as variações registradas no meio de cultura das plântulas de *C. bicolor* cultivadas na ausência dos reguladores de crescimento ou cultivadas na presença de um ou de outro regulador de crescimento (Tabelas 2, 4, e 6). A Tabela 6 registra que a diminuição de pH após 6 meses de cultivo foi menor no meio KC sem adição de IBA ou de KIN, para as duas espécies de *Cattleya*.

A adição de IBA ou de KIN no meio de cultura foi significativamente mais marcante para alterar o pH na cultura de *C. intermédia var. alba*. Por outro lado, a variação de pH no meio sem os reguladores de crescimento foi maior

no meio contendo as plântulas de *C. bicolor*, do que no meio KC contendo as plântulas de *C. intermedia var. alba*, indicando que a variação de pH no meio



Tabela 6. Valores médios de pH registrados no meio KC suplementos com combinações dialélicas (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L) de IBA e KIN, e de IBA e 6BA, após 6 meses de cultivo das plântulas de *Cattleya bicolor* e *Cattleya intermédia var. alba*

VALORES DE pH				
Combinações	IBA x KIN		IBA x 6BA	
	<i>Cattleya bicolor</i>	<i>Cattleya intermedia alba</i>	<i>Cattleya bicolor</i>	<i>Cattleya intermedia alba</i>
<b>0,0 x 0,0</b>	<b>3,11</b> <sup>a</sup>	<b>4,63</b> <sup>a</sup>	3,11 <sup>f</sup>	4,63 <sup>bc</sup>
<b>0,0 x 0,5</b>	2,90 <sup>cde</sup>	3,29 <sup>de</sup>	4,33 <sup>bc</sup>	<b>5,10</b> <sup>a</sup>
<b>0,0 x 1,0</b>	3,00 <sup>abc</sup>	3,38 <sup>cd</sup>	3,92 <sup>de</sup>	4,60 <sup>bc</sup>
<b>0,0 x 1,5</b>	2,81 <sup>efg</sup>	3,90 <sup>b</sup>	<b>4,74</b> <sup>a</sup>	4,28 <sup>e</sup>
<b>0,5 x 0,0</b>	2,80 <sup>efg</sup>	3,15 <sup>efg</sup>	2,85 <sup>gh</sup>	3,72 <sup>g</sup>
<b>0,5 x 0,5</b>	2,75 <sup>g</sup>	3,05 <sup>g</sup>	4,43 <sup>b</sup>	3,92 <sup>fg</sup>
<b>0,5 x 1,0</b>	3,08 <sup>ab</sup>	3,05 <sup>g</sup>	<b>4,93</b> <sup>a</sup>	4,13 <sup>ef</sup>
<b>0,5 x 1,5</b>	2,88 <sup>cdefg</sup>	3,28 <sup>def</sup>	4,23 <sup>bc</sup>	4,62 <sup>bc</sup>
<b>1,0 x 0,0</b>	2,76 <sup>fg</sup>	3,08 <sup>g</sup>	2,98 <sup>fg</sup>	3,81 <sup>g</sup>
<b>1,0 x 0,5</b>	2,85 <sup>defg</sup>	3,04 <sup>g</sup>	3,05 <sup>fg</sup>	4,13 <sup>ef</sup>
<b>1,0 x 1,0</b>	2,87 <sup>cdefg</sup>	3,37 <sup>cd</sup>	3,78 <sup>e</sup>	<b>5,15</b> <sup>a</sup>
<b>1,0 x 1,5</b>	2,87 <sup>cdefg</sup>	3,09 <sup>fg</sup>	4,18 <sup>bc</sup>	4,54 <sup>cd</sup>
<b>1,5 x 0,0</b>	2,99 <sup>abc</sup>	3,22 <sup>defg</sup>	2,68 <sup>h</sup>	3,05 <sup>h</sup>
<b>1,5 x 0,5</b>	2,90 <sup>cdef</sup>	3,55 <sup>c</sup>	4,21 <sup>bc</sup>	4,82 <sup>b</sup>
<b>1,5 x 1,0</b>	2,77 <sup>efg</sup>	3,33 <sup>de</sup>	4,12 <sup>cd</sup>	4,32 <sup>de</sup>
<b>1,5 x 1,5</b>	2,97 <sup>bcd</sup>	3,28 <sup>def</sup>	4,25 <sup>bc</sup>	4,63 <sup>bc</sup>

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

KC são dependentes do genótipo das plântulas inoculadas. As plântulas de *C. intermédia var. alba* parecem provocar uma variação menor no pH do meio KC do que as plântulas de *C. bicolor*. Estas observações também têm sido observadas em outras espécies cultivadas *in vitro*. Embora a análise de variações no pH durante o cultivo *in vitro* de tecidos tenha sido um tema pouco explorado, as observações de alterações de pH no meio de cultura foram registradas desde a década de 80 (SKIRVIN *et al.*, 1986), e posteriormente foram consideradas como dependentes da espécie (LEIFERT *et al.*, 1992; MORALES *et al.*, 2006; PRIZÃO, 2006).

A interação de plântulas diferentes (de diferentes espécies) com o meio de cultivo pode determinar a liberação de substâncias diversas, que em contato com o meio determinam alterações na composição e disponibilidade dos sais minerais, e conseqüentemente, determinam alterações de pH do meio de cultura.

As variações de pH no meio de cultivo de plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia var. alba* suplementado com combinações de IBA e 6-BA indicam que a adição de ambos reguladores de crescimento ou que a adição de 6-BA (0,5 ou 1.5 mg/L) foram importantes para determinar uma menor variação no pH do meio de cultura após os 6 meses de cultivo *in vitro*. A variação no pH do meio de cultura das plântulas de *C. intermedia var. alba* contendo 1,0 mg/L de IBA e 1.0 mg/L de 6-BA foi menor que a variação de pH do meio de cultura das plântulas de *C. bicolor* contendo 0,5 mg/L de IBA e 1,0 mg/L de 6-BA, sugerindo assim, a existência de uma interação significativa para o efeito das combinações de IBA e 6-BA com os dois genótipos de *Cattleya* (Tabela 6).

Portanto, as variações de pH do meio KC são dependentes das concentrações de IBA e de 6-BA, e são diferentes dependendo da espécie de *Cattleya*.

## 5. CONCLUSÕES

O efeito de IBA na ausência de KIN ou 6-BA foi mais marcante para o desenvolvimento das plântulas de *Cattleya bicolor* do que para o desenvolvimento das plântulas de *C. intermédia var. alba*; as plântulas de *C. intermédia var. alba* apresentaram um desenvolvimento eficiente de raízes e partes aéreas no meio KC mesmo na ausência de combinações de IBA com KIN ou com 6-BA;

Embora não possam ser consideradas como mais efetivas para o desenvolvimento de plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia var. alba*, as combinações de IBA com 6-BA asseguram uma menor variação de pH do meio KC do que as combinações de IBA com KIN; a adição de 6-BA pode determinar uma maior estabilidade do pH do meio de cultura;

As combinações dialélicas das concentrações 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L de IBA e KIN são mais efetivas para o desenvolvimento das plântulas de *Cattleya bicolor*, do que as mesmas combinações de IBA e 6-BA;

Para promover o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya bicolor* e *C. intermedia var. alba* em meio KC usando os reguladores de crescimento IBA e KIN, a estratégia recomendada é que as plântulas sejam inoculadas inicialmente no meio suplementado com 0,5 mg/L de IBA combinado com 1,0 mg/L de KIN, e após a formação de novas raízes estas plântulas sejam transferidas para meio KC contendo concentrações igual ou menor que 0,5 mg/L de KIN;

Para estimular o desenvolvimento *in vitro*, de plântulas de *C. intermedia var. alba* em meio KC usando os reguladores de crescimento IBA e 6-BA, estas podem ser inicialmente inoculadas em meio KC sem a adição de IBA ou 6-BA, e após a indução de raízes e folhas, as plântulas poderão ser transferidas para o meio KC contendo somente 1,0 mg/L de IBA.

## REFERÊNCIAS

<http://wsbeorchids.org.uk/wp-content/uploads/2009/01/Cattleya%20intermedia%20alba.pdf>. Acessado no dia 10 de março de 2009 as 10:00.

<http://www.delfinadearaujo.com>. Acessado no dia 10 de março de 2009 as 10:00.

<http://www.delfinadearaujo.com/datacent/catcor44.htm>. Acessado no dia 10 de março de 2009 as 10:00.

ACKERMAN, A. N. On the evidence for a primitivity epiphytic habit in orchid. **Syst. Bot.**, v. 8, p. 474 – 477, 1983.

ARDITTI, J. *et al.* Orchid seed germination and seeding culture – manual. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspective II**. New York: Cornell University, p.390, 1982.

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

ARDITTI, J. Orchids. **Scientific American**, v. 214, n. 1, p. 70 -78, 1966.

BERG, C. Banco genético de orquídeas: Diversidade e Conservação. **Anais do 15º encontro sobre temas de genética e melhoramento**. Piracicaba, SP, v. 15, p. 27 – 38, 1998.

BICALHO, H. D.; Aspectos ornamentais e taxionômicos das orquídeas gênero *Cattleya* no continente sul-americano. In: CONGRESSO DA ESCOLA SUPERIOR AGRÔNOMICA LUIZ DE QUEIROZ, 37.;1980, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, p. 157 – 168, 1980.

BLOSSFELD, A, **Orquidologia, Orquidofilia e Orquicultura**. Jaboticabal: Funep, 1999.

BUTCHER, W. P.; INGRAM, D. S.; **Organs and ambryos**. In *Plant Tissue Culture*. (s.l.): Edwad Publishing Limited, p. 3- 15, 1976.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, Brasília, DF, v. 1, p. 37 - 70, 1990. In: CASTRO, P. R. de C.; SENA, J. O. A. de.; KLUGE, R. A. **Introdução `a fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá, p. 211 – 254, 2002.

CID, L. P. B. **Introdução aos Hormônios Vegetais**. (EMBRAPA) Brasília, DF. 2000.

CLARO, D.P.; SANTOS, A.C.; ALENCAR, E.; ANTONIALI, L.M.; LIMA, J.B. O complexo agroindustrial das flores do Brasil e suas peculiaridades. **Revista de Administração da UFLA**, v.1, n. 2. p. 17-30, 1999.

DIXON, R.A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL, p.169-191, 1985.

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

GARAY, L. A. On the original of the orchidaceae, II. J. **Arnold Arbor. Harv. Univ.** v. 53, p. 203 – 215, 1972.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. TORRES, A. C.; CALDAS, L. C. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, p. 99 – 169, 1990.

GRIESBACH, R. J. **Development of *Phalaenopsis* orchids for the massmarket**: trends in new crops and new uses. West Lafayette, 2002. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/griesbach.pdf>. Acesso em 10: maio 2004.

HANNIG, E. Zur physiologic pflanzlicher embryonen. In: Ueber die kultur von cruciferen embryonen aussehaib des embryosacks. *Botanische Zeitung*, v. 62, p. 45 – 80, 1904. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasilia, DF, v. 1, p. 11 – 16, 1998.

HASEGAWA, P. M. Factors affecting shoot and root initiation from culture rose shoot tips. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 105, p. 216 – 220, 1980. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasilia, DF, v. 1, p. 183 – 260, 1998.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y.; ed. *Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding*. New York: Macmillan, 1983. p. 117 – 227. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasilia, DF, v. 1, p. 183 – 260, 1998.

KERBAUY, G. B. In vitro conversion of *Cattleya* root-tip cells into protocorm-like bodies. **Journal of Plant physiology**, v. 138, n. 2, p. 248 – 251, 1991.

KHOSRAVI A. R., et al. Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium* cv. Serdang Beauty. **African journal of Biotechnology** v. 7 p. 4093 – 4099, 2008.

KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, v. 73, p. 1 – 25, 1922. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura**

**de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, DF, v. 1, p. 11 – 16, 1998.

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

KRAPIEC, P. V., et al, Effects of combinations of growth regulators for bud induction from seeding of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá v. 25 n. 1 p. 179 – 182, 2003.

LANE, W. D. regeneration of pear from shoot meristem-tips. *Plant Science Letters*, v. 16, p. 337 – 342, 1979. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, DF, v. 1, p. 183 – 260, 1998.

LEIFERT, C., et al. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro. **Plant Cell. Tiss and Organ Culture** 30 : 171 – 179, 1992.

LESHEN, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v. 62, p. 271 – 276, 1988.

LUO, J. P., et al Micropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. Ex Wall. Through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 93: 33 – 340, 2008.

MARTINI, P. C.; WELLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. S. Propagation of orchid *Gongora quinquenervis* in vitro germination. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1319 – 1324, 2001.

MILANEZE, M. A. **Estudos em orquídeas nativas do Brasil**: morfologia de sementes e cultivo assimbiótico. 1997. 241f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

MILLER, D.; WARREN, R. *Orquídeas do alto da serra*. Rio de Janeiro: Salamandra, v. 1 , 1996.

MURASHIGE, T. manipulation of organ initiation in plant tissue culture. *Botanical Bulletin academy Sinica*, v.8, p. 1-24, 1977. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, DF, v. 1, p. 183 – 260, 1998.

NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; e PATNAIK, S. In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium Aphyllum* (Roxb.) Fisch. And *Dendrobium moschatum* (Buch – Ham) Sw. through thidiazuron – induced high frequency shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, v.71, p. 243 – 250, 1997.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasiliensis**. Hildesheim: Bruck – Verlag, v. 1, p. 408, 1975.

PASQUAL, M. **Introdução**: fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 97, 2001.

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

PAULA, C. C. de.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 2. Ed. Viçosa: UFV, p. 63, 2002.

PERES, L. E. P., *et al*. Effects of Auxin, Cytokinin and Ethylene Treatments on the Endogenous Ethylene and Auxin-to-cytokinins Ratio Related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into Buds. **J. Plant Phsiol**. Vol 155 p. 551 – 555, 1999.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de lãs plantas superiores**. 3.ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, p. 326, 1990.

PRAXEDES, S. C.; FIGUEREDO, M. de L.; CÂMARA, F. A. A.; OLIVEIRA, A. K. D.; de. Efeitos do BAP e do carvão ativado no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídeas. **Expressão**, v. 31, n. 1, p. 75 – 80, jan – jun, 2000.

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

RAPOSO, J. G. M. F. **A etimologia a serviço dos orquidófilos**. São Paulo: Ave Maria LTDA, 1993.

REGO, I. V.; FARIA, R. T. Interação genótipo x meio nutritivo na propagação in vitro de orquídeas nativas do Brasil, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, v. 1., 2001, Goiânia. **Resumos....** Goiânia: SBMP, p. 1- 3, 2002.

ROY, J. et al. Direct and callus- mediated protocorm-like body induction from shoot- tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 90:31 – 39, 2007

SANTANA, E. Nem tudo são rosa. **Revista Tecnologista**. São Paulo, v. 22, n. 251. p. 18- 24, out. 1997.

SILVA, W. *Cultivo de orquídeas no Brasil*. São Paulo: Nobel, 1986.

SINGH, F. **Storage of orchid seeds en organic solvents**. *Garstenbauwissenschaft*. V. 53, p. 122 – 400, 1988.

SINGH, F. Micropropagation of orchids *Spaihogloottis plicata* and *Epidendrum radicans*, In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and floresty**: London, Springer – Verlag, v. 20, p. 223 – 450, 1992.

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 Rep.**, v. 5, n. 4 p. 292-294, 1986.

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

STOUTAMIRE, W. P. Seeds and seeding of native orchids. **Mich. Bot.**, v.3, n.4, p. 104 -190, 1964.

SUNGKUMLONG. Effects of different factors on immature embryo culture, PLBs differentiation and rapid mass multiplication of *Coelogyne suaveolens* (Lindl). Hook. **Indian J Exp Biol.** Apr , 46 (4): 248 – 8, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Ed. Artmed, Ed. 3, São Paulo, p. 449 – 538, 2006.

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

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, DF, v. 1, p. 161 – 260, 1998.

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

WITHNER, C. L. Orchid Physiology. In: WITHNER, C. L. (ed.). **The orchids: a scientific**. New York: Ronald Press, p. 155 – 188, 1959.

ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. action of growth regulators. In BONGA, J. M.; DURZAN, D. J.; ed. Tissue Culture in forestry. 2 ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p. 231 – 255, 1985. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, DF, v. 1, p. 183 – 260, 1998.

ZEIGLER, A. T.. **Influence of various media and photoperiods on growth and amino acid content of orchid seedings**. Amer. Orchid Soc. Bull. 36:185 – 202. Sheehan, and R. Pesle. 1967