



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PESQUISA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

GILZENI VELOSO

CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya violacea* ROLFE 1889 (ORCHIDACEAE)
UTILIZANDO MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS

Boa Vista, RR

2012

GILZENI VELOSO

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya violacea* ROLFE 1889 (ORCHIDACEAE)
UTILIZANDO MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais - PRONAT da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Manejo e conservação de bacias hidrográficas.

Orientadora: Profa. Dra. Gardênia Holanda Cabral

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital

Boa Vista, RR

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

V443c Veloso, Gilzeni.
Cultivo *in vitro* *cattleya violacea* rolfe 1889 (orchidaceae) utilizando
meios de cultura alternativos / Gilzeni Veloso. – Boa Vista, 2012.
46p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Gardênia Holanda Cabral.
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

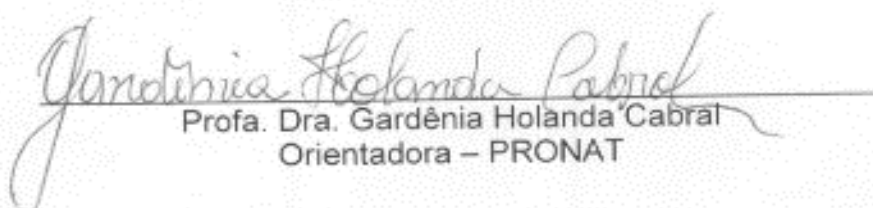
1 – Floricultura. 2 – Orquídeas. 3 – Plantas ornamentais. 4 – Frutas
amazônicas. 5 – Solidificante. I – Título. II – Cabral, Gardênia Holanda
(orientador). III – Vital, Marcos José Salgado (orientador).


CDU – 582.594.2

GILZENIR VELOSO

Cultivo *in vitro* de *Cattleya violácea* Rolfe (Orchidaceae) utilizando meios de cultura alternativos

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 27 de agosto de 2012 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:


Prof. Dra. Gardênia Holanda Cabral
Orientadora – PRONAT


Prof. Dra. Simone da Silva
Membro – Centro de Biotecnologia da Amazônia


Prof. Dra. Aline das Graças Souza
Membro – Embrapa Roraima


Prof. Dra. Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes
Membro – Universidade Federal de Roraima

À Minha amada família.

Aos meus queridos mestres.

Pelos momentos de descontração e compreensão
que todos me proporcionaram, no intuito de compensar
os momentos de dedicação a este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela graça da vida a mim concedida, e me abençoado com mais essa vitória.

Aos meus pais José Carlos e Maria Ivonilde, as minhas irmãs e irmãos, aos cunhados e cunhadas. Em especial ao meu cunhado Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa, pelas palavras de incentivo e coragem para continuar a jornada.

À Universidade Federal de Roraima, onde tive a oportunidade de me graduar Engenheira Agrônoma e ao privilégio da realização do curso de Pós-graduação mestrado em Recursos Naturais.

À Coordenação do PRONAT, na pessoa do Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital, professores e funcionários, sem a ajuda dessa equipe nada poderia ser feito.

À minha querida orientadora e Professora Dra. Gardênia Holanda Cabral pela dedicação, profissionalismo, compreensão e demonstração de amizade no decorrer de toda a minha vida acadêmica e neste trabalho.

Ao Professor Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva pela parceria e colaboração nos cálculos de estatística, tornando-se essencial para a conclusão desta pesquisa.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, agradeço pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudo por seis meses, período delicado e especial da minha vida.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA por ter me recebido com tanto carinho e respeito, e por contribuir com a minha qualificação.

À colega Eng.^a Agrônoma Antônia Florismar S. Matos pela parceria nos trabalhos de laboratório e campo.

Às amigas Hosana Carolina Carvalho dos Santos e Iolete do Nascimento Araújo Maciel, pela colaboração no início da pesquisa, e disponibilidade nos momentos que precisei da contribuição de ambas.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

O Senhor é a fortaleza da minha vida; a
quem temerei?
Ainda que um exército se acampe contra
mim, não se atemorizará o meu coração;
e, se estourar contra mim a guerra, ainda
assim terei confiança.

Bíblia Sagrada

RESUMO

A *Cattleya violacea* Rolfe (1889) é considerada a orquídea símbolo de Roraima, sendo muito apreciada por colecionadores, orquidófilos e produtores, que almejam cultivar essa espécie em suas coleções. Objetivou-se com este trabalho desenvolver um protocolo de cultivo *in vitro* para a *C. violacea* utilizando meios de cultura alternativos ao ágar e aos sais e vitaminas que compõem o meio tradicional Knudson C, no intuito de reduzir os custos dessa forma de reprodução de orquídeas. As plântulas utilizadas nesta pesquisa foram oriundas da germinação *in vitro* de *C. violacea* estriata com 1,0 cm de altura e com 02 folhas. Os meios de cultura testados foram compostos por ágar, vermiculita e carvão vegetal adicionados de 60,00 g L⁻¹ de polpa das frutas regionais cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum [Willd. Ex. Spreng]), buriti (*Mauritia flexuosa* L.), cajá (*Spondiaslutea* L.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.), graviola (*Anona muricata* L.) e murici (*Birsonima crassifolia* L.) acrescidos de 40,0 ml L⁻¹ de água de coco, de 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado e 20,0 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 18 tratamentos e 05 repetições contendo 05 plântulas por frasco. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância multivariada (AMOVA) e utilizou-se o teste de Tukey a 5% de significância. Os parâmetros biométricos avaliados nas plântulas após seis meses de subcultivo nos meios testados foram, altura da parte aérea, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz e número de brotos. Observou-se que os meios compostos por ágar e frutas proporcionaram os maiores crescimentos das plântulas de *C. violacea* quanto à altura da parte aérea, número de folhas e número de raízes, do que o meio tradicional Knudson C. Sendo que o meio composto por ágar e buriti promoveu o maior desenvolvimento das plântulas e o meio formado por buriti e vermiculita (BU2), em relação à variável número de brotos, influenciou positivamente na escolha do melhor meio de cultura estudado para o subcultivo de *C. violacea*.

Palavras-chave: Orquídeas. Solidificante. Frutas amazônicas.

ABSTRACT

Cattleya violacea Rolfe (1889) is considered the orchid symbol of Roraima, very appreciated by collectors, orchid growers and producers, that aims to cultivate this species in their collections. The objective of this work is to develop an in vitro cultivation protocol for *C. violacea* using alternative culture media to the agar and salts and vitamins that make up the traditional medium Knudson C in order to reduce costs for this form of reproduction of orchids. Seedlings used in this study were from in vitro germination of *C. violacea* *estriata* with 1.0 cm and 02 leaves. The tested media were composed of agar, vermiculite and charcoal added 60.00 g L⁻¹ pulp regional fruit cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum [Willd. Ex. Spreng]), Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) caja (*Spondias lutea* L.), açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), soursop (*Annona muricata* L.) and murici (*Birsonima crassifolia* L.) plus 40.0 L⁻¹ ml of coconut water, 2.0 g L⁻¹ activated and 20.0 g L⁻¹ sucrose coal. The pH was adjusted to 5.7 ± 0.1. The experimental design was completely randomized, with 18 treatments and 05 repetitions containing 05 seedlings per bottle. The data were subjected to multivariate analysis of variance (AMOVA) and used the Tukey test at 5% significance level. The biometric parameters evaluated in seedlings after six months of subculture media tested were, shoot height, number of leaves, number of roots, the greater root length and number of shoots. It was observed that the means consisting of agar, and fruit resulted in the highest growth of *C. violacea* as the seedling shoot height, number of leaves, number of roots, than the traditional means Knudson C. Since the medium composed of agar and Buriti promoted the further development of seedlings and the medium formed by Buriti and vermiculite (BU2), in relation to the shoot number, positively influenced the choice of the best culture medium studied for the subculture of *C. violacea*.

Keywords: Orchids. Solidificante. Amazonian fruit.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Cattleya violacea</i> Rolfe (1889).....	18
Figura 2 -	Meios de cultura alternativos compostos por Knudson C (testemunha) e polpas das frutas cupuaçu, buriti, cajá, açaí, graviola e murici, solidificados com ágar, vermiculita e carvão vegetal.....	29
Figura 3 -	Fluxograma dos procedimentos.....	30
Figura 4 -	Médias das variáveis avaliadas em plântulas de <i>C. violacea</i> estriata subcultivadas em meios de cultura Knudson e com frutas, na presença dos solidificantes ágar, vermiculita e carvão vegetal.....	32
Figura 5 -	Estatística descritiva geral em relação aos tratamentos e as variáveis biométricas altura aérea, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz e número de brotos.....	33
Figura 6 -	Resumo com os resultados da matriz de correlação de Pearson.....	34
Figura 7 -	Análise de Componentes Principais (PCA), onde é capturada a maior variabilidade das variáveis.....	33
Figura 8 -	Valores dos auto vetores que geraram as componentes principais.....	35
Figura 9 -	Resumo das análises de variâncias realizadas.....	35
Figura 10 -	Análise das variáveis biométricas em relação aos meios de cultura estudados.....	36
Figura 11 -	Gráfico dos autovalores mostrando a porcentagem de variabilidade explicada pelas componentes principais.....	36

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Composição básica dos meios de cultura convencionais mais utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas..... 21
- Quadro 2 - Composição das polpas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum [Willd. Ex. Spreng]), buriti (*Mauritia flexuosa* L.), cajá (*Spondias lutea* L.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.), graviola (*Anona muricata* L.) e murici (*Birsonima crassifolia* L.)..... 23

LISTA DE SIGLAS

AMOVA	Análise de variância multivariada
APA	Altura da parte aérea
Bo	Boro
°C	Grau centígrado
Ca	Cálcio
Co	Cobre
Cl	Cloro
CMR	Comprimento da maior raiz
Cm	Centímetro
Cu	Cobre
F	Valor do teste de Fisher
F1; F2; F3; F4; F5	Coordenadas dos eixos cartesianos
Fe	Ferro
g	Grama
gL ⁻¹	Grama por litro
I	Iodo
K	Potássio
mg	Miligrama
Mg	Magnésio
ml	Mililitro
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
N	Nitrogenio
NB	Número de brotos
NF	Número de folhas
NR	Número de raízes
P	Fósforo
PCA	Análise de componentes principais
pH	Potencial hidrogeniônico
Pr	Probabilidade
PRONAT	Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais
R ²	Coefficiente de correlação
UFRR	Universidade Federal de Roraima
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 ORQUÍDEAS.....	14
2.2 HISTÓRICO DAS ORQUÍDEAS	16
2.3 O GÊNERO <i>Cattleya</i>	17
2.3.1 Reprodução de Orquidáceas	18
2.3.2 Técnicas de Propagação <i>in vitro</i>	19
2.3.2.1 Cultura assimiótica ou semeadura <i>in vitro</i>	20
2.3.3 Meios de Cultura Utilizados no Cultivo de Orquídeas	20
2.3.3.1 Agentes gelificantes e substâncias substitutas ao ágar no meio de cultura ...	24
2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
APENDICE	48

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas fazem parte de uma grande família de plantas ornamentais, que se caracterizam principalmente pela beleza e forma de suas flores. Existindo diversos gêneros e milhares de espécies em quase todas as regiões da terra, especialmente nas regiões tropicais. São plantas que se diferenciam quanto à dificuldade de cultivo, e cada vez mais se encontra adeptos a essa prática denominada de orquidofilia, existindo várias associações que promovem constantes eventos e estudos sobre as orquidáceas.

O gênero *Cattleya*, de ocorrência natural no Brasil é bastante conhecido e apreciado por orquidófilos e produtores, devido à beleza e exuberância de suas flores. Como as *Cattleyas* atraem muitos admiradores, sua coleta predatória na natureza tem levado algumas espécies à iminência da extinção, o que vem impulsionando pesquisas relacionadas à produção *in vitro* de orquidáceas, no intuito de evitar a perda desse patrimônio genético e ofertá-las em grande quantidade, de modo a suprir o mercado orquidófilo, contribuindo para reduzir sua retirada da natureza.

Os meios de cultura utilizados para a germinação e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídeas foram estabelecidos a partir das exigências nutricionais de cada espécie, com modificações para atender as necessidades específicas em um ambiente estéril. Vários trabalhos vêm sendo realizados na tentativa de produzir combinações de substâncias, que têm sido acrescentadas aos meios nutritivos, como polpas de frutas e água de coco, com a finalidade de obter um protocolo simplificado. Dentre os diversos meios de cultura empregados na produção de orquídeas, os mais conhecidos são os compostos por macronutrientes e micronutrientes minerais, vitaminas, açúcares, reguladores vegetais e suplementos orgânicos (KNUDSON, 1946; MURASHIGE; SKOOK, 1962; VACIN; WENT, 1949), substâncias que oneram a produção *in vitro* dessas plantas e que são de difícil acesso a colecionadores e a pequenos produtores.

O cultivo comercial de plantas ornamentais, entre elas as orquídeas, tem crescido nos últimos anos e exigido maior conhecimento técnico para a produção. E como as orquidáceas são de difícil propagação, além de possuírem crescimento vegetativo lento, tornou-se necessário desenvolver protocolos para a propagação dessas plantas, de modo a viabilizar sua produção em larga escala. A técnica de

propagação de plantas em ambiente controlado e livre de contaminações, ou seja, cultivo *in vitro* é utilizada na semeadura e desenvolvimento de plântulas de orquídeas, por aumentar o índice de germinação em cerca de 100%, além de produzir plantas mais vigorosas e adaptáveis ao cultivo em ambiente *ex vitro*, tornando o processo de multiplicação de orquídeas comercialmente viável (SILVA, 2003).

Tendo em vista a necessidade de se preservar a *C. violacea* é importante se desenvolver um protocolo de propagação da espécie, que permita acelerar seu desenvolvimento, diminuir a percentagem de perda de plântulas e minimizar os custos da propagação *in vitro*, tornando-se possível desenvolver economicamente essa forma de multiplicação. E como a utilização de meios de cultura alternativos tem como principal finalidade diminuir os custos da produção *in vitro*, e devido às diferentes necessidades nutricionais das orquidáceas, faz-se necessário a busca por protocolos específicos. Desse modo, com o propósito de desenvolver um meio de cultura alternativo no cultivo *in vitro* da *C. violacea* estudou-se a utilização das frutas da região amazônica cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum [Willd. Ex. Spreng]), buriti (*Mauritia flexuosa* L.), cajá (*Spondiaslutea* L.), açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), graviola (*Anona muricata* L.) e murici (*Birsonima crassifolia* L.) solidificados com ágar, vermiculita e carvão vegetal, na produção de meios de cultura adequados ao desenvolvimento dessa espécie de orquídea.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Tendo em vista o melhor entendimento sobre as orquídeas e os meios de cultura alternativos utilizados em seu cultivo *in vitro*, detalharemos a seguir as informações sobre os mesmos.

2.1 ORQUÍDEAS

As orquídeas são pertencentes à família *orchidaceae*, considerada a maior família fanerógama e taxonomicamente a mais evoluída das monocotiledôneas. Estima-se que existam 1.800 gêneros, cerca de 35.000 espécies e mais de 100.000 híbridos naturais, sendo as espécies extremamente diversificadas, representando aproximadamente 7% do total das espécies vegetais do mundo, ocorrendo principalmente em áreas tropicais (SILVA, 2003).

A família orquidácea é composta por plantas herbáceas perenes que vegetam em diversos ecossistemas, sendo encontradas em florestas, campos, cerrados, dunas, restingas e tundras. Podem ser terrestres, encontradas nos solos das matas, campos e até mesmo na areia de dunas e restingas; rupícolas, ocorrendo sobre ou entre as rochas; epífitas, quando vivem sobre outras plantas, utilizando-as como suporte e algumas são consideradas saprófitas, por se desenvolvem sobre matéria orgânica em decomposição, embora esse termo seja controverso entre os pesquisadores, preferindo alguns as denominarem como humidícolas (BRUSTULIN; SCHMITT, 2008).

Geralmente as orquídeas não suportam ambientes encharcados e/ou com muita umidade. Em ambientes naturais a umidade que necessitam vem das precipitações pluviométricas, do orvalho noturno e da umidade relativa do ar. Quando o substrato se encontra em condições ideais de textura e drenagem, a água é absorvida pelas raízes através de uma estrutura denominada velame, tecido que cobre as raízes aéreas das orquídeas epífitas, capaz de absorver água e de evitar a evaporação excessiva pela raiz (RODRIGUES, 2005).

As orquídeas apresentam flores com modificações extremamente variadas em tamanho, forma, cor e fragrâncias. Algumas são tão pequenas que são conhecidas

por microorquídeas, enquanto outras como a trepadeira baunilha (*Vanilla* sp.) pode atingir vários metros de comprimento (MORAIS et al., 2009).

Ocorrem dois tipos de crescimento nas orquídeas: simpodial e monopodial. As orquídeas simpodiais têm crescimento horizontal, o caule é formado pelo rizoma que fica paralelo ao substrato e pelo pseudobulbo que se desenvolve perpendicularmente ao substrato. E as orquídeas monopodiais têm crescimento vertical e não possuem pseudobulbos (FERREIRA, 2009).

A flor, principal característica taxonômica das orquídeas é composta por três sépalas, que tem a função de proteger a flor no botão e três pétalas, sendo duas idênticas e uma diferenciada, denominada labelo, quase sempre maior que as duas primeiras e mais vistosa, com a função de atrair os agentes polinizadores, que podem ser insetos ou pássaros (SORACE, 2008). As flores de *Cattleya* spp. são geralmente grandes, com as sépalas e pétalas apresentando-se da mesma cor e o labelo como a parte mais colorida da flor, sendo que a parte basal ligada ao resto da flor normalmente é tubular, envolvendo a coluna (VENTURA, 2007).

O órgão reprodutor das orquídeas é constituído por quatro partes: coluna, que é um órgão carnudo e claviforme originado do centro da flor; antera, que contém os grãos de pólen agrupados em duas a oito massas denominadas de políneas, localizadas no extremo da coluna; estigma, órgão receptivo feminino e ovário, que após a fecundação se desenvolve e forma uma cápsula ou fruto da orquídea, onde se encontram as sementes (NASCIMENTO, 2007). As sementes das orquídeas são geralmente muito pequenas e caracterizam-se pela ausência de endosperma e cotilédone; os embriões das sementes são formados por poucas células, que acumulam reservas predominantemente lipídicas. Como não possuem reserva que forneça energia para mobilização dos lipídeos, a semente das orquídeas não germina sem que haja uma fonte externa de açúcares. E o fornecimento contínuo de açúcares, vitaminas e outros fatores necessários ao crescimento de suas plântulas são supridos através da associação com fungos micorrízicos simbiotes, que viabilizam a germinação da semente e o estabelecimento da planta (LINHARES, 2006).

2.2 HISTÓRICO DAS ORQUÍDEAS

Um relato antigo da China datando de 551- 479 a.C informa que os chineses decoravam suas casas com orquídeas, o que simbolizava pureza, perfume e graça. Entretanto, não se sabe quando o homem passou a cultivar as orquídeas e qual a finalidade dessa cultura (SILVA, 2003). Gregos e romanos utilizavam as orquídeas para fins terapêuticos e acreditavam que o consumo das flores estimulava a fertilidade e virilidade (PAULA; SILVA, 2001).

Em 1818 William Cattley, orquidófilo inglês, adquiriu uma orquídea de rara beleza proveniente do Brasil que o fascinou, esta espécie desconhecida até aquele momento deu origem ao gênero *Cattleya* em sua homenagem (ENGLERT, 2000). E Carolus Linnaeus, botânico sueco, em 1735 estabeleceu a primeira classificação das orquidáceas, usando um nome genérico seguido de um específico, e empregando a palavra *Orchis* para designar um gênero de orquídea em seu trabalho *Species Plantarum*; mais tarde ele usou o nome *Orchidaceae* para toda a família. As primeiras orquídeas registradas como provenientes da América Central foram a *Bletia verecunda* Lindl. (1732) e o *Epidendrum fragrans* Sw (1788), ambas foram levadas para a Europa, aonde chegaram a florir. E como a maioria dos coletores que viajavam o mundo em busca de espécies raras de orquídeas, não eram os mesmos que faziam a classificação botânica das espécies, ocorreram muitos erros de nomenclatura, o que até hoje acarreta modificações na denominação das mesmas (CIRCULO, 1941).

No Brasil existem várias espécies de orquídeas em risco de extinção. Estima-se que muitas variedades estão desaparecendo da natureza e/ou existem poucos exemplares, como exemplo a *C. granulosa* Lindl. (1842), espécie endêmica do município de Natal, Rio Grande do Norte, muito visada por ser rara e com alto valor de mercado (RAMALHO; PIMENTA, 2010).

Na Amazônia encontram-se catalogadas 709 espécies em 131 gêneros de orquídeas, sendo a maioria plantas epífitas encontradas vegetando nos galhos das copas das grandes árvores em alturas de até 20 metros. Acredita-se que esse número é bem maior, pois por não serem interessantes ao extrativismo da madeira, as orquídeas passavam despercebidas nos inventários florestais (STORTI, 2007). A *C. eldorado* Liden conhecida como “o ouro da Amazônia” é uma espécie nativa da região amazônica, vegetando em áreas restritas próximas a cidade de Manaus, sendo endêmica do estado do Amazonas, até alguns anos atrás facilmente visualizada as

margens do Rio Negro, atualmente é também um exemplo das orquídeas epífitas brasileiras ameaçadas de extinção devido à destruição de seu habitat e intensa coleta ilegal (BLIND; BLIND, 2009).

2.3 O GÊNERO *Cattleya*

As orquídeas mais conhecidas são as dos gêneros *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium*, *Mitonia*, *Dendrobium*, *Vanda*, *Phalaenopsis* e *Paphiopedilum*. O gênero *Cattleya* possui cerca de 50 espécies epífitas e são plantas especializadas do ponto de vista ecológico, devido as suas adaptações morfológicas e funcionais, que permitem a absorção de nutrientes, água e fixação de suas raízes (GODOY; COSTA, 2003).

As *Cattleyas* são encontradas desde o hemisfério norte (México), passando pela América Central até a América do Sul, onde ocorre em maior número de espécies. No Brasil tem ocorrência em todos os estados, desde o extremo norte, nas serras de Pacaraima e Parima, em Roraima; na divisa do Brasil com a Venezuela e a Guiana, até o Rio Grande do Sul. Das aproximadamente 50 espécies conhecidas, 32 ocorrem no Brasil, sem contar o grande número de híbridos naturais entre suas próprias espécies e outros gêneros (COLOMBO et al., 2005).

Na Amazônia são encontradas seis espécies de *Cattleya* onde cinco são monofoliadas, ou seja, possuem apenas uma única folha: *C. araguaiensis* Pabst (1967), *C. eldorado* Linden (1869), *C. jenmanii* Rolfe (1906), *C. lawrenceana* Rchb (1885), *C. luteola* Lindl (1853) e, apenas a *C. violaceae* Rolfe (1889) é bifoliada, com 2 a 3 folhas. Geralmente as espécies monofoliadas carregam menos flores do que as bifoliadas, que possuem uma distribuição geográfica desde o Planalto Central até a Amazônia (ZANENGA-GOGY; COSTA, 2003). Em Roraima na fronteira com a Venezuela, mais precisamente na serra de Pacaraima, ocorrem as *C. jenmaniie* e *C. lawrenceana*, consideradas espécies endêmicas da Amazônia, de grande valor ornamental e comercial, que estão sob forte risco de extinção na natureza (RIGHETO et al., 2012).

A *C. violacea* (figura 1) vegeta em matas ensolaradas em altitudes variando de 800 a 1200 metros, ocorrendo nos estados do Amazonas, Mato Grosso e Roraima. E assim como as diversas espécies de *Cattleyas* encontradas no Brasil, apresentam grande potencial para o agronegócio brasileiro (VENTURA, 2007).

Figura 1 - Orquídea *Cattleya violacea* estriata Rolfe (1889) cujo fruto forneceu as sementes cultivadas *in vitro* e que produziram as plântulas utilizadas em nossa pesquisa.



Foto: Gardênia Cabral

2.3.1 Reprodução de Orquídeas

Existem vários sistemas de propagação de orquídeas. Os mais simples são variações da reprodução assexuada, podendo ser por divisão de touceiras; divisão de pseudobulbos; divisão de bulbos velhos e, indução de brotamento a partir de hastes florais. Entretanto, embora estes métodos sejam simples e com resultados seguros, apresentam capacidade reprodutiva limitada, pois dependem de um indivíduo adulto para formar uma nova planta, no período de 2 até 8 anos. Para a maioria das espécies de *Cattleya* é necessário um ano para a formação de um broto constituído de um pseudobulbo, sendo recomendado, manter no mínimo três pseudobulbos por muda (BACH; CASTRO, 2004).

A reprodução sexuada das orquídeas consiste na fecundação da flor, quando ocorre o intumescimento do ovário após ser fecundado, formando o fruto ou cápsula que conterà milhões de sementes. A cápsula leva em média um ano para se desenvolver e amadurecer; quando madura a cápsula se abre e as sementes são espalhadas pelo vento. A reprodução sexuada causa a variabilidade das espécies, onde cada semente é um indivíduo diferente, produzindo plantas únicas (KLEIN, 2008).

A propagação das orquídeas por sementes podem ser feita por dois métodos: simbiótico e assimbiótico (FERREIRA, 2009). O método simbiótico ocorre quando da reprodução das orquídeas na natureza com dependência de fungos micorrizicos, já que as sementes não possuem reservas nutritivas, além de condições especiais de temperatura e umidade. Os fungos entram nas células contidas no embrião das sementes e colonizam-nas. A membrana plasmática das células embrionárias invagina-se, ou seja, vira as bordas para dentro, mantendo os fungos cercados por uma fina camada de citoplasma, onde posteriormente formam-se os *peletons*, que ao se degenerar intracelularmente são digeridos pela orquídea, fornecendo nutrientes para o embrião e dando origem aos protocórmios (PEREIRA et al., 2005).

A multiplicação de orquídeas por sementes na natureza é um processo demorado, mas pelo método assimbiótico ou cultivo *in vitro* de suas sementes, aumenta consideravelmente o índice de germinação, pois das aproximadamente 2,5 milhões de sementes produzidas em uma cápsula, em meio natural apenas cerca de 5% consegue germinar (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001). Este método acelera o processo de crescimento e desenvolvimento das orquídeas, formando plantas mais vigorosas e adaptáveis ao cultivo em ambiente natural, utilizando pequeno espaço físico e em curto tempo, independente de fatores climáticos limitantes (VENTURA, 2007).

2.3.2 Técnicas de Propagação *in vitro*

As técnicas de propagação *in vitro* são utilizadas para multiplicar plantas livres de doenças e pragas sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais, como luz e temperatura, além de proporcionar o crescimento uniforme de grande quantidade de plantas e acelerar a germinação de sementes de difícil propagação (SILVA; VILLA; PASQUAL, 2009). Na multiplicação de orquídeas *in vitro* atualmente se utiliza uma das três técnicas disponíveis: cultura assimbiótica ou semeadura *in vitro*; cultura de tecido vegetal ou meristemática e cultura de embriões imaturos (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

Segundo demonstrado por Bosa et al. (2003) estas técnicas vêm sendo utilizadas com amplo sucesso para a produção de mudas em escala comercial, associada à utilização de meios de cultura alternativos, o que permite a redução dos

custos de produção. Outro fator relevante do cultivo *in vitro* é a compatibilização de demandas específicas dos mercados interno e externo no que se refere à floração, coloração, tamanho e formas das flores, além da garantia da qualidade do produto (COLOMBO et al., 2010).

2.3.2.1 Cultura assimbiótica ou sementeira *in vitro*

A cultura assimbiótica ou sementeira *in vitro* é realizada em laboratório sob condições assépticas para a germinação de sementes de orquídeas, na ausência de fungos micorrízicos. O cultivo *in vitro* de orquídeas passa por dois estádios de desenvolvimento: sementeira e subcultivo. A sementeira é feita em meio de cultura e posteriormente se faz o subcultivo ou repicagem, que são estágios mais prolongados, podendo variar de 9 a 12 meses dependendo da espécie cultivada (SILVA, 2003). Na cápsula ou fruto de uma orquídea é possível encontrar mais de 800.000 diminutas sementes, e na sementeira *in vitro* quase todas as sementes podem germinar (BACH; CASTRO, 2004).

Como as sementes de orquídeas não possuem reservas, no cultivo *in vitro* as exigências nutricionais devem ser supridas através de meios de cultura adequados para cada espécie. Portanto, a composição de meios nutritivos que possibilitem o desenvolvimento dos embriões e crescimento das plântulas de orquídea é de grande relevância, pois a exigência nutricional depende da fase em que se encontra a planta; e quanto mais jovem for o embrião, mais complexa será a exigência nutricional para o seu desenvolvimento (PASQUAL, 2001).

2.3.3 Meios de Cultura Utilizados no Cultivo de Orquídeas

A maioria dos meios nutritivos para o cultivo *in vitro* são formados por minerais podendo ser macronutrientes: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), ferro (Fe) e magnésio (Mg) e micronutrientes: manganês (Mn), zinco (Zn), boro (Bo), cobre (Cu), cobalto (Co), molibdênio (Mo), cloro (Cl) e iodo (I), além de vitaminas, açúcares, reguladores de crescimento vegetativo e suplementos orgânicos (quadro 1). O emprego dessas substâncias permite a reprodutibilidade dos meios, tendo em vista que as constituições químicas são conhecidas e suas concentrações podem ser

previamente determinadas (VENTURA, 2007). O resultado do cultivo de orquídeas depende de vários fatores e o meio de cultura é um dos principais, portanto, os nutrientes minerais e vitamínicos são essenciais ao metabolismo das plantas, e sua falta ou excesso pode acarretar danos ao seu crescimento e desenvolvimento normal (ICHINOSE, 2008).

Quadro 1 - Composição básica dos meios de cultura convencionais mais utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas.

Composição	Knudson C	Murashige & Skoog (MS)	Vacin & Went
	Macronutrientes (mg L ⁻¹)		
NH ₄ NO ₃ (Nitrato de amônia)	-	1650	500
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sulfato de amônia)	500	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O (Cloreto de cálcio dihidratado)	-	440	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (Nitrato de cálcio tetrahidratado)	1000	-	-
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (Fosfato de cálcio)	-	-	200
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de magnésio heptahidratado)	250	370	250
KNO ₃ (Nitrato de potássio)	-	1900	225
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potássio)	250	170	250
	Micronutrientes (mg L ⁻¹)		
H ₃ BO ₃ (Ácido bórico)	-	6,2	-
CoCl ₂ .6H ₂ O(Cloreto de cobalto hexahidratado)	-	0,025	-
CuSO ₄ .5H ₂ O (sulfato de cobre pentahidratado)	-	0,025	-

Continua

Composição	Knudson C	Murashige & Skoog (MS)	Vacin & Went
MnSO ₄ .4H ₂ O (Sulfato de manganês tetra hidratado)	7,5	22,3	7,5
KI (Iodeto de potássio)	-	0,83	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Molibdato de sódio)	-	0,25	-
ZnSO ₄ .4H ₂ O (Sulfato de zinco tetra hidratado)	-	8,6	-
Na ₂ .EDTA (sódio EDTA)	-	37,3	-
FeSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de ferro hepta hidratado)	25	27,8	-
Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃ .2H ₂ O (Tartarato férrico)	-	-	28
	Vitaminas (mg L ⁻¹)		
Niacina		0,5	
Piridoxina		0,5	
Tiamina		0,1	
	Aminoácidos (mg L ⁻¹)		
Glicina		2,0	
Edamina		1000	
Myo-inositol		100	

Fonte: VENTURA (2007)

Unemoto *et al.* (2007) estudando a propagação *in vitro* de plantas de orquídeas desenvolveram diferentes formulações de meios de cultura, na tentativa de produzir meios mais eficientes e protocolos simplificados, através da adição de substâncias alternativas como a água de coco e extratos de frutas e legumes. Alguns aditivos utilizados na composição dos meios de cultura na categoria de misturas complexas incluem: água de coco, extrato de sementes de feijão e de malte, sucos de tomate, batata, cenoura, ameixa e melancia, entre outros (STANCATO; ABREU; FURLANI, 2008).

No cultivo *in vitro* de *Cattleya* spp. misturas orgânicas como água de coco e extratos de frutas tem sido utilizadas para estimular o crescimento de protocormos, estrutura efêmera resultante da germinação de sementes de orquídeas, a partir da qual se formam os primórdios dos sistemas caulinar e radicular das mudas *in vitro* (ORI, 2006). De acordo com Araújo *et al.* (2006) a água de coco é o aditivo mais utilizado para várias espécies de orquídeas cultivadas *in vitro*, por conter sais minerais, mio-inositol, citocinina, nucleotídeos e outros compostos orgânicos utilizados pelas plantas em seu desenvolvimento. No entanto, apesar do uso da água de coco ter sido benéfico no cultivo *in vitro* de híbridos de *Cattleya* spp. é importante se observar como se emprega esta mistura, que possui uma composição química indefinida e pode gerar alterações no meio de cultura, como oscilações no pH e adição de reguladores de crescimento em quantidades não mensuráveis.

Vários autores fazem referência ao uso de polpas de frutas compondo o meio de cultura utilizado na propagação *in vitro* de orquídeas, como fontes orgânicas de vitaminas, proteínas e carboidratos, além de estimuladores de crescimento e enraizamento das plântulas (ARAÚJO *et al.*, 2009; PASQUAL *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2009; VYAS *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2010; SU; SCHNITZER; FARIA, 2012). Neste trabalho foi estudada a utilização de polpas de frutas encontradas na região amazônica como cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum [Willd. Ex. Spreng]), buriti (*Mauritia flexuosa* L.), cajá (*Spondias lutea* L.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.), graviola (*Anona muricata* L.) e murici (*Birsonima crassifolia* L.) na produção de meios de cultura alternativos, adicionados de água de coco (*Cocos nucifera* L) e carvão vegetal para fornecer os nutrientes necessários ao desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya violacea*, com a intenção de desenvolver um protocolo de cultivo para a espécie (quadro 2).

Quadro 2 - Composição das polpas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum [Willd. Ex. Spreng]), buriti (*Mauritia flexuosa* L.), cajá (*Spondias lutea* L.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.), graviola (*Anona muricata* L.) e murici (*Birsonima crassifolia* L.).

Frutas	Composição nutricional
Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i> Schum [Willd. Ex. Spreng])	Vitaminas (A, B1, B2, C), proteínas e sais minerais (K, Se, Ca, P, Fe, Mg)

Continua

Frutas	Composição nutricional
Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i> L.)	Vitaminas (A, B, C), proteínas, sais minerais (Ca, P, Fe, Zn), carboidrato, lipídios, fibra, tiamina, riboflavina, niacina, β - caroteno
Cajá (<i>Spondias lutea</i> L.)	Vitaminas (A, B, C), proteínas, sais minerais (K, Ca, P, Zn), carboidrato
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	Vitaminas (B1, B2, C), proteínas, sais minerais (Ca, P, Fe)
Graviola (<i>Anona muricata</i> L.)	Vitaminas (A, C), proteínas, sais minerais (K, Ca, P, Fe, Mg, Zn), carboidrato
Murici (<i>Birsonima crassifolia</i> L.)	Vitaminas (B1, B2, C), proteínas, sais minerais (Ca, P, Fe), carboidrato

Fontes: Lopes; Pezoa-Garcia; Amaya-Farfán (2008); Carneiro (2011); Gadelha (2009); Menezes; Torres; Srur (2008); Moraes (2013); Guimarães; Silva (2008)

2.3.3.1 Agentes gelificantes e substâncias substitutas ao ágar no meio de cultura

Os agentes gelificantes são promotores de sustentação no meio de cultura e utilizados na propagação *in vitro*, devido ao fato de apresentar condições ideais de suporte às plântulas, embora onerem a produção *in vitro*, por ser um produto de custo elevado. No entanto, vários trabalhos mostraram que é possível substituir os gelificantes pelo uso de substratos inertes como a vermiculita, a perlita ou espumas de poliuretano, embebidas em meio líquido (FARIA et al, 2006; FIALHO et al, 2011).

Como exemplo temos o trabalho de Adelberg et al. (1997) onde demonstraram que, o meio de cultura líquido apresentou-se viável, proporcionando um crescimento mais vigoroso das plântulas quando adicionado a materiais de suporte que aumentavam a aeração do meio de cultura na propagação *in vitro* de *Cattleya* spp. De acordo com Faria et al. (2002) o meio de cultura adicionado a espuma de poliuretano picada proporcionou o enraizamento e desenvolvimento vegetativo de plântulas da orquídea *Oncidium baueri* Lindl, mostrando que este substrato pode ser utilizado como excelente alternativa para substituição ao ágar, principalmente por seu baixo valor econômico.

2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A floricultura encontra-se em constante crescimento no mercado mundial, ocupando lugar de destaque no setor produtivo por apresentar rentabilidade superior a outras culturas, utilizando tecnologia moderna e empregando grande número de mão de obra (SORACE, 2008). No Brasil a floricultura está concentrada principalmente na região Sul, precisamente em Santa Catarina, Joinville e Corupá (OTTMANN et al., 2008), embora comercialmente a floricultura no país tenha iniciado no estado de São Paulo na década de 50 (AKI; PEROSA, 2002).

Pode-se observar um notável crescimento e consolidação de importantes pólos florícolas no Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, Distrito Federal e alguns estados do Norte e do Nordeste do País. Este crescimento tem ocorrido devido ao fortalecimento econômico destes pólos produtivos e ao uso de tecnologia avançada, principalmente quando o produto é destinado à exportação (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

A comercialização de orquídeas ocorre de duas formas: a planta é comercializada antes do seu florescimento já aclimatizada ou é feita ainda nos frascos de cultivo *in vitro* (NARDO; HIRGA, 2009). As orquídeas entram no mercado como plantas ornamentais ou “flor de corte”, além dos produtos industriais, como é o caso da *Vanilla planifolia* Andrews (1808), que produz a essência de baunilha (SILVA, 2003) e do *Cyrtopodium cardiochilum* Lindl., cujo extrato apresenta propriedades imunológicas no tratamento da tuberculose (JUNIOR, 2009).

Os Estados Unidos, tradicional exportador de orquídeas do gênero *Cymbidium* movimenta 14 milhões de dólares anualmente, onde o Havaí exporta quatro milhões de dólares (SILVA, 2003). O Brasil em 1990 exportou US\$ 9,2 milhões em flores e produtos de floricultura, sendo que as mudas de orquídeas contribuíram com 2,9% deste valor (STORTI, 2007). A partir deste ano houve um crescimento na participação brasileira de exportação de flores e plantas ornamentais, sendo registrado em 2007 valores anuais de US\$ 35 milhões (LÍRIO; MENDOÇA, 2011).

As exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais estão aquém dos valores gerados internacionalmente pelos principais países que atuam no setor. Mas as “flores de corte” têm contribuído para o desenvolvimento dessa atividade hortícola, embora ainda não seja condizente com a capacidade produtiva e exportadora que ocorreria se o país adotasse tecnologia moderna em todos os elos da cadeia produtiva (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

Estima-se que no ano de 2010 o mercado de exportação de flores e plantas ornamentais tenha movimentado valores da ordem de R\$ 3,8 bilhões e no primeiro semestre de 2011, as exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais alcançaram US\$ 7,60 milhões (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011). No Brasil o cultivo de orquídeas vem se consolidando como importante atividade econômica em várias regiões do país. E as orquídeas que antes eram vistas apenas como um hobby se apresentam no mercado como importante atividade econômica, embora o setor ainda seja pequeno na pauta de exportações da floricultura, devido às mudas de orquídeas comercializadas serem em grande parte de espécies nativas e seus híbridos, destinados especialmente aos colecionadores (REIS, 2011).

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram elaborados com a finalidade de estudar o comportamento de plântulas de *C. violacea* subcultivadas em meios de cultura com frutas e Knudson, utilizando solidificantes alternativos ao ágar.

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência de meios de cultura alternativos no crescimento *in vitro* de plântulas de *C. violacea estriata*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um protocolo de cultivo *in vitro* para a *C. violacea* utilizando meios de cultura alternativos compostos por polpa de frutas amazônicas e diferentes solidificantes;
- Caracterizar o comportamento da *C. violacea* frente aos meios de cultura alternativos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A semeadura *in vitro* foi realizada na Biofábrica da Universidade Federal de Roraima (UFRR), localizada no Centro de Ciências Agrárias, no município de Boa Vista, Roraima. Utilizou-se um fruto (cápsula) maduro, mas fechado de *Cattleya violacea* estriata ROLFE (1889) proveniente de uma planta adulta, doado por uma orquidófila da região.

A cápsula fechada foi lavada com detergente neutro comum e enxaguada em água corrente, tendo sido removida a haste que a prendia na planta com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Dentro da capela de fluxo laminar a cápsula fechada, contendo as sementes maduras, foi desinfetada com álcool 70% por 5 minutos e após foi transferida para uma solução de hipoclorito de sódio a 2% por trinta minutos. Transcorrido este tempo a cápsula foi lavada quatro vezes em água destilada estéril, para posteriormente ser aberta dentro de uma placa de Petri, com o auxílio de um bisturi, uma pinça e uma espátula previamente autoclavados.

Após estes processos as sementes foram retiradas da cápsula e semeadas *in vitro* em frascos de 250 ml esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos e contendo 50 ml do meio de cultivo composto por 10,0 ml L⁻¹ de meio Knudson (KNUDSON, 1946), acrescido de 2,0 gL⁻¹ de carvão ativado, 20,0 gL⁻¹ de sacarose e 7,0 gL⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da inclusão do ágar. Estes frascos com os meios de cultura contendo as sementes foram transferidos para a sala de crescimento e mantidos sob temperatura de 26 ± 2°C e 2.000 lux de luminosidade, em fotoperíodo de 16 horas (UNEMOTO et al., 2007) por noventa dias.

Após noventa dias da semeadura *in vitro* os frascos com as plântulas foram levados para o Laboratório de substâncias bioativas do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais (PRONAT) da UFRR, onde foram selecionadas plântulas de *C. violacea* estriata com aproximadamente 1,0 cm de altura e com 02 folhas, que foram subcultivadas nos meios de cultura compostos pelas frutas regionais açai, buriti, cajá, cupuaçu, graviola e murici (figura 2) acrescidos de 40,0 mL⁻¹ de água de coco, 2,0 gL⁻¹ de carvão ativado, 20,0 gL⁻¹ de sacarose, além dos solidificantes ágar, vermiculita e carvão vegetal; e pelos meios de cultura testemunha compostos por meio Knudson C utilizando também os solidificantes acima referidos (figura 3). O pH dos meios foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e as plântulas após o subcultivo em capela de fluxo laminar,

foram depositadas em sala de crescimento por seis meses, nas mesmas condições ambientais da semeadura descrita no parágrafo anterior.

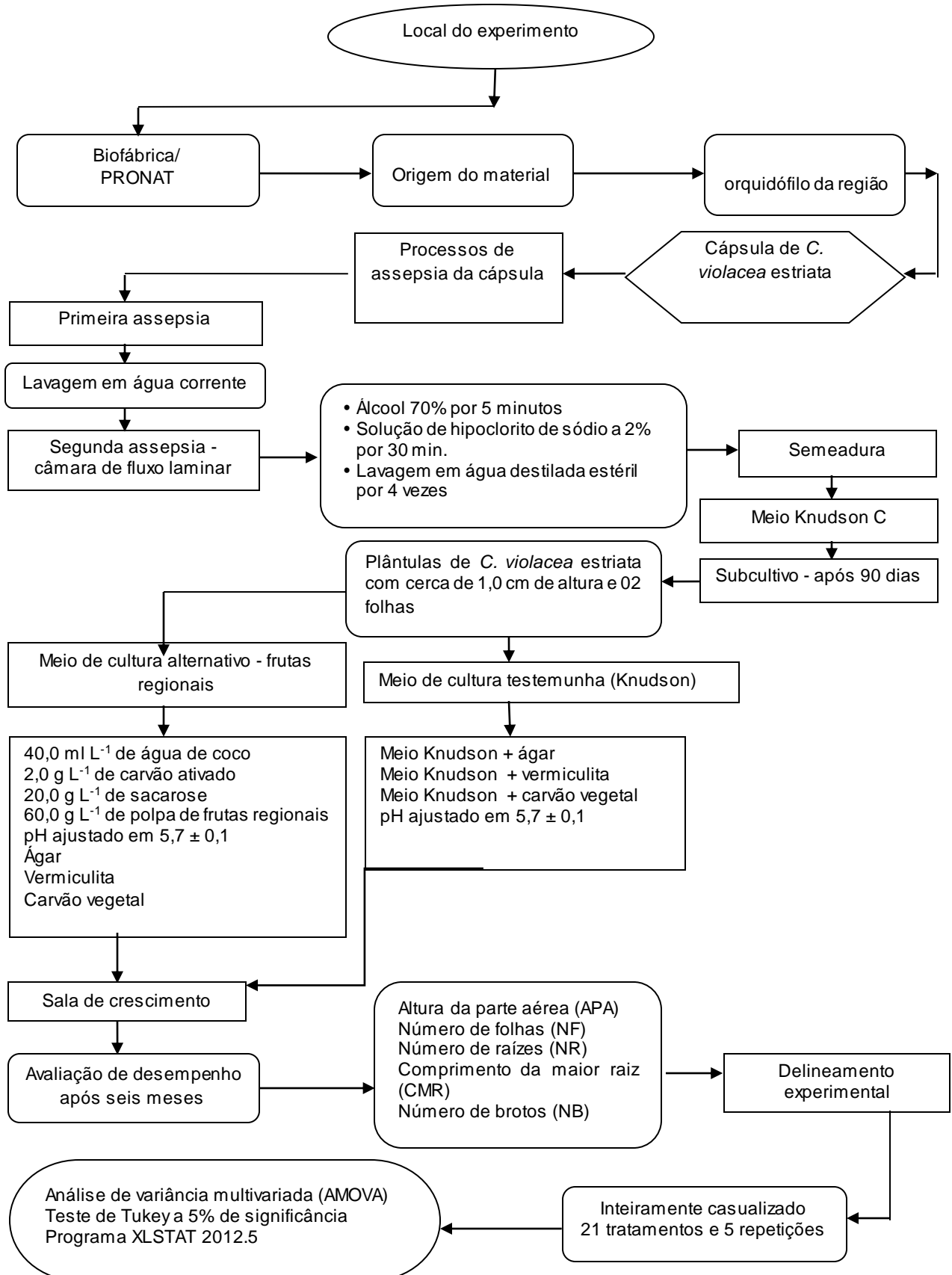
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 21 tratamentos e 05 repetições, contendo 05 plântulas por repetição (frasco). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância multivariada (AMOVA) e utilizou-se o teste de Tukey a 5% de significância (UNEMOTO et al., 2007).

Figura 2 - Meios de cultura alternativos compostos por Knudson C (testemunha) e polpas das frutas cupuaçu, buriti, cajá, açai, graviola e murici, solidificados com ágar, vermiculita e carvão vegetal.

Composição dos meios estudados						
Tratamento	Cupuaçu 60,0 g L ⁻¹	Buriti 60,0 g L ⁻¹	Cajá 60,0 g L ⁻¹	Açai 60,0 g L ⁻¹	Graviola 60,0 g L ⁻¹	Murici 60,0 g L ⁻¹
Ágar	Ágar e cupuaçu	Ágar e buriti	Ágar e cajá	Ágar e açai	Ágar e graviola	Ágar e murici
Vermiculita	Vermiculita e cupuaçu	Vermiculita e buriti	Vermiculita e cajá	Vermiculita e açai	Vermiculita e graviola	Vermiculita e murici
Carvão vegetal	Carvão vegetal e cupuaçu	Carvão vegetal e buriti	Carvão vegetal e cajá	Carvão vegetal e açai	Carvão vegetal e graviola	Carvão vegetal e murici
Tratamento						
Ágar	Knudson (K1)					
Vermiculita	Knudson (K2)					
Carvão vegetal	Knudson (K3)					

K1 = Knudson e ágar, 2 = Knudson e vermiculita, 3 = Knudson e carvão vegetal

Figura 3 - Fluxograma dos procedimentos de propagação *in vitro* de *C. violacea* estriata subcultivada em meios compostos por frutas regionais e Knudson, com diferentes solidificantes.



A avaliação dos tratamentos foi feita seis meses após o subcultivo das plântulas de *C. violacea* estriata nos meios com frutas e Knudson, com os solidificantes estudados. As plântulas foram retiradas dos frascos e mensuradas quanto às variáveis: altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e número de brotos (NB). As variáveis biométricas altura da parte aérea e comprimento da maior raiz foram obtidas utilizando-se um paquímetro digital e o número de folhas, de raízes e de brotos foram feitos por contagem visual.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da pesquisa executada apresentaremos a seguir os resultados encontrados e confrontados com autores que desenvolveram temas similares. Na figura 4 podemos visualizar os dados médios das variáveis biométricas de plântulas de *C. violacea* estriata subcultivadas em meios compostos por frutas regionais (AC = açaí, BU = buriti, CA = cajá, CP = cupuaçu, GR = graviola e MU = murici) e Knudson, com diferentes solidificantes (ágar =1, vermiculita = 2 e carvão vegetal =3).

Figura 4 - Médias das variáveis avaliadas em plântulas de *C. violacea* estriata subcultivadas em meios de cultura Knudson e com frutas, na presença dos solidificantes ágar, vermiculita e carvão vegetal.

Número de tratamentos	Tratamentos	Altura aérea (Cm)	Número de folhas	Número de raízes	Comprimento maior raiz (Cm)	Número de brotos
1	K1	1,97	4,72	2,32	2,90	2,20
2	K2	1,64	3,48	1,82	1,33	1,92
3	K3	1,25	2,6	1,76	1,02	1,92
4	CP1	7,86	12,60	7,40	3,58	2,40
5	CP2	2,10	4,80	2,00	1,01	1,40
6	CP3	4,62	17,20	6,20	3,22	2,00
7	BU1	16,32	29,50	12,25	6,35	3,25
8	BU2	1,17	3,00	1,40	0,38	2,00
9	BU3	1,50	3,80	1,60	1,32	1,00
10	CA1	4,96	13,00	7,00	1,90	1,80
11	CA2	1,37	3,40	1,40	0,49	1,40
12	CA3	1,61	4,07	2,80	1,12	1,40
13	MU1	5,44	17,00	4,00	2,02	2,00
14	MU2	1,76	4,60	2,40	1,25	2,00
15	MU3	3,02	10,20	4,60	1,72	1,20
16	AC1	9,12	24,00	10,40	5,94	1,80
17	AC2	2,07	4,80	2,00	1,12	2,00
18	AC3	4,64	13,60	7,00	3,98	1,20
19	GR1	3,69	17,40	5,80	2,26	1,60
20	GR2	1,67	4,40	2,40	1,14	1,00
21	GR3	3,24	12,20	4,40	2,04	1,20

K1 = Knudson e ágar, K2 = Knudson e vermiculita, K3 = Knudson e carvão vegetal, CP = cupuaçu, BU = buriti, CA = cajá, MU = murici, AC = açaí, GR = graviola
1 = ágar, 2 = vermiculita, 3 = carvão vegetal

Na figura 5 observa-se que o modelo estatístico apresentou um desvio padrão elevado para as variáveis biométricas analisadas: altura aérea, número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz, e conseqüentemente um grande coeficiente de variação, indicando variabilidade entre as variáveis estudadas. O número de brotos apresentou a menor variabilidade, o que pode ser verificado no seu coeficiente de variação de 44,934 %, enquanto na altura aérea o CV foi de 114,041%, o que indica que as variáveis não apresentam comportamento padrão, indicando que o desenvolvimento das plântulas é aleatório, comum em plantas selvagens.

Figura 5 - Estatística descritiva geral em relação aos tratamentos e as variáveis biométricas altura aérea, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz e número de brotos.

Variável	Número Observações	Observações com dados faltantes	Observações sem dados faltantes	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão (\pm)	CV
Altura aérea	105	0	105	0,320	28,700	3,860	4,402	114,041
Número de folhas	105	0	105	1,000	65,000	10,018	9,500	94,829
Número de raízes	105	0	105	1,000	2,000	4,331	3,688	85,153
Comprimento da Maior raiz	105	0	105	0,170	11,200	2,196	2,096	95,446
Número de brotos	105	0	105	1,000	7,000	1,747	0,785	44,934

CV = coeficiente de variação

Uma análise preliminar dos dados demonstrou que o uso da ferramenta estatística da análise de variância univariada iria fornecer uma quantidade muito grande de tabelas explicativas, por isso optou-se pelo uso da análise de variância multivariada, onde há uma diminuição do número de variáveis pela substituição de uma única variável que consiga capturar a maior variabilidade dos dados (componente principal).

Os resultados obtidos por essa análise pode ser sumarizado através da matriz de correlação de Pearson (figura 6), onde se observa grande correlação (maior que 0,8) para as variáveis altura aérea, número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz, com exceção do número de brotos (0,537). Sendo possível inferir que há um grande número de parâmetros explicativos que influenciam no ajuste do modelo, ou seja, poderia ser selecionado apenas um dos parâmetros biométricos

mensurados para avaliar os meios de cultura estudados, com exceção do número de brotos.

Figura 6 - Resumo com os resultados da matriz de correlação de Pearson

Variáveis	Altura aérea	Número de folhas	Número de raízes	Comprimento da maior raiz	Número de brotos
Altura aérea	1,000	0,810	0,844	0,830	0,537
Número de folhas	0,810	1,000	0,874	0,725	0,527
Número de raízes	0,844	0,874	1,000	0,846	0,515
Comprimento da maior raiz	0,830	0,725	0,846	1,000	0,437
Número de brotos	0,537	0,527	0,515	0,437	1,000

Portanto, pode-se concluir que apenas uma variável que capturasse a maior variabilidade dos dados, seria suficiente para a construção do modelo, o que corrobora com os dados da análise dos componentes principais (PCA), que podem ser visualizados na figura 7, onde mostra que o uso de duas componentes principais são suficientes para explicar a variabilidade total dos dados, o que pode ser comprovado pelos valores dos auto vetores que representam as coordenadas das variáveis (figura 8).

Figura 7 - Análise de Componentes Principais (PCA), onde é capturada a maior variabilidade das variáveis.

	F1	F2	F3	F4	F5
Autovalores	3,825	0,652	0,273	0,161	0,090
Variabilidade	76,499	13,034	5,452	3,223	1,794
% acumulada	76,499	89,532	94,984	98,206	100,000

F1; F2; F3; F4 e F5 = Representam as coordenadas dos novos eixos cartesianos que demonstram os vetores das componentes principais.

Apenas os valores de F1 e F2 são suficientes para explicar mais de 80% das variabilidades dos dados que compõem o modelo.

Figura 8 - Valores dos auto vetores que geraram as componentes principais

Variáveis	F1	F2	F3	F4	F5
Altura aérea	0,476	-0,115	-0,169	0,840	0,159
Número de folhas	0,466	-0,079	0,722	-0,034	-0,504
Número de raízes	0,484	-0,177	0,164	-0,406	0,737
Comprimento da maior raiz	0,456	-0,295	-0,637	-0,348	-0,421
Número de brotos	0,336	0,928	-0,131	-0,086	-0,017

F1; F2; F3; F4 e F5 = representam as coordenadas dos novos eixos cartesianos que demonstram os vetores das componentes principais.

A análise de variância multivariada (AMOVA) entre os tratamentos indicou que não há diferença estatística significativa entre as variáveis biométricas estudadas. O que se pode ser visto nos apêndices (A₁, A₂, A₃, A₄, A₅), cujo resumo pode ser observado na figura 9.

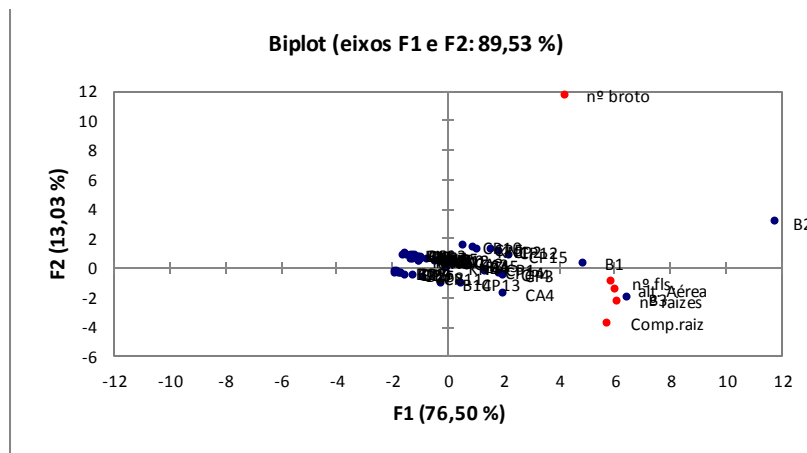
Figura 9 - Resumo das análises de variâncias realizadas

	Altura aérea	Número de folhas	Número de raízes	Comprimento maior raiz	Número brotos
R ²	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F					
Pr > F					

R² = coeficiente de correlação; F = valor do teste de Fischer; Pr = probabilidade.

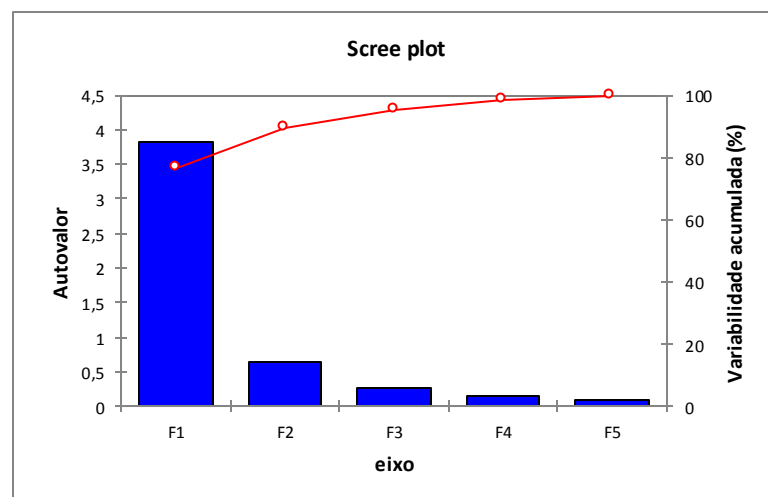
Verifica-se na figura 10 que a grande maioria dos tratamentos não apresentou diferença significativa, o que é observado pelo aglomerado de variáveis formando um único bloco. No entanto, os tratamentos que utilizaram buriti solidificados com ágar, vermiculita e carvão se destacaram em relação aos demais, onde o meio composto por buriti e vermiculita (B2), que se encontra acima do eixo no lado positivo, mostra que o número de brotos foi responsável pelo comportamento apresentado por esse tratamento.

Figura 10 - Análise das variáveis biométricas em relação aos meios de cultura estudados



Na figura 11 ao se analisar os autovalores podemos verificar que, a primeira componente principal explica 76,50% da variabilidade dos dados e com isso o cálculo da segunda componente principal consegue explicar quase 100% de toda variabilidade existente entre os tratamentos (meios de cultura) e as variáveis biométricas analisadas. O que já foi demonstrado na matriz de Pearson, onde é possível verificar que há uma alta correlação entre altura aérea e número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz e as correlações dos outros parâmetros, com exceção do número de brotos, que apresentou uma correlação abaixo de 0,8.

Figura 11 - Gráfico dos autovalores mostrando a porcentagem de variabilidade explicada pelas componentes principais.



Verificou-se nesta pesquisa que, o subcultivo de plântulas de *C. violacea* estriata em meios compostos por polpas de frutas provenientes da região amazônica induziu o maior desenvolvimento das mesmas em relação ao meio Knudson C (testemunha). E que o meio composto por buriti solidificado com ágar (BU1) proporcionou o maior crescimento (16,32 cm), enquanto que as plântulas subcultivadas no meio Knudson com ágar apresentaram a menor altura aérea (1,97 cm). O que também foi observado por Su; Schnitzer; Faria (2012) quando subcultivaram a orquídea *Dendrobium nobile* Lindl. em meios com e sem polpa de banana, adicionados a cinco formulações de fertilizantes comerciais, onde concluíram que os meios com polpa de banana provocaram um maior desenvolvimento das plântulas em relação ao meio Knudson. E confirmado no experimento realizado por Brahm; Gomes; Bosenbecker (2006) onde adicionaram polpa de frutas ao meio de cultura utilizado no subcultivo de *Schomburgkia* e observaram que, a adição de tomate e banana ao meio provocou uma maior altura aérea nas plântulas (6,25 cm e 5,39 cm, respectivamente), do que o meio Knudson. Corroborando com Silva et al. (2005) e Vieira et al. (2009) que pesquisaram protocolos com orquídeas cultivadas *in vitro* em meios de cultura composto pelos meios tradicionais, Knudson C e MS, respectivamente solidificado com ágar e suplementados com polpa de banana, e obtiveram o maior desenvolvimento nas plântulas cultivadas nos meios com frutas. Resultados semelhantes foram obtidos no nosso trabalho, onde o maior desenvolvimento das plântulas de *C. violacea* ocorreu quando subcultivadas em meios de cultura contendo buriti solidificado com ágar (BU1), quando as mesmas apresentaram o maior crescimento da parte aérea em relação às subcultivadas nos demais meios avaliados. Pode-se presumir que esse resultado está relacionado às características nutricionais do fruto do buriti (*M. flexuosa* L.), que é rico em vitaminas A, B e C e nos minerais cálcio, ferro e zinco, além de β -caroteno, carboidratos e proteínas (AMBROSIO et al. 2006; CANUTO et al. 2010), tendo suprido mais adequadamente as necessidades das plântulas, do que os outros meios de cultivo, pois segundo Villa et al (2014) que avaliaram a micropropagação de um híbrido de *Cattleya* e *Laelia*, estas espécies são exigentes em minerais, principalmente zinco, que possui relevante atuação no metabolismo de crescimento das plântulas.

Entretanto, alguns autores relatam resultados diversos do nosso quando utilizaram polpa de frutas no meio de cultura, como o trabalho de Su; Schnitzer; Faria (2012) que testaram meios de cultura MS suplementados com diferentes polpas de

banana nanica e concentrações de NPK no cultivo *in vitro* de *D. nobile* Lindl. e verificaram que, o meio composto por MS sem a adição da polpa de banana proporcionou o melhor resultado para altura aérea e número de folhas (6,07 e 7,83 cm, respectivamente). Resultado semelhante foi encontrado por Araújo et al. (2006) estudando a adição de polpa de banana nanica em diversas concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 g L⁻¹), além de água de coco verde (0, 50, 100, 150 e 200 ml L⁻¹) suplementando o meio Knudson C no cultivo *in vitro* de *C. loddgessi* grande x *C. loddgessi* alba, onde observaram um maior número de folhas nas plântulas subcultivadas no meio sem polpa de banana e com 100 ml L⁻¹ de água de coco.

Poderia se deduzir que estes resultados negativos relacionados à adição de polpas de frutas a meios de cultura estariam relacionadas à polpa de banana, mas divergem do resultado encontrado por Brahm et al. (2006) que utilizaram polpa de frutas e legumes (banana, mamão, tomate e batata) em meios de cultura para subcultivar a orquídea *Schomburgkia* sp. e obtiveram plântulas com as maiores alturas aéreas nos meios compostos por 60g L⁻¹ de tomate e 60g L⁻¹ de banana (6,25 cm e 5,39 cm, respectivamente), além do maior número de folhas (2,77; 2,30 e 2,25) e de raízes (2,60; 2,31 e 2,29) nos meios com banana, tomate e mamão. No nosso estudo foi possível verificar que, o meio de cultura composto por buriti e ágar (BU1), acerola e ágar (AC1) apresentaram os melhores resultados para número de folhas em comparação aos demais tratamentos (29,50 e 24,0, respectivamente).

Em relação ao número de raízes foi observado que as maiores médias (BU1=12,25; AC1=10,4; CP1=7,4; CA1=7,0; GR1=5,80 e KA=2,32) ocorreram nos meios de cultura solidificados com ágar (figura 4). Resultados que corroboram com o trabalho de Saito; Ducca; Chaves (2006) que verificaram um maior desenvolvimento do sistema radicular do híbrido de *Laelia purpurata* x *Cattleya warneri* em meio com polpa de tomate adicionado ao ágar. Os dados deste trabalho, relativos ao comprimento da maior raiz também indicam que, nos meios solidificados com ágar as plântulas obtiveram os maiores valores médios (BU1=6,35; AC1=5,94; CP1=3,58; KA=2,90; GR1=2,26; MU1=2,02 e CA1=1,90), superiores aos das plântulas subcultivadas nos demais solidificantes, vermiculita e carvão vegetal (figura 4).

Em nossa pesquisa observamos que os meios de cultura solidificados com vermiculita não se diferenciaram estatisticamente entre si em relação à altura das plântulas, embora os meios compostos por cupuaçu e vermiculita (CP2), açaí e vermiculita (AC2) tenham induzido as maiores médias de altura das plântulas (2,10 e

2,07 cm, respectivamente), sendo que as menores alturas médias ocorreram nos meios compostos por buriti e vermiculita (BU2) e cajá e vermiculita (CA2), com 1,17 e 1,37 cm, respectivamente. No entanto, Fialho et al. (2011) ao avaliarem o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe em meio de cultura líquido MS (Murashige; Skoog, 1962) solidificado com ágar, vermiculita e fibra de rizomatosa moída de *Pteridium quilinum* Kuhn concluíram que, tanto a vermiculita, quanto a fibra estudada poderiam substituir o ágar, promovendo um desenvolvimento da parte aérea similar ao proporcionado pelo mesmo.

Podemos observar que os meios de cultura compostos pelas frutas amazônicas e solidificados com vermiculita proporcionaram a menor média de crescimento das plântulas (figura 4) para quase todas as variáveis biométricas avaliadas, com exceção do número de brotos, onde se verificou que o meio composto por buriti e vermiculita mostrou diferença significativa entre os tratamentos utilizados (figura 9). Faria et al. (2006) desenvolveram trabalhos utilizando metade da concentração do meio MS e solidificantes como espuma picada de poliuretano, esfagno e areia grossa como alternativa ao ágar, para subcultivar plântulas de *Oncidium baueri* Lindl e comprovaram a eficiência da espuma picada, que provocou a maior altura aérea (4,51), o maior comprimento da maior raiz (2,13) e o maior número de raízes (5,35) em comparação aos demais solidificantes analisados.

Nos trabalhos de Braga et al. (2011) os pesquisadores mostraram que é possível utilizar a vermiculita em substituição ao gelificante ágar, como suporte físico no cultivo *in vitro* do abacaxizeiro, onde se observou que os meios de cultura composto por vermiculita proporcionaram os melhores resultados para a variável comprimento de parte aérea. O que diferiu dos resultados obtidos neste trabalho, onde as plântulas de *C. violacea* subcultivadas neste solidificante apresentaram as menores médias em quase todas as variáveis estudadas (figura 4). Com relação ao número de brotos, o meio de cultura composto por polpa de buriti e vermiculita promoveu um maior número destes, o que influenciou positivamente na escolha deste meio para a produção de brotos.

Comportamento semelhante ao verificado nos meios solidificados com vermiculita ocorreu nos meios onde se utilizou o carvão vegetal como solidificante, que não se diferenciaram estatisticamente entre si em relação à altura das plântulas, com as maiores médias sendo observadas nas subcultivadas nos meios compostos por açai e carvão (AC3), com 4,64 cm e cupuaçu e carvão (CP3), com 4,62 cm. E o

menor crescimento das plântulas de *C. violacea* estriata ocorreu nos meios de cultura compostos por Knudson e carvão (K3), com 1,25 cm e buriti e carvão (BU3), com 1,50 cm. De forma diversa do nosso trabalho, os pesquisadores Hermann et al. (2011) ao avaliarem a eficiência de meios de cultura alternativos no desenvolvimento de plântulas de *Brassavola tuberculata* Hook frente a meios tradicionais observaram que, o meios compostos por NPK, banana e carvão ativado promoveram nas plântulas um crescimento superior ao provocado pelos meios MS e Knudson.

Em pesquisa realizada por Villa et al. (2014) onde testaram diferentes concentrações do meio de cultura Knudson, MS, BAP e carvão ativado no subcultivo *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassiocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow, buscando um protocolo que atendesse melhor a espécie, observaram que nas maiores concentrações de carvão ativado obteve-se um aumento significativo do número de brotos, número de folhas e peso fresco, resultados positivos devido provavelmente a adsorção de substâncias tóxicas. Neste trabalho foi utilizado o carvão vegetal em pedaços adicionado ao meio Knudson C, onde foram observadas as menores médias de altura aérea (1,25 cm), número de folhas (2,6) e comprimento da maior raiz (1,02) das plântulas, resultado que pode estar relacionado aos tamanhos dos pedaços de carvão, pois as raízes das plântulas ficaram parcialmente imersas na fração líquida do meio, por não se fixarem bem ao carvão. E para os meios de cultura contendo apenas as polpas de frutas, os tratamentos que promoveram as maiores médias de crescimento foram o cupuaçu com carvão (CP3) e a acerola com carvão (AC3), o que pode ser visualizado na figura 4.

6 CONCLUSÕES

O meio de cultura composto por polpa de buriti solidificado com ágar promoveu o melhor desenvolvimento das plântulas de *C. violacea*.

Os meios compostos por polpas de frutas amazônicas solidificados com ágar proporcionaram os maiores crescimentos médios das plântulas de *C. violacea* quanto à altura da parte aérea, ao número de folhas e ao número de raízes, frente ao meio tradicional Knudson C.

REFERÊNCIAS

- ADELBERG, J. W. et al. Long term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid membrane sistem. United State of America, **Cell and Tiss. Organ Cult.** Dordrecht, v. 48, p.17, 1997.
- AKI, A.; PEROSA, J.M.Y. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Rev. Bras. de Hort. Ornam.** Campinas, v.8, n.1, p.13-23, 2002.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, mar./abr. 2006.
- ARAÚJO, A. G. et al. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Rev. Cer.**, p.608-613, nov./dez. 2006.
- ARAÚJO, A. G. et al. Crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico. **Ver. Cer.**, Viçosa, v. 56, n. 5, p.542-546, set./out. 2009.
- CIRCULO PAULISTA DE ORQUIDÓFILOS. 1941. Disponível em: <http://www.cpo.org.br/_CpoApresenta%E7%E3o.htm>. Acesso em: 11 de jul. 2012.
- BACH, E. E.; CASTRO, O. L. Germinação de sementes de *Cattleya* sp (Orchidaceae) em cultura de tecido visando produção de mudas. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v.71, n.3, p.1-749, abr. 2004.
- BOSA, N. et al. Enraizamento e Aclimatização de Plantas Micropropagadas de Gipsófila. **Hortic. Bras.**, Brasília, v. 21, n. 2, p.207-210, abr./jun. 2003.
- BLIND, A. D.; BLIND, E. J. O verdadeiro ouro da Amazônia "*Cattleya eldorado* Linden". Inf. OnLine, Manaus, p.3. 2009. Disponível em: <<http://www.orquidariocuiaba.com.br>> Acesso em: 13 de jul. de 2012.
- BRAGA, F. T. et al. Características morfofisiológicas de abacaxizeiro 'gomo de mel' enraizado *in vitro* sob luz natural e substrato vermiculita. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 551-557, Jun. 2011.
- BRAHM, R. U.; GOMES, J. C. C.; BOSENBECKER, V. K. Meios de cultura alternativos para o crescimento e desenvolvimento de orquídeas *in vitro*. **Rev. Bras. de Agroec.**, Cruz Alta, v. 1, n. 1, p.1, p. 623-1.626, 2006.
- BRUSTULIN, J.; SCHMITT, J. L. Composição florística, distribuição vertical e floração de orquídeas epifíticas em três parques municipais do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Instituto Anchieta de Pesquisas**, n. 59, p.143-158, 2008.

CANUTO, G. A. B. et al. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CARNEIRO, T. B. Frutos e polpa desidratada buriti (*Mauritia flexuosa* L.): aspectos físicos, químicos e tecnológicos. **Ver. Verd.**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 105 - 111 abril/jun, 2011.

COLOMBO, L. A. et al. Estabelecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. **Ac. Sci. Agron**, Maringá, v.32, n.4, p.695-700, 2010.

ENGLERT, S. I. **Orquídeas e bromélias: manual prático de cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 96p.

FARIA, R. T. et al. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breed. and App. Biotec.**, Viçosa, v.3, n. 2, p.489-492, 2002.

FARIA, R. T. et al. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl (orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Sci. Agron**, Maringá, v.28, n.1, p.71-74, jan/mar. 2006.

FERREIRA, A. W. C. **Orchidaceae nativas da região central de São Paulo, Brasil: florística, interação com forófitos, proposta de novas espécies e propagação *in vitro* de uma espécie ameaçada de extinção**. 2009. 177p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2009.

FERREIRA, A. W. C. et al. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Bot. Bras.**, Feira de Santana, v. 24, n. 3, p.636-639. 2010.

FIALHO, G. S. et al. Comportamento de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe (Orchidaceae), inoculadas *in vitro* sob diferentes substratos. **Idesia**, Chile, v.29, n.1, p.103-105, abr. 2011.

GADELHA, A. J. F. et al, Avaliação de Parâmetros de Qualidade Físico-Químicos de Polpas Congeladas de Abacaxi, Acerola, Cajá e Caju. **Rev. Caat**. v. 22, n. 1, p. 115-118, jan./mar., 2009.

GODOY, R. Z.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do planalto central brasileiro. **Acta. Bot. Bras**, v. 17, n. 1, p.101-118, 2003.

GUIMARÃES, M. M.; SILVA, M. S. Valor nutricional e características químicas e físicas de frutos de murici-passa (*Byrsonima verbascifolia*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 817-821, out./ dez. 2008.

HERMANN, M. H; FREITAS, E.M.; PÉRICO, E. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. **R. Bras. Agroc.**, Pelotas, v. 17, n. 1-4, p. 162-166, jan./ mar. 2011.

ICHINOSE, J. G. S. **Desenvolvimento e acúmulo de nutrientes em duas espécies de orquídeas: *Dendrobium nobile* Lindl. e *Miltonia flavescens* Lindl. var. *stellata* Regel.** 2008. 75p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, São Paulo, 2008.

JUNIOR, R. F. G., **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas.** 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, São Paulo, 2009.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M, S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Rev. Bras. Hortic. Ornam**, Brasília, v.14, n.1, p.37-52, mai. 2008.

JUNQUEIRA AH; PEETZ MS. Análise conjuntural do comércio do comércio exterior da floricultura brasileira. 2011. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes>>. Acesso em 1 de agosto de 2012.

KLEIN, E. H. S. **Levantamento e desenvolvimento de kit diagnóstico de patógenos e propagação *in vitro* de orquídeas no estado do Rio de Janeiro.** 2008. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **Amer. Orc. Soci. Bullet**, West Palm Beach, v.15, p.214-217, 1946.

LINHARES, D. O. **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG).** 2006. 46p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.

LÍRIO, V. S.; MENDONÇA, T. G. Análise comparativa do desempenho exportador de flores e plantas ornamentais nos Estados de São Paulo e Ceará. Documento técnico-científicos, v. 42, n. 02, p. 260-286, abr/jun. 2011.

LOPES, A. S.; PEZOA-GARCIA, N. H.; AMAYA-FARFÁN, J. Qualidade nutricional das proteínas de cupuaçu e de cacau. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 263-268, abr/ jun. 2008.

MENEZES, E. M. S; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Act. Amaz.**, Manaus, v. 38, n. 2, p. 311-316, 2008.

MORAIS, M. E. S. P. et al. Difusão de tecnologia em manejo e produção de orquídeas. **Rev. Cienc. Ext.**, v. 5, n. 2, p.86. 2009.

MORAES, M.O.B. **Caracterização química e determinação da atividade antioxidante em massa da graviola (*Annonamuricata* L.)**. 2013. 62p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 15, p.473-497,1962.

NARDO, C. A. F.; HIRGA, R. Cultivo e comercialização de orquídeas na cidade de Santa Cruz do Rio Pardo/SP. **Cic. Anais**, v. 4, n. 4, P. 51, 2009.

NASCIMENTO, M. G. A. **Morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleyaharrisoniana***. 2007. 42p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 2007.

NOGUEIRA, R. E.; PEREIRA, O. L. Kasuya, M. C. M.; Lanna, M. C. S.; MENDONÇA, M. P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta Bot. Bras.** São Paulo v.19, n.3 jul/set. 2005.

ORI, S. S. **Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* (Lineu) Blume (Orchidaceae) cultivada *in vitro***. 2006.133p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

OTTMANN, M. M. A. et al. Por que estudar a produção de plantas ornamentais? **Rev. Bras. Hortic. Orn.**, Brasília, v. 14, n. 1, p.85-90, nov. 2008.

PASQUAL, M. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações, meios de cultura. **Assoc. Bras. de Cult. de Tec. de Plant.** Lavras, v.10, n.2, p.74, 2001.

PASQUAL, M. et al. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Hortic. Bras.** v. 27, p.211-216, 2009.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídea**. Viçosa: 2. Ed., 2001. 63p.

PEREIRA, O. L. et al. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizotonióides. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 29, n. 2, p.199-206, 2005.

RAMALHO, A. M. Z.; PIMENTA, H. C. D. Valorização econômica do dano ambiental ocasionado pela extração ilegal da *Cattleya granulosa* no parque natural Dom Nivaldo Monte, Natal/RN. **Holos**, v. 1, n. 26, p.62-82, 2010.

REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? **IX Enc. Nac. da Eco**, Brasília, p.1-21, out.2011.

RIGHETO, M. V. L. et al. Morfofisiologia de plântulas de *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden cultivadas *in vitro* sob influência de paclobutrazol. **Rev. Bras. Bioci**, Porto Alegre, v. 10, n. 1, p.20-25, jan./mar. 2012.

RODRIGUES, D. T. **Nutrição e fertilização de orquídeas *in vitro* e em vasos**. 2005. 90p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2005.

SAITO, B. C.; DUCCA, F.; CHAVES, T. O. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídeas em meio de cultura suplementado com polpa de tomate. **III Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar**. Maringá, out. 2006.

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya AmberGlow***. 2003. 62p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2003.

SILVA, E. F. et al. Polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de orquídea. **Plant Cell Cult. Micropropg.**, Lavras, v. 1, p.8-12, 2005.

SILVA, E. F.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Meio de Knudson modificado utilizado no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Scient. Agr.**, Curitiba, v.10, n.4, p.267-274, jul./ago. 2009.

SORACE, M. **Substratos alternativos ao xaxim para o cultivo de espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae)**. 2008. 61p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2008.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica. **R. Bras. de Hortic. Ornam**, Campinas, v.17, n.1, p.25-33, 2001.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Ciênc. Agron**, Campinas, v. 67, n. 1, p.51-57, ago. 2008.

STORTI, E. F. **Dinâmica populacional e biologia reprodutiva de *Cattleya eldorado* Linden (Orchidaceae)**. 2007. 131p. Tese (Doutorado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Amazonas/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2007.

SU, M. J.; SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Cient.**, Jaboticabal, v. 40, n. 1, p.28-34. 2012.

UNEMOTO, L. K. et al. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **R. Bras. Agric.**, Pelotas, v.13, n.2, p.267-269, abr./jun. 2007.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Bot. Gaz**, Cambridge, v.110, p.605-613. 1949.

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

VIEIRA, J. G. Z. et al. Propagação *in vitro* e aclimação de um híbrido da *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Cient.**, Jaboticabal, v. 37, n. 1, p.48 - 52, 2009.

VILLA, F; PASQUAL, M.; SILVA, E. F. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio knudson com adição de vitaminas do meio ms, benzilaminopurina e carvão ativado. **Ciênc. Agrar.**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 683-694, mar./abr. 2014.

VYAS, S. et al. Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. Amsterdam, United State of America, **Sci. Hortic.**, v. 121, p.32–37, 2009.

ZANENGA-GOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Bot. Bras**, v.17, n.1, p.101-118, maio. 2003.

APENDICE

APENDICE A - Análise da variância da altura aérea das plântulas

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr> F
Modelo	102	2015,089	19,756		
Erro	2	0,000	0,000		
Total corrigido	104	2015,089			

APENDICE A1 - Análise da variância do número de folhas das plântulas

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr> F
Modelo	102	9386,563	92,025		
Erro	2	0,000	0,000		
Total corrigido	104	9386,563			

APENDICE A2 - Análise da variância do número de raízes das plântulas

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr> F
Modelo	102	1414,412	13,867		
Erro	2	0,000	0,000		
Total corrigido	104	1414,412			

APENDICE A3 - Análise da variância do comprimento da maior raiz das plântulas

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr> F
Modelo	102	456,855	4,479		
Erro	2	0,000	0,000		
Total corrigido	104	456,855			

APENDICE A4 - Análise da variância do número de brotos das plântulas

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Modelo	102	64,009	0,628		
Erro	2	0,000	0,000		
Total corrigido	104	64,009			