

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Propagação *in vitro* e aclimatização de *Cattleya walkeriana*
Gardner cultivadas em meios de cultura alternativos**

Michele Cagnin Vicente

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE
CATLEYA WALKERIANA GARDNER CULTIVADAS EM
MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS**

MICHELE CAGNIN VICENTE

Sob a orientação do Professor
João Sebastião de Paula Araujo
UFRRJ

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Fitotecnia no Curso de
Pós-Graduação em Fitotecnia.

Seropédica, RJ
Junho, 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V632p Vicente, Michele Cagnin, 1986-
 Propagação in vitro e aclimatização de Cattleya
 walkeriana Gardner cultivadas em meios de cultura
 alternativos / Michele Cagnin Vicente. - Seropédica,
 2019.
 112 f.

 Orientador: João Sebastião de Paula Araujo.
 Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
 do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
 Fitotecnia - PPGF/UFRRJ, 2019.

 1. orquídeas. 2. meios de cultura. 3. inoculação
 bacteriana. 4. potencial hidrogeniônico. I. Araujo,
 João Sebastião de Paula, 1969-, orient. II
 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
 Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia - PPGF/UFRRJ
 III. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – A autora”.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

MICHELE CAGNIN VICENTE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia** no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 26/06/2019.

João Sebastião de Paula Araujo (*DSc*) UFRRJ
(Orientador)

Rogério Gomes Pêgo (*DSc*) UFRRJ

Sandy Sampaio Videira (*DSc*) CETEM - Petrobras

*"De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos apenas começando,
A certeza de que é preciso continuar e
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda um passo de dança,
Fazer do medo uma escada,
Fazer do sonho a ponte".*

(Fernando Sabino)

Aos meus amados pais e ao meu esposo

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade e privilégio de ter permitido chegar até aqui e em todos os momentos de minha vida.

A minha família, principalmente meus pais, pelas ajudas e compreensão pelos muitos momentos em que estive ausente. Amo vocês.

Ao meu amado esposo por estar sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e acreditando no meu trabalho. Obrigada pelo amor, carinho e compreensão que sempre tivestes comigo. Sou muito grata por tudo.

Ao meu orientador, Professor João Araujo, que me recebeu em seu laboratório e confiou no meu trabalho, pela sua amizade, ajudas e sugestões que possibilitaram a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal (LCTV) da UFRRJ, Tarcísio, Leandro, João, Fernanda, Maria e Eliane, pela amizade, pelos ensinamentos, sugestões e ajudas que contribuíram para realização desse trabalho.

À saudosa Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo ensino público gratuito e de qualidade e a todos os mestres queridos que compartilharam comigo os seus conhecimentos.

Aos funcionários do Instituto de Agronomia e da Secretaria da Pós Graduação em Fitotecnia pela atenção com que me atenderam durante o mestrado.

A PESAGRO de Seropédica/RJ, em especial à funcionária Cida Prado pela grande ajuda ao me disponibilizar o material vegetal utilizado neste trabalho.

A minha amiga Larissa Brasil pelos momentos de alegria, companheirismo, tristezas e amizade que passamos juntas durante a graduação e do mestrado.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia pela amizade.

A todos que de uma forma ou de outra ajudaram para a realização deste trabalho.

Aos amigos e pessoas que embora não citadas colaboraram e incentivaram, para que este trabalho fosse cumprido.

Ao CNPq pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (**Portaria 206, de 04 de setembro de 2018 da CAPES**).

RESUMO GERAL

VICENTE, Michele Cagnin. “**Propagação *in vitro* e aclimatização de *Cattleya walkeriana* Gardner cultivadas em meios de cultura alternativos**” 2019. 112p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Cattleya walkeriana Gardner é uma orquídea endêmica do Brasil de alto valor comercial e muito cobiçada pelos orquidófilos. A exploração extrativista e a degradação do seu habitat natural atrelados às especificidades reprodutivas da família são fatores que a colocam entre as espécies da flora em risco de extinção na natureza. Deste modo, a propagação *in vitro* se mostra como uma valiosa ferramenta para obtenção de mudas, visando o abastecimento do mercado e a preservação da espécie. Nesse contexto buscou-se avaliar o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner cultivadas em diferentes meios de cultura em sistema de propagação *in vitro* e posteriormente o desempenho das mesmas *ex vitro* pela aclimatização em casa de vegetação. O trabalho foi constituído de três experimentos, no primeiro, protocormos com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram subcultivados durante 240 dias nos meios de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS); Knudson C (1946) modificado por Morel (1965) (KC); Fertilizante Peters[®] (PE); Fertilizante Kristalon[™] Laranja (KL); Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®] (BG). No segundo experimento as plântulas provenientes dos tratamentos MS, PE, KL e BG do primeiro experimento foram levadas para aclimatização em casa de vegetação onde foram inoculadas com 1,0 ml da suspensão de *Azospirillum brasilense* SP 245 (BR 11005) (AZ); 1,0 ml da suspensão de *Microvirga vignae* BR 3299 (MV); 1,0 ml de H₂O destilada, sendo este o tratamento controle (CO). As mesmas permaneceram pelo período de 120 dias em aclimatização. E no terceiro experimento, com o objetivo de validar os resultados dos experimentos anteriores, protocormos de *Cattleya walkeriana* Gardner foram subcultivados durante 240 dias *in vitro* nos meios de cultura KL e BG, estes tiveram as concentrações de sacarose e de carvão ativado iguais. No primeiro experimento foi possível concluir que o meio Knudson C (1946) modificado por Morel (1965) não é adequado para propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* sob as condições deste experimento. O meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®] e o meio de cultura a base de fertilizante Kristalon[™] Laranja se mostraram os mais eficientes no desenvolvimento das plântulas, adicionalmente o meio de cultura a base de fertilizante Peters[®] também se mostrou como boa alternativa em substituição ao meio de cultura Murashige e Skoog (1962). Não houve correlação positiva e/ou negativa entre o pH dos meios de culturas ao final do subcultivo e as variáveis biométricas avaliadas. No segundo experimento, pode-se concluir que quando aclimatizadas, as mudas provenientes do meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®] foram as que apresentaram os melhores resultados independentemente do fator inoculação, logo, pode-se concluir que o meio de cultura interfere na etapa de aclimatização e que o meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®] é o mais indicado na propagação *in vitro* das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner. No terceiro experimento, tanto na etapa *in vitro* quanto na etapa de aclimatização os melhores resultados foram observados para as plântulas provenientes do cultivo no meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®], comprovando a superioridade deste meio em relação ao meio a base de fertilizante Kristalon[™] Laranja na propagação de *Cattleya walkeriana* Gardner.

Palavras-chave: orquídeas, meios de cultura, inoculação bacteriana.

GENERAL ABSTRACT

VICENTE, Michele Cagnin. "***In vitro* propagation and acclimatization of *Cattleya walkeriana* Gardner grown in alternative culture media**" 2019. 112p. Dissertation (Master in Plant Science). Institute of Agronomy, Department of Plant Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Cattleya walkeriana Gardner is an orchid endemic to Brazil of high commercial value and much coveted by orchid growers. Extractive exploitation and the degradation of its natural habitat, coupled with the reproductive specificities of the family, are factors that place it among the flora species at risk of extinction in the wild. In this way, *in vitro* propagation proves to be a valuable tool to obtain seedlings, aiming at supplying the market and preserving the species. In this context we sought to evaluate the development of *Cattleya walkeriana* Gardner seedlings grown in different culture media *in vitro* propagation system and later the *ex vitro* performance by acclimatization in greenhouse. The work consisted of three experiments; in the first one, protocorms approximately 1.0 cm in length were subcultured for 240 days in the Murashige and Skoog culture media (1962) (MS); Knudson C (1946) modified by Morel (1965) (KC); Peters[®] Fertilizer (PE); Kristalon[™] Orange Fertilizer (KL); Culture medium B&G Orchidées[®] (BG). In the second experiment the seedlings from the treatments MS, PE, KL and BG of the first experiment were taken to acclimatization in greenhouse where they were inoculated with 1.0 ml of the suspension of *Azospirillum brasilense* SP 245 (BR 11005) (AZ); 1.0 ml of the suspension of *Microvirga vignae* BR 3299 (MV); 1.0 ml of distilled H₂O, this being the control treatment (CO). They remained for a period of 120 days in acclimatization. And in the third experiment, in order to validate the results of the previous experiments, *Cattleya walkeriana* Gardner protocorms were subcultured for 240 days *in vitro* in the KL and BG culture media, which had the concentrations of sucrose and activated carbon equal. In the first experiment it was possible to conclude that the Knudson C (1946) modified by Morel (1965) medium is not suitable for *in vitro* propagation of *Cattleya walkeriana* seedlings under the conditions of this experiment. The B&G Orchidées[®] supply medium and the Kristalon[™] Orange fertilizer culture medium proved to be the most efficient in seedling development, in addition the Peters[®] fertilizer culture medium was also shown as a good substitute for the medium of Murashige and Skoog (1962). There was no positive and / or negative correlation between the pH of the culture media at the end of the subculture and the biometric variables evaluated. In the second experiment, it can be concluded that, when acclimatized, the seedlings from the B&G Orchidées[®] supply medium were the ones that presented the best results independently of the inoculation factor, so it can be concluded that the culture medium interferes in the acclimatization and that the B&G Orchidées[®] supply medium is the most indicated in the *in vitro* propagation of the *Cattleya walkeriana* Gardner seedlings. In the third experiment, both the *in vitro* and the acclimatization stages, the best results were observed for the seedlings from the cultivation in the B&G Orchidées[®] supply culture medium, demonstrating the superiority of this medium in relation to the Kristalon[™] Orange based fertilizer medium in propagation of *Cattleya walkeriana* Gardner.

Keywords: orchids, culture media, bacterial inoculation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mapa de ocorrência de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner.....	06
FIGURA 2. <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner - XIII Exposição de Orquídeas e Bromélias da UFRRJ.....	08
FIGURA 3. Frasco contendo protocormos de <i>Cattleya walkeriana</i> adquirido na PESAGRO-Seropédica/RJ.....	30
FIGURA 4. Protocormos de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner com altura média de 1,0 cm de comprimento utilizados para o subcultivo.....	31
FIGURA 5. Etapas para aferição do pH dos meios de cultura ao final do subcultivo.....	33
FIGURA 6. Frascos do tratamento BG contaminados por fungo do gênero <i>Penicillium</i> (A); Frasco do tratamento KC contaminado por fungo do gênero <i>Cladosporium</i>	34
FIGURA 7. Frascos contendo meio KC, evidenciando o sintoma de clorose seguido de oxidação das plântulas.....	36
FIGURA 8. Alguns frascos do tratamento KC no dia da coleta, ou seja, após 240 dias de cultivo das plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner <i>in vitro</i>	37
FIGURA 9. Plântulas do tratamento KC, fora dos frascos, no dia da coleta, ou seja, após 240 dias de cultivo das plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner <i>in vitro</i>	38
FIGURA 10. Massa fresca total (gramas) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i>	40
FIGURA 11. Número de folhas (NF) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i>	41
FIGURA 12. Comprimento da maior folha (CMF) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i>	41
FIGURA 13. Número de raiz (NR) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i>	42
FIGURA 14. Comprimento da maior raiz (CMR) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i>	42
FIGURA 15. pH _{final} dos meios de cultura após 240 dias de cultivo de <i>Cattleya walkeiana</i> Gardner <i>in vitro</i>	45

FIGURA 16. Comparação visual do desenvolvimento das plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner após oito meses de cultivo nos meios MS (Murashige e Skoog, 1962), PE (Fertilizante Peters [®] (20-20-20)), KL (Fertilizante Kristalon TM Laranja (6-12-36)) e BG (Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées [®]).....	47
FIGURA 17. Mudas de <i>Cattleya walkeriana</i> em aclimatização antes de receber a inoculação bacteriana (Seropédica, 2018).....	58
FIGURA 18. Mudas de <i>Cattleya walkeriana</i> em aclimatização sendo inoculadas: suspensão de bacteriana (A); Inoculação com 1,0 ml da suspensão bacteriana no colo da raiz (Seropédica, 2018).....	60
FIGURA 19. Percentual de sobrevivência (SB) por tratamento (Fator B) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	65
FIGURA 20. Percentual de sobrevivência (SB) por tratamento (Fator A) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	65
FIGURA 21. Massa fresca total (MFT) por tratamento (Fator B) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	66
FIGURA 22. Massa fresca total (MFT) por tratamento (Fator A) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	67
FIGURA 23. Número de folhas (NF) por tratamento (Fator B) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	67
FIGURA 24. Número de folhas (NF) por tratamento (Fator A) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	68
FIGURA 25. Comprimento da maior folha (CMF) por tratamento (Fator B) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	68
FIGURA 26. Comprimento da maior folha (CMF) por tratamento (Fator A) das mudas de <i>Cattleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	69

FIGURA 27. Número de raiz (NR) por tratamento (Fator B) das mudas de <i>Catleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	70
FIGURA 28. Número de raiz (NR) por tratamento (Fator A) das mudas de <i>Catleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	70
FIGURA 29. Comprimento da maior raiz (CMR) por tratamento (Fator B) das mudas de <i>Catleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	71
FIGURA 30. Comprimento da maior raiz (CMR) por tratamento (Fator A) das mudas de <i>Catleya walkeiana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.....	72
FIGURA 31. Plântulas de <i>Catleya walkeriana</i> Gardner após 240 dias de aclimatização em casa de vegetação nos diferentes tratamentos. Seropédica, 2018.....	76
FIGURA 32. Protocormos de <i>Catleya walkeriana</i> Gardner inoculadas em meio de cultura BG e KL. Seropédica, 2018.....	85
FIGURA 33. Massa fresca total (gramas) das mudas de <i>Catleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Seropédica, 2018.....	90
FIGURA 34. Número de folhas (NF) das mudas de <i>Catleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Seropédica, 2018.....	90
FIGURA 35. Comprimento da maior folha (CMF) das mudas de <i>Catleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Seropédica, 2018.....	91
FIGURA 36. Número de raiz (NR) das mudas de <i>Catleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Seropédica, 2018.....	91
FIGURA 37. Comprimento da maior raiz (CMR) das mudas de <i>Catleya walkeiana</i> após 240 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Seropédica, 2018.....	92
FIGURA 38. pH _{final} dos meios de cultura após 240 dias de cultivo de <i>Catleya walkeiana</i> Gardner <i>in vitro</i> . Seropédica, 2018.....	93
FIGURA 39. Comparação visual do desenvolvimento das plântulas de <i>Catleya walkeriana</i> Gardner após oito meses de cultivo nos meios KL (Fertilizante Kristalon TM Laranja e BG (Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées [®])).	94
FIGURA 40. Percentual de sobrevivência (SB) das mudas de <i>Catleya walkeriana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.....	95

FIGURA 41. Massa fresca total (MFT) das mudas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.....	96
FIGURA 42. Número de folhas (NF) das mudas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.....	96
FIGURA 43. Comprimento da maior folha (CMF) das mudas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.....	97
FIGURA 44. Número de raiz (NR) das mudas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.....	97
FIGURA 45. Comprimento da maior raiz (CMR) das mudas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.....	98
FIGURA 46. Comparação visual do desenvolvimento das plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner após quatro meses de aclimatização. Seropédica, 2019.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Espécies de Orquídeas do gênero <i>Cattleya</i> presentes na Lista Vermelha de espécies ameaçadas de extinção.....	05
TABELA 2. Composição química dos meios de cultura utilizados para o crescimento <i>in vitro</i> de <i>Cattleya walkeriana</i> (mg.L ⁻¹).....	31
TABELA 3. Outros componentes presentes apenas no meio MS (Murashige e Skoog, 1962).....	32
TABELA 4. Resultados da avaliação qualitativa realizada após 150 dias de subcultivo no tratamento KC. Número total de plantas que apresentaram sintoma de clorose seguida de oxidação e plantas que não apresentaram sintoma de clorose e consequentemente oxidação nas 19 repetições deste tratamento.....	35
TABELA 5. Médias da massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e do potencial hidrogeniônico dos meios de cultura (pH _{final}) após oito meses de cultivo de protocormos de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner <i>in vitro</i>	39
TABELA 6. Custo médio por litro dos meios de cultura utilizados neste trabalho.....	48
TABELA 7. Resultado da análise de variância (ANAVA) para os parâmetros avaliados, após quatro meses de aclimatização das plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner produzidas <i>in vitro</i>	61
TABELA 8. Teste de média para as variáveis analisadas após quatro meses de aclimatização de plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultura.....	61
TABELA 9. Teste de média para as variáveis analisadas após quatro meses de aclimatização de plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner cultivadas <i>in vitro</i> , comparação das médias dentro de cada tratamento do fator inoculação.....	63
TABELA 10. Resultado das variáveis analisadas antes (<i>in vitro</i>) e depois (<i>ex vitro</i>) da aclimatização das mudas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner.....	74
TABELA 11. Composição química dos meios de cultura Kristalon TM Laranja (KL) e suprimento B&G Orchidées [®] (BG) utilizados para o desenvolvimento <i>in vitro</i> de protocormos de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner.....	86
TABELA 12. Médias da massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e do potencial	

hidrogeniônico dos meios de cultura (pH_{final}) após oito meses de cultivo de protocormos de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner <i>in vitro</i> . UFRRJ, Seropédica – 2018.....	89
TABELA 13. Médias da massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e do potencial hidrogeniônico dos meios de cultura (pH_{final}) após oito meses de cultivo de protocormos de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner <i>in vitro</i> . UFRRJ, Seropédica – 2018.....	94
TABELA 14. Médias do percentual de sobrevivência (SB), massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR) e do comprimento da maior raiz (CMR) após quatro meses de aclimatização de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner em casa de vegetação. UFRRJ, Seropédica - 2019.....	95
TABELA 15. Resultado das variáveis analisadas antes (<i>in vitro</i>) e depois (<i>ex vitro</i>) da aclimatização das mudas de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner. Seropédica, 2019.....	100
TABELA 16. Custo médio/litro dos meios de cultura utilizados neste trabalho.....	101

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	01
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
1.1. A FAMÍLIA ORCHIDACEAE.....	03
1.2. O GÊNERO <i>CATTLEYA</i>	04
1.3. PROPAGAÇÃO IN VITRO DE ORQUÍDEAS.....	08
1.3.1. MEIOS DE CULTURA.....	09
1.3.2. POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH).....	13
1.4. ACLIMATIZAÇÃO.....	13
1.5. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP).....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	17
CAPÍTULO I. PROPAGAÇÃO IN VITRO DE <i>Catleya walkeriana</i> Gardner EM MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS	25
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	50
CAPÍTULO II. INOCULAÇÃO DE PLÂNTULAS DE <i>CATTLEYA WALKERIANA</i> COM <i>Azospirillum brasilense</i> E <i>Microvirga vignae</i> DURANTE ACLIAMTIZAÇÃO	53
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	78

CAPÍTULO III. COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE CULTURA KRISTALON LARANJA E SUPRIMENTO B&G ORCHIDÉES® NO DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO E EX VITRO</i> DE <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner.....	80
RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	82
1. INTRODUÇÃO.....	83
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	85
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
4. CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
APÊNDICE.....	105

INTRODUÇÃO GERAL

A atividade florícola é uma atividade agrícola em expansão no Brasil, vem ganhando espaço e se caracterizando como um dos mais promissores segmentos da horticultura no campo do agronegócio nacional (OLIVEIRA *et al.* 2016; SILVA, 2016). Segundo Oliveira *et al.* (2016) e Neves e Pinto (2015), o Produto Interno Bruto (PIB) da cadeia produtiva de Flores e Plantas Ornamentais do Brasil, em 2014, foi de R\$ 4,51 bilhões, ou 0,6% do PIB agrícola do Brasil e o mercado vem exibindo taxas de crescimento da ordem de 9 a 10% ao ano. O Brasil, segundo dados do IBRAFLOR (2017), encontra-se entre os 15 maiores produtores de flores e plantas ornamentais do mundo, apresentando cerca de 8.250 produtores, 15.000 ha em área cultivada, o tamanho médio de 1,8 ha/propriedade, produzindo mais de 350 espécies. É uma atividade dominada principalmente por pequenos produtores, se destacando como boa alternativa para geração de emprego e renda. Este setor emprega em média 5,24 pessoas/ha, número considerado alto se comparado com outros setores agrícolas (Bonato, 2015). Em 2014 os estados de SP, RS e SC foram os três primeiros em percentual de área destinada ao cultivo de flores e plantas ornamentais, mas em se tratando da distribuição percentual do faturamento brasileiro de flores e plantas ornamentais os estados de SP, RJ e MG foram os pioneiros em faturamento (NEVES e PINTO, 2015).

A participação brasileira no mercado florícola internacional ainda é muito pequena, do total do volume financeiro comercializado pelos produtores, apenas 3% foram comercializados no mercado externo (SILVA, 2016; NEVES e PINTO, 2015), no entanto, esse mercado pode oferecer boas perspectivas aos produtores brasileiros desse segmento. De acordo com Bonato (2015), as características brasileiras de clima, geografia e biodiversidade favorecem a expansão da atividade no país, podendo inclusive proporcionar vantagens competitivas em relação a outros países.

As orquídeas são plantas ornamentais comercializadas em vaso que apresentam elevado valor comercial, estando entre as espécies ornamentais mais produzidas e comercializadas no país (KUHN *et al.* 2014; SCHNEIDER, 2014). Segundo Galdiano Júnior *et al.* (2012), o comércio internacional de orquídeas representa cerca de 8% do mercado mundial de plantas ornamentais, além disso, inúmeras espécies de orquídeas possuem importância muito grande na indústria alimentícia, medicinal e de cosméticos (Silva *et al.* 2016). O Brasil é um dos países com a maior diversidade de espécies de orquídeas, sendo registrada a ocorrência de 235 gêneros e aproximadamente 2500 espécies, sendo que cerca de

60% dessas são endêmicas da Mata Atlântica (CNCFLORA, 2018; SOUZA & LORENZI, 2012).

Contudo, as constantes agressões e ameaças de destruição aos diferentes biomas brasileiros têm colocado em risco várias espécies dessa família. Além disso, a coleta indiscriminada na natureza e o ciclo de vida altamente especializado das orquídeas intensificam esse problema (ALMEIDA, 2014). Infelizmente, na atual Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção encontram-se 68 gêneros de orquídeas, com um total de 168 espécies, ou seja, aproximadamente 7% das espécies estão ameaçadas de extinção na natureza. Nessa lista, o gênero *Cattleya* apresenta o maior número de espécies ameaçadas de extinção, com 15 espécies, sendo 9% do total de espécies listadas (CNCFLORA, 2018).

Dentro deste contexto, o emprego de técnicas de propagação *in vitro* tem sido muito relevante do ponto de vista comercial e ecológico para essa família. A semeadura e a clonagem de orquídeas *in vitro* têm auxiliado na preservação destas espécies, além de ser uma alternativa economicamente viável na produção comercial de plantas ornamentais, possibilitando a produção de mudas em grande quantidade e em espaço reduzido (STANCATO *et al.* 2001). Uma das fases mais críticas da propagação *in vitro* é a aclimatização das mudas, pois essas são retiradas de um ambiente controlado e são expostas ao ambiente *ex vitro*, passando por um momento de muito estresse que pode levar à morte (LEITÃO *et al.* 2005).

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. A família Orchidaceae

Orchidaceae é considerada a família mais diversa na Floresta Atlântica (COSTA, 2010) representando também a maior família de Angiospermas em número de espécies, incluindo cerca de 899 gêneros e 27 mil espécies aceitas, excluindo híbridos artificiais (CONTI, 2016). Apresenta distribuição cosmopolita, e, no Brasil já foram registradas a ocorrência de aproximadamente 235 gêneros e 2.500 espécies (SOUZA e LORENZI, 2012). São plantas herbáceas, perenes e bastante diversificadas (SCHNEIDERS, 2012), podem apresentar hábito terrestre, epifítico ou rupícola (KRAHL *et al.* 2015). A maioria das espécies de orquídeas apresenta metabolismo CAM (metabolismo do ácido crassuláceo), mas há aquelas que são C3/CAM facultativas (Metabolismo C3 e Metabolismo do Ácido Crassuláceo), poucas espécies apresentam metabolismo C3 exclusivo, e não foi constatada nenhuma com metabolismo C4 (SAWAMURA, 2016). O caule na maioria das espécies é espessado e denominado de pseudobulbo, podendo ser simpodial ou monopodial, muitas vezes rizomatoso, e raramente são cormos (KRAHL *et al.* 2015; SCHNEIDER, 2014). As folhas são alternas, raramente opostas, dísticas ou espiraladas, simples, inteiras, com nervação geralmente paralelinérvea (SCHNEIDER, 2014). No geral as espécies de orquídeas apresentam crescimento bastante lento, permanecendo no estado juvenil por um longo período de tempo até atingir a maturação, podendo levar de 3 a 10 anos para florescerem (SUZUKI *et al.* 2010). Cada espécie de orquídea, com exceção aos gêneros *Arundina*, *Phalaenopsis* e *Vanda*, floresce somente uma vez no ano e sempre na mesma época (FARIA *et al.* 2012). Nas orquídeas, a polinização natural é feita principalmente por abelhas, borboletas e moscas (VENDRAME *et al.* 2015). A maioria das espécies de orquídeas apresentam flores hermafroditas e ocorrendo a polinização e conseqüentemente a fecundação do pólen no estigma, ocorrerá simultaneamente a senescência da flor e a formação do fruto, denominado de cápsula (FARIA *et al.* 2012). A maturidade dessa cápsula varia de acordo com o gênero e/ou espécie, podendo levar até 10 meses (VENDRAME *et al.* 2015; FARIA *et al.* 2012). É nessa cápsula que ficam armazenadas milhares de sementes diminutas e que geralmente não possuem reservas nutritivas, apresentando um padrão bastante particular de germinação e desenvolvimento, em que na natureza é necessário que ocorra associação simbiótica entre as sementes de orquídeas com fungos micorrízicos específicos para que ocorra a germinação, estima-se que apenas aproximadamente 5% das sementes dessas plantas germinam em

condições naturais (VENDRAME *et al.* 2015; ALMEIDA, 2014; CORREIA, 2012). As sementes de orquídeas apresentam um embrião de aproximadamente 0,1 mm que ao se desenvolver, durante a germinação, formam estruturas denominadas de protocormos (ARAÚJO *et al.* 1999). Após a associação com um fungo micorrízico específico, formam-se enovelados de hifas fúngicas no espaço intracelular das células parenquimáticas do embrião, chamados pelotons, a degradação destas estruturas fornece carbono e sais minerais ao protocormo, estrutura tuberiforme geralmente clorofilada, depois de alguns dias ou semanas o protocormo desenvolve um ápice caulinar com primórdio foliar e ocorre a formação de raiz, inclusive este comportamento diferenciado também ocorre na propagação *in vitro* (ALMEIDA, 2014).

Além da propagação sexuada, há também possibilidade de propagação vegetativa por meio da divisão de rizomas ou pelo enraizamento de brotos, contudo a formação de brotos é lenta e restrita a algumas brotações emitidas por ano em cada planta, conseqüentemente fornecerá poucas mudas e em longo tempo, no geral as orquídeas apresentam crescimento bastante lento na natureza (CONTI, 2016; SCHNEIDER, 2014).

Entre os gêneros de maior destaque no mercado florícola estão *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium*, *Epidendrum*, *Sophronitis* e *Dendrobium* (SILVA, 2014) Dentre estes, o gênero *Cattleya* se mostra como um dos favoritos e tem sido o mais popular, cultivado e comercializado, evidenciando a sua importância econômica no agronegócio florícola (ARAÚJO *et al.* 2012). E, infelizmente, é o gênero dessa família que mais apresenta espécies em extinção na natureza (CNCFLORA, 2018).

1.2. O gênero *Cattleya*

Cattleya é um gênero exclusivamente neotropical que abrange aproximadamente 120 espécies, principalmente epífitas e, mais raramente, rupícolas e terrícola (BUZATTO *et al.* 2010). A grande característica desse gênero é a presença de flores, em sua maioria, de cor lilás-róseas, de tamanho grande e labelo não fundido a coluna (CONTI, 2016; SCHNEIDER, 2014). Na lista da Flora do Brasil 2020 em Construção (2018) estão catalogadas para o país 102 espécies de orquídeas do gênero *Cattleya*, sendo 95 endêmicas, ou seja, cerca de 93% das espécies são exclusivas do Brasil. Sendo o gênero *Cattleya* de grande importância ao comércio de plantas ornamentais, o elevado valor ornamental das espécies desse gênero as torna alvo de coletas irregulares advindas das extração predatória, o que, aliado à redução de

hábitats naturais, contribui para a diminuição das populações naturais, levando inúmeras espécies ao risco de extinção (CONTI, 2016; SASAMORI *et al.* 2014).

Entre as orquídeas do gênero *Cattleya* presentes no Brasil, 18 espécies (Tabela 1), que equivale a 18% das espécies desse gênero, encontram-se na Lista Vermelha de espécies da flora ameaçadas de extinção publicada pelo Ministério do Meio Ambiente, a partir da avaliação do risco de extinção das espécies conduzido pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA, 2018).

Tabela 1. Espécies de orquídeas do gênero *Cattleya* presentes na Lista Vermelha de espécies ameaçadas de extinção (Fonte: CNCFLORA, 2018).

Item	Espécie	Situação na Natureza
01	<i>Cattleya aclandiae</i> Lindl.	VU
02	<i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden e Rchb.f.	NT
03	<i>Cattleya bicolor</i> Lindl.	NT
04	<i>Cattleya dormaniana</i> Rchb.f.	EN
05	<i>Cattleya granulosa</i> Lindl.	VU
06	<i>Cattleya guttata</i> Lindl.	VU
07	<i>Cattleya harrisoniana</i> Batem. ex Lindl.	VU
08	<i>Cattleya intermedia</i> Grah.	VU
09	<i>Cattleya labiata</i> Lindl.	VU
10	<i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f.	NT
11	<i>Cattleya porphyroglossa</i> Linden e Rchb.f.	CR
12	<i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f.	EN
13	<i>Cattleya schofieldiana</i> Rchb.f.	CR
14	<i>Cattleya tenuis</i> Campacci e Vedovello	EN
15	<i>Cattleya tigrina</i> A.Rich	VU
16	<i>Cattleya velutina</i> Rchb.f.	VU
17	<i>Cattleya walkeriana</i> Gardner	VU
18	<i>Cattleya warneri</i> T.Moore	VU

Criticamente em Perigo (CR): São espécies que estão enfrentando um risco extremamente elevado de extinção na natureza. **Em perigo (EN):** São espécies que enfrentam um risco muito elevado de extinção na natureza. **Vulnerável (VU):** São espécies que enfrentam um risco de extinção elevado na natureza. **Quase ameaçada (NT):** Espécies que no momento não se qualificam como ameaçadas, mas estão perto ou suscetíveis de serem qualificadas em uma categoria de ameaça num futuro próximo.

Destacou-se na Tabela 1 a espécie *Cattleya walkeriana* Gardner, endêmica do Brasil, presente na Mata Atlântica e no Cerrado brasileiro, nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Tocantins (Figura 1). Têm-se indícios de que sua população tenha sofrido uma redução de cerca de 30% nos últimos anos, estando entre as espécies consideradas vulneráveis, ou seja, que enfrenta risco elevado de extinção na natureza (CNCFlora, 2018).

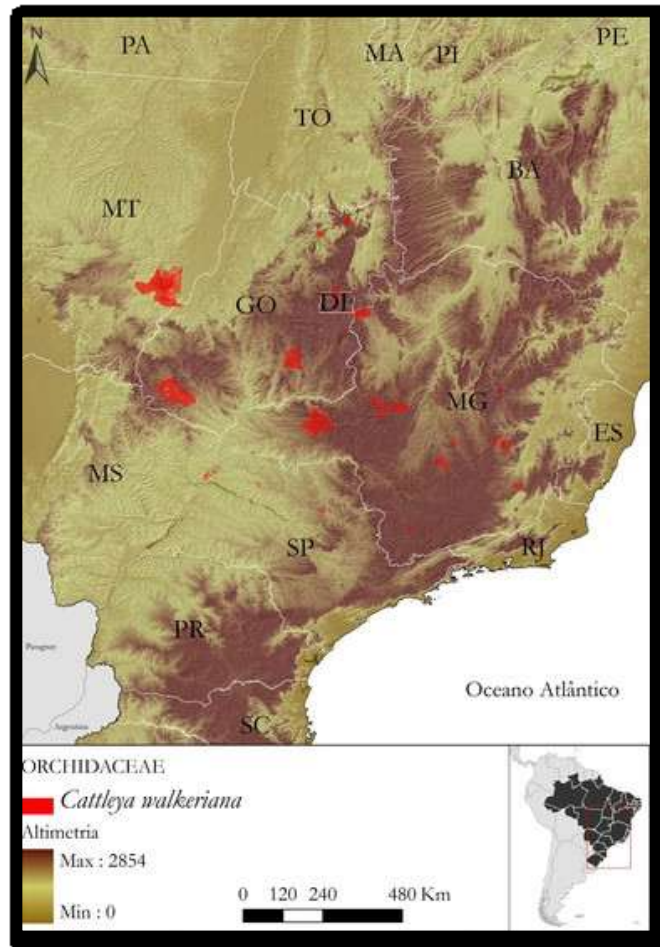


Figura 1. Mapa de ocorrência de *Cattleya walkeriana* Gardner (Fonte: CNCFLORA, 2018).

A espécie *Cattleya walkeriana* Gardner (Figura 2) foi descoberta por Martin Gardner no período de 1839/1840 e descrita pela primeira vez no ano de 1843 no Hooker's London Journal Botany, recebeu esse nome em virtude da homenagem de Gardner ao seu assistente Edward Walker (MENEZES, 2011). A espécie pertence à Família Orchidaceae, Subfamília Epidendroideae, Tribo Epidendreae, Subtribo Laeliinae, tendo hábito predominantemente epifítico (seus hospedeiros variam de gigantescas árvores a pequenos arbustos), rupícola (em afloramentos rochosos de calcário) e também em matas ciliares (MENEZES, 2011; SILVA e

MILANEZE-GUTIERRE, 2004). Apresenta metabolismo do tipo CAM (Crassulaceae acid metabolism), crescimento simpodial, sendo considerada uma espécie de pequeno porte dentro de seu gênero, com altura de aproximadamente 15 cm. São unifoliadas, embora raramente possam ocorrer pseudobulbos com duas folhas, estas que são obovadas, de ápice arredondado e base obtusa, com aspecto suculento-coriáceas, as nervuras são paralelinérvias com apenas a nervura central aparente, são hipostomáticas (estômatos apenas na face abaxial), sobre ambas as faces foliares há espessa cutícula, o que pode ser considerado um caráter xeromórfico, sendo esta uma das características das orquídeas de ambientes ensolarados (SILVA e MILANEZE-GUTIERRE, 2004). Os pseudobulbos são fusiformes e formados por três entrenós, no rizoma, os entrenós são relativamente curtos, o que torna os pseudobulbos próximos uns dos outros, as raízes são longas, relativamente grossas e por vezes ramificadas (RODRIGUES *et al.* 2013; SILVA e MILANEZE-GUTIERRE, 2004). Suas flores possuem coloração rosa-lilás, com labelo apresentando tonalidade purpúrea com pequena mancha branca no lobo mediano e no ápice da coluna, as flores são visitadas pela abelha *Melipona scutellaris* (nome popular uruçú), por abelhas do gênero *Euglossa* e também por beija-flores, sendo esses os potenciais polinizadores naturais da espécie. A floração no planalto central ocorre entre os meses de abril e junho, sendo maio o pico de floração (MENEZES, 2011). Em seu habitat natural, como por exemplo, no planalto central em regiões de altitude a temperatura varia entre 6°C e 22°C no período seco e frio, época que ocorre a floração, quanto então a umidade varia de 15% a 50%. Já no período quente e chuvoso a temperatura varia entre 22°C e 33°C, com umidade relativa do ar entre 30% e 80% (MENEZES, 2011). Ainda segundo Menezes (2011) o sucesso no cultivo de *Cattleya walkeriana* parece estar associado a condições de umidade relativa do ar entre 20% e 90%, luminosidade entre 50% e 80%, sendo preferencialmente 70%, temperaturas entre 15°C e 33°C e aeração nas raiz das plantas.



Figura 2. *Cattleya walkeriana* Gardner - XIII Exposição de Orquídeas e Bromélias da UFRRJ - Seropédica/RJ, 2018 (Foto da Autora).

1.3. Propagação *in vitro* de orquídeas

A propagação *in vitro* é uma importante ferramenta na propagação de plantas cujas sementes apresentam dificuldade de germinação na natureza, na produção de clones, no melhoramento genético, na produção de plantas livres de vírus, redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie, entre outros (CARVALHO *et al.* 2006). Como já mencionado, as orquídeas apresentam sementes diminutas que geralmente não possuem reservas nutritivas, com padrões bastante peculiares de germinação e desenvolvimento, provavelmente, condições que motivaram Lewis Knudson (1922) a desenvolver o primeiro procedimento prático descrito para germinar assimbioticamente sementes de orquídeas. O autor, partindo da hipótese de que a germinação das sementes dependia da associação simbiótica com fungos, propôs que ao invés de uma ação direta desses microrganismos sobre o embrião, poderia ter o mesmo efeito inoculando sementes de orquídeas oriundas de *Cattleya*, *Laelia* e *Epidendrum* sobre um meio de cultura constituído de sacarose, ágar e sais. Com este procedimento Knudson (1922) conseguiu um percentual de germinação muito superior aos 5% que geralmente ocorre na natureza. Seu experimento foi pioneiro e até hoje serve de base para a propagação *in vitro* de orquídeas (DRONK, 2004; FRANCO, 1942).

Deste modo, a técnica de semeadura *in vitro* de orquídeas tornou-se bastante relevante do ponto de vista comercial e também ecológico, uma vez que essa técnica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da associação simbiótica com fungos micorrízicos, muitas vezes espécie-específicos (CARVALHO *et al.* 2012; LOPES *et al.* 2006). Assim, além de permitir a produção em grande escala de plantas para comercialização, contribui para minimizar as coletas predatórias e permite manter a variabilidade genética da população original, o que é muito importante no caso dessas plantas serem reintroduzidas na natureza (CONTI, 2016).

Recentemente, tem-se empregado o termo biofábrica para as empresas que produzem e comercializam mudas propagadas *in vitro*. No Brasil, as primeiras biofábricas foram criadas na década de 1980, e o número desses estabelecimentos vem crescendo a cada ano, a maioria dessas empresas está localizada na região Sudeste, e as principais espécies produzidas são ornamentais, seguida das frutíferas, espécies florestais (silvicultura) e grandes culturas, neste último caso com destaque para a cana-de-açúcar (CARVALHO *et al.* 2012).

Contudo, ainda segundo Carvalho *et al.* (2012), embora algumas décadas tenham se passado, no geral, muitas pesquisas ainda são necessárias para a maior eficiência e otimização dos custos de produção nessa área, como, por exemplo, com a adoção de práticas adequadas, uso apropriado de equipamentos e de recursos, utilização de meios de cultura que visem à redução do custo unitário por muda produzida e sem comprometer a qualidade das mudas, fontes de luz alternativas, entre outros, uma vez que a maior interação entre todos os elos da cadeia produtiva são fundamentais para a expansão do setor.

1.3.1. Meios de Cultura

Estudos da matéria seca de plantas demonstram que cerca de 90% da composição elementar das mesmas apresenta os elementos C, O e H e os 10% restantes são representados pelos elementos minerais. Sendo a absorção de C proveniente do CO₂ atmosférico, O e H da água e os nutrientes minerais da solução do solo (FAQUIN, 2005). Desta forma, no cultivo *in vitro*, os meios de cultura desempenham importante função, pois devem oferecer as condições necessárias ao crescimento e desenvolvimento das plantas, servindo de suporte físico para as mesmas e também proporcionar todos os nutrientes necessários à sua sobrevivência (BRAZ *et al.* 2013; CARVALHO e VIDAL, 2003).

A composição do meio de cultivo pode ser formulada com diferentes combinações de acordo com a necessidade nutricional de cada espécie, assim é possível verificar na literatura o uso de infinitas combinações de macro e micronutrientes, vitaminas, açúcares, ágar-ágar, carvão ativado, entre outros, na composição dos meios de cultura utilizados na propagação *in vitro* de orquídeas a partir de sementes, entretanto, em alguns casos, essas combinações forneceram respostas positivas, mas por vezes, os resultados não apresentam êxito e são divergentes (Freitas *et al.*2014; Guson *et al.*2012; Costa *et al.*2007). Embora a técnica de germinação assimbiótica de sementes de orquídeas esteja próxima de completar um século, estudos demonstram que há uma especificidade muito grande entre a composição química do meio e o genótipo; por isso para cada espécie ou grupo de espécies de orquídeas há um meio mais apropriado, ademais, ainda há uma grande carência de informações sobre a nutrição de orquídea (Rodrigues *et al.*2012; Cunha *et al.*2011).

Nos meios de cultura a sacarose é a principal fonte de açúcar usada para compor o esqueleto carbônico e obtenção de energia pelas células durante o crescimento e desenvolvimento *in vitro*, sendo essencial para o crescimento das plantas, pois nestas condições a fotossíntese é limitada e as plantas necessitam obter carbono do meio de cultivo (CONTI, 2016; SCHNEIDER, 2014).

O ágar-ágar é o agente geleificante de natureza polissacarídica produzido por algas (*Gelidium amansii*), tradicionalmente mais empregado na preparação de meios de cultura semissólidos, trata-se de um polissacarídeo solúvel em água, com a capacidade de fundir-se a 100°C e de permanecer semissólido à temperatura ambiente, sua função no meio de cultivo *in vitro* é basicamente de dar suporte às plantas (SCHNEIDER, 2014; SOARES *et al.* 2014; CHAPLA *et al.* 2009).

O carvão ativado é um pó finamente moído obtido a partir da combustão da madeira. No meio de cultura diversos estudos vêm demonstrando alguns efeitos benéficos deste componente, entre eles capacidade de adsorção de substâncias tóxicas presentes no meio de cultura, como, por exemplo, o 5-hidroximetil-furfural (HMF), o qual é produzido a partir da desidratação da sacarose durante a autoclavagem, adsorção de substâncias inibitórias presentes no ágar e também de metabólitos tóxicos, tais como substâncias fenólicas, etileno e ácido abscísico que são eliminados pelas próprias plântulas (PEDROSO-DE-MORAES *et al.* 2017; GALDIANO JUNIOR *et al.* 2012; SCHNEIDERS *et al.* 2012; CHAPLA *et al.* 2009). Além disso, também ajuda na estabilização do potencial hidrogênio (pH) do meio e, fisicamente também há relatos que melhora a porosidade do meio de cultura e simula a

condição de escuro, na qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor (PEDROSO-DE-MORAES *et al.* 2017; GALDIANO JUNIOR *et al.* 2012; SCHNEIDERS *et al.* 2012; CHAPLA *et al.* 2009).

As vitaminas, essenciais a qualquer ser vivo inclusive aos vegetais, são substâncias requeridas em pequenas quantidades e fundamentais para o metabolismo, sobretudo, como cofator enzimático, deste modo, sua carência pode trazer diversos problemas ao metabolismo e, conseqüentemente, ao desenvolvimento, bem como o seu excesso pode ser tóxico (SAWAMURA, 2016). Tradicionalmente, as vitaminas mais utilizadas nos meios de cultura são a Tiamina (B₁), a Piridoxina (B₆) e o Ácido Nicotínico (B₃), além dessas também é comum à adição de Mio-inositol ou simplesmente Inositol, que é derivado do metabolismo da glicose. Este por muito tempo foi considerado como uma vitamina do complexo B e do aminoácido Glicina, estudos demonstram que os aminoácidos são essenciais no metabolismo primário das plantas e também percussores de metabólitos secundários, como, por exemplo, alguns hormônios e moléculas de defesa (SAWAMURA, 2016; TEIXEIRA, 2016). Porém, não há um consenso se esses componentes seriam realmente essenciais (SAWAMURA, 2016).

Em se tratando de nutrientes, considerados essenciais para o desenvolvimento das plantas, são divididos dois grupos conforme os teores exigidos pelas plantas, o grupo dos macronutrientes (C, H, O, N, P, K, Ca, Mg e S) e o grupo dos micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn) (FERNANDES, 2006; FAQUIN, 2005). Segundo Fernandes (2006) e Malavolta (1980), um elemento é considerado essencial quando na ausência do mesmo a planta não sobrevive ou não completa seu ciclo de vida, quando o elemento não pode ser substituído por nenhum outro similar e, além disso, quando o elemento participa diretamente no metabolismo da planta e, não apenas, neutraliza efeitos físicos, químicos e/ou biológicos desfavoráveis para a planta. Outros elementos, dentre eles Co, Na e Si, são considerados benéficos para o crescimento e desenvolvimento de algumas espécies de plantas, porém sua falta não é um fator limitante (FERNANDES, 2006).

As plantas, por não apresentarem um sistema seletivo de absorção de nutrientes acabam por absorver do solo elementos essenciais, elementos benéficos e, até mesmo, elementos tóxicos, deste modo todos os elementos essenciais devem estar presentes nos tecidos das plantas, mas nem todos os elementos presentes, mesmo quando em grande quantidade, são necessariamente essenciais (FERNANDES, 2006; FAQUIN, 2005).

Dentre os meios mais tradicionais e mundialmente utilizados na propagação *in vitro* de diversas espécies de orquídeas destacam-se o Knudson C (KNUDSON, 1946) e o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (FERREIRA *et al.* 2016; CARVALHO e VIDAL, 2015; SILVA *et al.* 2015). O meio de Knudson (1946) desenvolvido para semeadura de orquídeas, ainda é bastante utilizado na propagação *in vitro* dessas espécies, contudo o meio MS desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), a princípio desenvolvido para cultura de tecidos de tabaco (*Nicotiana tabacum*), contribuiu significativamente para o sucesso da produção *in vitro* de muitas espécies vegetais, sendo inclusive até os dias atuais o mais amplamente utilizado, embora seja um meio com alto conteúdo de sais (MENEZES *et al.* 2015; FREITAS *et al.* 2014; CARVALHO *et al.* 2012; HERRMANN *et al.* 2011). Entretanto, esses meios apresentam custo significativamente alto, tanto pela aquisição da formulação pronta tanto quando elaborado, pois, são importados e no último caso, além de demandar complexidade para elaboração há necessidade da utilização de compostos como nitrato de amônia e de potássio, cuja aquisição é controlada pelo Ministério da Defesa, conforme consta no Decreto Federal nº 3665, de 20 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000).

Desta forma, o uso de meios de cultura que substituem os meios tradicionais é uma técnica cada vez mais pesquisada, estes meios vêm se mostrando viáveis e, por vezes, mais eficientes no crescimento e no desenvolvimento de várias espécies vegetais, sobretudo de orquídeas. Além disso, apresentam simplicidade na elaboração, geralmente são de fácil aquisição nos mercados locais, assim, possibilitam a redução no custo final de produção (SILVA *et al.* 2016; FREITAS *et al.* 2014; SCHNEIDER, 2014; BRAZ *et al.* 2013; GUSON *et al.* 2012).

Um exemplo é o meio de cultura Suprimento da linha B&G Orchidées[®], desenvolvido especificamente para o cultivo *in vitro* dos principais gêneros e híbridos comerciais de orquídeas, é um produto da B&G Flores, sendo de fácil aquisição e fácil preparo, pois os sachês para o preparo de 1 litro de meio de cultura já possui os macro e micronutrientes, sacarose e carvão ativado, sendo necessário acrescentar apenas o ágar-ágar (no caso de meios semissólido ou sólido) e a água destilada (B&GFLORES, 2019).

Um produto utilizado no preparo de meios de cultura alternativos é o Kristalon[™]Laranja, produzido pela Yara Tera, trata-se de um fertilizante da linha de sólidos solúveis desenvolvidos especialmente para uso via água (fertirrigação) (YARA, 2019), quando utilizado no preparo de meios de cultura atua como fonte de macro e micronutrientes para as plantas, sendo necessário o acréscimo de sacarose, carvão ativado, ágar-ágar (no caso

de meios semissólido ou sólido) e água destilada. Outro fertilizante utilizado é o Peters[®] Professional, este contém os macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) e alguns micronutrientes (ICL SPECIALTY FERTILERS, 2019), sendo considerado um fertilizante de uso geral, e assim como o fertilizante Kristalon[™]Laranja atua no fornecimento de macro e micronutrientes, os demais componentes do meio de cultura devem ser adicionados.

Além do emprego de fertilizantes como fontes alternativas de nutrientes minerais para constituição de meios, há também pesquisas com adição de compostos orgânicos, como polpa de frutas, principalmente de banana, tomate e água de coco, tipos alternativos de suporte, visando substituir o ágar, fontes de luz mais econômicas, entre outros; tudo para simplificação e otimização dos custos do cultivo *in vitro* (FREITAS *et al.* 2014; SCHNEIDER, 2014).

1.3.2. Potencial hidrogeniônico (pH)

Outro importante fator que deve ser levado em consideração no meio de cultura é o potencial hidrogeniônico (pH), uma vez que esse fator atua diretamente sobre a disponibilidade dos sais, influenciando assim na absorção de nutrientes e conseqüentemente no desenvolvimento das plântulas (PEDROSO-DE-MORAES *et al.* 2017; CHAPLA *et al.* 2009; BARROS e PASQUAL, 1992). Além disso, alguns autores sugerem que o pH do meio de cultura estaria relacionado com a formação de raiz das plantas cultivadas *in vitro*, assim, um pH levemente ácido seria o preferido pela maioria das espécies vegetais, o que poderia ser explicado pela teoria do crescimento ácido e ação das auxinas (PRIZÃO, 2006). No geral, tem-se utilizado pH variando de 5,2 a 5,8 na propagação *in vitro* da maioria das espécies, sendo esses valores ajustados sobre temperatura ambiente e antes da adição do ágar e do processo de autoclavagem do meio de cultura (PRIZÃO, 2006; PEIXOTO e PAQUAL, 1995; SKIRVIN *et al.* 1986). Entretanto, diversos fatores podem afetar o pH do meio de cultivo, e isto pode ocorrer antes e/ou durante o subcultivo das plantas, como, por exemplo, pelo aquecimento para a diluição e homogeneização do ágar-ágar, pelo processo de autoclavagem dos meios e pela atividade metabólica das plântulas como por exemplo a absorção ou excreção de íons como o NO_3^- e NH_4^+ , entre outros (ADAMUCHIO, 2015; RODRIGUES *et al.* 2006; SKIRVIN *et al.* 1986).

Diniz (1996), Williams *et al.* (1993) e Skirvin *et al.* (1986) verificaram que após a inoculação dos propágulos, há uma rápida alteração no pH do meio de cultura, até que o mesmo alcance um equilíbrio. Isso que depende do tipo de propágulo e dos componentes do

meio utilizado e que, independentemente do pH inicial, quando no equilíbrio, geralmente o pH fica em torno de 4,0 com pequenas oscilações até o final do subcultivo. Adamuchio (2015) e Leifert *et al.* (1992) sugerem que algumas espécies, independente do pH inicial, seriam capazes de tornar o meio de cultivo mais próximo do ideal para seu ótimo desenvolvimento. Deste modo, torna-se fundamental a consideração de Skirvin *et al.* (1986), que sugeriram que sejam feitas medições de pH do meio de cultura antes e após a autoclavagem, e também durante o tempo de cultivo das plântulas, sendo possível observar quais as variações que podem ocorrer e em que determinado momento, sendo possível uma melhor interpretação dos resultados e, conseqüentemente, obtenção de conclusões mais consistentes.

1.4. Aclimatização

O termo aclimatização refere-se ao conjunto de procedimentos técnicos que tem como objetivo adaptar, por um período de tempo, as plântulas propagadas *in vitro* para as condições ambientais *ex vitro* em estufas ou casa de vegetação (DORNELES e TREVELIN, 2011; GOMES e FARIA, 2009; STEGANI, 2006). Trata-se de uma etapa fundamental, sendo considerada a etapa mais crítica na produção de mudas micropropagadas, uma vez que a transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* requer alterações bioquímicas, anatômicas e morfológicas, alterando os processos fisiológicos normais das plantas propagadas *in vitro* (LIMA-BRITO *et al.* 2016; SORGATO, 2013; Santos *et al.* 2013; DORNELES e TREVELIN, 2011; PEREIRA *et al.* 2009; SILVA *et al.* 2007). Em sistema de propagação *in vitro* as plântulas se encontram em ambiente de alta umidade e baixa concentração de CO₂, reduzida intensidade luminosa e presença de sacarose no meio de cultura, deste modo, em geral, apresentam raiz e estômatos pouco funcionais, reduzida taxa de transpiração e atividade fotossintética limitada quando comparada às condições *ex vitro* (LIMA-BRITO *et al.* 2016; SORGATO, 2013; MAYER *et al.* 2008; StEGANI, 2006; BOSA *et al.* 2003). Assim, durante a etapa de aclimatização as plântulas ficam mais susceptíveis ao estresse hídrico, e precisam adaptar seu metabolismo para um incremento na taxa de transpiração, além disso, passam de uma condição heterotrófica para um estado autotrófico e de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes no meio de cultura para outra, onde é necessário incrementar a absorção de sais, além disso, também deixam um ambiente asséptico, ficando sujeitas à ação de microrganismos (CARDOSO, 2015; SORGATO, 2013; LONE *et al.* 2008; STEGANI, 2006).

Nesse contexto, o controle dos diversos fatores ambientais como: temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes são fundamentais nessa etapa, procedimentos incorretos durante a aclimatização podem acarretar em prejuízo econômico muito significativo ao produtor, caso haja atraso e/ou diminuição do crescimento da planta, e até mesmo a morte desta (DORNELES e TREVELIN, 2011; STEGANI, 2006). Daí a importância de se testar diferentes técnicas para favorecer o melhor desempenho na sobrevivência das plantas aclimatizadas (DORNELES e TREVELIN, 2011).

1.5. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP)

As Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) compreendem um grupo de microrganismos exofíticos e endofíticos que colonizam diferentes órgãos vegetais, podendo estimular o crescimento das plantas por meio de mecanismos diretos e/ou indiretos e não apresentam ação patogênica (SPOLAOR *et al.* 2016; MARIANO *et al.* 2004).

Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento das plantas pelas bactérias estão relacionados à síntese de compostos que oferecem (PAIS *et al.* 2016). O principal efeito direto sobre as plantas é o fornecimento de fitoreguladores como auxinas, giberelinas e citocininas. Além disso, também aumentam a performance das plantas na absorção de nutrientes como nitrogênio, fósforo e ferro e na produção de enzimas, como por exemplo a ACC-deaminase (PAIS, *et al.* 2016; SPOLAOR *et al.* 2016; SILVEIRA, 2008; MARIANO *et al.* 2004). Indiretamente, essas bactérias também contribuem para o desenvolvimento das plantas através de mecanismos de biocontrole, os quais inibem o crescimento de diversos microrganismos considerados fitopatogênicos (PAIS, *et al.* 2016; SPOLAOR *et al.* 2016; SILVEIRA, 2008; MARIANO *et al.* 2004).

Deste modo, respostas benéficas do uso de BPCP têm sido observadas por diversos autores em plantas propagadas *in vitro* e *ex vitro*, entre essas respostas estão incremento da área foliar, altura da planta, número de folhas, número de raiz, comprimento de raiz, matéria seca, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência das mudas, controle de doenças e conseqüentemente maior produtividade (SOUZA, 2016). Em troca de todos esses benefícios, as plantas, por sua vez, transferem para os microrganismos, carbono, aminoácidos, flavonoides, entre outros compostos, que contribuem na nutrição microbiana (EMBRAPA, 2016).

Neste contexto, a utilização dos microrganismos na forma de inoculantes é uma ferramenta promissora no mercado agrícola, sendo uma das tecnologias mais eficientes em substituir métodos tradicionais de adubação com fertilizantes, visando o incremento da produtividade vegetal de forma econômica e sustentável (COSTA *et al.* 2014; SILVEIRA, 2008). A técnica pode ser utilizada para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raiz, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita (MARIANO *et al.* 2004).

Há uma vasta quantidade de gêneros dessas bactérias descritos para diferentes culturas, entre eles *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Microvirga*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (SPOLAOR *et al.* 2016; COSTA *et al.* 2014; MARIANO *et al.* 2004).

Em orquídeas alguns desses gêneros também já foram descritos como presentes naturalmente, dentre eles, *Azospirillum amazonense* descrita por Lange e Moreira (2002), *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acetobacteres* e *Herbaspirillum* descritos por Zambrano *et al.* (2007), *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Curtobacterium* descritos por Galdiano Júnior *et al.* (2011), *Bacillus thuringiensis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Herbaspirillum frisingense*, *Pseudomonas stutzer*, *Rhizobium cellulosilyticum*, *Rhizobium radiobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* descritas por Gontijo *et al.* (2018).

Diante da diversidade de gêneros já descritos para orquídeas, tornam-se fundamentais estudos que busquem selecionar estirpes bacterianas que contribuam para produção comercial mais eficiente e sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMUCHIO, L. G. **pH do meio de cultura e agentes geleificantes na multiplicação in vitro de *Lavandula angustifolia* Miller**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015. 82 p.
- ALMEIDA, V. **Análises de amido, proteínas, poliaminas e metilação do DNA em *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae)**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Florianópolis, SC, 2014. 98 p.
- ARAÚJO, J. D. M.; NASCIMENTO, E. H. S.; SILVA-JÚNIOR, J. M. T.; BESSA, M. C. **Otimização da Produção de Mudanças de *Cattleya labiata*: Efeito da Sacarose no Crescimento in vitro e na Aclimatização**. EMBRAPA: Circular Técnica, 38, Fortaleza (CE), outubro de 2012. 8 p.
- ARAÚJO, L. G.; CARNEIRO, I. F.; PRABHU, A. S. Produção in vitro de mudas de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* a partir de sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 29, n. 2, p. 67-71, 1999.
- B&G FLORES. Produtos. Meio de Cultura para Orquídeas. Meio de cultura Suprimento Disponível em: <<https://www.begflores.com.br/index.php/produtos/meio-de-cultura-para-orqu%C3%ADdeas-940-g-detail>> Acesso em: 04/07/2019.
- BONATO, I. T. **A logística do transporte e da distribuição de flores e plantas ornamentais no Brasil**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Agrônoma). Universidade de Brasília – UNB: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015. 23 p.
- BOSA, N.; CALVETE, E.O.; NIENOW, A.A.; SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofíla. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p.207-210, abril-junho 2003.
- BRASIL, Ministério da Defesa. Decreto-Lei n. 3665, de 20 de novembro de 2000. Estabelece critérios para o regulamento para fiscalização de produtos controlados. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/D3665.htm Acesso em: 05 nov. 2018.
- BRAZ, C.; AZEVEDO, M. ULISSES, C. Influência de diferentes concentrações de quitosana no crescimento de *Cattleya labiata*. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX, UFRPE: Recife, dezembro, 2013.
- BUZATTO, C. R.; FERREIRA, P. P. A.; WELKER, C. A. D.; SEGER, G. D. S.; HERTZOG A.; SINGER, R. B. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae: Laeliinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 388-398, out./dez. 2010.
- CARDOSO, M. C. **Estabelecimento in vitro sob condições mixotróficas e criopreservação de *Hancornia speciosa* Gomes**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2015. 75 p.

CARVALHO, A. C. P. P.; RODRIGUES, A. A. J.; SANTOS, E. O. **Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. 42 p.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores Inerentes à Micropropagação**. Embrapa Algodão: Campina Grande, 2006. 28 p.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. EMBRAPA Algodão, Campina Grande - PB, 2003. 39p.

CHAPLA, P. I.; BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; SILVA, J. M.; ROCHA, A. C. S.; STEFANELLO, S. pH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.5, n.2, p. 87-93, 2009.

CNCFlora. *Cattleya walkeriana* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_walkeriana>. Acesso em novembro, 2018.

CNCFlora. Lista Nacional das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/listavermelha/ORCHIDACEAE> Acesso em novembro, 2018.

CONTI, D. **Caracterização fisiológica e bioquímica do padrão de desenvolvimento de estruturas semelhantes à protocormos de *Cattleya tigrina* A. Richard**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Florianópolis, SC, 2016. 136 p.

CORREIA, D.; ARAÚJO, J. D. M.; NASCIMENTO, E. H. S.; TUPINAMBÁ, J. M.; BESSA, M. C. Otimização da Produção de Mudanças de *Cattleya labiata*: Efeito da Sacarose no Crescimento In Vitro e na Aclimatização. **EMBRAPA: Circular Técnica 38**. Fortaleza CE, outubro, 2012. 8 p.

COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; ESTEVES, J. A.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta da soja a inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e *Bradyrhizobium* **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19, p. 1678, 2014.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P.; PEREIRA, J.S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n.1, p. 41-46, jan./fev., 2007.

COSTA, R. A. Biologia floral e sistema reprodutivo de *Cattleya granulosa* Lindl., uma orchidaceae ameaçada e endêmica do Nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Vegetal, 2011. 62 p.

CUNHA, T.; CORDEIRO, G.M.; MASSARO, R.; DEZAN, L.F.; PEDROSO-DE-MORAE, C. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, v.7, n.8, p.1201, 2011.

DINIZ, J. D. N.; GONÇALVES, A. N.; MINAMI, K. Variação do pH no meio de cultura *in vitro* para explantes de bananeira cv. Prata Anã. **Ciência Agrônômica**, v. 27, n.1/2, 1996.
DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (*Orchidaceae*) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 66, n.2, p. 167-174, Dez. 2011.

DRONK, A. G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa*** Linden e Rchb.f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004. 33 p.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Microrganismos promotores do crescimento de planta**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 51 p.

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: UFLA / FAEPE, 2005.

FARIA, R T ASSIS, A. M., UNEMOTO, L. K., CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de Orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenaz, 2012. 124 p.

FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. 432 p.

FERREIRA, L. T. REAL, N. C.; PEREIRA, J. A. F.; ULISSES, C.; WILLADINO, L. Germinação *in vitro* de gongora (*Orchidaceae*) em meios nutritivos simplificados. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v.12, n.1, p. 20-26, 2016.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11329>>. Acesso em: 02 Nov. 2018.

FRANCO, C. M. Propagação de Orquídeas por sementes. **Bragantia**, Campinas, v. 2, n.7, p. 250-257, 1942.

FREITAS, E. M.; HERRMANN M. H., BRUISMA, G.; PÉRICO E.; ARAUJO, A. G. Propagação *in vitro* de *Cattleya intermedia* GRAHAM EX HOOK. (ORCHIDACEAE) em diferentes meios de cultura. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 30-41, 2014.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (*Orchidaceae*) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 801-807, 2012.

GOMES, G. P; FARIA, R. Aclimatização de orquídeas propagadas *in vitro*. **Congresso Nacional de Extensão Universitária, 3º Encontro de Atividades Científicas da UNOPAR**. Londrina: UNOPAR, 2009.

GONTIJO, J. B.; ANDRADE, G. V. S.; BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Bioprospecting and selection of growth-promoting bacteria for *Cymbidium* sp. Orchids. **Scientia Agricola**. v.75, n.5, p.368-374, 2018.

GUSON, R. R.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; RONCONI, C. C. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento *in vitro* de *Cattleya pumila* Hook. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.5, n.3, p. 551-563, set./dez. 2012.

HERRMANN, M. H.; FREITAS, E. M.; PÉRICO, E. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.17, n.1-4, p.162-166, jan-mar, 2011.

ICL SPECIALTY FERTILERS. Produtos & Soluções. Peters® Professional. Disponível em:<<https://icl-sf.com/global-en/explore/nursery-stock-perennials-pot-bedding-plants/water-soluble-fertilizers/peters-professional/>> Acesso em:04/07/2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA - IBRAFLOR. **Boletim Informativo**. Holambra, SP: Ano 8, v. 77, Agosto de 2017. 26 p. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=278>>. Acesso em: 29 de agosto de 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA - IBRAFLOR. **Dados do setor de Exportação de 2003 a 2011**. Holambra, SP: IBRAFLOR, 2012. 3 p. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=184>>. Acesso em: 29 de agosto de 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA - IBRAFLOR. **Mercado Interno 12.2014**. Holambra, SP: IBRAFLOR, 2015. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/ns_mer_interno.php>. Acesso em: 29 de agosto de 2017.

KNUDSON L. A **New nutrient solution for the germination of orchid seed**. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 14, p. 214-217, 1946.

KNUDSON, L. Non-symbiotic germination of orchid seed. **Botanical Gazette**, v.73, n.1, p.1-25, 1922.

KRAHL, A. H.; KRAHL, D. R. P.; VALSKO, J. J.; HOLANDA, A. S. S.; ENTRINGER-JÚNIOR, H.; NASCIMENTO, J. W. Biologia reprodutiva e polinização em orquídeas: com ênfase em espécies brasileiras e da região amazônica – uma revisão de literatura. **Natureza on line**, v.13, n.3, p. 128-133, 2015.

KUHN, B. C.; CLAUDINO, L. O.; KUHN, S. B.; GUTIERRE, M. A. M.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Micropropagação de *Cattleya forbesii* Lindley (Orchidaceae) usando combinações de Auxina e Citocinina. **Editora Pleiade**, v. 8, n. 14, p. 73-82, Jan. - Jun., 2014.

LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 2, p. 529-533, 2002.

LEIFERT, C.; PRYCE S.; LUMSDEN P. J.; WAITES W.M. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plants growing *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.30, p.171-179, 1992.

LEITÃO, A. C. T. C.; MAYER, J. L. S.; QUOIRIN, M.; RIBAS, L. L. F. Aclimatização de mudas micropropagadas de *Cattleya walkeriana* (Orchidaceae). **Resumo do 56º Congresso Nacional de Botânica**. Paraná: Curitiba: 2005.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M.S.; RESENDE, S. V.; CARNEIRO, C. E.; SANTANA, J. R. F. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161, jan-mar, 2016.

LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; ASSARI, L. S. TAKAHASHI, L. S. A., FARIA, R. T. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 465-469, 2008.

LOPES, F. S.; QUEIROZ, R. P.; SILVA, P. A.; FOLLI, M. S.; RABELLO, W. S.; CRUZ, L. M.; MINAS, R. S.; AMARAL, J. A. T.; Schimildt E. R. Interferência da descontaminação de sementes orquídeas *Laelia tenebrosa* Rolfe na germinação e desenvolvimento *in vitro*. **IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-graduação**, Universidade do Vale do Paraíba. Vale do Paraíba: UNIVAP, 2006. p. 587-589.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1980. 254 p.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004.

MAYER, J. L. S.; RIBAS, L. L. F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raiz de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica** [online], v. 22, n. 2, p.323-332, 2008.

MENEZES, C. A. S.; MIRANDA, D. P.; NASCIMENTI, H. R.; Dahmer, N.; Karsburg, I. V. Germinação e desenvolvimento de *Cattleya violacea* Rolfe *in vitro* em meios de cultura alternativos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p. 1140, 2015.

MENEZES, L. C. **Orquídeas *Cattleya walkeriana***. Brasília: Ibama, 2011. 276 p.

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

NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A. Mapeamento e Quantificação da Cadeia de Flores e Plantas Ornamentais do Brasil. São Paulo: **Organização das Cooperativas do Estado de São Paulo (OCESP)**, 2015. 122 p.

OLIVEIRA, E. C.; CARVALHO, J. A.; REZENDE, F. C.; ALMEIDA, E. F. A.; REIS, S. N.; MIMURA, S. N. Rendimento de rosas cultivadas em ambiente protegido sob diferentes níveis de irrigação. **Brazilian Journal of Irrigation and Drainage (IRRIGA)**, Botucatu, v. 21, n. 1, p. 14-24, janeiro-março, 2016.

PAIS, A. K. L.; SILVA, J. R.; ALENCAR, F. C.; PEIXOTO, A. R.; SOUZA, J. C.; PAZ, C. D. Seleção de rizobactérias como promotoras de crescimento em melancia. **Scientia Plena**, v.12, n.04, 2016.

PEDROSO-DE-MORAES, C.; SOUZA-LEAL, T.; DIOGO, J. A.; CANABRAVA, R. I.; PEDRO, N. P.; MARTELINE, M. A. Crescimento de *Arundina graminifolia* (D. DON.) HOCHR em diferentes meios de cultivo e níveis de pH. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá – PR, v. 10, n. 1, p. 9-24, jan./mar. 2017.

PEREIRA, J. A. F.; SANTOS, L. A. R.; SIQUEIRA, I. T. D.; ULISSES, C. Desenvolvimento morfofisiológico de espécie de orquídeas aclimatizadas em diferentes regiões climáticas do Estado de Pernambuco. **XVII Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e IV Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas**, 2009.

PEIXOTO, P. H. P.; PASQUAL, M. Micropropagação da Videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, v.42, n. 242, p.431-434, 1995.

PRIZÃO, E. C. **Efeito de carvão ativado e do grafite no crescimento *in vitro* de Orquídeas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2006. 43 p.

RODRIGUES, D, T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V. V. H.; DIAS, J. M. M.; OTONI, W. C.; VILLANI, E. M. A. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. **Revista Ceres**, v. 59, p. 9-15, 2012.

RODRIGUES, M. A.; MATIZ, A.; CRUZ, A. B.; MATSUMURA, A. T.; TAKAHASHI, C. A.; HAMACHI L.; FÉLIX, L. M.; PEREIRA, P. N.; LATANSIO-AIDAR, S. R.; AIDAR, M. P. M.; DEMARCO, D.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Spatial patterns of photosynthesis in thin-and thick-leaved epiphytic orchids: Unravelling C3-CAM plasticity in an organ-compartmented way. **Annals of Botan** 112:17-29, 2013.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.1, p.29-35, 2006.

SANTOS, E. M.; AZEVEDO, B. M; MARINHO, A. B.; CARVALHO, A. C. P. P.; SARAIVA, K. R. Aclimatização de mudas micropropagadas de Bastão do Imperador em diferentes volumes de recipientes. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n.1, p. 134-137, jan/fev, 2013.

SASAMORI, M. H. ENDRES-JÚNIOR, D. DROSTE, A. Sobrevivência e desenvolvimento de plântulas de *cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) micropropagadas e aclimatadas em substratos com fibra de coco. **Revista Pesquisas**, São Leopoldo: Instituto Anchietano de Pesquisas, n. 65, p. 293-303, 2014.

SAWAMURA, L. H. **Influências de vitaminas no desenvolvimento *in vitro* de Cattleyas brasileiras**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2016. 42 p.

SCHNEIDER, L. **Propagação *in vitro* de catléias nativas da Mata Atlântica**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, 2014. 87 f.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; RAITZ BOOZ, M.; MAMORU SUZUKI, R. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185-191, março-abril, 2012.

SILVA, C. I.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Caracterização morfológica das sementes e das primeiras fases do ciclo de vida de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Arquivos Apadec**, n.8, v.2, p. 22-26, 2004.

SILVA, E. S. **Desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* Kunth em meio de cultura com extratos**. Dissertação (Mestrado) Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, RR, 2014. 61 p.

SILVA, J. V.; HERNANDEZ, F. F. F.; BEZERRA, F. C.; DINIZ, J. D. N. Aclimatização “*ex vitro*” de mudas de antúrio em diferentes substratos. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.2, p.188-191, 2007.

SILVA, K. A.; MELLO, V. S.; KARSBURG, I. V. Avaliação da germinação *in vitro* de *Arundina bambusifolia* Lindl. (orchidaceae). **III Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas amazônicos**. Mato Grosso: Alta Floresta, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2015.

SILVA, L. F. A. **Comercialização de flores e plantas ornamentais em supermercados do Distrito Federal e entorno**. Monografia (Curso de Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2016. 33p.

SILVA, P. M. A. D.; OLIVEIRA, S. M.; FINGOLO, V. M.; THOMÉ, M. P. M. Desenvolvimento de orquídeas *Cattleya guttata* Lindl. em meios de cultura de mamão e tomate. **Revista Interdisciplinar do Pensamento Científico**, n. 1, v. 2, artigo nº 03, p. 22-28, Janeiro/Junho 2016.

SILVEIRA, E. L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008. 83 p.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; MANN, M. L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 292-294, 1986.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; PEREIRA, S. T. S. **Utilização de agentes geleificantes alternativos no cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl.** **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p.1833, 2014.

SORGATO, J. C. **Aclimatização de *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Agronomia. Universidade Federal da Grande Dourados. Mato Grosso do Sul: Dourados, 2013. 35p.

SOUZA, A. K. P. **Bactérias promotoras de crescimento de plantas associadas à diferentes doses de fertilização nitrogenada na cultura do trigo**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2016. 56 p.

SOUZA, Vinícius Castro; LORENZI, Harri. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2012.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C. A.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônômico de milho pipoca. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 1, p.33-40, 2016.

STANCATO, G.C.; BELMELMONS, P.F.; VEGRO, C.R.L. 2001. 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.

STEGANI, V. **Aclimatização de orquídea utilizando como substrato pó de bagaço de cana**. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Paraná: Maringá, 2006. 32 p.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R. FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 4, p. 731-742, 2010.

TEIXEIRA, W. F. **Avaliação do uso de aminoácidos na cultura de soja**. Tese (Doutorado) USP: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. SP:Piracicaba, 2016. 158 p.

VENDRAME, A. W.; TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S. **Cultivo moderno de orquídeas: Phalaenopsis e seus híbridos**. Fortaleza (CE): Expressão Gráfica e Editora Ltda, 2ª Edição, 2015. 200 p.

WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition *in vitro* – a mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, v. 41, p. 237-251, 1993.

YARA INTERNATIONAL ASA. Yara Tera KRISTALON LARANJA. Disponível em:<<https://www.yarabrasil.com.br/nutricao-de-plantas/produtos/yaratera/yaratera-kristalon-laranja-06-12-36/>> Acesso em: 04/07/2019.

ZAMBRANO, E. R.; SALGADO, T. J.; HERNÁNDEZ, A. T. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). **Lankesteriana International Journal on Orchidology**, v. 7, n. 1-2, p.322-325, 2007.

CAPÍTULO I

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Catleya walkeriana* Gardner EM MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS

RESUMO

No cultivo *in vitro*, o meio de cultura tem grande influência no desenvolvimento das plântulas, pois é responsável por fornecer as condições ideais de nutrição e as características físico-químicas adequadas para o desenvolvimento das mesmas, assim, alguns estudos vêm sendo realizados para que esse sucesso seja o maior possível, adequando a composição do meio de cultura à determinada espécie. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desenvolvimento de protocormos de *Cattleya walkeriana* cultivados em diferentes meios de cultura em sistema de propagação *in vitro*. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos e 20 repetições, sendo considerado cada frasco uma repetição, contendo quatro plântulas/frasco, totalizando 400 plântulas. Os meios de cultura testados foram Murashige e Skoog (1962) (MS), Knudson C (1946) modificado por Morel, (1965) (KC), meio de cultura a base de fertilizante Peters[®] (PE), meio de cultura a base de fertilizante Kristalon[™] Laranja (KL) e o meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®] (BG). Após 240 dias de subcultivo das plântulas foram mensuradas as variáveis: massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e o pH dos meios de cultura ao final do subcultivo das plântulas (pH_{final}). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias com teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 1%. Foi possível concluir que o meio Knudson C (1946) modificado por Morel (1965) (KC) não é adequado para propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* sob as condições utilizadas neste experimento. O meio a base do fertilizante Kristalon[™] Laranja (KL) e o meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®] (BG) foram os que apresentaram as maiores médias para as variáveis massa fresca total (MFT), comprimento da maior folha (CMF), comprimento da maior raiz (CMR). O meio de cultura a base de fertilizante Peters[®] (PE) apresentou médias iguais ao do meio Murashige e Skoog (1962) (MS) para as variáveis massa fresca total (MFT) e comprimento da maior raiz (CMR), contudo apresentou média inferior para a variável comprimento da maior folha (CMF). O meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS) foi o que apresentou média superior para variável número de folhas (NF), sendo que os demais meios não se diferiram entre si. Para variável número de raiz (NR) não houve diferença entre os meios testados, exceto para o meio de cultura a base de fertilizante Peters[®] (PE) que apresentou a menor média. Pode-se constatar que houve variação de pH em todos os meios de cultura testados, todos sofreram uma redução de pH quando comparados ao pH_{inicial} ($5,8 \pm 0,1$) dos meios. Contudo, não houve respostas lineares, positivas ou negativas, entre os resultados das variáveis biométricas obtidos e o pH_{final} do meio de cultura. Pode-se concluir que o meio a base do fertilizante Peters[®] (PE), do fertilizante Kristalon[™] Laranja (KL) e o meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®] (BG) podem ser utilizados para propagação de *Cattleya walkeriana* em substituição aos meios de cultura tradicionais Knudson C (1946) modificado por Morel (1965) (KC) e o Murashige e Skoog (1962) (MS), possibilitando ao produtor melhor relação custo-benefício.

Palavras-chave: orchidaceae, desenvolvimento de protocormos, potencial hidrogeniônico.

ABSTRACT

In the *in vitro* culture, the culture medium has great influence on the development of the seedlings, as it is responsible for providing the ideal conditions of nutrition and the appropriate physico-chemical characteristics for the development of the same, some studies have been carried out so that this success is as large as possible, adjusting the composition of the culture medium to the particular species. Thus, the objective of this work was to evaluate the development of *Cattleya walkeriana* protocorms grown in different culture media in an *in vitro* propagation system. The experimental design was a completely randomized design (DIC) with five treatments and 20 replicates, each vial being considered one replicate, containing four seedlings / vial, totaling 400 seedlings. The culture media tested were Murashige and Skoog (1962) (MS), Knudson C (1946) modified by Morel, (1965) (KC), Peters[®] (PE) fertilizer-based culture medium, Kristalon[™] Orange (KL) fertilizer and B&G Orchidées[®] (BG) supply medium. After 240 days of subculture of the seedlings, the following variables were measured: total fresh mass (MFT), leaf number (NF), leaf length (CMF), root number (NR), length of largest root (CMR) pH of the culture media at the end of the subculture of the seedlings (pH_{final}). The data were submitted to analysis of variance and the comparison of means with Tukey statistical test, with a confidence interval of 1%. It was concluded that the Knudson C (1946) modified by Morel (1965) (KC) medium is not suitable for *in vitro* propagation of *Cattleya walkeriana* seedlings under the conditions used in this experiment. The medium of the Kristalon[™] orange fertilizer (KL) and the B&G Orchidées[®] (BG) supply medium were the ones that presented the highest averages for the variables total fresh mass (MFT), leaf length (CMF), leaf length greater root (CMR). The Peters[®] (PE) fertilizer medium presented mean values similar to those of the Murashige and Skoog (1962) medium (MS) for the variables total fresh mass (MFT) and length of the largest root (CMR), however, for the variable length of the largest leaf (CMF). The culture medium Murashige and Skoog (1962) (MS) presented the upper average for leaf number variable (NF), and the other media did not differ from each other. For the root number variable (NR), there was no difference between the media tested, except for the Peters[®] (PE) fertilizer medium with the lowest mean. It can be verified that there was variation of pH in all culture media tested, all of them suffered a reduction of pH when compared to the initial pH (5.8 ± 0.1) of the media. However, there were no linear positive or negative responses between the results of the biometric variables obtained and the final pH of the culture medium. It can be concluded that Peters[®] fertilizer (PE), Kristalon[™] Orange (KL) fertilizer and B&G Orchidées[®] (BG) supply medium can be used for the propagation of *Cattleya walkeriana* in replacement of culture media (1946) modified by Morel (1965) (KC) and Murashige and Skoog (1962) (MS), making it possible for the farmer to be more cost-effective.

Keywords: orchidaceae, development of protocorms, hydrogenation potential.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil dispõe de grande biodiversidade de espécies de orquídeas, no entanto, muitas espécies estão correndo o risco de extinção na natureza, seja pela coleta predatória, destruição dos ecossistemas, uso de produtos químicos tóxicos, acompanhada da evasão dos polinizadores, e neste caso, não mais se reproduzem, pois não ocorre a polinização e a formação das cápsulas de sementes (FREITAS *et al.* 2014; SOUZA *et al.* 2006). Ademais, as sementes das orquídeas são diminutas e não possuem endosperma, deste modo, na natureza essas sementes germinam e desenvolvem-se através da relação com fungos simbiotes específicos, assim, apesar de produzirem milhares de sementes por cápsula, apenas aproximadamente 5% delas germinam (FARIA *et al.* 2012; SOUZA *et al.* 2006).

Desse modo, a técnica de sementeira *in vitro* desenvolvida por Lewis Knudson (1922) se tornou imprescindível para propagação de orquídeas em escala comercial, por proporcionar alto percentual de germinação e produção de mudas com qualidade fitossanitária, e, além disso, uma importante ferramenta de preservação, pois ao aumentar a oferta de mudas comerciais reduz a predação das mesmas da natureza e também por permitir, caso necessário, a sua propagação e reintrodução em seu habitat natural (*in situ*), uma vez que a técnica mantém a variabilidade genética das plantas produzidas (FREITAS *et al.* 2014; CORREIA *et al.* 2012; FARIA *et al.* 2012; SCHNEIDERS *et al.* 2012).

Portanto, os motivos supracitados reforçam a importância de estudos da propagação *in vitro*, que tem como objetivo proporcionar as melhores condições para o crescimento e desenvolvimento dessas plantas, uma vez que as necessidades ambientais (temperatura, umidade, intensidade luminosa, etc.) e nutricionais variam conforme o genótipo e o estágio de desenvolvimento das mesmas, não existindo, ainda, condições ambientais e um meio de cultura específico e ideal, quanto à composição nutricional, em nível de gênero, espécie, híbrido ou clones de orquídeas (SCHNEIDER, 2014; CORREIA *et al.* 2012). Os meios de cultura mais tradicionais nessa área necessitam de uma série de compostos químicos para a sua formulação ou devem ser importados, sendo, portanto, de difícil acesso no mercado, o que dificulta a produção de mudas principalmente por pequenos produtores (SCHNEIDER, 2014). Deste modo, o uso de meios de cultura alternativos na propagação *in vitro* vem sendo testados, e algumas pesquisas têm mostrado que uma das formas de simplificar a produção do meio é através do uso de fertilizantes comerciais como base nutricional e/ou pela adição de compostos orgânicos, produtos de fácil acesso no mercado, de simples utilização e que,

consequentemente, proporcionam redução de custos dos meios de cultura e muitas vezes com resultados superiores aos dos meios de culturas mais tradicionais (FREITAS *et al.* 2014; SCHNEIDER, 2014; HERRMANN *et al.* 2010).

A espécie *Cattleya walkeriana* Gardner, é uma orquídea endêmica que encontra-se em risco de extinção elevado na natureza, sendo muito cobiçada pelos orquidófilos devido a beleza de suas flores e pequenas dimensões das porções vegetativas, características que lhe confere considerável importância econômica no Brasil e no mundo (GALDIANO JUNIOR *et al.* 2014; DIGNART *et al.* 2009; SILVA e MILANEZE-GUTIERRE, 2004; FARIA *et al.*; 2002). Assim, considerando a importância econômica e necessidade de conservação dessa espécie, este trabalho teve como objetivos: 1) indicar meios de cultura alternativos eficientes para o crescimento de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner propagadas *in vitro*; 2) avaliar a correlação entre o pH final dos meios de cultura e as variáveis biométricas analisadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), no Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Rio de Janeiro, RJ. Frascos contendo protocormos de *Cattleya walkeriana* foram adquiridos na PESAGRO-Seropédica/RJ, a semeadura *in vitro* dessas plântulas foi realizada no mês de outubro de 2016 em câmara de fluxo, os frascos foram fechados com tampas plásticas que tiveram as bordas protegidas com filme PVC (Figura 3). Estes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de aproximadamente $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ até a data de realização desse experimento.



Figura 3. Frasco contendo protocormos de *Cattleya walkeriana* adquirido na PESAGRO-Seropédica/RJ.

No dia 18 de outubro de 2017 protocormos, apresentando altura média de 1,0 cm de comprimento (Figura 4), foram subcultivados nos diferentes meios de culturas descritos a seguir e cuja composição encontra-se discriminada na Tabela 2.

1. Murashige e Skoog (1962) - MS
2. Knudson C (1946) modificado por Morel (1965) – KC
3. Fertilizante Peters[®] (20-20-20) (3 g.L⁻¹) - PE
4. Fertilizante Kristalon[™] Laranja (6-12-36) (3 g.L⁻¹) - KL
5. Meio de cultura suprímento B&G Orchidées[®] - BG



Figura 4. Protocormos de *Cattleya walkeriana* Gardner com altura média de 1,0 cm de comprimento utilizados para o subcultivo (Seropédica, 2017).

Tabela 2. Composição química dos meios de cultura utilizados para o crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* (mg.L⁻¹).

Componentes dos Meios de Cultura (mg.L ⁻¹)*					
Macronutrientes	MS	KC	PE	BG**	KL
N total	841,000	245,000	600,000	42,500	180,000
N-Nítrico (NH ₃ ⁻)	552,000	140,000	177,000	-	135,000
N-amoniacoal (NH ₄ ⁺)	289,000	105,000	117,000	-	45,000
N-ureia	-	-	306,000	-	-
Fósforo (P ₂ O ₅)	88,700	127,500	600,000	33,500	360,000
Potássio (K ₂ O)	892,000	82,500	600,000	146,500	1080,000
Cálcio (Ca)	60,000	200,000	-	23,000	-
Magnésio (Mg)	36,000	70,300	-	6,500	90,000
Enxofre (S)	48,000	92,350	-	15,000	600,000
Micronutrientes	MS	KC	PE	BG	KL
Boro (B)	1,080	-	0,600	0,295	0,750
Cloro (Cl)	-	286,700	-	-	-
Cobre (Cu)	0,010	-	1,500	0,035	0,300
Ferro (Fe)	11,200	4,750	3,000	0,880	2,100
Manganês (Mn)	5,490	1,875	1,500	0,575	1,200
Molibidênio (Mo)	0,100	-	0,015	0,0001	0,120
Zinco (Zn)	1,950	-	1,500	0,270	0,750
Total de Solutos	1985,5	1356,0	2408,115	269,055	2495,220
Componentes Meios de Cultura (g.L ⁻¹)					
Sacarose	30,0	30,0	30,0	40,0*	30,0
Carvão Ativado	1,0	1,0	1,0	2,0*	1,0
Ágar-ágar	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

* conforme informado pelos fabricantes.

** Fabricante informou apenas o percentual de N-total.

No meio MS além dos compostos listados na Tabela acima, há também adição dos compostos listados na Tabela 3.

Tabela 3. Outros componentes presentes apenas no meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

Componentes	mg.L⁻¹
Ácido Nicotínico (B ₃)*	0.5
Piridoxina (B ₆)*	0.5
Tiamina (B ₁)*	0.1
Glicina**	2
Mio-Inositol (Inositol) ***	100

*Vitaminas do complexo B; **Aminoácido não essencial; *** componente derivado do metabolismo da glicose

Como podemos observar na Tabela 2, com exceção ao meio BG, todos os meios utilizados para o subcultivo dos protocormos foram suplementados com 1 g.L⁻¹ de carvão ativado (Vetec[®]), 30 g.L⁻¹ de sacarose (Isofar[®]) e 7,5 g.L⁻¹ de ágar (Isofar[®]). No meio BG, que já vem com sacarose (40 g.L⁻¹) e carvão ativado (2 g.L⁻¹), também foi acrescentado 7,5 g.L⁻¹ de ágar. Todos os meios tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do ágar. Por fim foram colocados em aparelho micro-ondas até a terceira fervura, quando então se transferiu cerca de 35 ml de cada meio para frascos de 268 ml que, posteriormente, foram esterilizados em autoclave a 121°C, a 1,1 atm, durante 15 minutos.

Os protocormos foram subcultivados em câmara de fluxo laminar, os frascos foram fechados com tampa plástica e tiveram suas bordas protegidas com filme PVC, em seguida estes foram transferidos para sala de crescimento e mantidos sob temperatura média de 28.9°C (mínima de 22.8°C e máxima de 29.7°C), umidade relativa do ar média de 28.2% (mínima 19% e máxima 68%), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de aproximadamente 3.000 lux (Luxímetro Digital marca Icel modelo Ld 510) pelo período de 240 dias, quando foram feitas as coletas para realização das avaliações.

Antes da realização das avaliações, de todos os tratamentos, as plantas obtidas foram retiradas do meio de cultura e tiveram suas raízes lavadas em água corrente até a completa eliminação do meio de cultura. Foram avaliados a massa fresca total (MFT), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF), o número de raiz (NR), o comprimento da maior raiz (CMR) e o pH dos meios de cultura ao final do subcultivo das plântulas (pH_{final}).

Para avaliação do MFT foi utilizada balança eletrônica digital de precisão da marca Bioprecisa modelo FA2104N com quatro casas decimais, a avaliação do CMF e do CMR

foram feitas manualmente com uso de régua graduada em milímetros, já a avaliação do NF e NR foram feitas manualmente por contagem, em todos os casos as avaliações foram feitas planta por planta, obtendo-se a média de 4 plantas/frasco (repetição).

Para aferição do pH_{final} a metodologia foi adaptada da Embrapa (1997), selecionou-se ao acaso 10 frascos de cada tratamento, em seguida o meio de cultura foi homogeneizado com ajuda de um bastão de vidro (A), em seguida 10 ml do meio homogeneizado foram transferidos para copo descartável de 150 ml (B), então colocou-se 25 ml de água destilada deionizada, agitou-se com bastão de vidro, lavando-se ao passar de uma amostra para outra(C). Deixou-se em repouso por 1 hora e em seguida agitou-se novamente com bastão de vidro, sendo feita a aferição do pH_{final} com uso de eletrodo combinado imerso em suspensão, a leitura foi feita em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C (D) (Figura 5).

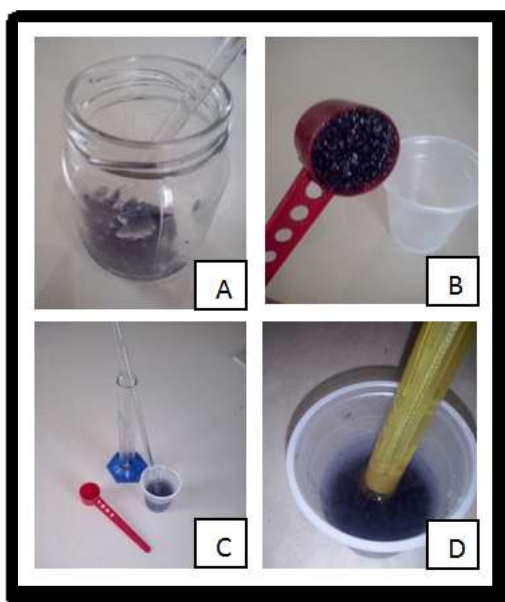


Figura 5. Etapas para aferição do pH dos meios de cultura ao final do subcultivo (Fonte: Autora, 2018).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos e 20 repetições, sendo considerado cada frasco uma repetição, contendo 4 protocormos/frasco, totalizando ao final 400 plântulas. Para a avaliação do pH_{final} selecionou-se ao acaso 10 frascos de cada tratamento, totalizando 10 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias com teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 1%, com auxílio do *software* SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas duas primeiras semanas, verificou-se a presença de frascos contaminados, estes foram retirados da sala de crescimento e levados para identificação do agente contaminante. A identificação dos contaminantes presentes nos frascos foi realizada em nível de gênero e foi realizada através do preparo de lâminas e posterior exame microscópico. De acordo com a identificação foi detectada a presença dos fungos do gênero *Penicillium* (20 frascos c/ BG) e *Cladosporium* (1 frasco c/ KC) (Figura 6), totalizando 21 frascos contaminados. Deste modo, o tratamento BG foi recultivado e, posteriormente não foram constatados novos frascos com contaminação. A contaminação por fungos e bactérias é comum neste tipo de propagação, segundo Colombo *et al.* (2004), nas biofábricas brasileiras já foram registrados percentuais de contaminação superiores a 30%, causado tanto por fungos como por bactérias, mesmo com todos os cuidados de assepsia, assim neste trabalho conseguimos manter a contaminação dentro do percentual esperado. Deste modo, o tratamento BG foi refeito, e após duas semanas do início do experimento reintroduzido na sala de crescimento.

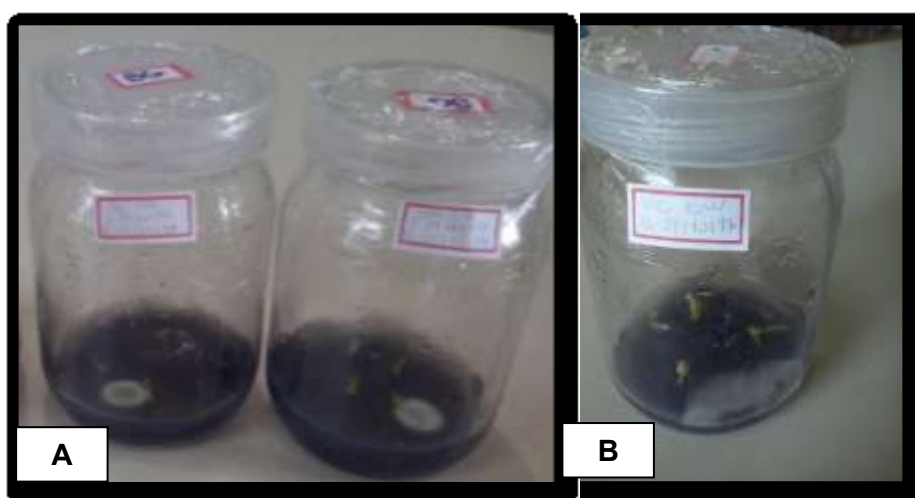


Figura 6. Frascos do tratamento BG contaminados por fungo do gênero *Penicillium* (A); Frasco do tratamento KC contaminado por fungo do gênero *Cladosporium* (B) (Seropédica, 2017).

Após cinco meses de subcultivo das plântulas *in vitro*, foi realizada avaliação qualitativa, visual e preliminar, uma vez que abrir a unidade experimental representa elevado risco de contaminação. Nesta avaliação pode-se constatar que no tratamento KC houve clorose seguida de oxidação de 34 plantas (44,74%) e que as 42 plantas (55,26%) que permaneceram vivas apresentam desenvolvimento bastante reduzido quando comparadas aos outros tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados da avaliação qualitativa realizada após 150 dias de subcultivo no tratamento KC. Número total de plantas que apresentaram sintoma de clorose seguida de oxidação e plantas que não apresentaram sintoma de clorose e conseqüentemente oxidação nas 19 repetições deste tratamento.

Unidade experimental (4 plântulas/frasco)	Com sintoma de Clorose/oxidação (unidade)	Sem sintoma de Clorose/oxidação (unidade)
R01	0	4
R02	2	2
R03	2	2
R04	0	4
R05	4	0
R06	4	0
R07	1	3
R08	2	2
R09	2	2
R10	1	3
R11	2	2
R12	1	3
R13	1	3
R14	0	4
R15	1	3

R16	2	2
R17	4	0
R18	4	0
R19	1	3
Total	76 (100%)	42 (55,26%)

Essa avaliação qualitativa foi feita, uma vez que, observou-se que neste tratamento as plantas começaram a adquirir coloração esbranquiçada e em seguida entravam em senescência (Figura 7). Nesta mesma avaliação, aos cinco meses de subcultivo, pode-se observar que nos demais tratamentos as plântulas seguiam se desenvolvendo normalmente, isto é, sem estes ou outros sintomas visuais.

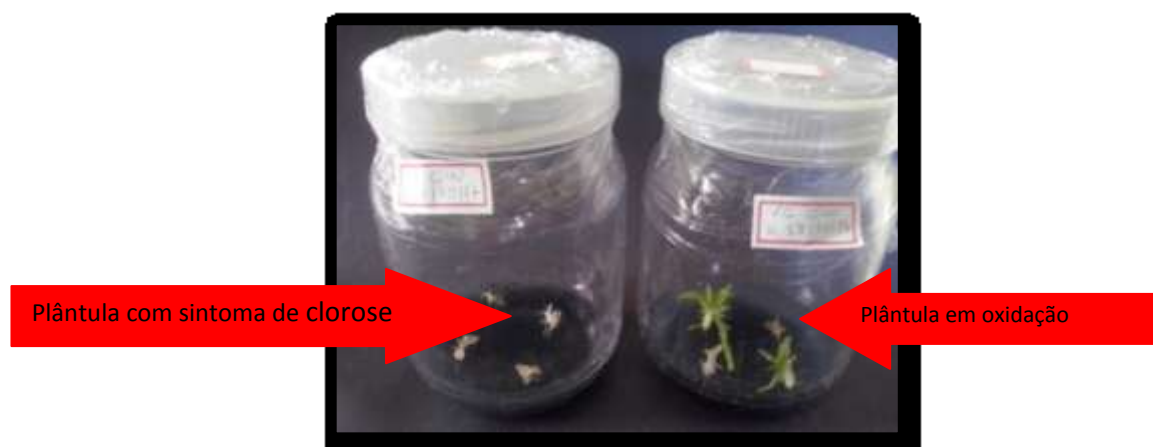


Figura 7. Frascos contendo meio KC, evidenciando o sintoma de clorose seguido de oxidação das plântulas (Seropédica, 2018).

Supõe-se que os resultados obtidos tenham ocorrido pela ausência de alguns nutrientes ditos essenciais para o desenvolvimento de plantas, aliás, o meio KC foi utilizado por Lewis Knudson (1946) na etapa de semeadura. Resultados semelhantes foram obtidos por Sousa *et al.* (2006), que também subcultivaram protocormos de *Cattleya walkeriana* em meios Knudson C (1922) e observaram que de um total de 257 protocormos subcultivados apenas 38 plântulas foram obtidas, sendo que estas apresentavam coloração verde menos intensa do que as plântulas da espécie *Shomburgkia crispa* (Orchidaceae) que também foi objeto de estudo no trabalho desses pesquisadores. Contudo, Araújo *et al.* (1999) obtiveram sucesso no uso do meio KC na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner, mas embora tenham

subcultivado as plantas pelo período total de 240 dias (8 meses), esses autores fizeram a inoculação por duas vezes, ou seja, sendo quatro meses cada subcultivo. De acordo com Freitas *et al.* (2014), embora o meio Knudson C possua diferentes sais minerais e, seja muito utilizado na germinação de sementes de orquídeas, parece não proporcionar as condições ideais para o desenvolvimento de plântulas de algumas espécies, esses autores observaram que o tratamento KC foi o que alcançou a segunda menor média na propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya intermedia*.

Mesmo com esses resultados, optou-se por manter os 19 frascos (repetições) deste tratamento na sala de crescimento até o final do experimento, e pode-se observar que apenas poucas plântulas desse tratamento sobreviveram e que apresentam tamanho muito reduzido (Figuras 8 e 9). Mediante esses resultados, esse tratamento foi excluído da análise estatística, exceto para variável pH_{final} .



Figura 8. Alguns frascos do tratamento KC no dia da coleta, ou seja, após 240 dias de cultivo das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner *in vitro*.

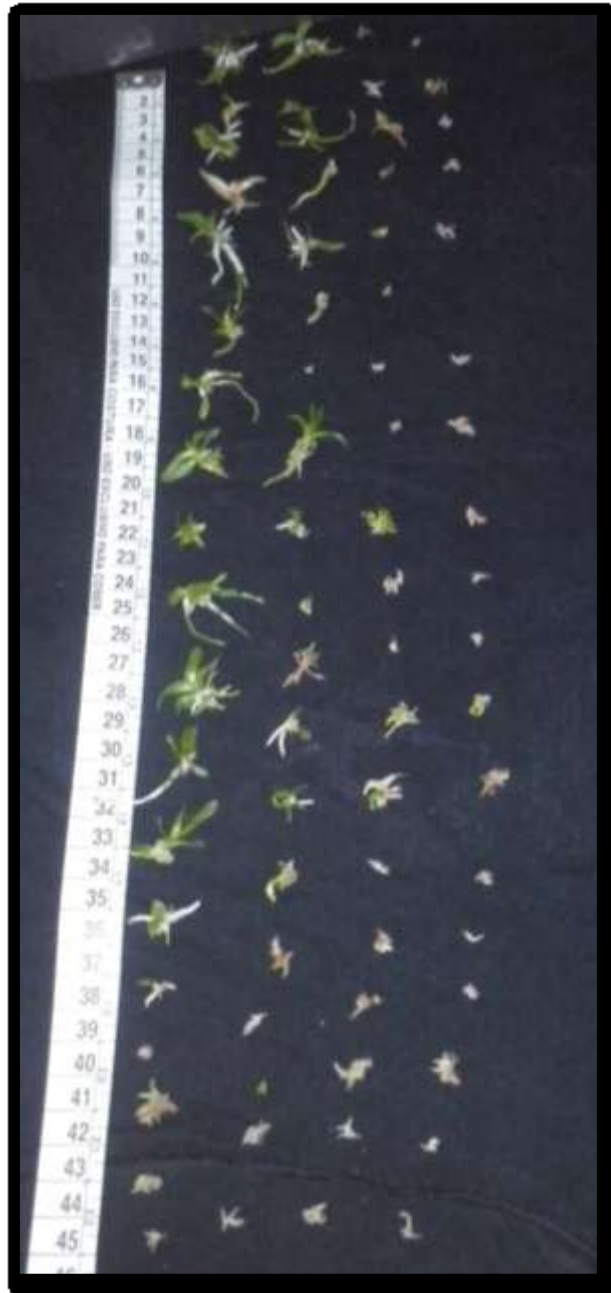


Figura 9. Plântulas do tratamento KC, fora dos frascos, no dia da coleta (240 dias de subcultivo) das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner *in vitro*.

A análise de variância (ANAVA) mostrou resultado significativo para todos os parâmetros avaliados, ou seja, mostrou que o meio utilizado influenciou nos resultados de todas as variáveis analisadas. Assim, na Tabela 5, podemos observar o resumo da análise da comparação das médias pelo teste de Tukey a 1% das variáveis MFT, NF, CMF, NR e CMR

para os tratamentos MS, PE, KL e BG. E as médias da variável pH_{final} para todos os tratamentos.

Tabela 5. Médias da massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e do potencial hidrogeniônico dos meios de cultura (pH_{final}) após oito meses de cultivo de protocormos de *Cattleya walkeriana* Gardner *in vitro*.

Meios de Cultura (Tratamentos)	Média das Variáveis Avaliadas*					
	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)	pH_{final}
MS	0.4839 b	6.8875 a	1.7088 b	6.7000 a	2.5550 b	3.8130 cd
PE	0.4678 b	4.4708 b	1.2029 c	4.5292 b	2.7304 b	4.6040 b
KL	1.0339 a	4.9375 b	2.0900 ab	7.8875 a	3.9900 a	3.8930 c
BG	0.9288 a	5.3500 b	2.3863 a	6.7750 a	4.7413 a	3.8630 cd
KC**	-	-	-	-	-	3.4680 d
Controle***	-	-	-	-	-	5.8000 a
Média Geral	0.7286	5.4115	1.8470	6.4729	3.5042	4.2402
CV (%)	35.54	19.48	21.04	19.63	26.49	5.96

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

**Uma vez que os protocormos pouco se desenvolveram neste meio, não foi possível fazer avaliação das variáveis biométricas, sendo apresentado apenas a média do pH_{final} desse meio de cultura.

***Controle – pH aferido durante o preparo dos meios de cultura antes do cultivo dos protocormos.

MS - Murashige e Skoog (1962); KC - Knudson C (1946) modificado por Morel (1965); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées®.

Os dados representam a média de 20 repetições para as variáveis biométricas de cada tratamento e 10 repetições para o pH_{final} de cada tratamento.

Os resultados acima seguem abaixo representados graficamente e de maneira individual para cada uma das variáveis analisadas. Na Figura 10 temos os resultados médios para a variável MFT em gramas, onde podemos observar que as médias dos tratamentos KL e BG não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 1%, mas se mostraram superiores às dos tratamentos PE e MS, estes que também não apresentaram médias com diferença significativa entre si, pelo teste de Tukey a 1%.

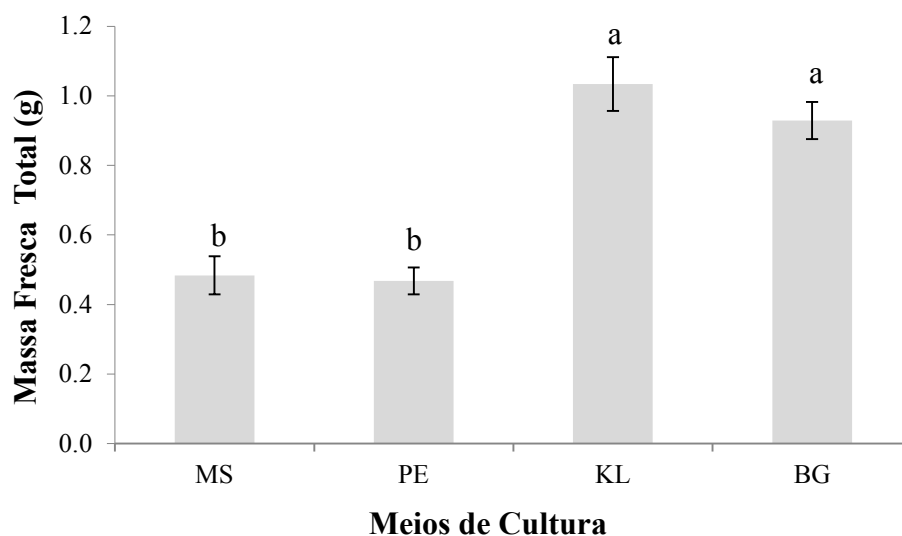


Figura 10. Massa fresca total (expresso em gramas) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 20 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

Em relação a variável NF o tratamento MS foi o que apresentou melhores resultados, com média diferindo significativamente das médias dos tratamentos PE, KL e BG, esses que não apresentaram médias com diferença significativa entre si (Figura 11). Contudo, embora o tratamento MS tenha apresentado média superior para variável NF, em se tratando da variável CMF ele apresentou média significativamente inferior ao tratamento BG, igual ao do tratamento KL e superior ao do tratamento PE, pelo teste de Tukey a 1% (Figura 12).

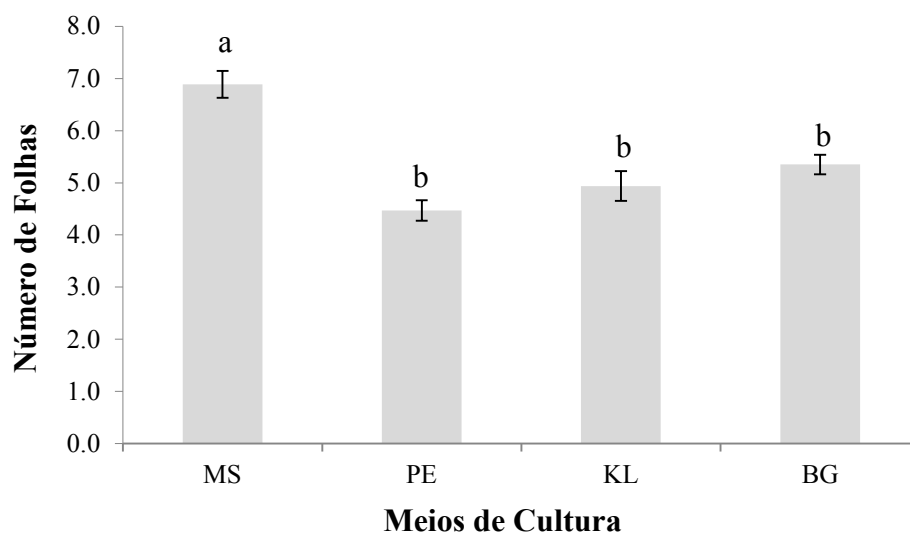


Figura 11. Número de folhas (NF) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 20 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

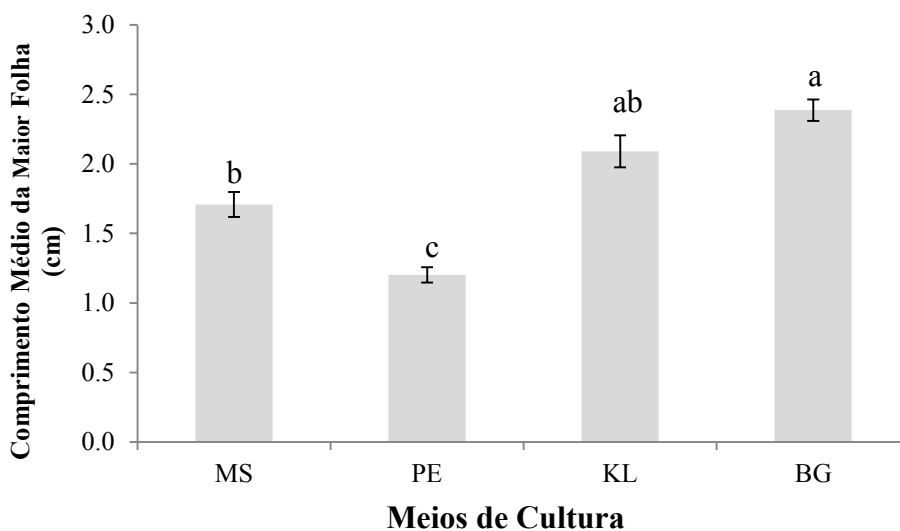


Figura 12. Comprimento da maior folha (CMF) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 20 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

Em relação a variável NR, podemos observar que os meios de cultura KL, MS e BG não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 1%, contudo todos eles apresentaram médias significativamente superiores ao tratamento PE (Figura 13). Contudo, para variável CMR, pode-se observar que as médias dos tratamentos KL e BG foram superiores às médias dos tratamentos PE e MS (Figura 14).

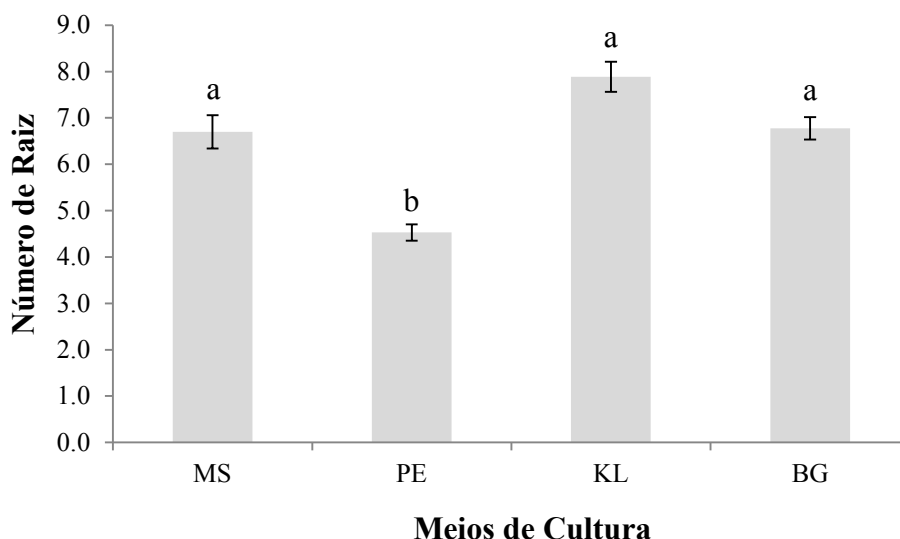


Figura 13. Número de raiz (NR) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 20 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

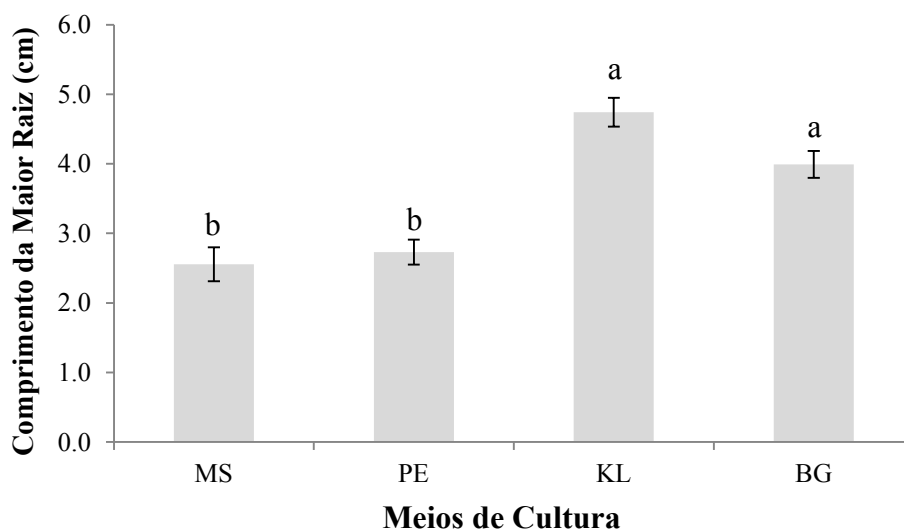


Figura 14. Comprimento da maior raiz (CMR) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 20 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters[®]; KL - Fertilizante Kristalon[™] Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®].

Dignart *et al.* (2009) observaram que não houve diferença significativa entre as médias das variáveis número de brotos, número de folhas, comprimento de parte aérea e comprimento de raiz no cultivo *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* em meio de cultivo Murashige e Skoog (1962) com diferentes concentrações de sacarose (15,0 e 30,0 g.L⁻¹), apenas a variável número de raiz apresentou média inferior no tratamento com 15,0 g.L⁻¹ de sacarose, assim, esses autores consideraram que, no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*, é possível utilizar tanto a concentração convencional de sacarose (30 g.L⁻¹) como a metade dessa. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos nesse experimento, onde o tratamento KL, com menor concentração de sacarose (30,0 g.L⁻¹) apresentou médias estatisticamente iguais a do tratamento BG (40,0 g.L⁻¹ de sacarose) para todas as variáveis testadas.

Sousa *et al.* (2007) e Faria *et al.* (2002) inferiram que o uso de carvão ativado no meio de cultura para subcultivo da espécie *Cattleya walkeriana* contribui positivamente para o desenvolvimento vegetativo das plântulas. Faria *et al.* (2002) concluíram que a adição de 2 g.L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura foi a concentração mais benéfica para a propagação de *Cattleya walkeriana in vitro*. No entanto, neste estudo, a concentração de carvão ativado no meio de cultura, parece não ter contribuído para o melhor desempenho do meio BG, quando comparado ao meio KL, uma vez que estatisticamente não houve diferença significativa entre todas as variáveis biométricas avaliadas.

Pedroso-de-Moraes *et al.* (2009) concluíram que o meio de cultura à base de fertilizante Kristalon Laranja demonstrou ser mais eficaz na propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya tigrina*, considerando as variáveis Massa fresca da raiz, Número de raiz e Comprimento da maior da raiz, quando comparado ao meio de cultura à base de Hyponex (NPK 6,5-9-19) e ao meio Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes. Schneider (2014) verificou que o melhor meio de cultivo para o desenvolvimento *in vitro* de mudas de *Cattleya intermedia* a partir de protocormos foi o meio a base do suplemento para orquídeas B&G e que o meio a base do fertilizante comercial Krystalon Laranja apresentou resultados similares a este no desenvolvimento das mudas,

esses meios foram testados pela autora também em comparação aos meios Murashige e Skoog (1962) e Knudson C (1946). Santos (2009) cultivou protocormos de *Cattleya walkeriana* nos meios de cultura Murashige e Skoog (1962), fertilizante Peters[®] 10-30-20 (3,0 g.L⁻¹) e fertilizante B&G (3,0 g.L⁻¹) e avaliou a concentração de alguns nutrientes na massa seca dos tecidos das plântulas obtidas, este autor observou que no meio Peters[®] houve maior número de nutrientes deficitários (6 de 10 nutrientes avaliados), e que todos os meios apresentaram déficit dos nutrientes Ca, Mg e Mn, com exceção ao Mg no meio à base do fertilizante B&G (3,0 g.L⁻¹).

Ainda, Segundo Santos (2009), no meio à base do fertilizante Peters[®], que não apresenta Ca em sua constituição, o Ca presente no tecido das plântulas, provavelmente, foi fornecido pelos demais constituintes do meio de cultura, principalmente pelo carvão ativado. Esses resultados talvez possam explicar o fato dos bons resultados obtidos com o meio KL para todas as variáveis analisadas, uma vez que o meio KL utilizado nesse experimento também não possui o macronutriente essencial Ca em sua constituição.

Santos (2009) e Rodrigues (2005) em estudos com *Cattleya walkeriana* observaram que a relação Raiz/Folha aumenta com a redução da concentração de sais no meio de cultura, trata-se de uma capacidade das plântulas em se adaptarem às condições de baixo suprimento nutricional, ou seja, investem mais em raiz do que em parte aérea. Assim, comparando o tratamento KL com o tratamento BG, podemos observar a tendência do meio KL à maior relação Raiz/Folha, talvez por conta da ausência de Ca neste meio, enquanto, segundo informação na embalagem do fabricante, o meio BG apresenta 23,0 mg.L⁻¹ de Ca.

Na Figura 15 temos a comparação de valores médio do pH_{final} dos cinco tratamentos, pode-se constatar que houve variação de pH em todos os meios de cultura testados, todos sofreram uma redução de pH quando comparados ao pH_{inicial} (5,8 ± 0,1) dos meios. Nessa análise, o pH_{final} do meio PE foi o que se manteve mais elevado e o pH_{final} do meio KC foi o que sofreu maior redução. Portanto, não houve correlação entre o pH e os resultados das variáveis biométricas obtidos. Com isso descartamos a possibilidade dos resultados inferiores no desenvolvimento das plântulas cultivadas no meio KC ser devido a uma redução do pH do meio de cultura.

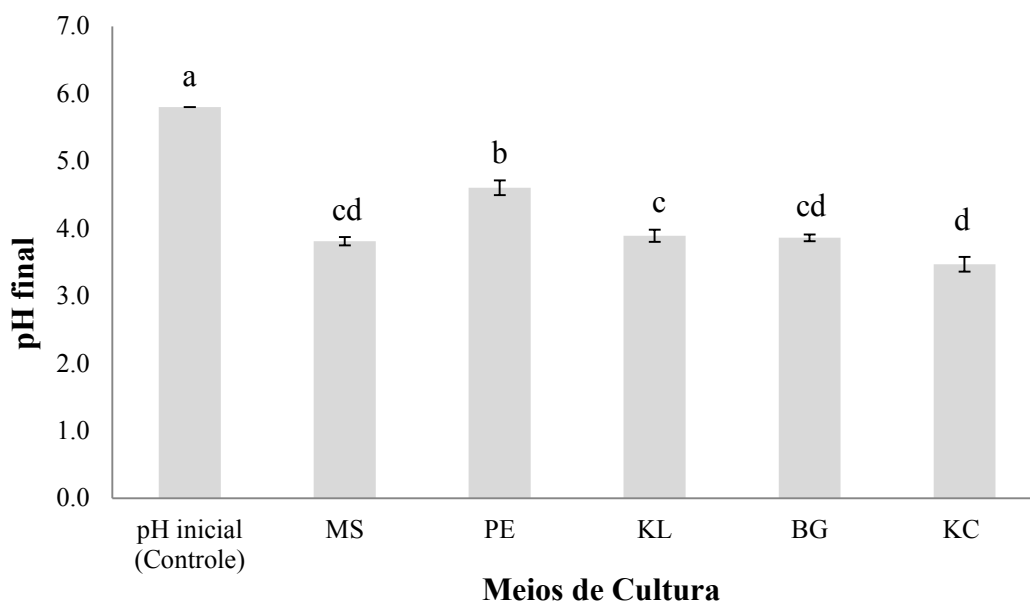


Figura 15. pH_{final} dos meios de cultura após 240 dias de cultivo de *Cattleya walkeriana* Gardner *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 10 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

MS - Murashige e Skoog (1962); KC - Knudson C (1946) modificado por Morel (1965); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

Alterações do pH do meio de cultura durante o subcultivo de plantas vem sendo especulada desde a década de 1940 (VACIN e WENT, 1949) a partir daí outros autores averiguaram que um conjunto de fatores estão envolvidos na variação de pH do meio de cultura, dentre eles fatores físicos (autoclavagem do meio de cultura) e/ou químicos (adição de ágar e pela própria dinâmica do balanço nutricional e exsudados liberados pela planta no meio) (PEDROSO-DE-MORAES *et al.* 2017; ADAMUCHIO, 2015; SCHNEIDER, 2014; PRIZAO, 2006). Vacin e Went (1949), ao medir o pH do meio contendo *Epidendrum brineanum* após cem dias, observaram uma alteração de 5,46 para 3,78, enquanto que na ausência de plântulas os autores verificaram que o pH foi pouco alterado. Do mesmo modo, Bettão (2009) encontrou valores médio de pH entre 3,03 e 3,98 após seis meses de cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* ao testar o meio de cultura Knudson C acrescido com diferentes doses de diferentes variedades de banana e pH inicial de $5,3 \pm 0,1$. Majerowicz *et al.* (2000) também observaram redução no pH dos meios com o cultivo de *Catasetum fimbriatum* e observaram que esta redução variava conforme a fonte de nitrogênio do meio. Sabe-se que o balanço de NO_3^- e NH_4^+ no meio de cultura e a absorção diferenciada destes íons pelas

plantas, participam na variação do pH no meio. Quando as plantas absorvem íons NH_4^+ , íons H^+ são liberados, contribuindo para a redução do pH do meio enquanto que a absorção de NO_3^- pode resultar em aumento do pH do meio, deste modo o balanço adequado entre esses dois íons parece ser fundamental no cultivo *in vitro* (FERNANDES, 2006; KAJIKI, 2004; SKIRVIN, *et al.* 1986). Peixoto e Pasqual (1995) em cultivo *in vitro* de videira também observaram ausência de respostas lineares, positivas ou negativas, entre alguns nutrientes analisados nos tecidos das plantas e o pH do meio de cultura. Da mesma forma Bettão (2009) verificou que não houve correlação entre o pH final de diferentes meios de cultura com as variáveis biométricas número de folhas e de raiz e comprimento de folha e de raiz das plântulas de *Cattleya walkeriana* propagadas *in vitro*.

Lone *et al.* (2008), testando diferentes substratos para a aclimatização de *Cattleya intermedia*, relataram que os valores médios de pH, apresentaram-se muito variados, e não influenciaram no desenvolvimento das plantas. Deste modo, outros estudos precisam ser realizados para que se possa entender a dinâmica pH *versus* desenvolvimento de plantas em sistema de propagação *in vitro*.

As diferenças visuais no desenvolvimento das plantas nos diferentes meios de cultivo avaliados podem ser observadas na Figura 16.



Figura 16. Comparação visual do desenvolvimento das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner após oito meses de cultivo nos meios MS (Murashige e Skoog, 1962), PE (Fertilizante Peters[®] (20-20-20)), KL (Fertilizante Kristalon[™] Laranja (6-12-36)) e BG (Meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®]).

Nesse contexto, um meio de cultura que seja de baixo custo e eficiente, torna-se muito importante na cadeia de produção da espécie. Ainda de acordo com Schneider (2014) o meio de cultura pode representar mais de 11% do custo operacional da produção da muda. E, conforme pode ser visto na Tabela 6 os custos com os meios alternativos utilizados neste trabalho podem representar uma redução de até quatro vezes quando comparado com os meios tradicionais, além disso, como visto os meios alternativos KL e BG forneceram resultados ainda melhores que os meios tradicionais, neste caso os meios KC e MS. Plantas de orquídeas podem demorar de quatro a seis anos para atingirem padrão de comercialização, assim, pequenos ganhos de tempo em alguma fase de desenvolvimento da cultura podem representar ganho econômico importante ao produtor (SAWAMURA, 2016).

Tabela 6. Custo médio por litro dos meios de cultura utilizados neste trabalho (Seropédica, 2018).

Meio de Cultura	Custo médio por litro (R\$)*				
	Meio de Cultura	Sacarose	Carvão Ativado	Ágar	Total
MS**	R\$ 12,80	R\$ 0,88	R\$ 0,09	R\$ 5,33	R\$ 19,01
KC**	R\$ 10,00	R\$ 0,88	R\$ 0,09	R\$ 5,33	R\$ 16,30
BG	R\$ 4,25	--	---	R\$ 5,33	R\$ 9,58
PE	R\$ 0,15	R\$ 0,88	R\$ 0,09	R\$ 5,33	R\$ 6,45
KL	R\$ 0,03	R\$ 0,88	R\$ 0,09	R\$ 5,33	R\$ 6,33

*Orçamento realizado em novembro de 2018.

** Meios de cultura utilizados a partir de formulação pronta.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters[®]; KL - Fertilizante Kristalon[™] Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®].

4. CONCLUSÕES

1) O meio Knudson C (1946) modificado por Morel (1965) não foi adequado para propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner nas condições utilizadas neste experimento;

2) Não houve correlação entre a variável pH_{final} dos meios de cultura e as respostas biométricas das plantas de *Cattleya walkeriana* Gardner avaliadas;

3) O meio de cultura alternativo a base de fertilizante KristalonTM Laranja e o meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®] se mostraram os mais indicados na propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner sob as condições testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMUCHIO, L. G. **pH do meio de cultura e agentes geleificantes na multiplicação in vitro de *Lavandula angustifolia* Miller**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015. 82 p.

ARAÚJO, L. G.; CARNEIRO, I. F.; PRABHU, A. S. Produção in vitro de mudas de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* a partir de sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 29, n. 2, p. 67-71, 1999.

BETTÃO, F. C. **Efeito de variedades e concentrações de polpa de banana no desenvolvimento in vitro de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 35p. Dissertação (Mestrado).

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T., CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento in vitro de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 253-258, 2004.

CORREIA, D.; ARAÚJO, J. D. M.; NASCIMENTO, E. H. S.; TUPINAMBÁ, J. M.; BESSA, M. C. Otimização da Produção de Mudanças de *Cattleya labiata*: Efeito da Sacarose no Crescimento In Vitro e na Aclimatização. **EMBRAPA: Circular Técnica 38**. Fortaleza CE, outubro, 2012. 8 p.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo in vitro de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun., 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Rio de Janeiro: Embrapa, 1997.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M., UNEMOTO, L. K., CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de Orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenas, 2012. 124 p.

FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAUJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using in vitro propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 489-492, 2002.

FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. 432 p.

FREITAS, E. M.; HERRMANN M. H., BRUISMA, G.; PÉRICO E.; ARAUJO, A. G. Propagação in vitro de *Cattleya intermedia* GRAHAM EX HOOK. (ORCHIDACEAE) em diferentes meios de cultura. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 30-41, 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v.38, n.2, 2014.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; GOMES, E. S.; GASPARINO, E. C.; MORO, F. V.; LEMOS, E. G. M. Morfologia da germinação de sementes e crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner em diferentes meios nutritivos. **Comunicata Scientiae** v. 5, n. 4, p. 456-463, 2014.

HERRMANN, M. H.; FREITAS, E. M.; PÉRICO, E. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.17, n.1-4, p.162-166, jan-mar, 2011.

KAJIKI, F. O. Estabelecimento do protocolo de micropropagação da espécie nativa *Baccharis tridentata* Vahl. (Asteraceae): estudos fisiológicos, anatômicos e histoquímicos *in vitro*. Campinas, SP: (s.n.), 2004.

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

KNUDSON, L. Non-symbiotic germination of orchid seed. **Botanical Gazette**, v.73, n.1, p.1-25, 1922.

LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; ASSARI, L. S. TAKAHASHI, L. S. A., FARIA, R. T. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 465-469, 2008.

MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G.B.; NIEVOLA, C.C.; SUZUKI, R.M. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. **Environmental and Experimental Botany**, v.44, p.1995-2006, 2000.

MOREL, G.M. Clonal propagation of orchids by meristem culture. **Cymbidium Society News**, 20: 3–11, 1965.

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

PEDROSO-DE-MORAES, C.; SANTOS, N. S.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G. M.; LEAL, T. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.13, n.2, p. 57-65, 2009.

PEDROSO-DE-MORAES, C.; SOUZA-LEAL, T.; DIOGO, J. A.; CANABRAVA, R. I.; PEDRO, N. P.; MARTELINE, M. A. Crescimento de *Arundina graminifolia* (D. DON.) HOCHR em diferentes meios de cultivo e níveis de pH. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá – PR, v. 10, n. 1, p. 9-24, jan./mar. 2017.

PEIXOTO, P. H. P.; PASQUAL, M. Micropropagação de videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista CERES**, v. 42, n. 242, p. 431-443, 1995.

PRIZAO, E. C. **Efeito de carvão ativado e do grafite no crescimento *in vitro* de Orquídeas.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2006. 43 p.

RODRIGUES, D. T. Nutrição e fertilização de orquídeas *in vitro* e em vasos. Dissertação (Mestrado) Mestrado em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas), Universidade Federal de Viçosa, 2005. 87 p.

SANTOS, A. F. Composição mineral do meio de cultura para crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, 2009. 24 p.

SAWAMURA, L. H. **Influências de vitaminas no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleyas* brasileiras.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2016. 42 p.

SCHNEIDER, L. **Propagação *in vitro* de catléias nativas da Mata Atlântica.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, 2014. 87 f.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; RAITZ BOOZ, M.; MAMORU SUZUKI, R. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185-191, março-abril, 2012.

SILVA, C. I.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Caracterização morfológica das sementes e das primeiras fases do ciclo de vida de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Arquivos Apadec**, n.8, v.2, p. 22-26, 2004.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; MANN, M. L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 292-294, 1986.

SOUSA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, V. L. R.; FARIA, S. P.; CAMPOS, M. R. C. Contaminação Microbiana na Propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 405-407, jul. 2007.

SOUSA, G. C.; CAMPOS, M. R. C.; CLEMENTE, P. L. Propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Shomburgkia crispa*. **IV Seminário de Iniciação Científica**, p.343-348 - UEG, 2006.

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

CAPÍTULO II

INOCULAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya walkeriana* Gardner COM *Azospirillum brasilense* E *Microvirga vignae* DURANTE ACLIMATIZAÇÃO

RESUMO

A etapa de aclimatização é a etapa na qual a planta é transferida das condições *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, trata-se de uma etapa crítica, representando, em muitos casos, as maiores perdas no cultivo *in vitro* de muitas espécies. A fim de minimizar os efeitos negativos desta etapa, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas durante a aclimatização de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner provenientes do cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura. Protocormos de *Cattleya walkeriana* com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram cultivadas *in vitro* nos meios de cultura Murashige e Skoog (MS); Fertilizante Peters[®] (PE); Fertilizante KristalonTM Laranja (KL) e Meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®] (BG) durante 240 dias. Ao término desse período as plântulas foram levadas para aclimatização em casa de vegetação, o substrato utilizado foi o *Sphagnum* e o sistema de irrigação foi do tipo nebulização intermitente. Aos 28 dias após o transplantio das mudas (DAT), com o auxílio de seringa esterilizada, plântulas de cada tratamento foram inoculadas com 1,0 ml da suspensão de *Azospirillum brasilense* SP 245 BR 11005 (AZ); com 1,0 ml da suspensão de *Microvirga vignae* BR 3299 (MV); e com zero ml de inoculante, sendo utilizada apenas H₂O destilada, este último foi designado de tratamento Controle (CO). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x4, sendo o fator A, inoculação da suspensão de *Azospirillum brasilense* (AZ), inoculação da suspensão de *Microvirga vignae* (MV) e ausência de inoculação (CO) e o fator B, mudas produzidas *in vitro* nos meios de cultura MS, PE, KL e BG. Foram feitas quatro repetições contendo seis plântulas cada, totalizando assim 288 plantas. Completados os 120 dias após o início da etapa de aclimatização das plântulas avaliou-se o percentual de sobrevivência (SB), a massa fresca total (MFT), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF), o número de raiz (NR) e o comprimento da maior raiz (CMR). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias ao teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 1%. Durante o período de aclimatização a temperatura média foi de 28°C, a umidade relativa do ar entre 70%-80% e a radiação média de 16.700 lux. O teste estatístico demonstrou que não houve interação entre os fatores testados e que a inoculação bacteriana não influenciou positivamente e/ou negativamente no desempenho das plântulas durante o período de aclimatização, contudo pode-se constatar que o meio de cultura interfere no desenvolvimento das plântulas durante a etapa de aclimatização. As plântulas provenientes do cultivo *in vitro* no meio de cultura BG foram as que obtiveram o melhor desempenho na etapa de aclimatização, quando comparadas àquelas provenientes do cultivo *in vitro* nos meios de cultura PE, KL e MS. Porém, os meios alternativos PE e KL também se mostram como boa alternativa para substituição do meio de cultura MS na propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner, representando redução significativa nos custos de produção.

Palavras-chave: orquídeas, inoculante, cultivo *ex vitro*.

ABSTRACT

The acclimatization stage is the stage in which the plant is transferred from the *in vitro* conditions to the *ex vitro* environment. This is a critical stage, representing, in many cases, the greatest losses in the *in vitro* cultivation of many species. In order to minimize the negative effects of this step, the objective of this work was to evaluate the effect of inoculation with plant growth promoting bacteria during the acclimatization of *Cattleya walkeriana* Gardner seedlings from *in vitro* culture in different culture media. *Cattleya walkeriana* protoplasts approximately 1.0 cm in length were cultured *in vitro* in the Murashige and Skoog (MS) culture media; Peters[®] Fertilizer (PE); Orange Kristalon[™] (KL) Fertilizer and B&G Orchidées[®] (BG) supply medium for 240 days. At the end of this period the seedlings were taken to acclimatization in greenhouse, the substrate used was Sphagnum and the irrigation system was of the intermittent mist type. Twenty-eight days after transplanting the seedlings (DAT), seedlings of each treatment were inoculated with 1.0 ml of the suspension of *Azospirillum brasilense* SP 245 BR 11005 (AZ); with 1.0 ml of the *Microvirga vignae* BR 3299 (MV) suspension; and with zero ml of inoculant, with only distilled H₂O being used, the latter was designated Control (CO) treatment. The experimental design was completely randomized (DIC) in a 3x4 factorial scheme, with factor A, inoculation of suspension of *Azospirillum brasilense* (AZ), inoculation of *Microvirga vignae* (MV) suspension and absence of inoculation (CO) and factor B, produced *in vitro* in the culture media MS, PE, KL and BG. Four replicates were made containing six seedlings each, totaling 288 plants. The total fresh mass (MFT), number of leaves (NF), length of largest leaf (CMF), total leaf mass (MFT) root number (NR) and the length of the largest root (CMR). The data were submitted to analysis of variance and the comparison of the means to the statistical test of Tukey, with a confidence interval of 1%. During the acclimatization period the average temperature was 28°C, the relative air humidity between 70% -80% and the average radiation of 16,700 lux. The statistical test showed that there was no interaction between the tested factors and that the bacterial inoculation did not influence positively and / or negatively on the performance of the seedlings during the acclimatization period, however, it can be verified that the culture medium interferes with the development of the seedlings during the acclimatization stage. The seedlings from the *in vitro* culture in the BG medium were the ones that obtained the best performance in the acclimatization stage when compared to those obtained from the *in vitro* culture in the culture media PE, KL and MS. However, the alternative media PE and KL are also shown as a good alternative for replacing the MS medium in the *in vitro* propagation of *Cattleya walkeriana* Gardner seedlings, representing a significant reduction in production costs.

Keywords: orchids, inoculant, *ex vitro* cultivation.

1. INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* de orquídeas a partir de sementes constitui uma das técnicas mais difundidas na propagação dessas espécies (EMBRAPA, 2011). A etapa final deste processo consiste na aclimatização das plântulas obtidas, sendo considerada uma das etapas mais delicadas, que se não for bem conduzida pode acarretar no atraso e/ou diminuição do crescimento das plântulas, ou até mesmo na perda de todo o material obtido *in vitro* (ASSAKAWA *et al.* 2008; STEGANI, 2006).

De acordo com Lone *et al.* (2008), a passagem das plântulas das condições *in vitro* para *ex vitro* em casa de vegetação torna-se crítica devido a fatores como o estresse hídrico, fotossíntese, absorção de nutrientes e fitossanidade. Desta forma, nessa etapa, as plantas passam por adaptações bioquímicas, anatômicas e morfológicas, alterando os processos fisiológicos até então adaptados para as condições de sobrevivência *in vitro* (ZANDONÁ *et al.* 2014; SILVA *et al.* 2007).

O estresse hídrico resulta da elevada transpiração das plantas durante a transferência para a condição *ex vitro*, a baixa eficiência em regular a transpiração excessiva ocorre porque, em geral, as plantas *in vitro* possuem estômatos pouco funcionais, reduzido espessamento da cutícula e da parede das células epidérmicas, pequeno desenvolvimento do mesófilo foliar, com muitos espaços intercelulares e ausência ou reduzido número de tricomas na epiderme (LIMA-BRITO *et al.* 2016).

A atividade fotossintética das plantas *in vitro* é limitada principalmente pela reduzida intensidade luminosa, baixa concentração de CO₂ no recipiente de cultivo e presença de sacarose no meio de cultura que é, em geral, a única ou principal fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (LIMA-BRITO *et al.* 2016; SOUTO *et al.* 2010). Deste modo, o processo de aclimatação visa auxiliar as plantas provenientes do cultivo *in vitro* a atingirem sua taxa fotossintética normal (LIMA-BRITO *et al.* 2016; SOUTO *et al.* 2010). Além disso, comumente, as raízes de plantas provenientes da propagação *in vitro* são fracas e pouco funcionais (BOSA *et al.* 2003), uma vez que no meio de cultura as plântulas, em geral, encontram facilmente disponíveis todo o suprimento necessário para seu desenvolvimento (ZANDONÁ *et al.* 2014).

Nas orquídeas, as raízes além de serem responsáveis pela fixação de plantas e absorção de nutrientes, podem atuar na propagação vegetativa e na realização de fotossíntese (KERBAUY, 1998). Deste modo, na fase de aclimatização, o sistema radicular tende a ficar

mais desenvolvido e funcional, proporcionando maior eficiência na absorção de nutrientes pelas plântulas, o que permite aumentar a probabilidade de sobrevivência das mesmas e, conseqüentemente possibilitando seu desenvolvimento (SOUTO *et al.* 2010; BOSA *et al.* 2003).

Nesse sentido, torna-se extremamente relevante, testar diferentes técnicas para favorecer o desenvolvimento de plântulas provenientes de propagação *in vitro* durante a etapa de aclimatização. Como, por exemplo, a técnica de inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), que naturalmente habitam raízes de orquídeas e podem trazer benefícios para a planta hospedeira, contudo pouco se conhece sobre a função desses microrganismos na fase de aclimatização *ex vitro* (GALDIANO JÚNIOR *et al.* 2011). As plântulas propagadas em condições *in vitro*, ou seja, em condições assépticas são, portanto, privadas de microrganismos benéficos, e essa técnica têm se mostrado altamente favorável na aclimatização de plântulas micropropagadas de diferentes espécies vegetais (GALDIANO JÚNIOR, 2009). Tais contribuições podem ser traduzidas em incremento da biomassa, maior aquisição de nutrientes, biocontrole de fitopatógenos e resistência a estresses ambientais, conseqüentemente com maior de sobrevivência das mesmas (GALDIANO JÚNIOR, 2009).

Nesse contexto, nesse experimento objetivou-se avaliar: 1) a influencia dos meios de cultura MS, PE, KL e BG na etapa de aclimatização das plântulas; 2) os efeitos da inoculação com duas espécies de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) durante a aclimatização das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner obtidas no experimento do Capítulo anterior.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Ao término das avaliações biométricas as plântulas do Experimento I obtidas *in vitro* foram transplantadas para bandejas de polipropileno com 40 células cada, totalizando oito bandejas (duas bandejas por tratamento MS, PE, KL e BG), o substrato utilizado foi o *Sphagnum*. As plântulas obtidas do tratamento KC não foram consideradas nessa etapa. As plântulas permaneceram no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Agronomia da UFRRJ (LCTV-IA/UFRRJ) por uma semana, em sequencia foram levadas para casa de vegetação onde permaneceram pelo período de 28 dias sem receber nenhum tipo de tratamento (Figura 17). O sistema de irrigação utilizado foi do tipo nebulização intermitente, sendo controlada automaticamente através do controlador e indicador digital de umidade e temperatura Full gauge modelo MT-530 *super* (Fabricante), quando a umidade relativa do ar no ambiente é $< 70\%$ o sistema é acionado, permanecendo em funcionamento pelo tempo de cinco minutos ou até que a umidade atinja 80%. A temperatura média na casa de vegetação foi de 28°C, uma vez que o sistema de exaustão de ar da estufa também é controlado pelo mesmo sistema, sendo o mesmo acionado quando a temperatura atinge 30°C, e permanece em funcionamento até que a temperatura baixe ou que o sistema de irrigação seja acionado. Ambos os sistemas, irrigação por nebulização intermitente e exaustão de ar, não funcionam simultaneamente. A intensidade luminosa média foi medida durante o período de aclimatização com aparelho Luxímetro Digital da marca Icel modelo Ld 510.



Figura 17. Mudas de *Cattleya walkeriana* em aclimatização antes de receber a inoculação bacteriana (Seropédica, 2018).

Aos 28 dias após o transplante das mudas (DAT), plântulas de cada tratamento foram inoculadas com 1 ml da suspensão de *Azospirillum brasilense* SP 245 (BR 11005) (concentração de 10^8 UFC ml⁻¹) (AZ); 1 ml da suspensão de *Microvirga vignae* BR 3299 (concentração de 10^8 UFC ml⁻¹) (MV); e sem adição de inoculante, sendo designado de tratamento Controle (CO) (Figura 18).

As estirpes bacterianas foram adquiridas na Embrapa Agrobiologia, Seropédica/RJ e posteriormente foram cultivadas em erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo DYGS líquido previamente esterilizado e com pH ajustado para 6,8 antes da autoclavagem (Döbereiner et al., 1999), pelo período de 48 horas a 30°C e sob agitação constante de 125 rpm. A quantidade de células foi determinada através de diluições seriadas e contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) no período entre 36-48 horas até resultar em concentrações bacterianas de $\sim 10^8$ células ml⁻¹, que foram então usadas para inoculação. Para inoculação utilizou-se seringas descartáveis e a suspensão foi aplicada ao redor do colo das plantas (Ferrari et al. 2018).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x4, sendo o fator A, inoculação da suspensão de *Azospirillum brasilense* (AZ), inoculação da suspensão de *Microvirga vignae* (MV) e ausência de inoculação (CO) e o fator B, os meios de cultura MS, PE, KL e BG, usados para a produção de mudas. Foram feitas quatro repetições, sendo considerada uma bandeja de polipropileno contendo seis células com uma planta cada, uma repetição, totalizando assim 288 plantas. As plantas permaneceram na casa de vegetação por mais 92 dias, totalizando 120 dias (28 dias + 92 dias), quando então avaliou-se o percentual de sobrevivência (SB), a massa fresca total (MFT), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF), o número de raiz (NR) e o comprimento da maior raiz (CMR). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias ao teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 1%, com auxílio do *software* SISVAR 5.6 (Ferreira, 2014).

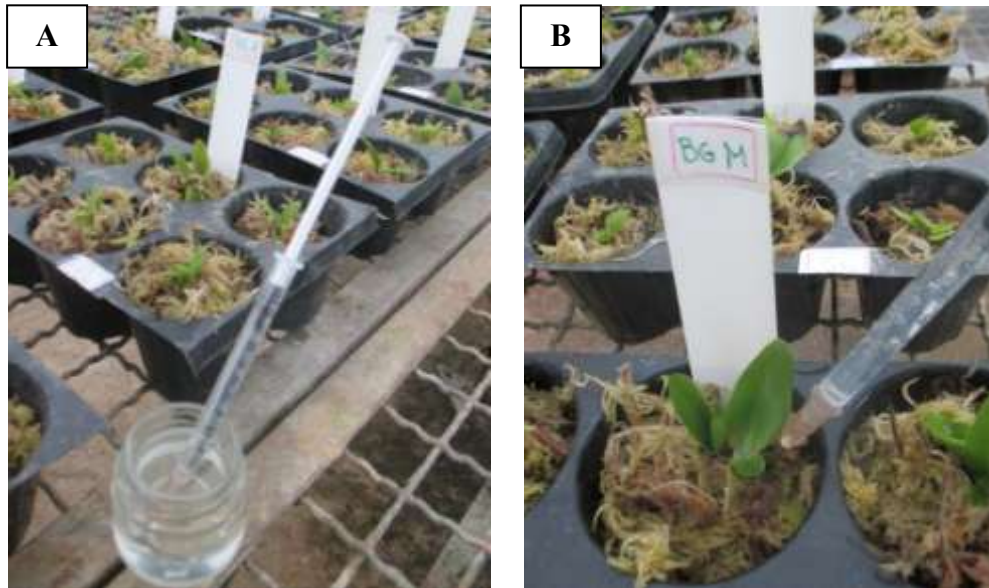


Figura 18. Mudanças de *Cattleya walkeriana* em aclimatização sendo inoculadas: suspensão de bactéria (A); Inoculação com 1,0 ml da suspensão bacteriana no colo da raiz (Seropédica, 2018).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância (ANAVA) mostrou que não houve diferença significativa, para o fator interação (meio de cultura *versus* inoculação), também não houve diferença estatisticamente significativa para o fator inoculação, havendo resultado significativo apenas para o fator meio de cultura, pelo teste F a 1%, para todas as variáveis analisadas. Portanto, a análise estatística mostrou que pelo menos um dos meios de cultura utilizado durante a fase de propagação *in vitro* influenciou nos resultados de todas as variáveis analisadas durante a aclimatização das plântulas independentemente da presença e/ou ausência de inoculação (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado da análise de variância (ANAVA) para os parâmetros avaliados, após quatro meses de aclimatização das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner produzidas *in vitro*.

Fatores	Variáveis Analisadas					
	SB (%)	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)
Inoculação (A)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Meios de Cultura (B)	*	*	*	*	*	*
Interação (AxB)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Média Geral	82.60	1.51	3.88	2.00	4.35	4.93
CV (%)	16.99	30.71	21.37	17.67	23.85	18.51

*resultado significativo no teste F a 1%; ns – resultado não significativo no teste F a 1%.

Percentual de sobrevivência (SB); Massa Fresca Total (MFT); Número de Folhas (NF); Comprimento da Maior Folha (CMF); Número de Raiz (NR); Comprimento da Maior Raiz (CMR).

Os resultados da comparação das médias pelo teste de Tukey a 1% estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8. Teste de média para as variáveis analisadas após quatro meses de aclimatização de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner cultivadas *in vitro* em diferentes meios de cultura.

Meios de Cultura	Média das Variáveis Analisadas*					
	SB (%)	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)
MS	62.5 b	0.94 bc	3.84 b	1.65 c	3.29 b	4.64 bc
PE	73.58 b	0.61 c	3.05 b	1.26 c	3.00 b	3.50 c
KL	95.75 a	1.46 b	3.46 b	2.16 b	4.32 b	5.25 ab

BG	98.58 a	3.03 a	5.20 a	2.94 a	6.78 a	6.34 a
Média Geral	82.60	1.51	3.88	2.00	4.35	4.93

* médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters[®]; KL - Fertilizante Kristalon[™] Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®].

Percentual de sobrevivência (SB); Massa Fresca Total (MFT); Número de Folhas (NF); Comprimento da Maior Folha (CMF); Número de Raiz (NR); Comprimento da Maior Raiz (CMR).

O meio BG mostrou resultados superiores para todos os parâmetros analisados, com exceção aos parâmetros percentual de sobrevivência (% SB) e comprimento da maior raiz (CMR), cujo meio KL apresentou médias estatisticamente iguais ao meio BG. Já os meios MS e PE apresentaram, entre si, resultados estatisticamente iguais para todos os parâmetros. O meio KL apresentou resultado estatisticamente similar ao meio MS para a variável massa fresca total (MFT), sendo superior ao meio PE. No entanto, para variável número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF) e número de raiz (NR) o meio KL não diferiu estatisticamente dos meios MS e PE.

Na Tabela 9 têm-se os resultados da comparação das médias pelo teste de Tukey a 1% para os meios de cultura dentro de cada tratamento do fator inoculação.

Em ausência de inoculação, o meio BG mostrou resultado superior para a variável MFT, CMF e NR, não diferindo estatisticamente do meio KL e PE para a variável SB e dos meios MS, PE e KL para variável NF. Para variável CMR os meios BG, KL e MS apresentaram resultados similares, contudo os meios KL e MS também não diferiram do meio PE, este que apresentou média inferior ao meio BG. Quando na presença de inoculação com *Azospirillum brasilense* (AZ), estatisticamente, não houve diferença entre as médias das variáveis SB e NF dos diferentes meios de cultura utilizados. Entretanto, o meio BG se mostrou superior aos demais meios quanto a variável MFT, para essa mesma variável os demais meios foram similares. Para variável CMF os meios BG e KL não diferiram estatisticamente entre si, contudo o meio KL também se mostrou similar ao meio MS, que por sua vez não diferiu do meio PE. Quanto a variável NR os meios BG e KL também não diferiram estatisticamente entre si, mas o meio KL apresentou resultados estatisticamente iguais aos meios MS e PE. Para variável CMR os meios MS, KL e BG não diferiram estatisticamente entre si, contudo os meios MS e KL também se mostraram similar ao meio PE.

Na presença de inoculação com *Microvirga vignae* (MV), estatisticamente, não houve diferença entre as médias da variável CMR em função aos diferentes meios de cultura

utilizados durante a fase de cultivo *in vitro*. Entretanto, o meio BG mostrou resultados superiores para a variável MFT, CMF e NR. Os meios MS, PE e KL não diferiram entre si para a variável MFT e NR. Quanto a variável NF os meios BG e MS não diferiram estatisticamente entre si, contudo, o meio MS também não diferiu estatisticamente dos meios KL e PE, estes que mostraram resultados inferiores àqueles obtidos com o meio BG. Para variável SB os meios BG, KL e PE não diferiram estatisticamente entre si, porém, os meios KL e PE também se mostraram similares ao meio MS, este que apresentou resultados inferiores aos do meio BG. Em se tratando da variável CMF o meio KL mostrou resultado estatisticamente igual ao meio PE, este que por sua vez não diferiu do meio MS, meio que se mostrou inferior ao meio KL para essa variável.

Tabela 9. Teste de média para as variáveis analisadas após 120 dias de aclimatização de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner cultivadas *in vitro*, comparação das médias dentro de cada tratamento do fator inoculação.

Fatores		Média das Variáveis Analisadas*					
Meios de Cultura	Inoculação	SB (%)	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)
MS	CO	54.25 b	1.00 b	4.08 ab	2.05 b	3.49 b	4.87 ab
PE	CO	79.25 ab	0.51 b	2.87 b	1.15 c	3.03 b	3.09 b
KL	CO	95.75 a	1.36 b	3.34 ab	2.11 b	3.97 b	4.97 ab
BG	CO	100.00 a	3.14 a	5.25 a	3.03 a	6.83 a	6.33 a
Média		82.31	1.50	3.89	2.08	4.33	4.82
MS	AZ	70.75 a	0.89 b	3.41 a	1.5 bc	2.58 b	4.80 ab
PE	AZ	62.50 a	0.62 b	3.42 a	1.25 c	3.38 b	3.34 b
KL	AZ	95.75 a	1.51 b	3.83 a	2.15 ab	4.56 ab	5.29 ab
BG	AZ	95.75 a	2.93 a	4.93 a	2.71 a	6.50 a	6.46 a
Média		81.19	1.49	3.89	1.90	4.25	4.97
MS	MV	62.50 b	0.92 b	4.02 ab	1.40 c	3.79 b	4.24 a
PE	MV	79.00 ab	0.71 b	2.85 b	1.37 bc	2.60 b	4.08 a
KL	MV	95.75 ab	1.51 b	3.21 b	2.22 b	4.43 b	5.50 a
BG	MV	100.00 a	3.01 a	5.42 a	3.08 a	7.00 a	6.23 a
Média		84.31	1.54	3.87	2.02	4.46	5.01

* médias seguidas da mesma letra na coluna dentro de um mesmo tratamento do fator inoculação não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

Percentual de sobrevivência (SB); Massa fresca total (MFT); Número de folhas (NF); Comprimento da maior folha (CMF); Número de raiz (NR); Comprimento da maior raiz (CMR).

Ausência de inoculação (CO); Inoculação com *Azospirillum brasilense* (AZ); Inoculação com *Microvirga vignae* (MV).

Galdiano Júnior (2009) promoveu a inoculação das bactérias *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Curtobacteria* sp., (rizobactérias produtoras de AIA que o autor verificou que naturalmente habitam o velame de *Cattleya walkeriana* Gardner do acervo da casa de vegetação do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia – FCAV/UNESP), o autor verificou que os isolados de *Enterobacter* sp. e de *Bacillus* sp. mostraram-se promissores para a promoção de crescimento desta espécie orquídea durante a fase *ex vitro* de plântulas obtidas de maneira assimbiótica, com percentual de sobrevivência superior ao tratamento testemunha, entretanto os isolados *Burkholderia* sp. e *Curtobacteria* sp. não foram eficientes para a sobrevivência e promoção de crescimento durante a aclimatização das plântulas.

Embora alguns estudos (VIEIRA *et al.* 2017; GOMES *et al.* 2016; SPOLAOR *et al.* 2016; SOUZA *et al.* 2015; COSTA *et al.* 2014) já comprovaram os benefícios que a inoculação com as bactérias *Azospirillum brasilense*, *Microvirga vignae*, entre outras, proporcionam às mais variadas culturas, como soja, milho, trigo, feijão, arroz, etc., alguns autores verificaram ausência de efeito ou até mesmo efeito negativo da inoculação com algumas bactérias. Santos *et al.* (2016) verificaram que a inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense* no tratamento de semente não trouxe mudança significativa na qualidade industrial e fisiológica de trigo. Corassa *et al.* (2013) verificaram que a inoculação de sementes de trigo com *Azospirillum brasilense* quando não associada à adubação nitrogenada, acarretou no declínio no rendimento de grãos. Amaral *et al.* (2017) também verificaram que na cultura de arroz o efeito da inoculação com bactérias depende da variedade e da dose de N utilizada. Neste trabalho, a inoculação com as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Microvirga vignae* parece não ter ocasionado efeito positivo e/ou negativo as plântulas, uma vez que, estatisticamente esses tratamentos não diferiram do tratamento com ausência de inoculação (Controle).

Os resultados seguem abaixo representados graficamente. Nas Figuras 19, 21, 23, 25, 27 e 29 temos, respectivamente, os resultados das médias para as variáveis SB, MFT, NF, CMF, NR e CMR por tratamento dentro do fator meio de cultura. E nas Figuras 20, 22, 24, 26, 28 e 30 temos, respectivamente, os resultados das médias para as variáveis SB, MFT, NF, CMF, NR e CMR por tratamento dentro do fator inoculação.

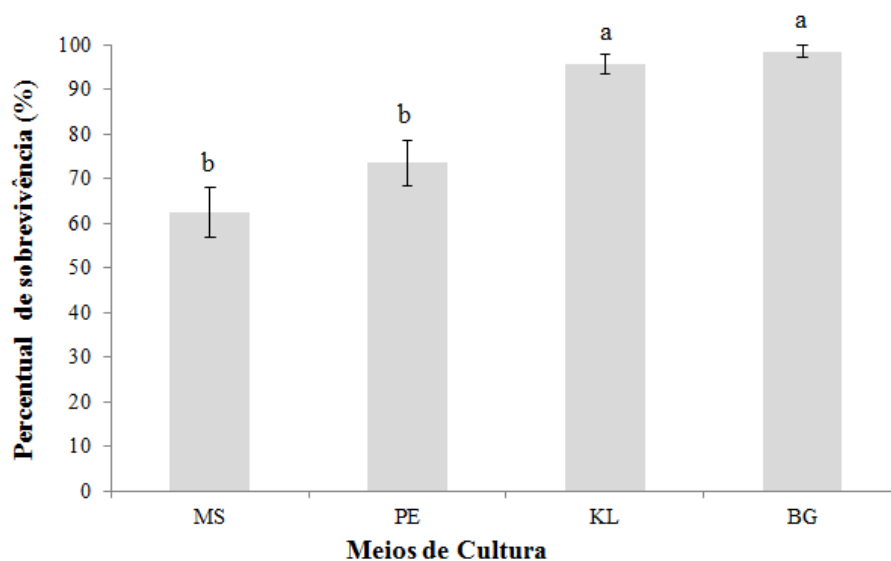


Figura 19. Percentual de sobrevivência (SB) por tratamento do Fator B das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média das 12 repetições para cada tratamento dentro do fator meio de cultura.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®. Barra de erro padrão.

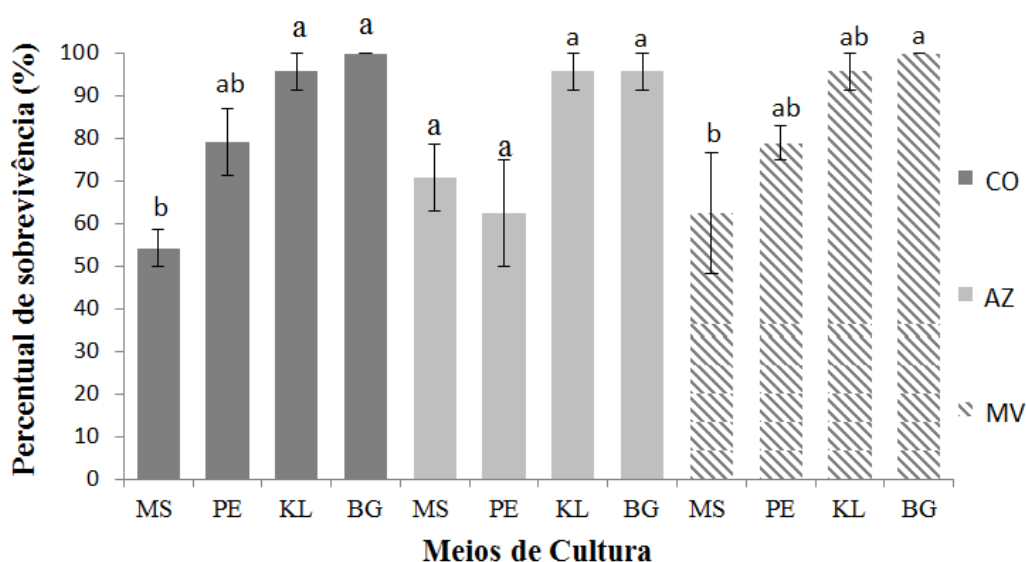


Figura 20. Percentual de sobrevivência (SB) por tratamento do Fator A das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra dentro de um mesmo tratamento do fator inoculação não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade. Barra de erro padrão.

Os dados representam a média geral das quatro repetições dentro de cada tratamento do fator inoculação.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

Ausência de inoculação (CO); Inoculação com *Azospirillum brasilense* (AZ); Inoculação com *Microvirga vignae* (MV).

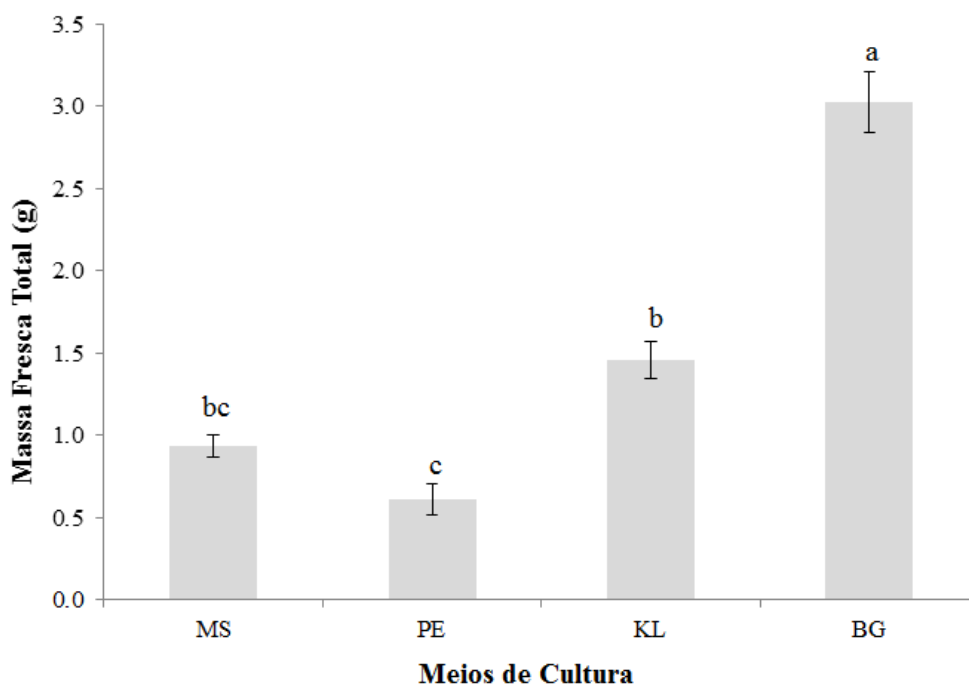


Figura 21. Massa fresca total (MFT) por tratamento do fator B das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média das 12 repetições para cada tratamento dentro do fator meio de cultura.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®. Barra de erro padrão.

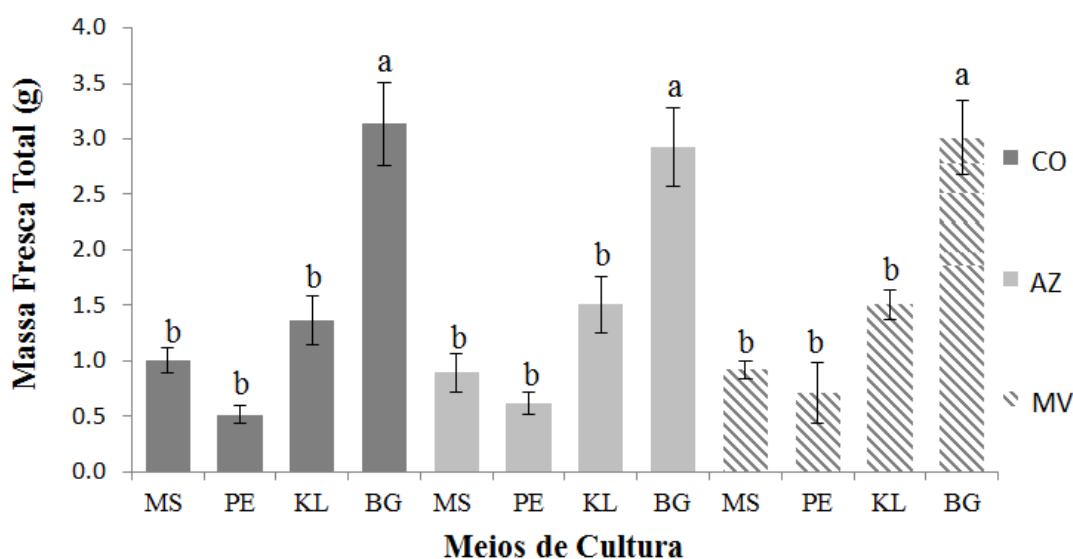


Figura 22. Massa fresca total (MFT) por tratamento do fator A das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra dentro de um mesmo tratamento do fator inoculação não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade. Barra de erro padrão.

Os dados representam a média geral das quatro repetições dentro de cada tratamento do fator inoculação.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

Ausência de inoculação (CO); Inoculação com *Azospirillum brasilense* (AZ); Inoculação com *Microvirga vignae* (MV).

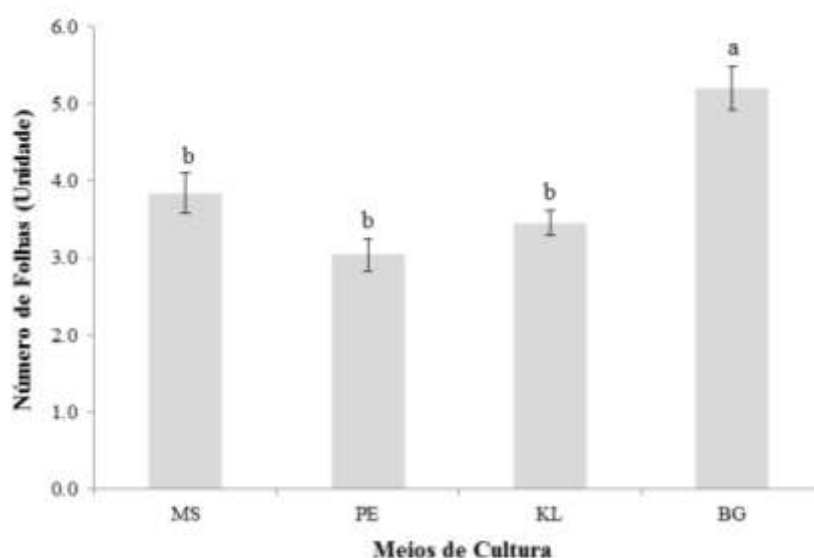


Figura 23. Número de folhas (NF) por tratamento do fator B das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média das 12 repetições para cada tratamento dentro do fator meio de cultura.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées®. Barra de erro padrão.

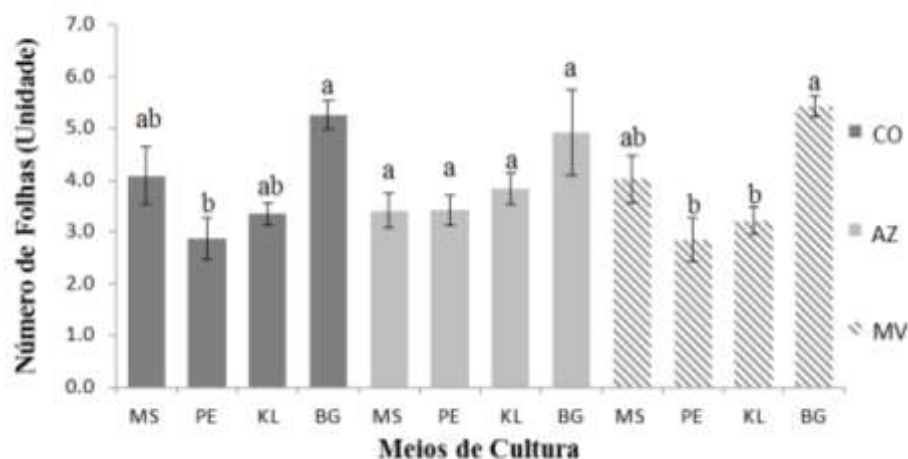


Figura 24. Número de folhas (NF) por tratamento do fator A das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra dentro de um mesmo tratamento do fator inoculação não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade. Barra de erro padrão.

Os dados representam a média geral das quatro repetições dentro de cada tratamento do fator inoculação.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées®.

Ausência de inoculação (CO); Inoculação com *Azospirillum brasilense* (AZ); Inoculação com *Microvirga vignae* (MV).

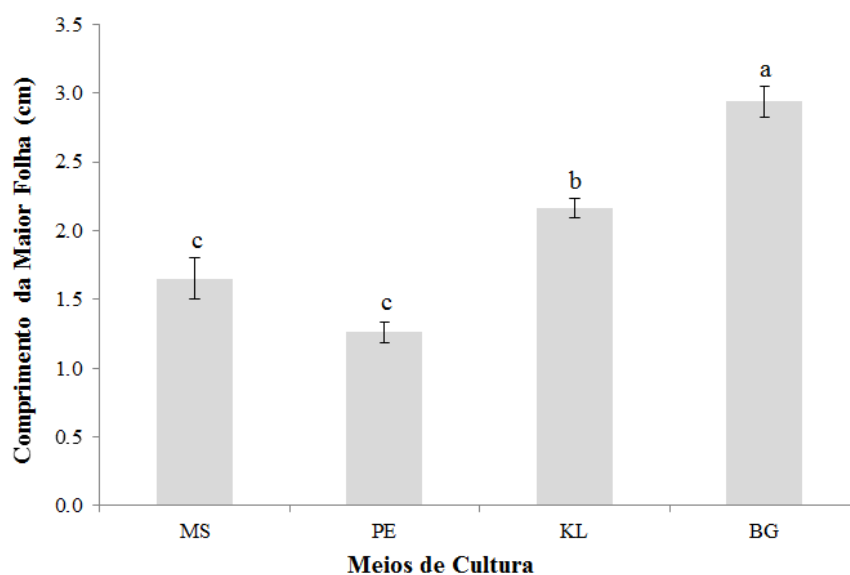


Figura 25. Comprimento da maior folha (CMF) por tratamento do fator B das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018. Barra de erro padrão.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média das 12 repetições para cada tratamento dentro do fator meio de cultura.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters[®]; KL - Fertilizante Kristalon[™] Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®].

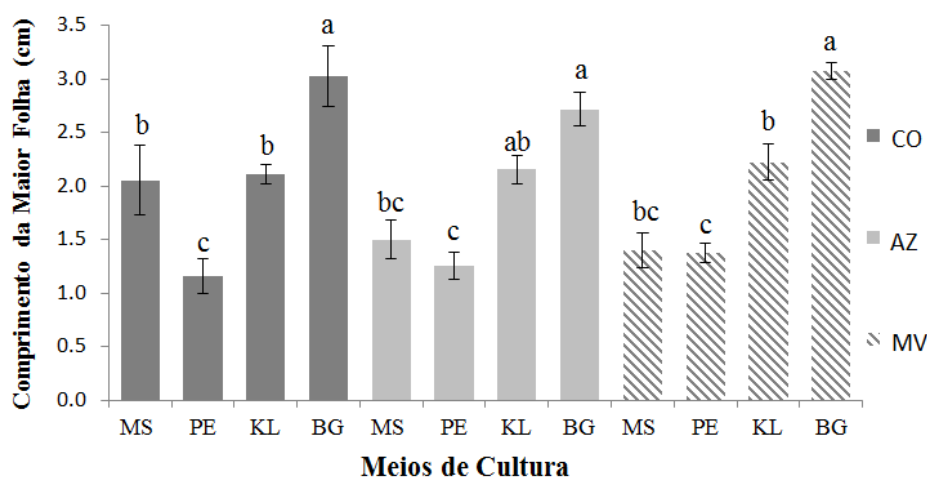


Figura 26. Comprimento da maior folha (CMF) por tratamento fator A das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra dentro de um mesmo tratamento do fator inoculação não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade. Barra de erro padrão.

Os dados representam a média geral das quatro repetições dentro de cada tratamento do fator inoculação.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters[®]; KL - Fertilizante Kristalon[™] Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®].

Ausência de inoculação (CO); Inoculação com *Azospirillum brasilense* (AZ); Inoculação com *Microvirga vignae* (MV).

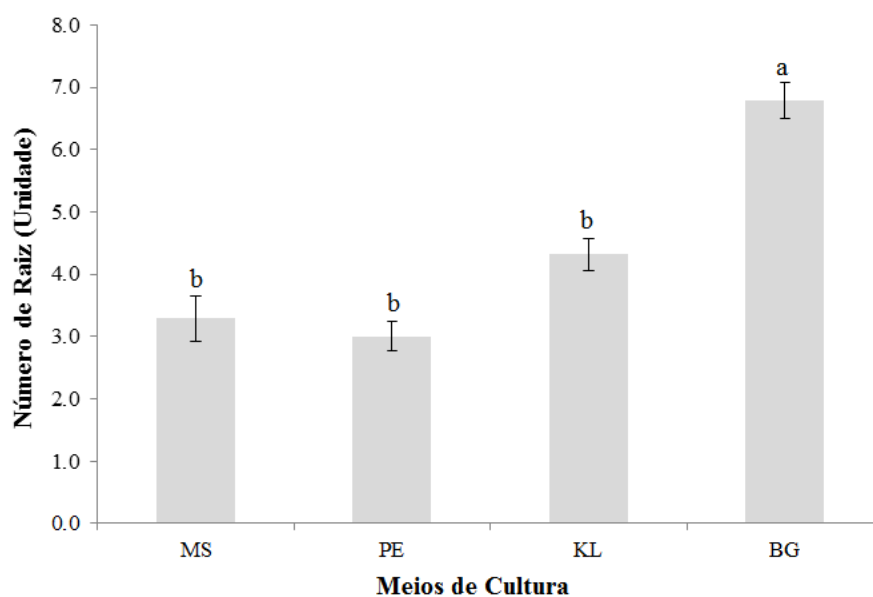


Figura 27. Número de raiz (NR) por tratamento (Fator B) das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média das 12 repetições para cada tratamento dentro do fator meio de cultura.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura supriemento B&G Orchidées®. Barra de erro padrão.

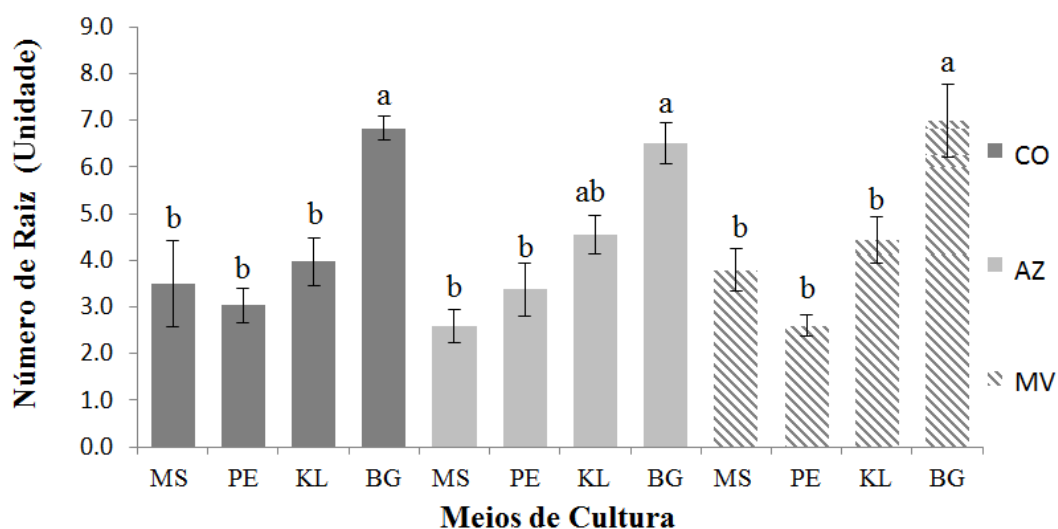


Figura 28. Número de raiz (NR) por tratamento do fator A das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra dentro de um mesmo tratamento do fator inoculação não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade. Barra de erro padrão.

Os dados representam a média geral das quatro repetições dentro de cada tratamento do fator inoculação.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters[®]; KL - Fertilizante Kristalon[™] Laranja; BG - Meio de cultura supriemento B&G Orchidées[®].

Ausência de inoculação (CO); Inoculação com *Azospirillum brasilense* (AZ); Inoculação com *Microvirga vignae* (MV).

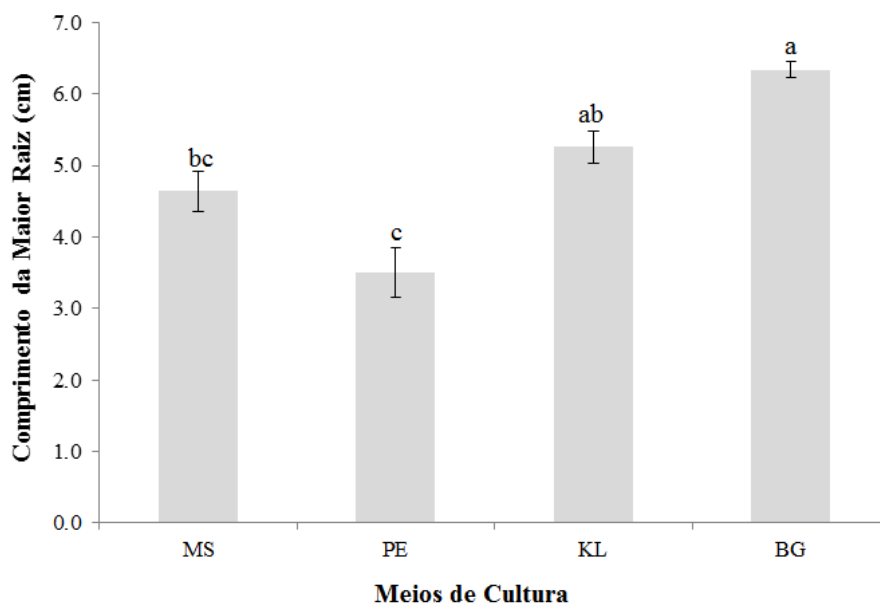


Figura 29. Comprimento da maior raiz (CMR) por tratamento do fator B das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média das 12 repetições para cada tratamento dentro do fator meio de cultura.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters[®]; KL - Fertilizante Kristalon[™] Laranja; BG - Meio de cultura supriemento B&G Orchidées[®]. Barra de erro padrão.

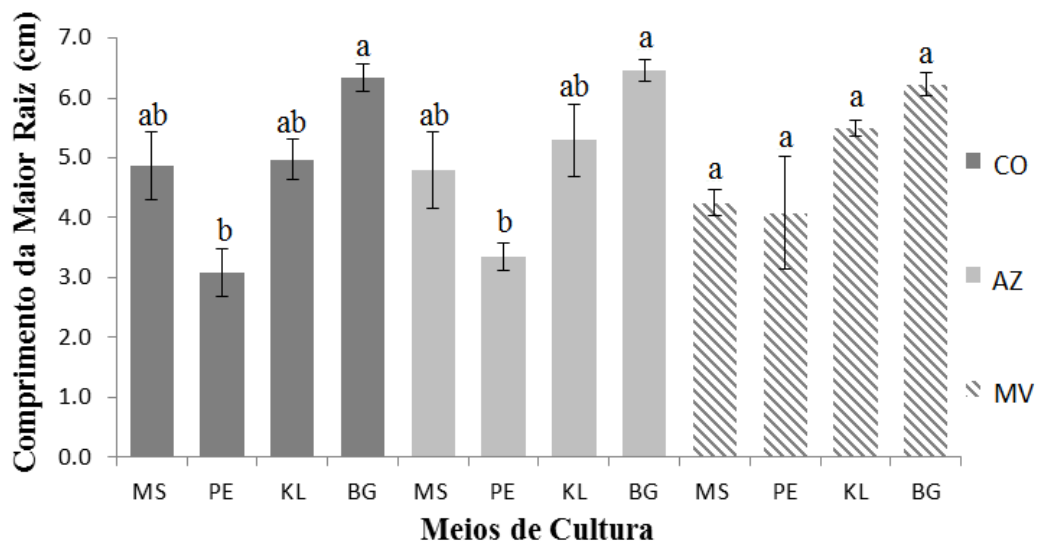


Figura 30. Comprimento da maior raiz (CMR) por tratamento do fator A das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra dentro de um mesmo tratamento do fator inoculação não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade. Barra de erro padrão.

Os dados representam a média geral das quatro repetições dentro de cada tratamento do fator inoculação.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

Ausência de inoculação (CO); Inoculação com *Azospirillum brasilense* (AZ); Inoculação com *Microvirga vignae* (MV).

Em se tratando do percentual de sobrevivência obtido, podemos considerar que houve grande eficácia na etapa de aclimatização, uma vez que os percentuais de sobrevivência, independentemente do tratamento do fator inoculação, foram de 62.50% para plântulas provenientes de cultivo *in vitro* no meio MS, 73.58% para plântulas provenientes de cultivo *in vitro* no meio PE, 95.75% para plântulas provenientes de cultivo *in vitro* no meio KL e de 98.58% para plântulas provenientes de cultivo *in vitro* no meio BG. Os resultados relativos à porcentagem de sobrevivência observados nesse trabalho se aproximam aos obtidos por Galdiano-Júnior *et al.* (2011). Estes autores obtiveram o seguinte percentual de sobrevivência ao final de 90 dias de aclimatização de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner provenientes de cultivo *in vitro* em meio Murashige e Skoog (1962) e inoculadas com rizobactérias em casa de vegetação: *Bacillus* (80%), *Burkholderia* (57.5%), *Enterobacter* (75.5%), *Curtobacterium* (55%) e na ausência de inoculação (60%).

Entretanto, Colombo *et al.* (2005) verificaram que dentre os substratos por eles testados, o *Sphagnum* spp. foi o substrato que proporcionou a menor taxa de sobrevivência de plântulas de um híbrido de *Cattleya*. Dorneles e Trevelin (2011) obtiveram apenas 53% de sobrevivência das plântulas de *Cattleya intermedia* aclimatizadas em substrato de *Sphagnum* spp., esses autores relataram que algumas plântulas apresentaram intolerância à umidade excessiva, senescendo devido ao apodrecimento de suas raízes, fato que também se observou neste experimento. Ademais, as bactérias do gênero *Azospirillum* spp. e *Microvirga* spp. são aeróbias, assim alguns estudos indicam que o excesso de água no substrato, pode influenciar negativamente na eficiência das mesmas, pela ocorrência de morte, de dormência ou diminuição da capacidade de fixação de nitrogênio (VIEIRA *et al.* 2017; SOUZA *et al.* 2015).

O *Sphagnum* spp. é um dos substratos mais indicado para aclimatização de orquídeas, uma vez que o estresse hídrico pós cultivo *in vitro* é um dos fatores preponderantes na sobrevivência das plantas, a alta capacidade de retenção de umidade proporcionada por este substrato leva ao bom desempenho de sobrevivência das plantas aclimatizadas, entretanto, questões ambientais têm gerado um aumento na pesquisa por substratos alternativos.

No Brasil, a coleta de *Sphagnum* spp. na natureza é proibida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), sendo o *Sphagnum* spp. importado de turfas chilenas, o que agrega alto custo ao substrato (ZANDONÁ *et al.* 2014; DORNELES e TREVELIN, 2011; LONE *et al.* 2008). Além do substrato, as condições ambientais na casa de vegetação foram mantidas dentro da faixa para a espécie, conforme valores descritos por Menezes (2011), sendo a umidade relativa do ar entre 70-80% e a temperatura média de 28 °C e radiação média de 16.700 lux.

Na Tabela 10 podemos analisar os resultados das variáveis biométricas obtidos antes e depois da aclimatização das mudas, houve aumento das médias das variáveis MFT e CMR após o período de aclimatização das mudas provenientes de todos os meios de cultura utilizados. Entretanto, para as demais variáveis, houve queda nos valores médios após a aclimatização, exceto para as plântulas provenientes do cultivo em meio BG. Estas mantiveram a média para variável NF e NR, após aclimatização, praticamente igual à média inicial, ou seja, antes da aclimatização e médias superiores para as variáveis CMF e CMR após o período de aclimatização. A queda do valor médio em algumas variáveis pode ser devido ao estresse sofrido pelas plântulas durante a fase de aclimatização, resultados semelhantes foram observados por Dorneles e Trevelin (2011) na aclimatização de *Cattleya intermedia*, cujo substrato utilizado também foi o *Sphagnum* spp. Estes autores observaram

que o número médio de folhas e de raiz e o comprimento médio de folhas e de raiz sofreram redução ao longo do tempo de aclimatização. Assim, estes resultados reforçam que as plantas cultivadas *in vitro* do meio BG tiveram melhor desempenho durante a fase de aclimatização que aquelas provenientes dos demais meios de cultura, uma vez que não houve redução nos valores médios de nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 10. Resultado das variáveis analisadas antes (*in vitro*) e depois (*ex vitro*) da aclimatização das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner.

Meios de Cultura	Média das variáveis analisadas				
	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)
MS <i>in vitro</i>	0.48	6.89	1.71	6.70	2.56
MS <i>ex vitro</i>	0.94	3.84	1.65	3.29	4.64
PE <i>in vitro</i>	0.47	4.47	1.20	4.53	2.73
PE <i>ex vitro</i>	0.61	3.05	1.26	3.00	3.50
KL <i>in vitro</i>	1.03	4.94	2.09	7.89	3.99
KL <i>ex vitro</i>	1.46	3.46	2.16	4.32	5.25
BG <i>in vitro</i>	0.93	5.35	2.39	6.78	4.74
BG <i>ex vitro</i>	3.03	5.20	2.94	6.78	6.34

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters[®]; KL - Fertilizante Kristalon[™] Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®].

Massa fresca total (MFT); Número de folhas (NF); Comprimento da maior folha (CMF); Número de raiz (NR); Comprimento da maior raiz (CMR).

O meio de cultura BG utilizado possui 10 g.L⁻¹ de sacarose e 1 g.L⁻¹ de carvão ativado a mais que os demais meios de cultura utilizados, fato que, além da própria concentração de macro e micronutrientes, pode ter influenciado nos resultados obtidos.

Contudo, Silva *et al.* (2014) testaram diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g.L⁻¹) em meio composto pelos sais do meio Murashige e Skoog (1962) no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner e obtiveram melhores resultados com emprego de 20 g.L⁻¹ de sacarose, estas apresentaram maior crescimento, bem como a maior espessura do mesofilo. Dignart *et al.* (2009) também testaram o meio Murashige e Skoog (1962) com diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g.L⁻¹) na propagação de *Cattleya walkeriana* Gardner e verificaram que estatisticamente as concentrações de 15 e 30 g.L⁻¹ de sacarose não interferiram nos resultados das variáveis biométricas analisadas.

Torres *et al.* (2010) verificaram que plântulas de *Cattleya labiata* propagadas *in vitro* em meio contendo 20 g.L⁻¹ de sacarose foram mais resistentes ao processo de aclimatização *ex vitro*, apresentando maior taxa de sobrevivência quando comparadas as do mesmo meio de

cultura utilizado só que contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose. Correia *et al.* (2012) constataram que a ausência de sacarose no meio de cultura favorece o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya labiata* tanto sob condições *in vitro* como em telado, além da maior porcentagem de sobrevivência na aclimatização.

Faria *et al.* (2002) testaram o meio Murashige e Skoog (1962) modificado com a metade da concentração dos macronutrientes e suplementado com 1, 2, 4 e 6 g.L⁻¹ de carvão ativado na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e concluíram que a adição de 2 g.L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura foi a mais benéfica para a propagação da espécie. Galdiano-Júnior *et al.* (2009) testaram diferentes concentrações de carvão ativado (0; 0,5; 1,0 e 2,0 g.L⁻¹) em meio Murashige e Skoog (1962) modificado com a metade da concentração dos macronutrientes e também verificaram que a adição de 2,0 g.L⁻¹ de carvão ativado no meio nutritivo favoreceu maior crescimento *in vitro* e maior porcentagem de sobrevivência *ex vitro* de plantas de *Cattleya loddigesii*. Além desses, outros autores, entre eles Guson *et al.* (2012), Chapla *et al.* (2009), Morales *et al.* (2006) e Prizao (2006) também constataram benefícios do uso do carvão ativado para a cultura *in vitro* de orquídeas.

Como nos resultados obtidos do cultivo *in vitro* o meio KL contendo e 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado e o meio BG contendo 2,0 g.L⁻¹ não diferiram entre si, esperava-se que ambos também tivessem o mesmo desempenho durante a aclimatização, contudo isso não ocorreu, e outros fatores também podem ser responsáveis por esses resultados, como a própria concentração de macro e micronutrientes presentes em cada um desses meios de cultura. Por exemplo, o macronutriente cálcio (Ca) não faz parte da composição do meio KL, embora seja um elemento essencial para as plantas. Segundo Fernandes (2006) na deficiência de Ca as plantas tendem a apresentar limitado crescimento do sistema radicular, podendo as raízes escurecer e apodrecerem, mas não foi o que se observou nas plantas cultivadas no meio KL, que, pelo contrário, apresentaram a maior média para a variável NR durante cultivo *in vitro* e segunda maior média para a variável CMR durante a aclimatização.

Deste modo, torna-se muito difícil apontar se houve uma interferência da concentração de sacarose, carvão ativado ou se foi mesmo o balanço de macro e micronutrientes presentes nesses meios de cultura os responsáveis pelos resultados obtidos durante a aclimatização das plântulas. Mas, independentemente desse fato, o meio BG foi o que apresentou melhores resultados durante a aclimatização das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner. Também, há de se ressaltar que os resultados obtidos com o meio alternativo KL e PE foram muito promissores, sendo observados com o uso do meio KL

resultados estatisticamente mais eficientes (variáveis SB e CMF) ou similares (variáveis MFT, NF, NR e CMR) aos obtidos com o meio MS durante a aclimatização das plantas e todos os resultados obtidos com o meio PE foram estatisticamente similares aos obtidos com meio MS.

As diferenças visuais no desenvolvimento das plântulas provenientes de diferentes meios de cultivo e inoculação durante aclimatização por quatro meses podem ser observadas na Figura 31.

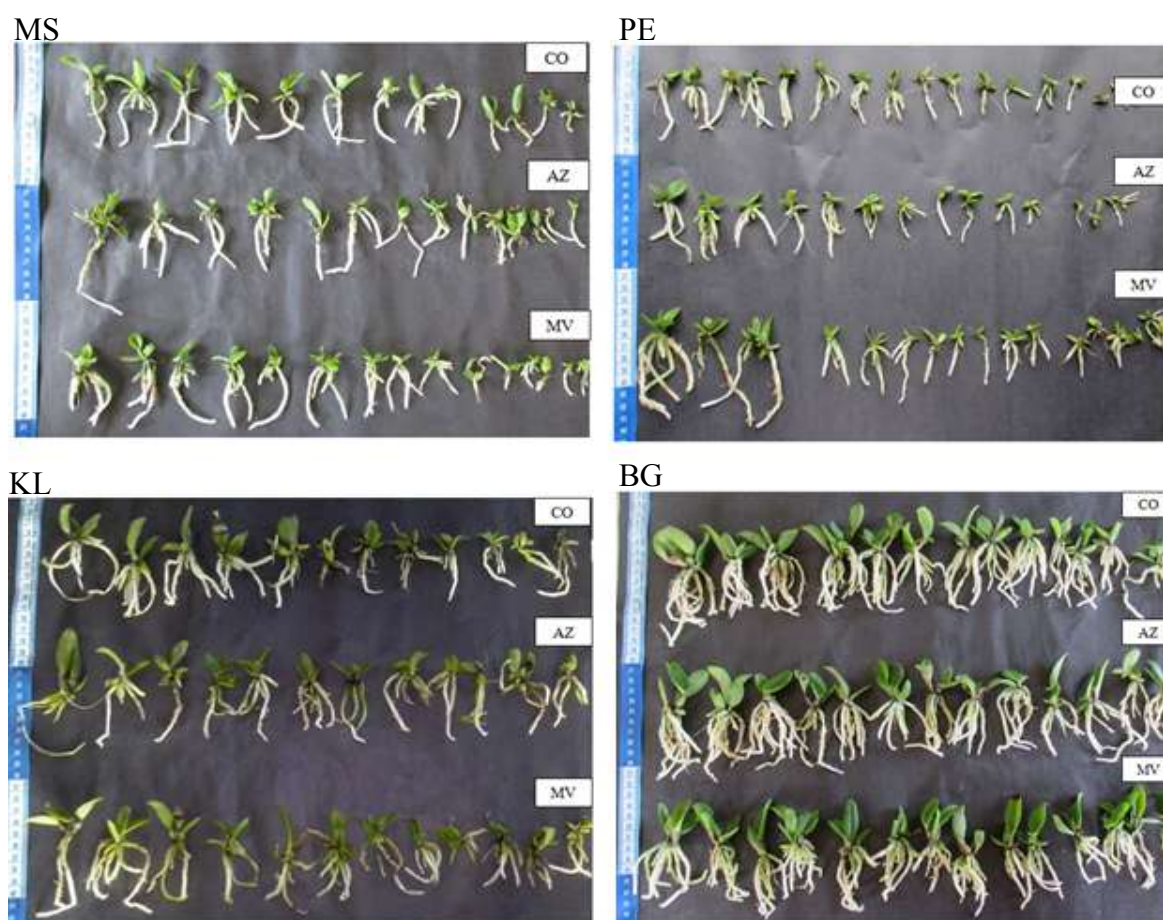


Figura 31. Plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 240 dias de aclimatização em casa de vegetação nos diferentes tratamentos. Seropédica, 2018.

MS - Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées®

Ausência de inoculação (CO); Inoculação com *Azospirillum brasilense* (AZ); Inoculação com *Microvirga vignae* (MV).

4. CONCLUSÕES

1) O meio de cultura suprimo B&G Orchidées[®] é o mais indicado na propagação *in vitro* das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner, permitindo obter plantas mais desenvolvidas durante a etapa de aclimatização;

2) A inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Microvirga vignae* não promoveu melhorias no desenvolvimento das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner durante etapa de aclimatização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, M. B.; SILVA, E. NOVAIS, D. B.; MONTEIRO, E. C.; CASTILHO, G. J. M.; BALDANI, V. L. D. Inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em variedades de arroz. **XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação à Docência** – Universidade do Vale do Paraíba, 2017.
- ASSAKAWA, R. H.; FARIA, S. L.; ZONETTI, P. C. Uso de substratos alternativos na aclimatização de Plântulas de *Laelia purpurata* Lindl (Orchidaceae). **IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar**, Maringá: Paraná, 2008.
- BOSA, N.; CALVETE, E.O.; NIENOW, A.A.; SUZIN, M.; Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 207-210, 2003.
- CORASSA, G. M.; BERTOLLO, G. M.; Gallon, M. BONA, S. D.; SANTI, A. L. Inoculação com *Azospirillum brasilense* associada à adubação nitrogenada em trigo na região norte do Rio Grande do Sul. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.9, n.16; p. 1298-1308, 2013.
- CORREIA, D.; ARAÚJO, J. D. M.; NASCIMENTO, E. H. S.; TUPINAMBÁ, J. M.; BESSA, M. C. Otimização da Produção de Mudas de *Cattleya labiata*: Efeito da Sacarose no Crescimento In Vitro e na Aclimatização. **EMBRAPA: Circular Técnica 38**. Fortaleza CE, outubro, 2012. 8 p.
- COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; ESTEVES, J. A.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta da soja a inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e *Bradyrhizobium*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 1678-1689, 2014.
- DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p.
- EMBRAPA. **Método de Aclimatização de Mudas de Orquídeas em Garrafas PET**. Circular Técnica, 34. 1ª edição, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, 2011. 3 p.
- FERRARI, F.; ANDRADE, S. M.; SABINO, D. C. C.; SHIOMI, H. F. Potencial de bactérias produtoras de auxinas na promoção do crescimento de mudas de bananeira micropropagadas. *Scientific Electronic Archives*, v. 11, n. 4, 7p., 2018.
- GALDIANO-JÚNIOR, R. F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raiz de orquídeas**. Dissertação (Mestrado) Genética e Melhoramento de Plantas. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, SP: Jaboticabal, 2009. 67 p.
- GALDIANO-JÚNIOR, R. F.; PEDRINHO, E. A. N.; CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, n.03, p.729-737, 2011.

GOMES, E. A.; SILVA, U. C.; PAIVA, C. A. O.; LANA, U. G. P.; MARRIEL, I. E.; SANTOS, V. L. **Microrganismos promotores do crescimento de plantas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 56 p.

KERBAUY, G. B. **Cultura de raiz e regeneração de plantas**. In: TORRES, A.C. e CALDAS, L. S. (Eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 161-181, 1998.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M.S.; RESENDE, S. V.; CARNEIRO, C. E.; SANTANA, J. R. F. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161, jan-mar, 2016.

LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; ASSARI, L. S. TAKAHASHI, L. S. A., FARIA, R. T. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 465-469, 2008.

SANTOS, P. R. R.; MALDANER, H.; SIMON, M.; SANTIN, A.; GUIMARÃES, V. F.; FERREIRA, D. T. L. Qualidade industrial e fisiológica de trigo CD 150 inoculado com a bactéria *Azospirillum brasilense*. **Revista Cultivando o Saber**, v. 9, n. 3, p. 337-346, 2016.

SILVA, J. V.; HERNANDEZ, F. F. F.; BEZERRA, F. C.; DINIZ, J. D. N. Aclimatização “*ex vitro*” de mudas de antúrio em diferentes substratos. **Revista Ciência Agrônômica**, v.38, n.2, p.188-191, 2007.

SOUTO, J. S.; MORIMOTO, J. M.; FERREIRA, W. M.; NAKABASHI M.; SUZUKI, R. M. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 179-185, 2010.

SOUZA, L. S. B.; AGUIAR, C. A. C.; MARINHO, L. B.; ZILLI, J. E.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MARTINS, L. M. Desenvolvimento do feijão-Caupi inoculado com bactérias diazotróficas em função da aplicação de diferentes lâminas de irrigação. Rio Grande do Norte: Natal, **XXXV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2015.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C. A.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônômico de milho pipoca. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 1, p.33-40, 2016.

STEGANI, V. **Aclimatização de orquídea utilizando como substrato pó de bagaço de cana**. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Paraná: Maringá, 2006. 32 p.

VIEIRA, R. F. **Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas**. Brasília, DF: Embrapa Meio Ambiente, 2017.163 p.

ZANDONÁ, A. P.; FARIA, R. T.; LONE, A. B.; HOSHINO, R. T. Substratos alternativos ao esfagno na aclimatização de plântulas de *Arundina graminifolia* “alba” (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n.1, p. 7-12, 2014.

CAPÍTULO III

COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE CULTURA KRISTALON LARANJA E SUPRIMENTO B&G ORCHIDÉES® NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Cattleya walkeriana* Gardner

RESUMO

No intuito de contribuir para obtenção de mudas de qualidade, por meio da indicação de um meio de cultura eficiente na promoção do crescimento das plântulas, protocormos de *Cattleya walkeriana* Gardner foram subcultivados *in vitro* em dois diferentes meios de cultura, denominados KL (Fertilizante Kristalon™ Laranja) e BG (Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®). Após 240 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas de cada tratamento foram retiradas dos frascos e foram avaliadas as variáveis: massa fresca total (MFT), comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e o pH dos meios de cultura ao final do subcultivo (pH_{final}). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos e 12 repetições, sendo considerado cada frasco uma repetição, contendo 4 protocormos/frasco, totalizando ao final 96 plântulas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias ao teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 1%. Em seguida, as plântulas obtidas foram levadas para aclimatização em casa de vegetação onde permaneceram por 120 dias. O substrato utilizado foi o *Sphagnum* e o sistema de irrigação foi do tipo nebulização intermitente. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos e oito repetições, sendo cada repetição com seis plantas/bandeja de polipropileno, totalizando assim 96 plantas. Completados os 120, avaliou-se o percentual de sobrevivência (SB), a massa fresca total (MFT), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF), o número de raiz (NR) e o comprimento da maior raiz (CMR). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias ao teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 1%. Tanto na etapa *in vitro* quanto na etapa *ex vitro*, com exceção ao parâmetro CMR, a análise de variância mostrou resultado significativo para todas as variáveis analisadas, e posteriormente, o teste de média aplicado demonstrou que as médias do tratamento BG se mostraram superiores às dos tratamentos KL para todos esses parâmetros. Pode-se concluir que o meio de cultura BG é o mais indicado para o cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner, sob as condições deste experimento. Os dois meios de cultura testados apresentaram redução significativa do pH ao final do subcultivo, o que reforça a necessidade de outros estudos a cerca dessa variável. Deste modo, constatou-se que os maiores teores de sacarose e/ou carvão ativado no meio de cultura a base de Fertilizante Kristalon™ Laranja parecem interferir de forma negativa no desenvolvimento das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner.

Palavras-chave: propagação *in vitro*, sacarose, carvão ativado.

ABSTRACT

In order to contribute to obtaining quality seedlings, by means of an efficient culture medium to promote seedling growth, *Cattleya walkeriana* Gardner protocorms were subcultured *in vitro* in two different culture media, called KL (Kristalon™ Orange Fertilizer) and BG (B&G Orchidées® supply culture medium). After 240 days of *in vitro* cultivation, the seedlings of each treatment were removed from the flasks and the following variables were evaluated: total fresh mass (MFT), shoot length (CPA), leaf number (NF), root number (NR), the length of the largest root (CMR) and the pH of the culture medium at the end of the subculture (pH_{final}). The experimental design was completely randomized (DIC) with two treatments and 12 replicates, each vial being considered one replicate, containing 4 protocorms/vial, totalizing at the end 96 seedlings. The data were submitted to analysis of variance and the comparison of the means to the statistical test of Tukey, with a confidence interval of 1%. Then, the seedlings obtained were taken to acclimatization in a greenhouse where they remained for 120 days. The substrate used was *Sphagnum* and the irrigation system was of the intermittent nebulization type. The experimental design was the completely randomized (DIC) with two treatments and eight replications, each replicate with six plants / polypropylene tray, totaling 96 plants. After completing the 120, the percentage of survival (SB), total fresh mass (MFT), leaf number (NF), leaf length (CMF), root number (NR) and length of the largest root (CMR). The data were submitted to analysis of variance and the comparison of the means to the statistical test of Tukey, with a confidence interval of 1%. In both the *in vitro* and *ex vitro* stages, with the exception of the CMR parameter, the analysis of variance showed a significant result for all the analyzed variables, and later, the applied mean test showed that the means of the BG treatment were higher than the KL treatments for all these parameters. It can be concluded that the BG culture medium is most suitable for the *in vitro* culture of *Cattleya walkeriana* Gardner, under the conditions of this experiment. The two culture media tested showed a significant reduction of pH at the end of the subculture, which reinforces the need for other studies about this variable. Thus, it was found that the higher levels of sucrose and/or activated carbon in the culture medium based on Kristalon™ Orange Fertilizer seem to interfere negatively in the development of *Cattleya walkeriana* Gardner seedlings.

Keywords: *in vitro* propagation, sucrose, activated carbon.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Cattleya walkeriana* Gardner é endêmica do Brasil e está entre as espécies ameaçadas de extinção na natureza (CNCFLORA, 2018). O elevado valor ornamental da espécie a torna alvo de coletas irregulares, o que, aliado à redução de habitats e consequentemente dos seus hospedeiros, contribui para a diminuição das populações naturais (MENEZES, 2011). Deste modo, a propagação de orquídeas *in vitro* tem sido uma valiosa e eficiente ferramenta para a produção dessas plantas, contribuindo para aumentar a produção de mudas, reduzindo seu custo e contribuindo para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção (SASAMORI *et al.* 2014; SCHNEIDERS *et al.* 2012; UNEMOTO *et al.* 2007). Entretanto, ainda não existe um meio de cultura único que seja ideal para o balanço nutricional de diferentes espécies de orquídeas cultivadas *in vitro*, uma vez que cada espécie possui distintas exigências nutricionais (FREITAS *et al.* 2014).

Por falta de informações em relação à nutrição dessas plantas, os orquicultores empregam meios de cultivo complexos, com diversos nutrientes e componentes, como carvão ativado, sacarose, vitaminas, fitoreguladores, etc., onerando os custos desta forma de propagação (MORAES *et al.* 2009; VENTURA, 2002). Ademais, há muitos resultados controversos na literatura, em certas combinações de componentes do meio e condições de cultivo, os resultados têm sido bem-sucedidos, enquanto em outras não há êxito (FREITAS *et al.* 2014; VENTURA, 2002). De acordo com Moraes *et al.* (2009) a resposta às condições do cultivo *in vitro* varia fortemente entre gêneros, espécies, cultivares e até mesmo plantas de um mesmo genótipo quando cultivadas sob diferentes condições ambientais. Em geral, é difícil definir os motivos pelos quais certas combinações de meio e condições de cultivo obtêm sucesso, ao passo que outras fracassam (Ventura, 2002).

Plantas provenientes do cultivo *in vitro* necessitam de um período de aclimatização, trata-se de uma etapa fundamental e muitas vezes considerada limitante para a sobrevivência dos indivíduos (SASAMORI *et al.* 2014). Sabe-se que a composição do meio de cultura durante a propagação *in vitro* pode interferir nesta etapa, como por exemplo, a concentração de sacarose no meio de cultura. Portanto, a formulação do meio de cultura é essencial para o bom desempenho das plântulas, pois possibilita a presença dos constituintes necessários (minerais, vitaminas, reguladores de crescimento, etc.) para seu desenvolvimento (CORREIA *et al.* 2012).

Assim, esse experimento teve como objetivo: 1) avaliar se as diferentes concentrações de sacarose e de carvão ativado nos meios de cultura KL (Fertilizante KristalonTM Laranja) e no meio de cultura BG (Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®]) podem ter influenciado nos resultados obtidos na propagação *in vitro* e na aclimatização das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner dos experimentos anteriores, descritos nos Capítulos I e II desta dissertação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No dia 03 de julho de 2018 protocormos que haviam restado do primeiro experimento, apresentando altura média de 1,0 cm de comprimento (Figura 32), foram subcultivados nos meios de culturas descritos a seguir:

1. Fertilizante Kristalon™ Laranja (6-12-36) (3 g.L⁻¹) - KL
2. Meio de cultura suprimento B&G Orchidées® - BG



Figura 32. Protocormos de *Cattleya walkeriana* Gardner inoculadas em meio de cultura BG e KL. Seropédica, 2018.

Neste segundo experimento o meio KL foi suplementado com 2 g.L⁻¹ de carvão ativado (Vetec®), 40 g.L⁻¹ de sacarose (Isofar®) e 7,5 g.L⁻¹ de ágar (Isofar®). No meio BG que já vem com sacarose (40 g.L⁻¹) e carvão ativado (2 g.L⁻¹), também foi acrescentado 7,5 g.L⁻¹ de ágar (Tabela 11). Os dois meios tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do ágar. Por fim, foram colocados em aparelho micro-ondas até a terceira fervura, quando então se transferiu cerca de 30 ml de cada meio para frascos de 268 ml que, posteriormente, foram esterilizados em autoclave a 121°C, a 1,1 atm, durante 15 minutos.

Tabela 11. Composição química dos meios de cultura Kristalon™ Laranja (KL) e suprimento B&G Orchidées® (BG) utilizados para o desenvolvimento *in vitro* de protocormos de *Cattleya walkeriana* Gardner.

Composição nutricional dos Meios de Cultura*		
Macronutrientes (%)	BG	KL
Nitrogênio total (N total)	0,85	6,0
N-Nítrico (NH ₃ ⁻)	**	4,5
N-amoniacal (NH ₄ ⁺)	**	1,5
Fósforo (P ₂ O ₅)	0,67	12,0
Potássio (K ₂ O)	2,93	36,0
Cálcio (Ca)	0,46	-
Magnésio (Mg)	0,13	3,0
Enxofre (S)	0,30	20,0
Micronutrientes (%)	BG	KL
Boro (B)	0,0059	0,025
Cobre (Cu)	0,0007	0,01
Ferro (Fe)	0,0176	0,07
Manganês (Mn)	0,0115	0,04
Molibdênio (Mo)	0,0001	0,004
Zinco (Zn)	0,0054	0,025
Demais componentes		
Sacarose (g.L ⁻¹)	40,0	40,0
Carvão Ativado (g.L ⁻¹)	2,0	2,0
Ágar-ágar (g.L ⁻¹)	7,5	7,5

* conforme informado pelos fabricantes.

** Fabricante informou apenas o percentual de N-total.

Os protocormos foram subcultivados em câmara de fluxo laminar, os frascos foram fechados com tampa plástica e tiveram suas bordas protegidas com filme PVC, em seguida estes foram transferidos para sala de crescimento e mantidos sob temperatura média de 25,6 °C (mínima de 23,9°C e máxima de 26,6 °C), umidade relativa do ar média de 30.1% (mínima 18% e máxima 50%), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de

aproximadamente 3.000 lux (Luxímetro Digital marca Icel modelo Ld 510) pelo período de 240 dias, quando foi feita a coleta das plântulas para realização das avaliações.

Antes da realização das avaliações as plantas obtidas foram retiradas do meio de cultura e tiveram suas raízes lavadas em água corrente até a completa eliminação do meio de cultura. Foram avaliados a massa fresca total (MFT), o comprimento da parte aérea (CPA), o número de folhas (NF), o número de raiz (NR), o comprimento da maior raiz (CMR), o peso de matéria fresca (PMF) e o pH dos meios de cultura ao final do subcultivo (pH_{final}).

Para avaliação da MFT foi utilizada balança eletrônica digital de precisão da marca Bioprecisa modelo FA2104N (Fabricante) com quatro casas decimais, a avaliação do CMF e do CMR foram feitas manualmente com uso de régua graduada em milímetros, já a avaliação do NF e NR também foram feitas manualmente por contagem, em todos os casos as avaliações foram feitas planta por planta, obtendo-se a média de 4 plantas/frasco (repetição). Para aferição do pH_{final} a metodologia foi adaptada da Embrapa (1997), a aferição foi feita em água (1: 2,5 v/v), onde o meio de cultura foi homogeneizado com bastão de vidro, em seguida 10 ml foram transferidos para copo descartável de 150 ml, em seguida adicionou-se 25 ml de água destilada deionizada e agitou-se com bastão de vidro, lavando-se ao passar de uma amostra para outra. Deixou-se em repouso por 1 hora e em seguida agitou-se novamente com bastão de vidro, sendo feita a aferição de pH com uso de eletrodo combinado imerso em suspensão, a leitura foi feita em temperatura ambiente. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos e 12 repetições, sendo considerado cada frasco uma repetição, contendo 4 protocormos/frasco, totalizando ao final 96 plântulas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias ao teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 1%, com auxílio do *software* SISVAR 5.6 (Ferreira, 2014).

○ **Aclimatização**

Ao término das avaliações biométricas as plântulas obtidas *in vitro* foram transplantadas para bandejas de polipropileno com seis células cada, totalizando dezesseis bandejas (oito bandejas por tratamento), o substrato utilizado foi o *Sphagnum* spp. As plântulas permaneceram no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Agronomia da UFRRJ (LCTV-IA/UFRRJ) por uma semana e em seguida foram levadas para casa de vegetação. O sistema de irrigação utilizado foi do tipo nebulização intermitente, sendo

controlada automaticamente através do controlador e indicador digital de umidade e temperatura Full gauge modelo MT-530 *super* (Fabricante), quando a umidade relativa do ar no ambiente é $< 70\%$ o sistema é acionado, permanecendo em funcionamento pelo tempo de cinco minutos ou até que a umidade atinja 80%. A temperatura média na casa de vegetação foi de 28°C, uma vez que o sistema de exaustão de ar da estufa também é controlado pelo mesmo sistema, sendo o mesmo acionado quando a temperatura atinge 30°C, e permanece em funcionamento até que a temperatura baixe ou que o sistema de irrigação seja acionado. Ambos os sistemas, irrigação por nebulização intermitente e exaustão de ar, não funcionam simultaneamente. A intensidade luminosa média foi medida durante o período de aclimatização com aparelho Luxímetro Digital da marca Icel modelo Ld 510.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com oito repetições, sendo considerada uma bandeja de polipropileno contendo seis células com uma planta cada, uma repetição, totalizando assim 96 plantas. As plantas permaneceram na casa de vegetação por 113 dias, totalizando 120 dias em condições *ex vitro* (7 dias + 113 dias), quando então avaliou-se o percentual de sobrevivência (SB), a massa fresca total (MFT), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF), o número de raiz (NR) e o comprimento da maior raiz (CMR). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias ao teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 1%, com auxílio do *software* SISVAR 5.6 (Ferreira, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o experimento *in vitro*, com exceção ao parâmetro CMR a análise de variância (ANAVA) mostrou resultado significativo para todos os demais parâmetros avaliados, e posteriormente, o teste de média aplicado demonstrou que as médias do tratamento BG se mostraram superiores às dos tratamentos KL para todos esses parâmetros. Na Tabela 12 podemos observar o resumo da análise da comparação das médias pelo teste de Tukey a 1% de significância das variáveis MFT, NF, CMF, NR e pH_{final}, para os tratamentos KL e BG.

Tabela 12. Médias da massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e do potencial hidrogeniônico dos meios de cultura (pH_{final}) após oito meses de cultivo de protocormos de *Cattleya walkeriana* Gardner *in vitro*. UFRRJ, Seropédica - 2019.

Meios de Cultura (Tratamentos)	Média das Variáveis Avaliadas*					
	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)	pH _{final}
BG	0.9684 a	4.8958 a	1.9167 a	6.7708 a	4.9000 ns	3.9800 b
KL	0.5114 b	3.5417 b	1.2958 b	4.7354 b	4.1229 ns	3.6750 b
Controle**	-	-	-	-	-	5.8000 a
Média Geral	0.7399	4.2188	1.6063	5.7531	4.5115	4.4850
CV (%)	50.77	24.45	29.43	25.70	28.36	5.10

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade; ns – resultado não significativo no teste F a 1%.

**Controle – pH aferido durante o preparo dos meios de cultura antes do cultivo dos protocormos.

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®].

Os dados representam a média de 12 repetições para as variáveis biométricas de cada tratamento e 10 repetições para o pH_{final} de cada tratamento.

Deste modo, temos esses resultados representados graficamente, nas Figuras 33, 34, 35, 36, 37 e 38, respectivamente, para as variáveis MFT, NF, CMF, NR, CMR e pH_{final}.

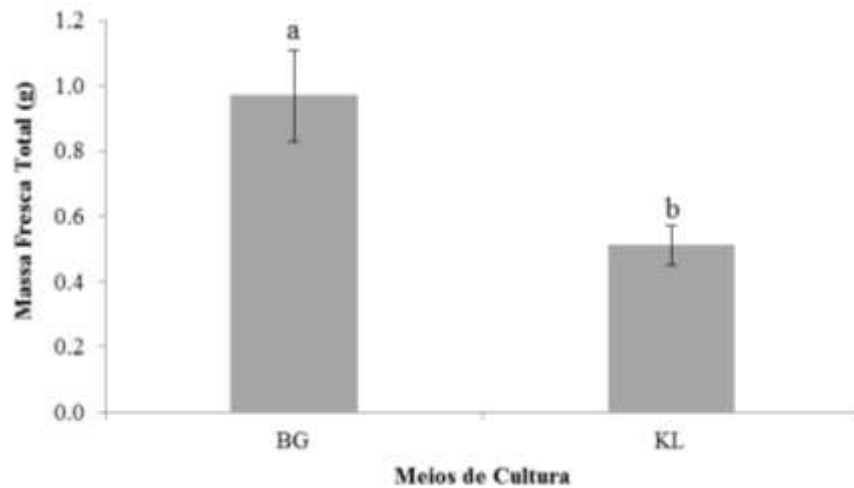


Figura 33. Massa fresca total (gramas) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 12 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprinmento B&G Orchidées[®].

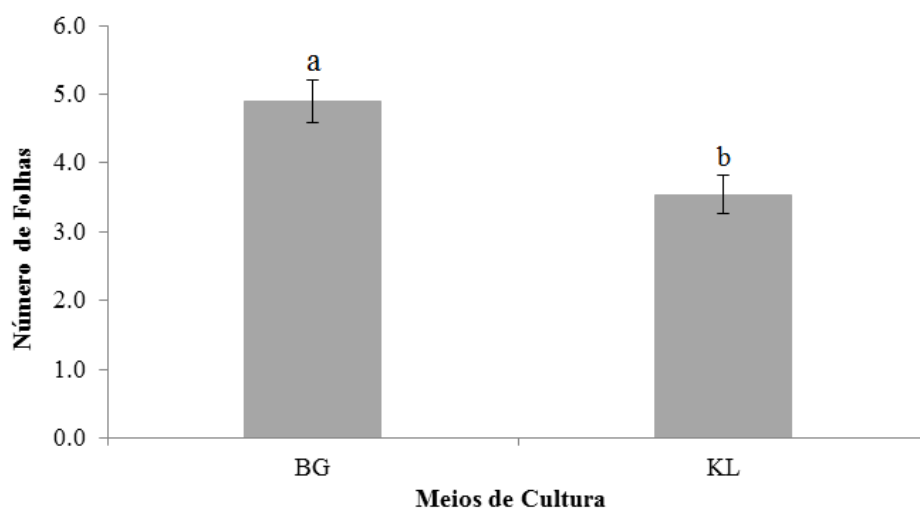


Figura 34. Número de folhas (NF) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 12 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprinmento B&G Orchidées[®].

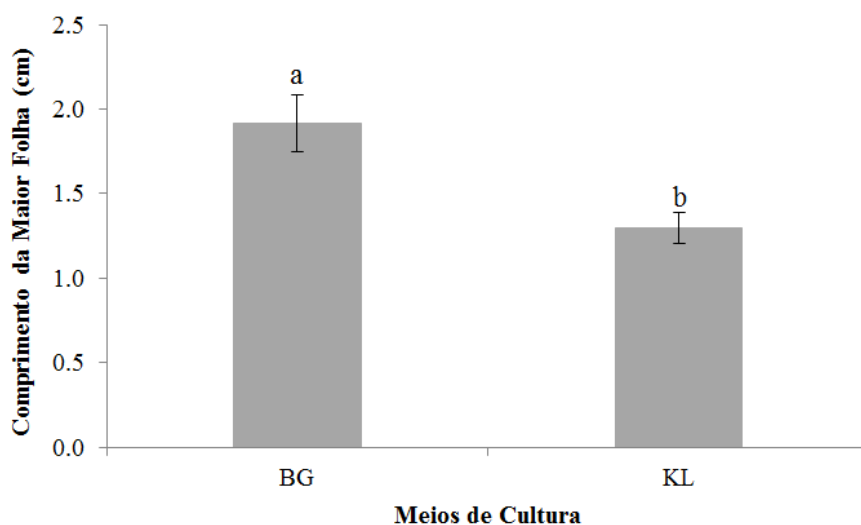


Figura 35. Comprimento da maior folha (CMF) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 12 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®].

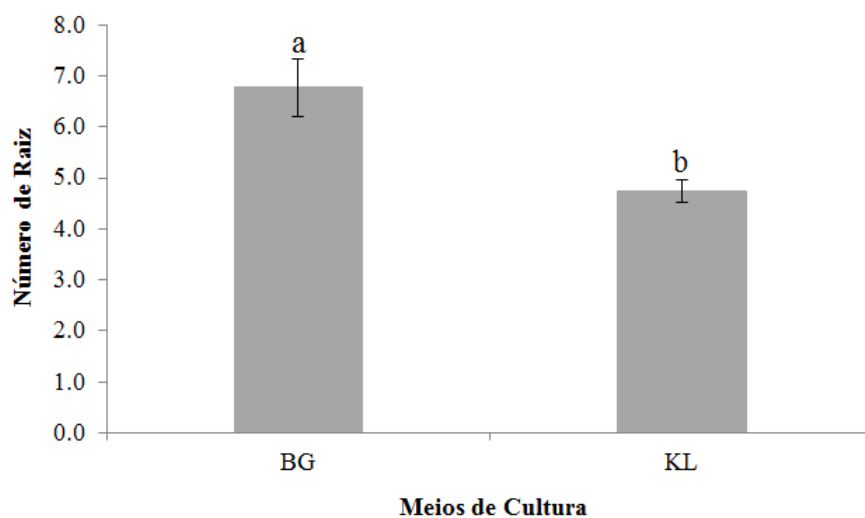


Figura 36. Número de raiz (NR) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 12 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®].

Quanto ao parâmetro CMR os resultados representados graficamente seguem na Figura 40. Embora não tenha ocorrido diferença significativa pelo teste de Tukey a 1% de significância em relação a esse parâmetro, podemos observar que a média do tratamento BG também foi superior.

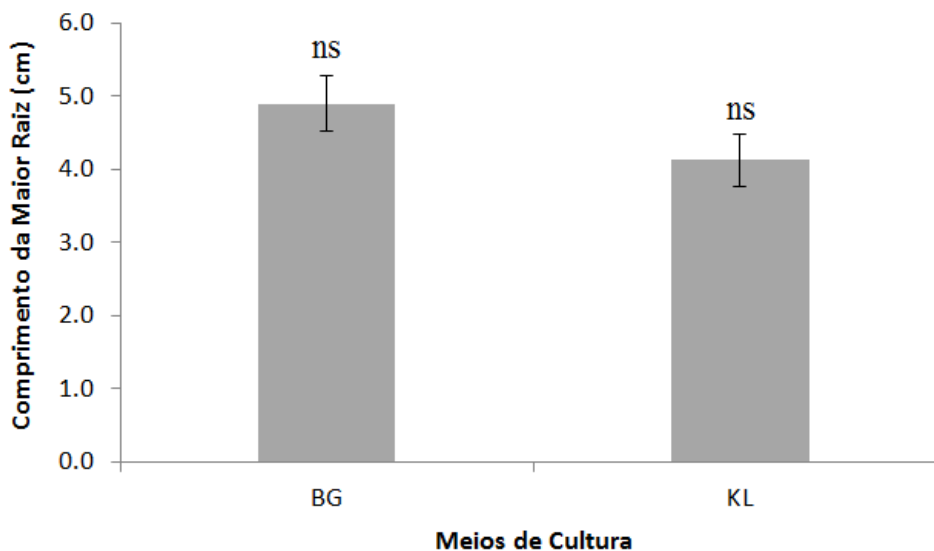


Figura 37. Comprimento da maior raiz (CMR) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 240 dias de cultivo *in vitro*. Seropédica, 2018.

*ns - resultado não significativo no teste F a 1%.

Os dados representam a média de 12 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées®.

Em se tratando do parâmetro pH_{final} os resultados representados graficamente seguem na Figura 41. Pode-se verificar que em ambos tratamentos o pH_{final} diferiu significativamente do $pH_{inicial}$ dos meios de cultura, porém não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 1% de significância entre os tratamento BG e KL.

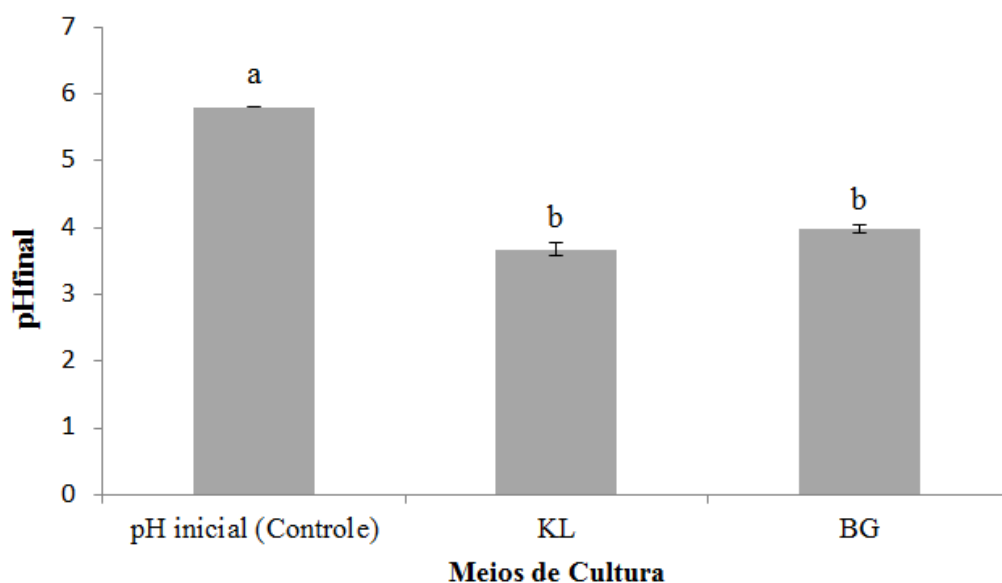


Figura 38. pH_{final} dos meios de cultura após 240 dias de cultivo de *Cattleya walkeriana* Gardner *in vitro*. Seropédica, 2018.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 10 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprido B&G Orchidées[®].

Na Tabela 13 podemos observar os resultados médios obtidos entre os meios de cultura BG e KL no primeiro e no segundo experimento *in vitro*. Curiosamente no segundo experimento *in vitro* houve redução nos valores médios do tratamento KL para todos os parâmetros analisados, embora o resultado esperado fosse o oposto, ou seja, esperava-se que os resultados médios fossem maiores ou, no mínimo, se mantivessem iguais ao do primeiro experimento *in vitro*. Comparando os resultados obtidos é possível observar que os resultados das médias do tratamento BG, se mostraram bastante aproximadas entre os experimentos. E que o mesmo não ocorreu com os resultados médios para o tratamento KL, onde no Experimento I, cujo teor de sacarose e carvão ativado era menor na composição do meio, os resultados médios tenderam a superioridade, sendo praticamente o dobro para as variáveis MFT, CMF e NR em relação ao Experimento III.

De fato podemos considerar que a concentração de sacarose e/ou de carvão ativado no meio de cultura, parece não interferir nos resultados superiores do meio BG na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner.

Tabela 13. Comparação das médias da massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e do potencial hidrogeniônico dos meios de cultura (pH_{final}) após oito meses de cultivo de protocormos de *Cattleya walkeriana* no Experimento *in vitro* I e II. UFRRJ, Seropédica - 2019.

Meios de Cultura (Tratamentos)	Média das Variáveis Avaliadas					
	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)	pH _{final}
BG Exp I	0.9288	5.3500	2.3863	6.7750	4.7413	3.8630
BG Exp II	0.9684	4.8958	1.9167	6.7708	4.9000	3.9800
KL Exp I	1.0339	4.9375	2.0900	7.8875	3.9900	3.8930
KL Exp II	0.5114	3.5417	1.2958	4.7354	4.1229	3.6750

Exp I: Experimento *in vitro* I; KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®] (Os dados representam a média de 20 repetições para cada tratamento);

Exp II: Experimento *in vitro* II. KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®] (Os dados representam a média de 12 repetições para cada tratamento).

As diferenças visuais no desenvolvimento das plântulas provenientes do meio de cultura BG e do meio de cultura KL podem ser observadas na Figura 39.



Figura 39. Comparação visual do desenvolvimento das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner após oito meses de cultivo nos meios KL (Fertilizante KristalonTM Laranja e BG (Meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®]).

Para a etapa de aclimatização, com exceção ao parâmetro CMR a análise de variância (ANAVA) mostrou resultado significativo para todos os parâmetros avaliados, e posteriormente, o teste de média aplicado demonstrou que o meio BG proporcionou valores médios superiores para todos os parâmetros analisados. Na Tabela 14 podemos observar o resumo da análise da comparação das médias pelo teste de Tukey a 1% de significância das variáveis SB, MFT, NF, CMF e NR para os tratamentos KL e BG.

Tabela 14. Médias do percentual de sobrevivência (SB), massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR) e do comprimento da maior raiz (CMR) após quatro meses de aclimatização de *Cattleya walkeriana* Gardner em casa de vegetação. UFRRJ, Seropédica - 2019.

Meios de Cultura (Tratamentos)	Média das Variáveis Avaliadas*					
	SB (%)	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)
BG	100 a	3.1724 a	5.3125 a	2.5771 a	7.5000 a	7.9583 ns
KL	77 b	1.1931 b	3.0250 b	1.7525 b	3.9917 b	5.4281 ns
Média Geral	88.50	2.1827	4.1687	2.1648	5.7458	6.6932
CV (%)	15.76	52.55	16.90	22.81	31.68	29.53

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. ns – resultado não significativo no teste F a 1%.

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®]. Os dados representam a média de 8 repetições.

Deste modo, temos esses resultados representados graficamente, nas Figuras 40, 41, 42, 43, 44 e 45, respectivamente, para as variáveis SB, MFT, NF, CMF, NR e CMR.

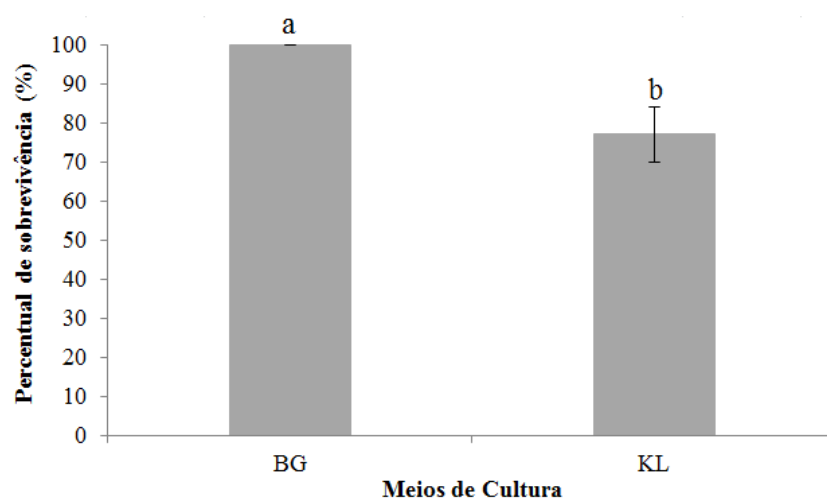


Figura 40. Percentual de sobrevivência (SB) das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 8 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

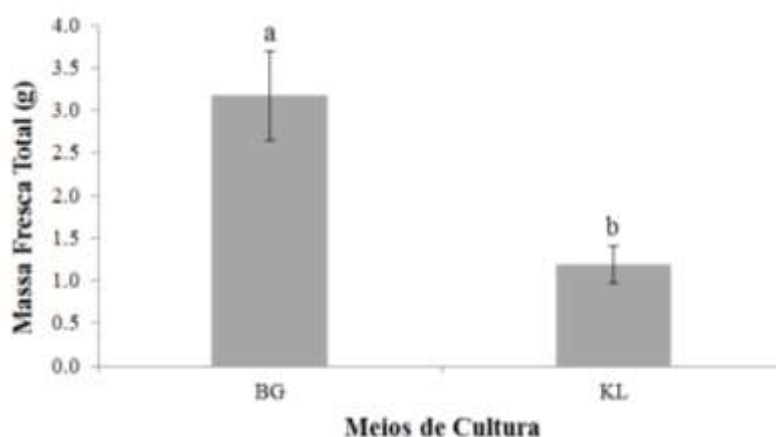


Figura 41. Massa fresca total (gramas) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 8 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

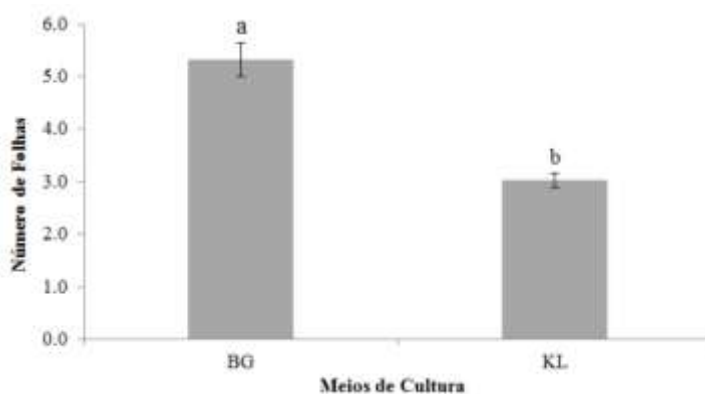


Figura 42. Número de folhas (unidade) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 8 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées®.

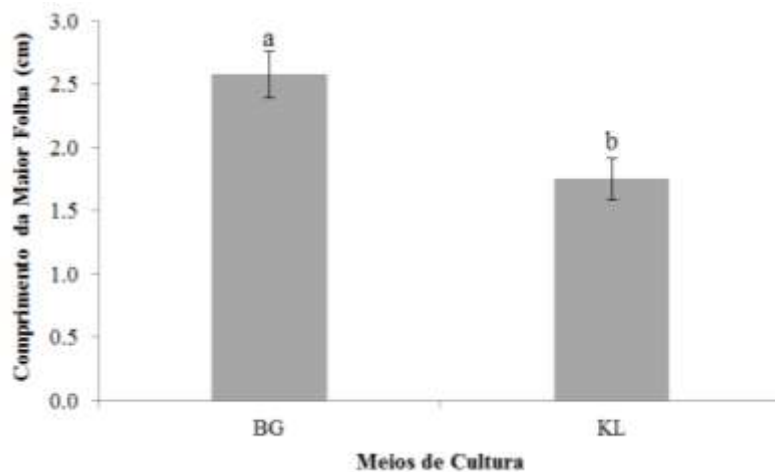


Figura 43. Comprimento da maior folha (cm) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 8 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprimido B&G Orchidées[®].

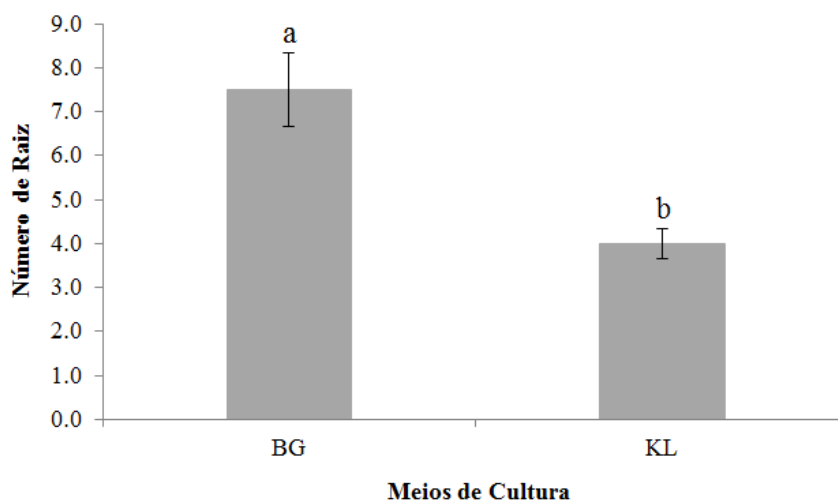


Figura 44. Número de raiz (cm) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 8 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprimido B&G Orchidées[®].

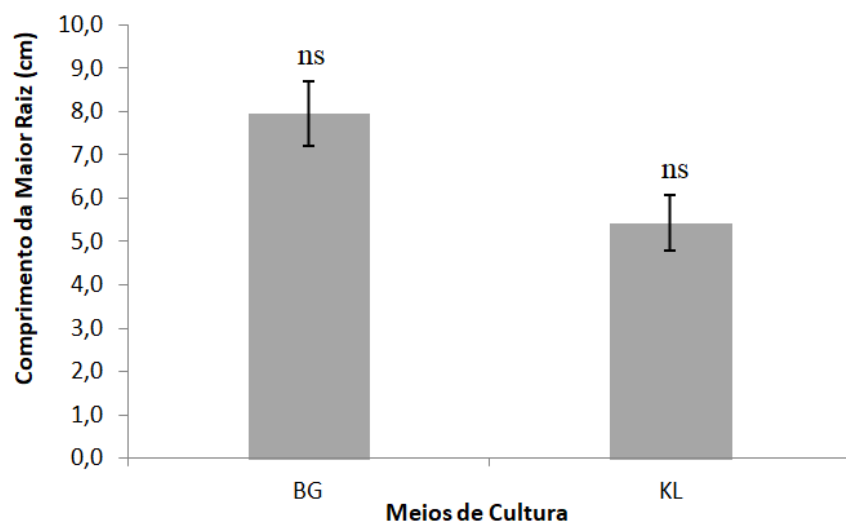


Figura 45. Comprimento da maior raiz (cm) das mudas de *Cattleya walkeriana* após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação. Seropédica, 2019.

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados representam a média de 8 repetições para cada tratamento. Barra de erro padrão.

KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées®.

As diferenças visuais no desenvolvimento das plântulas provenientes do meio de cultura BG e do meio de cultura KL podem ser observadas na Figura 46.



Figura 46. Comparação visual do desenvolvimento das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner após quatro meses de aclimatização. Seropédica, 2019.

KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja; BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées®.

Portanto, os resultados obtidos nos Experimentos I, II e III sugerem que pequenas alterações na composição do meio de cultura podem trazer resultados bem diferentes e por vezes indesejáveis. Alguns autores reconhecem o efeito antagônico da sacarose no meio de cultura, Maldaner et al. (2006), por exemplo, testaram diferentes doses de sacarose no meio de cultura na propagação de *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) e sugeriram que altas doses de nitrogênio e sacarose afetaram negativamente o enraizamento das plantas por conta do aumento do potencial osmótico do meio. Deste modo, supõe-se que ao alterarmos o teor de sacarose de 30 g.L⁻¹ para 40 g.L⁻¹ no meio KL, houve um efeito antagônico da sacarose com algum dos componentes deste meio de cultura, o que interferiu no desenvolvimento das plantas como um todo.

Afinal, Silva et al. (2014) testaram diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g.L⁻¹) em meio composto pelos sais do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e obtiveram melhores resultados com emprego de 20 g.L⁻¹ de sacarose, estas apresentaram maior crescimento, bem como a maior espessura do mesofilo. Dignart et al. (2009) também testaram o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g.L⁻¹) na propagação de *Cattleya walkeriana* e verificaram que estatisticamente as concentrações de 15 e 30 g.L⁻¹ de sacarose não interferiram nos resultados das variáveis número de brotos, número de folhas, comprimento de parte aérea e comprimento de raiz, assim, esses autores consideraram que, no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*, é possível utilizar tanto a concentração convencional de sacarose (30 g.L⁻¹) como a metade da mesma.

Faria et al. (2002) testaram o meio Murashige e Skoog (1962) modificado com a metade da concentração dos macronutrientes e suplementado com 1, 2, 4 e 6 g.L⁻¹ de carvão ativado na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e concluíram que a adição de 2 g.L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura foi a mais benéfica para a propagação da espécie. Deste modo, sugere-se que os resultados obtidos sejam em função da alteração na concentração de sacarose.

Inclusive podemos observar que neste último experimento de validação dos resultados as plantas cultivadas *in vitro* do meio BG tiveram melhor desempenho durante a fase de aclimatização que aquelas provenientes do meio KL, uma vez que não houve redução nos valores médios de nenhuma das variáveis analisadas para o tratamento BG, enquanto que para o tratamento KL houve redução nas variáveis NF e NR (Tabela 15).

Tabela 15. Resultado das variáveis analisadas antes (*in vitro*) e depois (*ex vitro*) da aclimatização das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner. Seropédica, 2019.

Meios de Cultura	Média das variáveis analisadas				
	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)
BG <i>in vitro</i>	0.9684	4.8958	1.9167	6.7708	4.9000
BG <i>ex vitro</i>	3.1724	5.3125	2.5771	7.5000	7.9583
KL <i>in vitro</i>	0.5114	3.5417	1.2958	4.7354	4.1229
KL <i>ex vitro</i>	1.1931	3.0250	1.7525	3.9917	5.4281

KL - Fertilizante KristalonTM Laranja; BG - Meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®].

Massa Fresca Total (MFT); Número de Folhas (NF); Comprimento da Maior Folha (CMF); Número de Raiz (NR); Comprimento da Maior Raiz (CMR).

A queda do valor médio em algumas variáveis pode ser devido ao estresse sofrido pelas plântulas durante a fase de aclimatização, fase que as plantas passam por mudanças fisiológicas, morfológicas e anatômicas (ZANDONÁ *et al.* 2014). Resultados semelhantes foram observados por Dorneles e Trevelin (2011) na aclimatização de *Cattleya intermedia*, cujo substrato utilizado também foi o *Sphagnum* spp. Estes autores observaram que o número médio de folhas e de raiz e o comprimento médio de folhas e de raiz sofreram redução ao longo do tempo de aclimatização.

Assim, podemos considerar que a composição nutricional dos meios de cultura sejam os fatores responsáveis pelos resultados obtidos nesse trabalho. Seja por conta da composição de macro e micronutriente e/ou pela relação desses com os outros componentes do meio, como, por exemplo, com sacarose. Ademais, segundo informação na embalagem do fabricante o meio BG apresenta 23,0 mg.L⁻¹ de Ca em sua composição, enquanto que o meio KL o nutriente Ca é ausente, sabe-se que este é um nutriente dito essencial para plantas, estando presente na membrana e na parede celular e atuando como sinalizador para ativação de enzimas e também no controle de eventos fisiológicos, por esse motivo o cálcio (forma Ca⁺²) é encontrado em baixos níveis no citosol celular ficando armazenado no vacúolo (FERNANDES, 2006). Portanto, uma hipótese é de que quando a planta passa para um ambiente *ex vitro* a ausência ou baixa concentração desse elemento traga algum prejuízo para planta nessa etapa.

Logo o meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®] (BG) pode ser considerado mais indicado na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner quando comparado ao meio de cultura a base do fertilizante KristalonTM Laranja (KL).

Levando em consideração o custo médio/litro de meio, e embora o custo médio por litro do meio a base do fertilizante KristalonTM Laranja (KL) seja 30% menor quando

comparado ao meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®] (BG) (Tabela 16), neste trabalho a diferença de custo entre os meios KL e BG parece não compensar os ganhos em desenvolvimento e qualidade das mudas obtidas, reforçando a indicação do meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®] na propagação de *Cattleya walkeriana* Gardner. Ademais, o procedimento de preparo do meio BG é mais simplificado, demandando menor uso de vidrarias, redução do procedimento de pesagem de reagentes como a sacarose e carvão ativado, conseqüentemente reduzindo o tempo no preparo (mão-de-obra) dos meios e, portanto, conferindo maior eficiência ao processo na etapa de produção *in vitro*.

Tabela 16. Custo médio/litro dos meios de cultura utilizados neste trabalho.

Meio de Cultura	Custo médio por litro (R\$)*				
	Meio de Cultura	Sacarose	Carvão Ativado	Ágar	Total
BG	R\$ 4,25	--	---	R\$ 5,33	R\$ 9,58
KL	R\$ 0,03	R\$ 1,17	R\$ 0,18	R\$ 5,33	R\$ 6,71

*Orçamento realizado em novembro de 2018.

BG - Meio de cultura suprimimento B&G Orchidées[®]; KL - Fertilizante KristalonTM Laranja.

4. CONCLUSÕES

1) O maior teor de sacarose e/ou de carvão ativado no meio de cultura a base de fertilizante KristalonTM Laranja parece interferir de forma negativa nos resultados das variáveis biométricas analisadas;

2) O meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®] demonstrou ser o mais indicado na propagação *in vitro* das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner, permitindo obter plantas mais desenvolvidas também durante a etapa de aclimatização;

3) Constatou-se que há redução do pH dos meios de cultura ao final do subcultivo, contudo não foi possível concluir se essa redução pode ser um fator crítico ou limitante para o desenvolvimento das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CNCFlora. *Cattleya walkeriana* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_walkeriana>. Acesso em novembro, 2018.
- CORREIA, D.; ARAÚJO, J. D. M.; NASCIMENTO, E. H. S.; TUPINAMBÁ, J. M.; BESSA, M. C. Otimização da Produção de Mudanças de *Cattleya labiata*: Efeito da Sacarose no Crescimento In Vitro e na Aclimatização. **EMBRAPA: Circular Técnica 38**. Fortaleza CE, outubro, 2012. 8 p.
- DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun., 2009.
- FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAUJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 489-492, 2002.
- FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. 432 p.
- FREITAS, E. M.; HERRMANN M. H., BRUISMA, G.; PÉRICO E.; ARAUJO, A. G. Propagação *in vitro* de *Cattleya intermedia* GRAHAM EX HOOK. (ORCHIDACEAE) em diferentes meios de cultura. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 30-41, 2014.
- MENEZES, L. C. **Orquídeas *Cattleya walkeriana***. Brasília: Ibama, 2011. 276 p.
- MORAES, C. P.; DIOGO, J. A.; PEDRO, N. P.; CANABRAVA, R. I.; MARTINI, G. A.; MARTELINE, M. A. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 67-69, 2009.
- SASAMORI, M. H. ENDRES-JÚNIOR, D. DROSTE, A. Sobrevivência e desenvolvimento de plântulas de *cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) micropropagadas e aclimatadas em substratos com fibra de coco. **Revista Pesquisas**, São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, n. 65, p. 293-303, 2014.
- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; RAITZ BOOZ, M.; MAMORU SUZUKI, R. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185-191, março-abril, 2012.
- UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; VIEIRA, A. O. S.; DALIO, R. J. D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n.2, p. 267-269, 2007.
- VENTURA, G. M. **Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002. 147 p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante analisar o efeito dos diferentes meios de cultura nas etapas *in vitro* e *ex vitro* (aclimatização) de cada espécie vegetal.

O meio de cultura suprimento B&G Orchidées[®] demonstrou ser o mais indicado na propagação de *Cattleya walkeriana* Gardner, permitindo obter plantas mais desenvolvidas. Além disso, trata-se de um produto de origem nacional, de fácil obtenção e preparo, permitindo maior eficiência no processo de produção de mudas.

Adicionalmente, os meios de cultura alternativos à base de fertilizante Peters[®] e do fertilizante Kristalon[™] Laranja também podem ser utilizados em substituição aos meios de cultura tradicionais Murashige e Skoog (1962) e Knudson C (1946) modificado por Morel (1965) na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner. É fundamental avaliar a relação custo-benefício do meio de cultura a ser utilizado, pois essa análise pode representar ganhos econômicos significativos ao produtor.

O mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil é dominado por pequenos produtores, o que reforça a necessidade de encontrar formas alternativas mais simples e econômicas de produção.

Contatou-se que há redução do pH dos meios de cultura ao final do subcultivo, contudo não foi possível concluir se essa redução pode ser um fator crítico ou limitante para o desenvolvimento das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner, assim, tendo em vista a importância do pH das soluções e meios de cultura na fisiologia de plantas, torna-se necessários outros estudos a cerca dessa variável.

Embora, os resultados com inoculação bacteriana durante a etapa de aclimatização não tenham sido positivos, novas pesquisas precisam ser realizadas a fim de testar outras estirpes e técnicas de inoculação.

APÊNDICE

Análise de Variância (ANAVA) – Capítulo I

- Variável analisada: massa fresca total (MFT)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	5.223311	1.741104	25.968	0.0000
erro	76	5.095600	0.067047		
Total corrigido	79	10.318911			
CV (%) =	35.54				
Média geral:	0.7286122	Número de observações:		80	

- Variável analisada: número de folhas (NF)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	65.837754	21.945918	19.758	0.0000
erro	76	84.417015	1.110750		
Total corrigido	79	150.254769			
CV (%) =	19.48				
Média geral:	5.4114584	Número de observações:		80	

- Variável analisada: comprimento da maior folha (CMF)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	15.675924	5.225308	34.614	0.0000
erro	76	11.472999	0.150961		
Total corrigido	79	27.148923			
CV (%) =	21.04				
Média geral:	1.8469791	Número de observações:		80	

- Variável analisada: número de raiz (NR)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	118.440638	39.480213	24.447	0.0000
erro	76	122.736800	1.614958		
Total corrigido	79	241.177438			
CV (%) =	19.63				
Média geral:	6.4729166	Número de observações:		80	

- Variável analisada: comprimento da maior raiz (CMR)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	65.320318	21.773439	25.278	0.0000
erro	76	65.462322	0.861346		
Total corrigido	79	130.782640			
CV (%) =	26.49				
Média geral:	3.5041666	Número de observações:		80	

- Variável analisada: pH final (pH_{final})

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	5	36.069468	7.213894	112.938	0.0000
erro	54	3.449230	0.063875		
Total corrigido	59	39.518698			
CV (%) =	5.96				
Média geral:	4.2401667	Número de observações:		60	

Análise de Variância (ANAVA) – Capítulo II

- Variável analisada: % de sobrevivência (SB)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	3	10964.395833	3654.798611	18.549	0.0000
TRAT	2	80.166667	40.083333	0.203	0.8169
MEIO*TRAT	6	1249.666667	208.277778	1.057	0.4059
erro	36	7093.250000	197.034722		
Total corrigido	47	19387.479167			
CV (%) =	16.99				
Média geral:	82.6041667	Número de observações:		48	

- Variável analisada: massa fresca total (MFT)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	3	41.136591	13.712197	63.875	0.0000
TRAT	2	0.020680	0.010340	0.048	0.9530
MEIO*TRAT	6	0.229667	0.038278	0.178	0.9810
erro	36	7.728213	0.214673		
Total corrigido	47	49.115152			
CV (%) =	30.71				
Média geral:	1.5087950	Número de observações:		48	

- Variável analisada: número de folhas (NF)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	3	31.324844	10.441615	15.147	0.0000
TRAT	2	0.003208	0.001604	0.002	0.9977
MEIO*TRAT	6	3.278069	0.546345	0.793	0.5818
erro	36	24.817311	0.689370		
Total corrigido	47	59.423432			
CV (%) =	21.37				
Média geral:	3.8847146	Número de observações:		48	

- Variável analisada: comprimento da maior folha (CMF)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	3	18.912229	6.304076	50.401	0.0000
TRAT	2	0.268838	0.134419	1.075	0.3521
MEIO*TRAT	6	1.157433	0.192905	1.542	0.1926
erro	36	4.502840	0.125079		
Total corrigido	47	24.841339			
CV (%) =	17.67				
Média geral:	2.0015290	Número de observações:		48	

- Variável analisada: número de raiz (NR)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	3	106.227535	35.409178	32.959	0.0000
TRAT	2	0.333942	0.166971	0.155	0.8566
MEIO*TRAT	6	5.342870	0.890478	0.829	0.5554
erro	36	38.676735	1.074354		
Total corrigido	47	150.581083			
CV (%) =	23.85				
Média geral:	4.3465242	Número de observações:		48	

- Variável analisada: comprimento da maior raiz (CMR)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	3	50.513442	16.837814	20.199	0.0000
TRAT	2	0.343627	0.171813	0.206	0.8147
MEIO*TRAT	6	3.404917	0.567486	0.681	0.6661
erro	36	30.010084	0.833613		
Total corrigido	47	84.272071			
CV (%) =	18.51				
Média geral:	4.9338521	Número de observações:		48	

Análise de Variância (ANAVA) – Capítulo III (Fase *in vitro*)

- Variável analisada: massa fresca total (MFT)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	1.253012	1.253012	8.881	0.0069
erro	22	3.104125	0.141097		
Total corrigido	23	4.357137			
CV (%) =	50.77				
Média geral:	0.7399000	Número de observações:		24	

- Variável analisada: número de folhas (NF)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	11.002604	11.002604	10.339	0.0040
erro	22	23.411458	1.064157		
Total corrigido	23	34.414063			
CV (%) =	24.45				
Média geral:	4.2187500	Número de observações:		24	

- Variável analisada: comprimento da maior folha (CMF)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	2.312604	2.312604	10.351	0.0040
erro	22	4.915208	0.223419		
Total corrigido	23	7.227812			
CV (%) =	29.43				
Média geral:	1.6062500	Número de observações:		24	

- Variável analisada: número de raiz (NR)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	24.857526	24.857526	11.370	0.0027
erro	22	48.097865	2.186267		
Total corrigido	23	72.955391			
CV (%) =	25.70				
Média geral:	5.7531250	Número de observações:		24	

- Variável analisada: comprimento da maior raiz (CMR)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	3.623151	3.623151	2.214	0.1510
erro	22	36.009323	1.636787		
Total corrigido	23	39.632474			
CV (%) =	28.36				
Média geral:	4.5114583	Número de observações:		24	

- Variável analisada: pH final (pH_{final})

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	2	26.403500	13.201750	252.647	0.0000
erro	27	1.410850	0.052254		
Total corrigido	29	27.814350			
CV (%) =	5.10				
Média geral:	4.4850000	Número de observações:		30	

Análise de Variância (ANAVA) – Capítulo III (Fase Aclimatização)

- Variável analisada: % de sobrevivência (SB)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	2116.000000	2116.000000	10.875	0.0053
erro	14	2724.000000	194.571429		
Total corrigido	15	4840.000000			
CV (%) =	15.76				
Média geral:	88.5000000	Número de observações:		16	

- Variável analisada: massa fresca total (MFT)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	15.670276	15.670276	11.911	0.0039
erro	14	18.419357	1.315668		
Total corrigido	15	34.089634			
CV (%) =	52.55				
Média geral:	2.1827313	Número de observações:		16	

- Variável analisada: número de folhas (NF)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	20.930625	20.930625	42.187	0.0000
erro	14	6.945961	0.496140		
Total corrigido	15	27.876586			
CV (%) =	16.90				
Média geral:	4.1687500	Número de observações:		16	

- Variável analisada: comprimento da maior folha (CMF)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	2.719753	2.719753	11.152	0.0049
erro	14	3.414172	0.243869		
Total corrigido	15	6.133925			
CV (%) =	22.81				
Média geral:	2.1647919	Número de observações:		16	

- Variável analisada: número de raiz (NR)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	49.233623	49.233623	14.858	0.0018
erro	14	46.390537	3.313610		
Total corrigido	15	95.624159			

CV (%) = 31.68
 Média geral: 5.7458331 Número de observações: 16

 - Variável analisada: comprimento da maior raiz (CMR)

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MEIO	1	25.607825	25.607825	6.554	0.0227
erro	14	54.702830	3.907345		
Total corrigido	15	80.310656			
CV (%) =	29.53				
Média geral:	6.6932294	Número de observações:	16		