

WALESKA DEMBISKI

DESENVOLVIMENTO E MULTIPLICAÇÃO DE PORTOCORMOS *IN VITRO* DE  
TRÊS ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS: *Cattleya intermedia* Graham, *Laelia lobata*  
(Lindl.) H.J. Veitch e *Laelia purpurata* (Lindl. & Paxton) Paxton's Fl.

MONBIO  
DEMBISKI, Waleska

CURITIBA

2007

**WALESKA DEMBISKI**

**DESENVOLVIMENTO E MULTIPLICAÇÃO DE PROTOCORMOS *IN VITRO* DE  
TRÊS ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS: *Cattleya intermedia* Graham, *Laelia lobata*  
(Lindl.) H.J. Veitch e *Laelia purpurata* (Lindl. & Paxton) Paxton's Fl.**

**Monografia apresentada à disciplina de  
Estágio em Botânica (BB033), como requisito  
para obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas, Curso de Ciências  
Biológicas, pelo Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Luciana L.F. Ribas  
Co-orientadora: Doutoranda Juliana Lischka  
Sampaio Mayer**

**CURITIBA**

**2007**

***DEDICO ESTE TRABALHO A MINHA  
FAMÍLIA E AO MEU AMOR, VOCÊS.  
SÃO ESPECIAIS PRA MIM...***

**“Aqueles que têm uma grande admiração pela beleza das flores possuem corações que a elas se assemelham”.**

**MOKITI OKADA**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Meishu-Sama em primeiro lugar, porque foram eles que me levaram através de seus sinais ser possível a conclusão da minha monografia com a micropropagação de flores tão lindas como as orquídeas.

Agradeço a Profa. Dra. Thelma A. Veiga Ludwig pela amizade e carinho, pois quando estava perdida foi você quem me ajudou e indicou a procurar a profa. Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas.

Agradeço a Profa. Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas, pela orientação e principalmente por ter me aceitado como orientada. Obrigada professora pelas palavras de incentivo e pelas orientações que só me fizeram crescer como profissional.

Agradeço a Profa. Doutoranda Juliana Lischka Sampaio Mayer pela co-orientação. Foi você que dispôs do seu tempo para ensinar as técnicas de micropropagação me dando a base para que eu pudesse realizar esse trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Marguerite Quoirin pela amizade.

Agradeço a Profa. Dra. Sônia Isoldi Marty Gama Muller e o Prof. Dr. Henrique Soares Koehler pela orientação estatística.

Gostaria de agradecer a todos do Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná aos amigos que fiz nesse ambiente como Tatiana, Luciana, João, Ana Paula, Pamela, Felipe, Lucinir, Paula e todos os novos estagiários.

Agradeço as minhas amigas Sikandra, Jamyle, Patrícia, Soraia, Kaline e ao meu amigo Eduardo por todos os momentos ótimos que passamos juntos durante a graduação. Também quero agradecer a Rô por tudo que fez por mim nesses anos, obrigada por estar sempre disposta a me ajudar.

E agradeço principalmente a minha família José Carlos Dembiski (pai), Maria Odete Jorge Dembiski (mãe) e Danusa Dembiski (irmã), pessoas maravilhosas que estavam sempre me apoiando para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada pela paciência, incentivo e compreensão.

Agradeço em especial ao meu amor Alexandre Papoulias por me apoiar em todos os momentos me dando sempre carinho e atenção.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1 EXPLANTE.....	4
2.2 MEIO DE CULTURA.....	4
2.3 MULTIPLICAÇÃO.....	7
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 COLETA DE FRUTOS, OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES.....	12
3.2 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS.....	12
3.2.1 Condições de cultivo <i>in vitro</i> .....	12
3.2.2 Fontes de explantes.....	13
3.2.3 Meio de cultura.....	13
3.3 AVALIAÇÕES E SUBCULTIVOS.....	14
3.4 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO.....	14
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
4.1 EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS.....	15
4.1.1 <i>Laelia lobata</i> .....	15
4.1.2 <i>Laelia purpurata</i> .....	18
4.1.3 <i>Cattleya intermedia</i> .....	21
4.2 EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO.....	23
4.2.1 <i>Laelia lobata</i> .....	23
4.2.2 <i>Laelia purpurata</i> .....	26
4.2.3 <i>Cattleya intermedia</i> .....	29
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
5.1 EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS.....	33
5.2 EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO.....	36
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>9 FIGURAS.....</b>	<b>48</b>
<b>10 ANEXOS.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** – A. Orquídea *Laelia lobata*; B-D Experimento de desenvolvimento de protocormos em meio de cultura MS, MS/2, WPM e KC (esquerda para a direita); B- 1º subcultivo (90 dias); C- 2º subcultivo (180 dias); D- 3º terceiro subcultivo (270 dias). E-G Experimento de multiplicação de protocormos na seguinte seqüência: 0, 5, 10, 20 e 40 µM de BAP; E- 1º subcultivo (90 dias); F- 2º subcultivo (180 dias); G- 3º terceiro subcultivo (270 dias).....48

**FIGURA 2** – A. Orquídea *Laelia purpurata*; B-D Experimento de desenvolvimento de protocormos em meio de cultura MS, MS/2, WPM e KC (esquerda para a direita); B- 1º subcultivo (90 dias); C- 2º subcultivo (180 dias); D- 3º terceiro subcultivo (270 dias). E-G Experimento de multiplicação de protocormos na seguinte seqüência: 0, 5, 10, 20 e 40 µM de BAP; E- 1º subcultivo (90 dias); F- 2º subcultivo (180 dias); G- 3º terceiro subcultivo (270 dias).....49

**FIGURA 3** – A. Orquídea *Cattleya intermedia*; B-D Experimento de desenvolvimento de protocormos em meio de cultura MS, MS/2, WPM e KC (esquerda para a direita); B-1º subcultivo (90 dias); C- 2º subcultivo (180 dias); D- 3º terceiro subcultivo (270 dias). E-G Experimento de multiplicação de protocormos na seguinte seqüência: 0, 5, 10, 20 e 40 µM de BAP; E- 1º subcultivo (90 dias); F- 2º subcultivo (180 dias); G- 3º terceiro subcultivo (270 dias).....50

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Laelia lobata</i> CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).....	16
TABELA 2	– RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Laelia lobata</i> CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).....	17
TABELA 3	– RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Laelia lobata</i> CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).....	17
TABELA 4	– RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Laelia purpurata</i> CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).....	19
TABELA 5	– RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Laelia purpurata</i> CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).....	20
TABELA 6	– RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Laelia purpurata</i> CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).....	20
TABELA 7	– RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Cattleya intermedia</i> CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).....	22
TABELA 8	– RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Cattleya intermedia</i> CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).....	22
TABELA 9	– RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE <i>Cattleya intermedia</i> CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).....	23
TABELA 10	– RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Laelia lobata</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).....	25
TABELA 11	– RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Laelia lobata</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).....	25
TABELA 12	– RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Laelia lobata</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).....	26
TABELA 13	– RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Laelia purpurata</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).....	28



<b>TABELA 14</b>	– RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Laelia purpurata</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).....	28
<b>TABELA 15</b>	– RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Laelia purpurata</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).....	29
<b>TABELA 16</b>	– RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Cattleya intermedia</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).....	31
<b>TABELA 17</b>	– RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Cattleya intermedia</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).....	31
<b>TABELA 18</b>	– RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Cattleya intermedia</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AIB** - Ácido indolbutírico
- ANA** - Ácido naftaleno acético
- BAP** - 6-benzilaminopurina
- MS** - Murashige e Skoog (1962)
- MS/2** - MS modificado com  $\frac{1}{2}$  dos macronutrientes
- PLBs** - Protocormóides ( "protocorm like body")
- WPM** - "Woody plant medium"
- 2,4 D** - Ácido 2,4 diclorofenoxiacético

## RESUMO

As espécies do gênero *Laelia* são muito parecidas com as *Cattleya* que são as orquídeas mais comercializadas na atualidade e possuem flores grandes e vivamente coloridas. A cultura assimbiótica de orquídeas resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos, simbioses muitas vezes espécie-específicas, por isso técnicas de micropropagação vêm sendo utilizadas como método de propagação clonal em larga escala de plantas ornamentais comercialmente importantes ou que correm algum perigo de extinção. O objetivo deste trabalho foi determinar *in vitro* o melhor meio de cultura e concentração de BAP para o desenvolvimento e multiplicação de protocormos de *Laelia lobata* (Lindl.) H.J. Veitch, *Laelia purpurata* (Lindl. & Paxton) Paxton's Fl. e *Cattleya intermedia* Graham. As três espécies foram inoculadas em diferentes meios de cultura MS, MS/2, WPM e KNUDSON C para verificar em qual deles teria o melhor desenvolvimento das plantas. No experimento de multiplicação foram adicionadas ao meio de cultura MS as seguintes concentrações de BAP: 0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M e 40  $\mu$ M. Os resultados obtidos para *L. lobata*, *L. purpurata* e *C. intermedia* permitiram concluir que o melhor meio de cultura para um melhor desenvolvimento da parte aérea e enraizamento das espécies *in vitro* foi no meio de cultura WPM. No experimento de multiplicação o meio de cultura MS sem adição de BAP apresentou uma maior soma do número de protocormos, brotações e plantas, em comparação com os meios que continham BAP, também proporcionou um melhor desenvolvimento da parte aérea e enraizamento. Por isso a utilização de BAP para a multiplicação de *L. lobata*, *L. purpurata* e *C. intermedia* não é necessária, pois na sua presença ocorre uma menor multiplicação e a inibição do desenvolvimento da parte aérea e das raízes das plantas.

**Palavras chave:** Orchidaceae, micropropagação, propagação *in vitro*, regulador vegetal.

## 1 INTRODUÇÃO

Orchidaceae é provavelmente a maior família de plantas com flores, sendo estimada em cerca de 35 mil espécies distribuídas em aproximadamente 1800 gêneros, correspondendo a um sétimo de todas as plantas com flores. Estão amplamente distribuídas, porém com maior diversidade nas montanhas tropicais (DRESSLER, 1993; WATANABE, 2002).

Orquídeas são monocotiledôneas, herbáceas e perenes, podendo ser epífitas, terrestres e rupícolas (BLACK, 1984). Elas são excelentes plantas para jardim e decoração interna e exibem uma grande diversidade de forma, tamanho, cor e textura das flores que vai além da imaginação humana (MUKHERJEE, 1983).

As espécies do gênero *Cattleya* são as orquídeas mais comercializadas na atualidade. Agrupam inúmeras espécies e milhares de híbridos que possuem flores grandes e vivamente coloridas. São plantas em geral epífitas (PAULA e SILVA, 2006).

As espécies do gênero *Laelia* são muito parecidas com as *Cattleya*, formando excelentes híbridos em seus cruzamentos. Podem ser epífitas ou rupícolas (PAULA e SILVA, 2006).

Nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina a grande maioria dos orquidófilos têm como preferência o cultivo de duas espécies: a *Laelia purpurata* (Lindl. & Paxton) Paxton's Fl., que floresce nos meses de novembro e dezembro e a *Cattleya intermedia* Graham, flor da primavera que floresce de setembro até meados de outubro (HÜBNER, 2003).

Um bom motivo para cultivar a *Cattleya intermedia* foi a facilidade de encontrá-la em abundância nos mais variados habitats nestes dois estados, principalmente na faixa litorânea e em algumas regiões atingindo mais de 150 km para o interior. A *Cattleya intermedia* possui uma grande variedade de colorido do branco ao rosa com ou sem máculas nas pétalas (FIGURA 3A). A facilidade de cultivo, sua rusticidade e grande tolerância às baixas temperaturas também influenciaram na preferência (HÜBNER, 2003).

*Laelia purpurata* (FIGURA 2A) que é conhecida como a "Rainha das Orquídeas Brasileiras" ocorre numa estreita faixa litorânea do norte do Rio Grande do Sul até o norte de São Paulo, mas foi no litoral catarinense que a espécie revelou

todo o seu esplendor, tanto em densidade populacional como na riqueza da variabilidade dos coloridos que vai do branco ao rosa choque (SANDER, 2000). Ela é hoje muito propagada em laboratórios visando o melhoramento genético de suas belas flores e é a orquídea que apresenta o maior número de variedades entre todas as orquídeas do mundo (ENDSFELDZ, 2000).

*Laelia purpurata* vegeta normalmente em árvores de médio e grande porte, parecendo ter preferência pelas grandes figueiras nativas, muito comuns nas regiões em que habita (SANDER, 2000). Seu cultivo, portanto, pode ser considerado um dos mais fáceis entre as orquídeas conhecidas, o que lhe tem assegurado um espaço destacado nas coleções (SANDER, 2000).

*Laelia lobata* (Lindl.) H.J. Veitch (FIGURA 1A) possui aproximadamente 24 variedades que estão em perigo de extinção na cidade do Rio de Janeiro. Estas variedades são endêmicas das montanhas mais visitadas da cidade, o Pão de Açúcar e a Pedra da Gávea e já se sabe que elas ocorrem no topo das montanhas. Hoje a população de orquídeas do Pão de Açúcar e da Pedra da Gávea poderá ser extinta por causa da grande exploração e extração por colecionadores (CONSTANTINO e FRAGA, 2005).

O Projeto CORES "Coastal Orchid Restoration" conjuntamente com a IUCN "World Conservation Union" foi elaborado para promover a conservação da espécie *Laelia lobata*. O projeto vai analisar a população demográfica, a biologia das plantas a genética de populações em três locais (Pão de Açúcar, Pedra da Gávea e propagações ex-situ) e também a micropropagação destas plantas usando suas sementes para germinação simbiótica e assimbiótica. Esse projeto tem como objetivo remover *Laelia lobata* da Lista das orquídeas que estão em perigo de extinção (CONSTANTINO e FRAGA, 2005).

A propagação *in vitro* de espécies raras ou que estão em perigo de extinção tem sido importante para várias angiospermas, incluindo as orquídeas (AGRAWAL et al., 1991; SEENI e LATHA, 1992; MARTIN e PEREZ, 1992; ARDITTI e ERNST, 1993; PAUWN et al., 1995; RAMSAY e STEWART, 1998).

Uma das características comuns a todas as orquídeas é a produção de milhões de pequenas sementes em cada fruto (MILANEZE, 1997). A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos, simbiotes muitas vezes espécie-específicos (MARTINI et al., 2001).

Isto ocorre em virtude destas sementes não possuírem endosperma com reservas nutritivas e a capacidade de utilizar diretamente o substrato na natureza (BAJAJ, 1992).

O desenvolvimento do método de germinação de sementes *in vitro* por KNUDSON, em 1922, abriu caminho para outros estudos visando à propagação *in vitro* (READ e SZENDRACK, 1998).

Nas últimas décadas, técnicas *in vitro* para rápida propagação das plantas têm sido essenciais para a indústria de horticultura, particularmente para plantas como as orquídeas cuja multiplicação é extremamente lenta pelos métodos convencionais *ex situ* (RAO, 1977; MUKHOPADHYAY e ROY, 1994). Os métodos convencionais como a propagação vegetativa pela separação, divisão de touceiras ou de pequenas mudas que se formam nos rizomas e em hastes florais proporcionam uma descendência geneticamente idêntica à planta matriz (SAGAWA e KUNISAKI, 1984). No entanto, esse método não é viável em escala comercial (REINERT e MOHR, 1967), sendo aconselhada a micropropagação para a propagação clonal em grande escala.

As maiores vantagens do cultivo *in vitro* são a multiplicação rápida e a obtenção de populações homogêneas oriundas de matrizes melhoradas geneticamente (GOVIL e GUPTA, 1997). Nessa técnica podem ser utilizados tecidos meristemáticos, constituídos por grupos de células indiferenciadas, que estão localizados nos ápices de caule e raiz e nas axilas das folhas. As células desse tecido são totipotentes, isto é, possuem a capacidade de regenerar e diferenciar diferentes órgãos e tecidos (KYTE e KLEYN, 1996). Além disso, permite produzir centenas de clones de plantas previamente selecionadas, muitas delas híbridas, mantendo-se assim o genótipo e fenótipo, e ainda eliminando a presença de vírus de plantas matrizes infectadas (CASTRO et al., 2002).

Experimentos realizados ao longo de anos vêm evidenciando que, dentro da família Orchidaceae, as condições de cultivo são específicas para os gêneros e algumas vezes para espécies pertencentes ao mesmo gênero (ARDITTI e ERNEST, 1993).

Por isso o objetivo deste trabalho foi determinar o melhor meio de cultura e concentração de BAP para o desenvolvimento e multiplicação das três espécies de orquídeas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EXPLANTE

Há vários tipos de explantes utilizados na micropropagação como, por exemplo, o meristema apical (MOREL, 1960), o rizoma (PAEK e YEUNG, 1991), raiz, folha e pseudobulbo (CHANG e CHANG, 1998), botão floral (SHIMASAKI e UEMOTO, 1991), PLBs ("protocorm like bodies") (BEGUM et al., 1994; NAYAK et al., 2002; HUAN et al., 2004; HUAN e TANAKA, 2004), etc.

Para KRAPIEC et al. (2003) a multiplicação de orquídeas *in vitro* tem sido mais realizada com protocormos ou secções dos protocormos e indução de calos embriogênicos.

Os protocormos são gerados a partir da germinação de sementes de orquídeas, os quais são descritos como uma pequena estrutura esférica e esverdeada (ARDITTI e ERNEST, 1993).

O desenvolvimento do protocormo após a germinação da semente é lento e ocorre com o aumento de volume e diferenciação dos tecidos, originando a plântula (BARABÉ et al., 1993). A presença de protocormos é única dentre as fanerógamas e pode ser considerada como uma extensão do estágio embrionário que ocorre fora das sementes (DRESSLER, 1993; LEROUX et al., 1997).

### 2.2 MEIO DE CULTURA

Vários estudos foram desenvolvidos para determinar os meios de cultura que promovem o melhor desenvolvimento e germinação das orquídeas (MARTINI et al., 2001; REGO-OLIVEIRA e FARIA, 2005; STANCATO e FARIA, 1996; BHADRA e HOSSAIN, 2003; VAASA E ROSENBERG, 2004; ALAM et al., 2002).

Para o cultivo *in vitro* são utilizados meios de cultura que fornecem substâncias essenciais para o crescimento de células, tecidos ou órgãos de plantas. Além disso, a composição e a concentração dos reguladores vegetais no meio de cultura determinam o padrão de desenvolvimento (CASTRO et al., 2002).

Os meios de cultura mais empregados para o gênero *Cattleya* e *Laelia* são o de MURASHIGE e SKOOG (1962) (MS) e o de KNUDSON (1946) (KC). O meio de

cultura MS é o mais utilizado na micropropagação, mas sua concentração de nutrientes é alta, podendo ser modificada (GEORGE, 1993; PIERIK, 1987).

Para algumas espécies a alta proporção de nitrogênio no meio de cultura MS, que é muito maior do que na maioria dos outros meios de cultura torna-se inadequada. Meios de cultura que apresentam uma menor proporção de nitrogênio como o KNUDSON e o WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), são mais indicados para otimizar o crescimento e a morfogênese dessas espécies (PASQUAL et al., 1997).

O meio de cultura nutritivo KC caracteriza-se pela ausência de N orgânico, bem como por baixas concentrações de amônia e nitrato, quando comparado ao meio de cultura MS e é considerado, até os dias atuais, como um dos mais adequados à germinação de orquídeas epifíticas tropicais (MARTINI et al., 2001).

KC (1946) é o meio de cultura mais utilizado para germinação *in vitro* e as fórmulas descritas por VACIN e WENT (1949) (VW) e MURASHIGE e SKOOG (1962) são as mais utilizadas para a propagação clonal (ARDITTI e ERNEST, 1990).

Os meios de cultura originais formulados por vários autores têm sido, geralmente, modificados para satisfazer às necessidades individuais de certas orquídeas ou mesmo pela preferência do pesquisador (ARDITTI e ERNEST, 1992). Dessa forma, várias formulações têm sido utilizadas, dependendo dos tipos de explantes utilizados e das estruturas de regeneração desejadas (VENTURA, 2002).

Para *Laelia cinnabarina* foi observado que entre o meio de cultura completo de HOAGLAND e ARNON (1950) e o MS/2 (MS com concentração de sais reduzido a  $\frac{1}{2}$ ), o último apresentou o melhor crescimento, provavelmente era o que possuía a maior quantidade de macro e micronutrientes (STANCATO e FARIA, 1996).

As espécies de orquídeas *Catasetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaensis* foram testadas em meios de cultura tradicionais como: MS, MS/2, MS/4 (MS com concentração de sais reduzidos a  $\frac{1}{4}$ ), VW e KC. O meio de cultura MS apresentou um melhor resultado para o desenvolvimento vegetativo de *Catasetum fimbriatum*. Já o meio de cultura MS/2 apresentou o melhor resultado para o desenvolvimento da parte aérea e para o número de raízes. Para *Cyrtopodium paranaensis* o melhor resultado de desenvolvimento vegetativo ocorreu no meio de cultura MS/2 (REGO-OLIVEIRA e FARIA, 2005).

ALAM et al. (2002) germinou sementes de *Dendrobium transparens* em diferentes meios de cultura, incluindo os meios de cultura MS e KC. A maior



porcentagem de germinação 78% ocorreu no meio de cultura MS, seguido do KC com 66%.

Sementes de *Dendrobium tosaense* foram semeadas no meio de cultura MS/2, MS, KC e VW. O melhor meio de cultura para a germinação das sementes foi o meio de cultura MS/2. O meio de cultura MS e MS/2 obtiveram os melhores resultados para o desenvolvimento das brotações, enquanto que o meio de cultura KC e VW foram os piores. No meio de cultura MS/2 houve o máximo desenvolvimento das brotações (67,5 brotações por tubo). O maior número de PLBs brancos e verdes se desenvolveram no meio de cultura MS e MS/2. Já no meio de cultura KC e VW formou-se poucos PLBs saudáveis, apesar dos PLBs verdes se desenvolveram em plântulas depois de 12 semanas de permanência na sala de crescimento. Isto contrasta com o estudo de *Geodorum densiflorum*, onde os PLBs não formaram brotações, mas desenvolveram rizomas no meio de cultura KC suplementado com 10% de água de coco (LO et al., 2004)

Para *Cattleya amethystoglossa* o meio de cultura KC apresentou o pior resultado para o comprimento de raízes (0,7 cm) e o meio de cultura MS apresentou o melhor resultado (1,8 cm). Para a altura da planta, os resultados foram próximos e não diferiram significativamente, no meio de cultura MS (0,51 cm) e o meio de cultura KC (0,49 cm). Esses resultados foram obtidos após 180 dias de cultivo *in vitro* (DRONK, 2004).

SILVA (2003) utilizou como explante plântulas de 1 a 1,5 cm de *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*, sendo que no meio de cultura KC com apenas 90 dias foram obtidas 4,5 folhas por explante, e no meio de cultura MS 4,2 folhas por explante, não ocorrendo grande diferença entre os meios. Para o número de raízes o meio de cultura MS apresentou 5,0 raízes por explante, após 90 dias. SILVA (2003) afirmou que o meio de cultura KC é inibitório e as vitaminas do meio de cultura MS são benéficas para promover o crescimento do sistema radicular de *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*. Com relação ao número de brotações no meio de cultura MS foi obtido um melhor resultado do que no meio de cultura KC, pois este estimula o crescimento do explante e o alongamento do sistema radicular.

## 2.3 MULTIPLICAÇÃO

A adição de reguladores vegetais no meio de cultura melhoram o desenvolvimento e crescimento dos protocormos (ARDITTI e ERNST, 1993).

As citocininas estimulam as células vegetais a se dividirem, seu nome deriva da palavra citocinese (divisão celular) (TAIZ e ZEIGER, 2006).

As citocininas mais utilizadas *in vitro* são BAP (6-benzilaminopurina), cinetina, zeatina e tidiazuron (TDZ). BAP é a citocinina mais potente e menos dispendiosa para promover o desenvolvimento da parte aérea da plântula (ZAERR e MAPES, 1985).

Alguns pesquisadores como MAURO et al. (1994); VENTURA (2002); SILVA (2003); MAYER (2006) realizaram estudos com reguladores vegetais, na etapa de multiplicação o mais utilizado foi 6-benzilaminopurina (BAP) uma citocinina que pode ser utilizada em várias concentrações para a multiplicação de gemas, brotações e novas plantas.

Vários trabalhos foram desenvolvidos numa tentativa de otimizar a semeadura *in vitro* de orquídeas com adição de BAP. Efeitos positivos, como redução no tempo de germinação, foram observados por PAUW et al. (1995) em *Cypripedium candidum*.

De acordo com PIERIK e STEEGMANS (1972), para que os protocormóides formados se desenvolvam em plântulas é necessária a transferência para o meio de cultura sem BAP, pois altas concentrações deste regulador vegetal provocam anormalidades nos explantes e inibem o desenvolvimento radicular. Segundo VENTURA (2002), o processo de organogênese foi mais eficiente quando os explantes primários e secundários foram transferidos para um meio de cultura sem reguladores vegetais.

Para MARTINI et al. (2001) a adição de BAP no meio de cultura de germinação de sementes de orquídeas tem apresentado resultados contrastantes. PAUW et al. (1995) obtiveram efeitos positivos com a redução do tempo de germinação de *Encyclia phoenicea*, em meio de cultura MS, acrescido de BAP. Para *Cyrtopodium eugenii* e *Cyrtopodium Cristatum*, a adição de BAP em diversos meios de cultura nutritivos resultou em efeitos deletérios para a germinação de sementes imaturas (CARAMASCHI e CALDAS, 1999).

Para *Zygopetalum intermedium* o meio de cultura MS combinado com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP apresentou o maior número de folhas e número de raízes (NAGARAJU e MANI, 2005).

*Gongora quinquenervis* foi cultivada em dois meios de cultura nutritivos, KC modificado e MS, com duas concentrações de BAP (0,0, 2,22  $\mu\text{M}$  e 4,44  $\mu\text{M}$ ). Os protocormos cultivados no meio de cultura KC necrosaram. A maioria dos embriões cultivados em meio de cultura MS se diferenciaram ou formaram calos. Estes calos apresentaram alto potencial morfogênético, regenerando grande número de plantas via organogênese indireta. No material proveniente do tratamento desprovido de BAP foram formadas 41 plantas pela rota normal de germinação, contrastando com 715 plantas regeneradas via organogênese indireta (MARTINI et al., 2001).

*Geodorum densiflorum* quando cultivada no meio de cultura MS se desenvolveu em estruturas globulares e plântulas bem desenvolvidas. No meio de cultura MS com a adição de 10,74  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -ácido naftalenoacético (ANA) e 8,87  $\mu\text{M}$  de BAP ocorreu o maior alongamento das plantas. Para a indução da multiplicação de brotações no meio de cultura MS, as melhores concentrações foram entre 8,87 - 11,09  $\mu\text{M}$  de BAP (BHADRA e HOSSAIN, 2003).

ÁVILA e SALGADO (2006) multiplicaram protocormos de *Cattleya aurantiaca* no meio de cultura MS com ANA, BAP e  $\text{GA}_3$  (ácido giberélico) combinados em diferentes concentrações. A melhor combinação dos reguladores vegetais nesta sequência para a multiplicação de protocormos de *Cattleya aurantiaca* foi 5,37/ 2,22/ 0  $\mu\text{M}$ ; para *Laelia albida* 0,54/ 2,22/ 0,29  $\mu\text{M}$ ; *Laelia autumnalis* 0,54/ 0,44/ 0,29  $\mu\text{M}$  e *Laelia speciosa* 0,54/ 2,22/ 0  $\mu\text{M}$ . A melhor concentração de BAP foi a de 2,22  $\mu\text{M}$  exceto para *Laelia autumnalis* que foi 0,44  $\mu\text{M}$  de BAP.

Brotações de *Cattleya aurantiaca* com folhas reduzidas a um 1/3, e utilizando BAP com concentração de 44,38  $\mu\text{M}$  e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA promoveu um maior número de gemas adventícias (MAURO et al., 1994). VENTURA (2002), também utilizando o mesmo tipo de explante, definiu como melhor concentração para a multiplicação de *Brassolaeliocattleya* Sun King Orange x *Laelia purpurata*, 5,33  $\mu\text{M}$  de BAP (4,8 brotações por explante). Já para SILVA (2003), o uso de BAP (0 -18  $\mu\text{M}$ ) não promoveu nenhum efeito na multiplicação de *Brassiocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow.

As sementes de *Cattleya walkeriana* foram germinadas *in vitro* em meio de cultura KC. As plântulas obtidas serviram de explante para multiplicação em meios de cultura B5 contendo BAP (0,0; 2,22; 4,44 e 6,66  $\mu\text{M}$ ). O maior número de brotações ocorreu no meio de cultura contendo 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP combinado com 2,46  $\mu\text{M}$  de AIB (KRAPIEC et al., 2003).

*Cattleya aelandiae*, *Cattleya bowringiana*, *Cattleya granulosa*, *Cattleya percivaliana*, *Cattleyopsis lindenii* e *Dendrobium parishii* foram germinadas no meio de cultura KC. Para a proliferação dos protocormos foi utilizado o meio de cultura MS suplementado com 22,19  $\mu\text{M}$  de BAP e 10,74  $\mu\text{M}$  de ANA. A formação de brotações para o gênero *Cattleya* ocorreu em torno de 500 dias, já para *Cattleyopsis lindenii* foi necessário um período de 600 dias (BUYUN et al., 2004).

Segmentos caulinares de 1,0 cm de comprimento de *Cattleya x mesquitae* foram retirados de plântulas originadas por semeadura *in vitro* e cultivados no escuro, durante sessenta dias. O meio de cultura utilizado foi o MS/2 contendo três concentrações de BAP (0,0; 2,22 e 8,87  $\mu\text{M}$ ). Com a adição de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP houve uma produção média de cinco brotações por explante estiolado, o que significou um incremento de até duas brotações, comparando ao cultivo na ausência de reguladores vegetais. A maior concentração de BAP no meio de cultura (8,87  $\mu\text{M}$ ), mostrou-se prejudicial, promovendo uma redução de 50% na produção de novas brotações. Para a variável altura da planta os melhores resultados foram obtidos no meio de cultura sem adição de BAP (1,98 cm), enquanto que para as outras concentrações a altura da planta diminuiu devido ao aumento da concentração de BAP, com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (1,76 cm) e com 8,87  $\mu\text{M}$  de BAP (1,55 cm). Na presença de BAP verificou-se uma maior produção de brotações que foi inversamente proporcional à altura. SUZUKI (1999) afirmou que a adição de BAP inibiu de forma significativa o crescimento caulinar das plantas de *Catasetum fimbriatum*, tanto na ausência como na presença de luz (RAMOS e CARNEIRO, 2007).

*Cattleya walkeriana* e *Shomburgkia crispa* foram germinadas *in vitro* no meio de cultura KC (1922) modificado, no entanto as espécies apresentaram respostas distintas quanto ao número de protocormos e plântulas formadas. Com o surgimento dos protocormos os mesmos foram transferidos para frascos de 200 mL contendo meio de cultura KC modificado por MOREL (1960). No meio de cultura KC modificado com adição de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP os protocormos se converteram em

plantas após 60 dias do cultivo. Foi obtida uma média de 7,6 e 1,8 plantas para *Cattleya walkeriana* e *Shomburgkia crispera*, respectivamente (SOUSA et al., 2006).

Protocormos de *Geodorum densiflorum* foram inoculados no meio de cultura MS modificado, acrescido com várias substâncias orgânicas e reguladores vegetais. As combinações de ANA (0; 2,69; 5,37; 10,74; 21,48 e 42,96  $\mu\text{M}$ ) e BAP (0; 2,22; 4,44; 8,87; 17,74 e 35,48  $\mu\text{M}$ ) não favoreceram o desenvolvimento dos protocormos, pois a BAP inibiu o efeito do ANA no crescimento do rizoma. Quando combinado ANA com BAP em baixas concentrações (abaixo de 8,87  $\mu\text{M}$ ) promoveu o desenvolvimento de brotações e o seu surgimento foi dependente da utilização de BAP. Um aumento no número de brotações ocorreu com o aumento das concentrações de BAP, mas resultou na diminuição do tamanho dos rizomas. A BAP também apresentou efeitos inibitórios na formação de raízes (ROY e BANERJEE, 2002).

A multiplicação de *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* e *Dendrobium moschatum* foi realizada com gemas em meio de cultura MS contendo BAP (4,4 - 44  $\mu\text{M}$ ). A melhor concentração de BAP para aumentar a freqüência da regeneração das brotações foi de 22  $\mu\text{M}$  para *Cymbidium aloifolium* e 44  $\mu\text{M}$  para *Dendrobium aphyllum* e *Dendrobium moschatum*. A combinação de ANA (5,4  $\mu\text{M}$ ) com BAP (22 - 44  $\mu\text{M}$ ) não aumentou a freqüência de regeneração das brotações, mas promoveu o alongamento das brotações, a expansão das folhas e induziu a formação de (2 - 3) raízes por brotação no mesmo meio de cultura para as três espécies de orquídeas. Altas concentrações de BAP (44  $\mu\text{M}$ ) foram testadas para o enraizamento das brotações, mas a porcentagem de enraizamento foi baixa (58 - 67%) (NAYAK et al., 1997).

NAYAK et al. (2002) utilizou discos de PLBs de *Cymbidium aloifolium* e *Dendrobium nobile* como explantes. Os discos de PLBs foram inoculados no meio de cultura MS com a adição de BAP, zeatina ou cinetina. Para a indução de PLBs, a adição de 14,0  $\mu\text{M}$  de BAP foi mais eficiente para *Cymbidium aloifolium*, enquanto 11,0  $\mu\text{M}$  de BAP foi melhor para *Dendrobium nobile*. O número de PLBs por explante foi alto para as duas espécies (28,2 em *Cymbidium aloifolium*, e 34,0 em *Dendrobium nobile*) embora, tenham sido verificados efeitos inibitórios da citocinina em concentrações acima do nível ótimo. Ocorreu uma porcentagem alta de

formação das brotações 85% em *Cymbidium aloifolium* e 80% em *Dendrobium nobile*.

Sementes de *Calanthe discolor* na presença de altas concentrações de BAP (44,38 e 443,80  $\mu\text{M}$ ) obtiveram um aumento na porcentagem de formação de protocormos de 1,5 e 2,3. A concentração de 443,80  $\mu\text{M}$  de BAP inibiu a pré-germinação e concentrações abaixo de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP tiveram pouco efeito na germinação (MIYOSHI e MII, 1995).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

#### 3.1 COLETA DE FRUTOS, OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de *Laelia lobata*, *Laelia purpurata* e *Cattleya intermedia* foram obtidas por doação do Orquidário Carlos Gomes, localizado em Florianópolis - SC. As sementes de *Laelia lobata* e *Laelia purpurata* foram coletadas em 2004 e as de *Cattleya intermedia* em 2005.

As sementes foram retiradas dos frutos e submetidas a desinfestação com imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaCl) a 1% e 0,1 % de Tween® 20, durante 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar, foram realizadas seis lavagens das sementes, com água destilada esterilizada, para remover os resíduos dos desinfestantes.

#### 3.2 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS

##### 3.2.1 Condições de cultivo *in vitro*

Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . As lâmpadas utilizadas foram do tipo luz branca da marca Philips® 32W/64RS, as quais ficavam a uma distância de 40 cm dos frascos. Os frascos de vidro utilizados para os experimentos tinham 12,5 cm de altura e 6,5 cm de diâmetro contendo 30 ml de meio de cultura, fechados com tampas de polipropileno transparentes.

### 3.2.2 Fontes de explantes

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos de 10 cm de altura e 7 cm de diâmetro, com 40 ml de meio de cultura MS.

As sementes de *Cattleya intermedia* foram semeadas em 21/06/06 e *Laelia lobata* e *Laelia purpurata* em 30/06/06. Após quatro meses os protocormos obtidos das sementes foram utilizados para a instalação dos experimentos.

### 3.2.3 Meio de cultura

Os meios de cultura foram solidificados com o acréscimo de 6 gL<sup>-1</sup> de ágar Micromed® e suplementados com 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose (Nuclear®) com exceção do meio de cultura WPM onde foi utilizado 20 gL<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCL a 0,1 N antes da adição do ágar e da autoclavagem. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

**Experimento 1:** Desenvolvimento de protocormos de *Cattleya intermedia*, *Laelia lobata* e *Laelia purpurata* em quatro meios de cultura diferentes.

Em câmara de fluxo laminar, com placas e pinças esterilizadas, os protocormos foram inoculados nos quatro meios de cultura MS, MS/2, WPM e KNUDSON.

**Experimento 2:** Multiplicação de protocormos de *Cattleya intermedia*, *Laelia lobata* e *Laelia purpurata* em meio de cultura MS, na ausência ou com quatro concentrações de BAP.

Em câmara de fluxo laminar, com placas e pinças esterilizadas, os protocormos foram inoculados no meio de cultura MS com as seguintes concentrações 0, 5, 10, 20 e 40 µM de BAP.



### 3.3 AVALIAÇÕES E SUBCULTIVOS

Os experimentos foram avaliados a cada três meses, nos três subcultivos aos 90, 180 e 270 dias. As seguintes variáveis foram avaliadas no experimento de desenvolvimento em diferentes meios de cultura: porcentagem de protocormos, porcentagem de brotações, porcentagem de plantas, número de novos protocormos, número de novas brotações, número de novas plantas, altura da planta, número de folhas, comprimento das três maiores folhas, número de raízes, comprimento das três maiores raízes e porcentagem de necrose.

Para o experimento de multiplicação foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de protocormos, porcentagem de brotações, porcentagem de plantas, número de protocormos, número de brotações, número de plantas, altura da planta, número de folhas, número de raízes e porcentagem de necrose.

### 3.4 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado.

No experimento de desenvolvimento de protocormos foram testados quatro diferentes meios de cultura com quatro repetições. A unidade experimental foi de quatro frascos com cinco explantes cada, totalizando 80 explantes por tratamento.

No experimento de multiplicação testou-se cinco tratamentos: ausência e quatro concentrações de BAP com cinco repetições. A unidade experimental foi dois frascos com cinco explantes cada, totalizando 50 explantes por tratamento.

As variâncias e os tratamentos foram testados quanto à sua homogeneidade por meio do Teste de Bartlett. As variâncias dos tratamentos homogêneas foram submetidas a Análise de Variância. As diferenças estatísticas entre as médias dos tratamentos na Análise de Variância foram comparadas pelo Teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o MSTAT-C, da Universidade do Missouri, EUA.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS

#### 4.1.1 *Laelia lobata*

O teste de Bartlett revelou que as variâncias dos tratamentos são homogêneas e pela análise de variância constatou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos (ANEXOS 1, 2 e 3). Nas Tabelas 1, 2 e 3 foram apresentados os resultados do Teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade para as variáveis analisadas nas três avaliações realizadas aos 90 (primeiro subcultivo), 180 (segundo subcultivo) e 270 (terceiro subcultivo) dias.

Os resultados indicaram que o meio de cultura MS proporcionou a maior porcentagem de protocormos e brotações no primeiro subcultivo e segundo subcultivo sendo superior à dos outros meios de cultura testados (TABELA 1 e TABELA 2). No terceiro subcultivo não haviam mais explantes na forma de protocormos e a porcentagem de brotações do meio MS foi significativamente superior à dos outros meios de cultura (TABELA 3). No entanto, para as outras variáveis analisadas, como número e comprimento de folhas, número e comprimento de raízes e porcentagem de plantas formadas foram obtidos os piores resultados com a utilização do meio MS (TABELAS 1, 2 e 3).

As TABELAS 1, 2 e 3 demonstraram que ocorreu uma redução na porcentagem de protocormos e de brotações com o aumento de subcultivos. E da mesma forma ocorreu um aumento da porcentagem de plantas, altura da planta, número de folhas, comprimento das três maiores folhas, número de raízes e comprimento das três maiores raízes, com o aumento de subcultivos independente do meio de cultura testado.

O número de folhas só foi inferior no meio de cultura MS, no primeiro subcultivo (TABELA 1), não diferindo no segundo e terceiro subcultivo dos diferentes meios de cultura (TABELAS 2 e 3).

A variável porcentagem de necrose apresentou a menor porcentagem (5 %) no meio de cultura WPM e a maior porcentagem de necrose (31,25%) foi obtida no meio de cultura MS, após o terceiro subcultivo.

Em relação à porcentagem de plantas formadas não ocorreu diferença significativa entre os meios MS/2, WPM e KC após o primeiro subcultivo e nos dois subcultivos consecutivos, apesar do meio WPM ter apresentado resultados superiores (TABELAS 1, 2 e 3). Para altura da planta esse meio foi significativamente superior aos demais no terceiro subcultivo (TABELA 3) e também para as variáveis comprimento das três maiores folhas, número e comprimento de raízes no segundo e terceiro subcultivo (TABELAS 2 e 3). Com a análise conjunta das variáveis podemos concluir que o meio de cultura WPM foi o melhor para o desenvolvimento *in vitro* de *Laelia lobata* e isso pode ser visualizado nas FIGURAS 1B, 1C e 1D.

**TABELA 1 – RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia lobata* CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Tratamentos	Protocormos (%)	Brotações (%)	Plantas (%)	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas (cm)	Nº de Raízes (1)	Comp. das 3 Maiores Raízes (cm)
MS	24,17 A	65,00 A	10,83 B	0,24 A	1,72 B	0,14 C	0,12 C	0,02 D
MS/2	6,25 B	36,25 B	57,50 A	0,25 A	2,16 A	0,18 BC	0,71 B	0,11 C
WPM	3,33 B	19,43 B	77,24 A	0,24 A	2,10 A	0,24 AB	0,91 AB	0,32 A
KC	3,51 B	23,95 B	72,54 A	0,25 A	2,20 A	0,25 A	0,95 A	0,20 B
C.V. (%)	76,18	26,53	22,69	10,15	7,26	13,62	12,93	23,96

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

(1) Dados transformados por raiz quadrada para análise.

Comp. - Comprimento

**TABELA 2 – RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia lobata* CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Tratamentos	Protocormos (%)	Brotações (%)	Plantas (%)	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas (cm)	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes (cm)
MS	4,30 A	60,26 A	35,44 B	0,40 A	2,96 A	0,27 C	0,55 C	0,08 C
MS/2	0,00 A	18,33 B	81,67 A	0,39 A	3,10 A	0,35 B	1,69 B	0,34 B
WPM	3,33 A	2,98 B	93,68 A	0,42 A	3,28 A	0,43 A	2,48 A	0,77 A
KC	3,51 A	6,84 B	89,65 A	0,38 A	3,01 A	0,34 B	1,68 B	0,23 B
C.V. (%)	165,38	34,85	12,68	6,50	6,65	9,93	17,75	16,70

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Comp. - Comprimento

**TABELA 3 – RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia lobata* CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Tratamentos	Brotações (%)	Plantas (%)	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas (cm)	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes (cm)
MS	46,05 A	54,20 B	0,48 B	3,96 A	0,39 B	1,03 C	0,19 C
MS/2	2,56 B	97,44 A	0,47 B	4,03 A	0,47 B	2,28 B	0,48 B
WPM	0,00 B	100,00 A	0,59 A	4,22 A	0,71 A	4,12 A	1,54 A
KC	1,96 B	98,04 A	0,47 B	4,48 A	0,44 B	2,82 B	0,32 BC
C.V. (%)	25,19	3,99	9,85	11,08	8,39	10,78	12,27

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Comp. - Comprimento

#### 4.1.2 *Laelia purpurata*

O teste de Bartlett revelou que as variâncias dos tratamentos são homogêneas e pela análise de variância constatou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos (ANEXOS 4, 5 e 6). Nas Tabelas 4, 5 e 6 foram apresentados os resultados do Teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade para as variáveis analisadas nas três avaliações realizadas aos 90 (primeiro subcultivo), 180 (segundo subcultivo) e 270 dias (terceiro subcultivo).

Os resultados da *Laelia purpurata* demonstraram que o meio de cultura MS foi significativamente superior aos demais com relação a porcentagem de brotações no primeiro e segundo subcultivos (TABELAS 4 e 5). No entanto, para a porcentagem de plantas foi o que apresentou o pior resultado, diferindo significativamente dos demais meios no primeiro e segundo subcultivos (TABELAS 4 e 5). No terceiro subcultivo todos os meios de cultura produziram 100 % de plantas. Além disso, de uma maneira geral, o meio MS foi o que formou os menores números de novas brotações e novas plantas nas três avaliações realizadas. No terceiro subcultivo, apesar de não haver diferença entre os meios, o MS proporcionou o maior número de novos protocormos e o meio de cultura KC apresentou desde o segundo subcultivo o maior número de novas brotações, porém não diferiu estatisticamente dos demais meios testados.

A variável número de novos protocormos foi analisada somente no terceiro subcultivo, porque anteriormente não haviam surgido novos protocormos. Apesar de não haver diferença significativa entre os meios de cultura testados, o maior resultado obtido foi para o meio MS.

Para a multiplicação de *Laelia purpurata* se forem somados o número de protocormos, brotações e plantas, o meio de cultura KC foi superior aos demais, em todos os subcultivos.

O meio de cultura MS foi o que apresentou a maior porcentagem de necrose e isso ocorreu com maior intensidade no terceiro subcultivo (41,67 %). No segundo subcultivo não ocorreu necrose nos meios de cultura KC e WPM e no terceiro subcultivo apenas o WPM não apresentou mortalidade.

Ao analisarmos os resultados das variáveis comprimento das três maiores folhas e comprimento das três maiores raízes, o meio de cultura WPM foi

significativamente superior aos demais no segundo e terceiro subcultivos (TABELAS 5 e 6). A altura da planta foi significativamente superior no terceiro subcultivo no meio de cultura WPM. No entanto, a partir do segundo subcultivo todos os explantes desse meio já se encontravam na forma de plantas e o número de novos protocormos formados foi zero. Considerando as variáveis relacionadas com o desenvolvimento da parte aérea e de raízes isso foi melhor evidenciado no segundo subcultivo o meio de cultura WPM poderia ser recomendado também para a *Laelia purpurata* (FIGURAS 2B, 2C e 2D).

**TABELA 4 – RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia purpurata* CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Tratamentos	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de novas Brotações	Nº de novas Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas (cm)	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes (cm)
MS	33,88 A	66,12 B	0,00 A	0,00 A	0,37 A	4,84 A	0,32 AB	1,13 B	0,28 B
MS/2	4,18 B	95,82 A	0,23 A	0,13 A	0,41 A	4,87 A	0,35 AB	2,12 A	0,41 B
WPM	3,82 B	96,18 A	0,31 A	0,08 A	0,39 A	4,31 A	0,42 A	1,66 AB	1,09 A
KC	10,00 B	90,00 A	0,11 A	0,35 A	0,37 A	4,34 A	0,28 B	1,65 AB	0,35 B
C.V. (%)	46,68	6,43	131,14	128,09	6,16	8,57	15,45	20,05	46,68

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Comp. - Comprimento

**TABELA 5 – RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia purpurata* CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Trata- mentos	Brota- ções (%)	Plantas (%)	Nº de novas Brota- ções	Nº de novas Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas (cm)	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes (cm)
MS	23,33 A	76,67 B	0,43 A	0,09 B	0,44 AB	5,10 AB	0,39 B	1,77 B	0,35 B
MS/2	1,85 B	98,15 A	0,55 A	0,85 A	0,51 A	5,38 A	0,46 B	2,82 A	0,79 B
WPM	0,00 B	100,00 A	0,05 A	0,96 A	0,50 A	5,02 AB	0,64 A	2,94 A	2,60 A
KC	0,00 B	100,00 A	0,74 A	0,74 A	0,39 B	4,71 B	0,35 B	2,02 B	0,53 B
C.V. (%)	54,22	3,09	108,71	32,50	9,25	4,42	13,00	16,04	21,67

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Comp. - Comprimento

**TABELA 6 – RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia purpurata* CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Trata- mentos	Plantas (%)	Nº de novos Proto- cormos	Nº de novas Brota- ções (1)	Nº de novas Plantas (1)	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas (cm)	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes (cm)
MS	100,00	0,42 A	0,31 A	0,07 B	0,54 B	5,67 A	0,54 B	2,58 B	0,58 B
MS/2	100,00	0,13 A	0,39 A	0,39 AB	0,54 B	5,89 A	0,50 B	2,81 AB	0,76 B
WPM	100,00	0,00 A	0,52 A	0,52 AB	0,89 A	6,51 A	1,06 A	4,57 A	4,87 A
KC	100,00	0,26 A	2,09 A	2,09 A	0,50 B	5,63 A	0,45 B	2,92 AB	1,13 B
C.V. (%)		107,56	49,25	54,62	11,63	7,80	12,77	27,43	17,72

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Comp. - Comprimento

(1) Dados transformados por raiz quadrada para análise.

#### 4.1.3 *Cattleya intermedia*

O teste de Bartlett revelou que as variâncias dos tratamentos são homogêneas e pela análise de variância constatou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos (ANEXOS 7, 8 e 9). Nas Tabelas 7, 8 e 9 foram apresentados os resultados do Teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade para as variáveis analisadas nas três avaliações realizadas aos 90 (primeiro subcultivo), 180 (segundo subcultivo) e 270 dias (terceiro subcultivo).

Os resultados indicaram que o meio de cultura MS/2 proporcionou a maior porcentagem de brotações no primeiro e segundo subcultivo, apesar de não haver diferença significativa entre os meios testados (TABELAS 7 e 8). O meio de cultura MS foi o que apresentou o maior número de novas brotações no terceiro subcultivo, sendo significativamente superior aos demais (TABELA 9). O meio de cultura MS também formou o maior número de novos protocormos no terceiro subcultivo.

A variável número de novos protocormos foi analisada somente no terceiro subcultivo, porque anteriormente não haviam surgido novos protocormos. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os meios de cultura testados (TABELA 9).

Para a multiplicação de *Cattleya intermedia* se somarmos o número de novos protocormos, brotações e plantas o meio de cultura que apresentou o melhor resultado nos três subcultivos foi o WPM.

Os quatro meios de cultura testados apresentaram elevadas porcentagens de plantas e número de folhas semelhantes nos três subcultivos realizados e não diferiram significativamente entre si.

Para a variável porcentagem de necrose o maior valor (33,33 %) ocorreu no meio de cultura MS e a menor porcentagem de necrose (2,50 %) foi obtida no meio de cultura WPM no terceiro subcultivo.

Para o desenvolvimento dos explantes o meio de cultura WPM foi o que apresentou maior altura das plantas, comprimento das três maiores folhas, número e comprimento de raízes, nos três subcultivos realizados sendo significativamente superior aos demais (TABELAS 7, 8 e 9). Com esses resultados observados podemos indicar o meio de cultura WPM para o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya intermedia* e isso pode ser melhor visualizado nas FIGURAS 3B, 3C e 3D.



**TABELA 7 – RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Cattleya intermedia* CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Tratamentos	Brotasções (%)	Plantas (%)	Nº de novas Brotasções	Nº de novas Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas (cm)	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes (cm)
MS	8,24 A	91,76 A	0,00 A	0,00 A	0,31 B	3,75 A	0,33 B	1,32 C	0,16 B
MS/2	14,65 A	85,35 A	0,06 A	0,03 A	0,33 B	3,72 A	0,34 B	1,65 BC	0,22 B
WPM	1,25 A	98,75 A	0,01 A	0,07 A	0,45 A	3,65 A	0,72 A	2,88 A	0,88 A
KC	10,00 A	90,00 A	0,01 A	0,00 A	0,36 B	3,99 A	0,37 B	2,02 B	0,31 B
C.V. (%)	113,86	10,62	249,08	290,95	9,29	10,41	11,51	13,13	23,55

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Comp. - Comprimento

**TABELA 8 – RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Cattleya intermedia* CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Tratamentos	Brotasções (%)	Plantas (%)	Nº de novas Brotasções	Nº de novas Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas (cm)	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes (cm) (1)
MS	4,58 A	95,42 A	0,00 A	0,02 A	0,43 B	4,83 A	0,48 B	1,83 C	0,17 C
MS/2	5,92 A	91,86 A	0,00 A	0,15 A	0,45 B	4,63 A	0,54 B	2,46 BC	0,51 B
WPM	5,00 A	95,00 A	0,22 A	0,20 A	0,86 A	5,14 A	1,43 A	4,96 A	2,02 A
KC	5,32 A	94,68 A	0,01 A	0,07 A	0,47 B	4,35 A	0,58 B	3,39 B	0,64 B
C.V. (%)	127,07	6,57	186,13	144,58	10,13	10,04	14,65	19,46	20,07

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Comp. - Comprimento

(1) Dados transformados por log (x+1) para análise.

**TABELA 9 – RESULTADOS DO DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Cattleya intermedia* CULTIVADOS EM QUATRO MEIOS DE CULTURA DIFERENTES, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Tratamentos	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de novos Protocormos	Nº de novas Brotações	Nº de novas Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas (cm)	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes (cm)
MS	0,00 A	100,0 A	0,09 A	0,89 A	0,27 A	0,45 C	7,30 A	0,48 C	2,56 B	0,27 C
MS/2	0,00 A	100,0 A	0,07 A	0,31 C	0,43 A	0,71 B	7,13 A	0,86 B	3,93 B	1,02 B
WPM	1,25 A	98,75 A	0,01 A	0,58 B	0,71 A	1,09 A	7,20 A	2,41 A	6,57 A	3,23 A
KC	2,38 A	97,62 A	0,03 A	0,14 C	0,11 A	0,71 B	6,99 A	0,81 B	4,33 B	1,15 B
C.V. (%)	273,56	2,58	202,34	20,16	71,69	14,66	8,08	9,86	21,04	21,13

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Comp. - Comprimento

## 4.2 EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO

### 4.2.1 *Laelia lobata*

O teste de Bartlett revelou que as variâncias dos tratamentos são homogêneas e pela análise de variância constatou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos (ANEXOS 10, 11 e 12). Nas Tabelas 10, 11 e 12 foram apresentados os resultados do Teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade para as variáveis analisadas nas três avaliações realizadas aos 90 (primeiro subcultivo), 180 (segundo subcultivo) e 270 dias (terceiro subcultivo).

Os resultados indicaram que a adição de BAP, independente da concentração foi eficiente no aumento da porcentagem e número de brotações no primeiro e segundo subcultivo quando comparado com a testemunha (TABELAS 10 e 11). No terceiro subcultivo, a maior concentração de BAP (40  $\mu$ M) proporcionou um aumento significativo na porcentagem de brotações e a ausência de BAP, uma redução significativa no número de brotações (TABELA 12). No entanto, apesar de 40  $\mu$ M ter propiciado o maior número de brotações, com essa concentração ocorreu uma redução significativa na porcentagem de plantas no terceiro subcultivo (TABELA 12).

Para a variável número de plantas a ausência de BAP apresentou resultados significativamente superiores nos três subcultivos (TABELAS 10, 11 e 12). A ausência de BAP no meio de cultura MS também proporcionou um aumento de altura das plantas e do número de folhas que foram significativamente superiores aos outros tratamentos no segundo e terceiro subcultivo.

Para a multiplicação de *Laelia lobata* se somarmos o número de protocormos, brotações e plantas o meio de cultura MS sem adição de BAP obteve uma média maior (1,03 no terceiro subcultivo) do que os outros tratamentos.

Para a variável porcentagem de necrose os maiores valores ocorreram no terceiro subcultivo em meio de cultura MS, acrescido de 40  $\mu\text{M}$  de BAP (20%). Os tratamentos que ocorreram a menor porcentagem de necrose foram no meio de cultura MS sem adição de BAP (0%) e acrescido com 20  $\mu\text{M}$  de BAP (2%), no terceiro subcultivo.

A análise conjunta dos resultados nos permite concluir que para *Laelia lobata* a adição de 5  $\mu\text{M}$  de BAP proporcionou um aumento na porcentagem e número de brotações e como de uma maneira geral, as concentrações de BAP não diferiram entre si, optou-se pela menor concentração por reduzir o custo na multiplicação. No entanto, se o objetivo for o desenvolvimento das plantas, aconselha-se não utilizar BAP. Além disso, se for considerada a soma dos números de protocormos, brotações e plantas, a ausência de BAP foi melhor do que com a utilização de BAP, verificar FIGURAS 1E, 1F e 1G.

**TABELA 10 – RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia lobata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Brotações	Nº de Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes
0	50,00 B	50,00 A	0,50 B	0,52 A	0,48 A	2,84 A	0,56 A
5	96,00 A	4,00 B	0,84 A	0,04 B	0,41 B	2,56 AB	0,04 B
10	92,00 A	6,00 B	0,92 A	0,06 B	0,43 AB	2,36 B	0,06 B
20	98,00 A	2,00 B	1,00 A	0,02 B	0,39 B	2,48 AB	0,02 B
40	100,00 A	0,00 B	1,00 A	0,00 B	0,39 B	2,78 AB	0,00 B
C.V. (%)	7,89	50,56	12,86	59,24	8,00	9,22	69,56

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

**TABELA 11 – RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia lobata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Brotações	Nº de Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes
0	12,44 B	85,10 A	0,14 B	0,86 A	0,56 A	4,89 A	1,83 A
5	84,79 A	15,21 B	0,78 A	0,12 B	0,41 B	2,83 B	0,20 B
10	91,00 A	8,82 B	0,86 A	0,08 B	0,44 B	2,86 B	0,09 B
20	96,00 A	4,00 B	0,96 A	0,04 B	0,38 B	2,82 B	0,06 B
40	98,00 A	1,82 B	0,94 A	0,02 B	0,40 B	2,72 B	0,02 B
C.V. (%)	14,04	49,07	21,82	43,28	6,53	7,93	41,89

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

**TABELA 12 – RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia lobata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Concentrações de BAP ( $\mu$ M)	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Protocormos	Nº de Brotações	Nº de Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes
0	6,67 C	93,33 A	0,00 A	0,10 B	0,93 A	0,63 A	5,13 A	2,37 A
5	83,50 B	16,50 B	0,04 A	0,74 A	0,16 B	0,39 B	3,49 B	0,17 BC
10	75,33 B	24,67 B	0,02 A	0,38 AB	0,14 B	0,45 B	3,33 B	0,27 B
20	80,25 B	19,75 B	0,02 A	0,70 A	0,18 B	0,39 B	3,11 B	0,22 B
40	97,14 A	2,86 C	0,06 A	0,76 A	0,02 C	0,44 B	3,17 B	0,03 C
C.V. (%)	9,60	24,26	213,67	44,19	21,71	9,44	9,17	14,98

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

#### 4.2.2 *Laelia purpurata*

O teste de Bartlett revelou que as variâncias dos tratamentos são homogêneas e pela análise de variância constatou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos (ANEXOS 13, 14 e 15). Nas Tabelas 13, 14 e 15 foram apresentados os resultados do Teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade para as variáveis analisadas nas três avaliações realizadas aos 90 (primeiro subcultivo), 180 (segundo subcultivo) e 270 dias (terceiro subcultivo).

Os resultados indicaram que em relação ao número de protocormos a ausência de BAP no terceiro subcultivo foi significativamente superior quando comparada com as outras concentrações de BAP (TABELA 15). No primeiro subcultivo, o pior resultado de formação de protocormos ocorreu com 20  $\mu$ M de BAP (TABELA 13). No segundo subcultivo, não houve diferença no número de protocormos, sendo que na testemunha não houve formação e a medida que aumentou a concentração de BAP ocorreu uma redução do número de protocormos (TABELA 14).

Em relação ao número de brotações, no primeiro e segundo subcultivo não houve diferença significativa entre os tratamentos (TABELA 13 e 14). No terceiro subcultivo a concentração de 40  $\mu\text{M}$  de BAP foi a que apresentou o menor número de brotações (TABELA 15). No segundo e terceiro subcultivo constatou-se que o aumento da concentração de BAP reduziu o número de brotações (TABELA 14 e 15).

Em relação à porcentagem de brotações, com a concentração de 5  $\mu\text{M}$  de BAP ocorreu os melhores resultados no segundo e terceiro subcultivo. Além disso, evidenciou-se uma redução na porcentagem com o aumento da concentração de BAP (TABELAS 14 e 15).

Para a variável porcentagem de necrose o maior valor (62 %) ocorreu no terceiro subcultivo em meio de cultura MS acrescido de 40  $\mu\text{M}$  de BAP seguido de 20  $\mu\text{M}$  de BAP (48 %). No meio de cultura MS acrescido de 10  $\mu\text{M}$  de BAP apresentou as menores porcentagens de necrose (26 %), no terceiro subcultivo. Devido a grande mortalidade por necrose o número de brotações e plantas viáveis apresentou uma média baixa.

Para a multiplicação de *Laelia purpurata* se somarmos o número de protocormos e o número de brotações após três subcultivos, o meio MS sem BAP proporcionou a maior média (4,4). Além disso, também ocorreu a maior porcentagem de plantas, número de plantas e número de folhas nos três subcultivos (TABELAS 13, 14 e 15). Outro fator importante é que na ausência de BAP houve um aumento significativo no número de raízes quando comparado com as concentrações de BAP nos três subcultivos (FIGURAS 2E, 2F e 2G). No entanto para a multiplicação de *Laelia purpurata* a concentração de BAP que promoveu uma maior porcentagem de brotações e número de brotações foi a de 5  $\mu\text{M}$  de BAP (TABELAS 13, 14 e 15).

**TABELA 13 – RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia purpurata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Concentrações de BAP ( $\mu$ M)	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Proto-cormos	Nº de Brotações	Nº de Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes
0	22,52 B	77,48 A	0,14 AB	1,00 A	0,68 A	0,46 A	4,29 A	1,43 A
5	61,95 A	38,05 B	0,10 AB	0,94 A	0,30 B	0,42 AB	4,27 A	0,44 B
10	54,28 AB	45,72 AB	0,18 A	1,30 A	0,46 AB	0,40 B	3,62 AB	0,66 B
20	70,89 A	29,11 B	0,04 B	1,40 A	0,26 B	0,43 AB	3,37 B	0,39 B
40	52,67 AB	45,33 AB	0,10 AB	1,08 A	0,44 AB	0,39 B	4,06 AB	0,50 B
C.V. (%)	33,02	37,44	55,40	43,62	42,57	8,62	9,87	29,93

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

**TABELA 14 – RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia purpurata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Concentrações de BAP ( $\mu$ M)	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Proto-cormos	Nº de Brotações	Nº de Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes
0	20,00 A	80,00 A	0,00 A	1,33 A	0,94 A	0,51 A	4,98 A	1,74 A
5	51,39 A	48,61 A	0,28 A	1,56 A	0,44 B	0,43 BC	4,63 A	0,59 B
10	43,43 A	56,57 A	0,24 A	1,26 A	0,46 B	0,43 BC	5,05 A	0,72 B
20	38,83 A	61,17 A	0,10 A	1,22 A	0,42 B	0,39 C	4,17 A	0,72 B
40	35,95 A	64,05 A	0,04 A	0,66 A	0,36 B	0,46 AB	4,59 A	0,73 B
C.V. (%)	53,23	32,51	121,10	60,66	42,16	5,85	11,73	33,12

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

**TABELA 15** – RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Laelia purpurata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).

Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Protocormos	Nº de Brotações	Nº de Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes
0	6,19 B	93,81 A	3,12 A	1,28 A	0,88 A	0,55 A	5,75 A	2,39 A
5	50,76 A	49,24 B	2,06 B	1,48 A	0,42 A	0,47 B	4,72 BC	0,55 B
10	48,43 A	51,57 B	1,06 C	0,58 AB	0,50 A	0,44 B	5,47 AB	0,88 B
20	26,33 AB	73,67 AB	0,88 C	0,54 AB	0,34 A	0,42 B	4,62 C	0,85 B
40	15,67 AB	84,33 AB	0,28 D	0,26 B	0,28 A	0,43 B	4,48 C	0,97 B
C.V. (%)	73,73	30,82	9,88	61,12	70,91	8,21	8,13	33,78

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

#### 4.2.3 *Cattleya intermedia*

O teste de Bartlett revelou que as variâncias dos tratamentos são homogêneas e pela análise de variância constatou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos (ANEXOS 16, 17 e 18). Nas Tabelas 16, 17 e 18 foram apresentados os resultados do Teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade para as variáveis analisadas nas três avaliações realizadas aos 90 (primeiro subcultivo), 180 (segundo subcultivo) e 270 dias (terceiro subcultivo).

Os resultados demonstraram que só ocorreu a formação de protocormos no terceiro subcultivo e apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos, a testemunha apresentou uma maior porcentagem de protocormos (TABELA 18).

A porcentagem de brotações na ausência de BAP foi baixa no primeiro subcultivo e nula nos demais. Os melhores resultados foram obtidos com 10 e 20  $\mu\text{M}$  de BAP e os piores com 40  $\mu\text{M}$  de BAP nos três subcultivos (TABELAS 16 a 18).



O número de brotações não apresentou diferença significativa entre os tratamentos no primeiro e segundo subcultivo, apesar de que com 10 e 20  $\mu\text{M}$  ocorreram os maiores resultados e com 0 e 40  $\mu\text{M}$  os menores (TABELAS 16 a 18).

Para a multiplicação de *Cattleya intermedia* se somarmos o número de protocormos, brotações e plantas o meio de cultura MS sem adição de BAP obteve uma média maior do que os outros tratamentos.

A porcentagem de necrose apresentou o pior resultado (28 %) no terceiro subcultivo no meio de cultura MS, acrescido de 10  $\mu\text{M}$  de BAP. A menor porcentagem foi obtida no meio de cultura contendo 5  $\mu\text{M}$  de BAP (2 %).

Em relação à porcentagem, altura, número de plantas, número de folhas e número de raízes os melhores resultados foram obtidos na ausência de BAP, nos três subcultivos (TABELAS 16 a 18). Para o desenvolvimento das plantas de *Cattleya intermedia* recomenda-se o meio de cultura MS, sem adição de BAP (FIGURAS 3E, 3F e 3G). Para a multiplicação se somarmos o número de protocormos e o número de brotações após três subcultivos, o meio MS sem BAP proporcionou a maior média (1,34). Mas para se obter um maior número e porcentagem de brotações recomenda-se utilizar 10  $\mu\text{M}$  de BAP, pois apresentou resultados semelhantes os da concentração de 20  $\mu\text{M}$  de BAP e é mais viável economicamente.

**TABELA 16** – RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Cattleya intermedia* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).

Concentrações de BAP ( $\mu$ M)	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Brotações	Nº de Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes
0	6,00 B	94,00 A	0,06 A	0,96 A	0,48 A	4,32 A	1,60 A
5	22,00 AB	78,00 AB	0,24 A	0,82 AB	0,43 AB	3,70 B	1,02 B
10	33,29 AB	66,71 AB	0,38 A	0,66 AB	0,38 B	3,77 AB	0,84 B
20	36,00 A	64,00 B	0,38 A	0,64 B	0,38 B	3,74 AB	0,76 B
40	12,00 AB	88,00 AB	0,12 A	0,88 AB	0,41 B	3,68 B	1,16 AB
C.V. (%)	71,90	20,11	80,84	20,84	7,57	8,13	27,02

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

**TABELA 17** – RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Cattleya intermedia* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).

Concentrações de BAP ( $\mu$ M)	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Brotações	Nº de Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes
0	0,00 B	100,00 A	0,24 A	1,10 A	0,57 A	4,98 A	2,94 A
5	18,00 AB	82,00 AB	0,28 A	0,82 AB	0,46 AB	3,76 B	1,22 B
10	34,89 AB	65,11 AB	0,40 A	0,58 B	0,44 B	3,95 B	0,86 C
20	38,67 A	61,33 B	0,42 A	0,60 B	0,42 B	3,73 B	0,76 C
40	13,22 AB	86,78 AB	0,14 A	0,82 AB	0,48 AB	4,23 B	1,19 B
C.V. (%)	95,67	25,36	73,24	21,04	13,28	9,20	10,74

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

**TABELA 18 – RESULTADOS DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCORMOS DE *Cattleya intermedia* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS COM CINCO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Proto-cormos	Nº de Brotações	Nº de Plantas	Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes
0	0,00 A	100,00 A	0,24 A	0,06 B	1,18 A	0,75 A	6,44 A	3,66 A
5	27,00 A	73,00 A	0,08 A	0,46 A	0,70 AB	0,50 B	5,17 B	1,16 B
10	28,71 A	71,29 A	0,10 A	0,34 AB	0,60 B	0,46 B	5,08 B	0,93 B
20	26,22 A	73,78 A	0,18 A	0,38 A	0,70 AB	0,46 B	5,17 B	0,92 B
40	7,00 A	93,00 A	0,12 A	0,22 AB	0,74 AB	0,52 B	5,09 B	1,27 B
C.V. (%)	99,57	21,54	71,51	53,71	53,71	12,45	11,82	15,03

Médias seguidas pela mesma letra na tabela, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO

As espécies de orquídeas apresentaram diferentes respostas em relação a formação de protocormos. A *Laelia lobata* não formou novos protocormos, enquanto que *Laelia purpurata* e a *Cattleya intermedia* só apresentaram formação de novos protocormos no terceiro subcultivo e apesar de não haver diferença significativa entre os meios de cultura testados, o meio de cultura MS apresentou os melhores resultados. ALAM et al. (2002) encontrou resultado diferente para *Dendrobium transparens*, onde o meio de cultura MS apresentou o pior resultado para a variável formação de protocormos.

Os resultados indicaram também que *Laelia lobata* apresentou a maior porcentagem de protocormos entre as espécies no primeiro e segundo subcultivo, isso ocorreu porque seus protocormos iniciais não se desenvolveram em brotações e plantas sendo das três espécies a mais lenta na sua morfogênese, além disso, não formou novos protocormos. Isso indicou que diferentes espécies de orquídeas respondem de forma diferente quando cultivadas nas mesmas condições *in vitro*. Em relação a porcentagem de brotações, a *Laelia lobata* apresentou maiores resultados no meio de cultura MS nos três subcultivos. Observou-se também uma redução na porcentagem de brotações com o aumento do número de subcultivos e conseqüentemente um aumento na porcentagem de plantas. A espécie *Laelia lobata* não multiplicou nos meios testados, porque não formou novos protocormos e novas brotações e plantas.

*Laelia purpurata* também apresentou uma maior porcentagem de brotações no meio de cultura MS, mas relativamente menor ao encontrado em *Laelia lobata*. A porcentagem de brotações diminuiu com os subcultivos, pois no terceiro todos os meios de cultura testados apresentavam 100 % de plantas. Além disso, para a multiplicação de novas brotações foi melhor o meio de cultura KC e o meio MS foi o pior nos três subcultivos.

Para *Cattleya intermedia* o meio de cultura MS/2 apresentou as maiores porcentagens de brotações, mas não houve diferença significativa entre os meios de cultura testados nos três subcultivos. Entre as três espécies foi a que apresentou as

menores porcentagens de brotações. Isso significa que *Cattleya intermedia* apresentou um processo de morfogênese rápido desde o primeiro subcultivo em todos os meios testados, por isso se tornaram plantas rapidamente. Para a multiplicação de novas brotações o meio MS e o WPM foram os melhores e o KC o pior. Resultados semelhantes foram obtidos para a espécie *Dendrobium tosaense*, onde o melhor resultado para o desenvolvimento das brotações foi obtido no meio de cultura MS e o pior foi no KC (LO et al., 2004). SILVA (2003) também obteve mais brotações no meio de cultura MS do que no meio de cultura KC para *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.

A *Laelia lobata* apresentou a maior porcentagem de protocormos e brotações no meio de cultura MS, seguida de *Laelia purpurata*, no entanto, a *Cattleya intermedia* obteve os maiores resultados para a variável porcentagem de brotações no meio MS/2. Isso significa que para essas espécies esses meios dificultam o seu desenvolvimento e transformação em plantas.

Outra recomendação importante a ser feita é que o meio de cultura MS deveria ser utilizado somente no primeiro subcultivo, pois o aumento de subcultivos provocou uma maior porcentagem de necrose nas espécies. Esse resultado contrastou com o estudo realizado por MARTINI et al. (2001) para uma orquídea epifítica *Gongora quinquenervis* que teve seus embriões necrosados no meio de cultura KC e no meio de cultura MS a maioria dos embriões germinaram.

O meio de cultura MS propiciou uma redução significativa na porcentagem de plantas de *Laelia lobata* nos três subcultivos e *Laelia purpurata* nos dois primeiros subcultivos. ALAM et al. (2002) também concluiu que o meio de cultura MS foi o pior para o desenvolvimento das plantas de *Dendrobium transparens* entre os meios de cultura testados.

A porcentagem de formação de plantas aumentou através dos subcultivos. Para *Laelia purpurata* no terceiro subcultivo ocorreu 100% de plantas em todos os meios de cultura. Para a variável porcentagem de plantas de *Laelia lobata* e *Laelia purpurata* os melhores resultados foram obtidos no meio de cultura WPM, seguido de KC, MS/2 e MS. Para *Cattleya intermedia* não houve diferença entre os meios de cultura testados, mas as maiores porcentagens ocorreram no meio de cultura WPM, além disso, foram obtidas elevadas porcentagens de plantas desde o primeiro subcultivo. A multiplicação de novas plantas ocorreu somente para *Laelia purpurata* e *Cattleya intermedia* sendo os melhores meios de cultura o KC e WPM

respectivamente. Para SILVA (2003) o meio de cultura KC também estimulou o crescimento de *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow* e o alongamento do sistema radicular formando um maior número de plantas o que não ocorreu com o meio MS formando assim um maior número de brotações.

Para algumas espécies a alta proporção de nitrogênio no meio de cultura MS, que é muito maior do que na maioria dos outros meios de cultura torna-se inadequada. Meios de cultura que apresentam uma menor proporção de nitrogênio como o KC e o WPM, são mais indicados para otimizar o crescimento e a morfogênese dessas espécies (PASQUAL et al., 1997).

Com relação a multiplicação e formação de novos protocormos, brotações e plantas o meio de cultura KC para *Laelia purpurata* foi o meio que apresentou a maior soma quando comparado aos outros meios. Já para *Cattleya intermedia* foi o meio de cultura WPM. *Laelia lobata* não multiplicou em nenhum dos meios de cultura testados.

O melhor desenvolvimento da altura da planta, número e comprimento das três maiores folhas ocorreram no meio de cultura WPM nas três espécies.

Os meios de cultura MS, MS/2 e KC para as três espécies não apresentaram diferença significativa para a altura da planta. DRONK (2004) também obteve resultados bem próximos que não diferiram significativamente para a altura da planta na espécie *Cattleya amethystoglossa* no meio de cultura MS (0,51 cm) e o meio de cultura KC (0,49 cm) após 180 dias.

Com relação ao desenvolvimento da parte aérea entre os meios MS, MS/2 e KC houve diferenças entre as espécies. *Laelia lobata* apresentou um maior desenvolvimento no meio de cultura KC, *Laelia purpurata* no meio MS/2 e *Cattleya intermedia* não apresentou diferenças significativas entre esses meios. SILVA (2003) também não obteve grande diferença entre o meio de cultura MS e KC para o número de folhas por explante, no meio de cultura KC obteve 4,5 folhas por explante de *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*, já no meio de cultura MS foram obtidas 4,2 folhas por explante.

Em relação ao enraizamento da *Laelia lobata* e *Cattleya intermedia* o meio de cultura que propiciou melhor resposta foi o WPM seguido de KC, MS/2 e MS e para *Laelia purpurata* o WPM, MS/2, KC e MS. A única diferença entre as espécies é que para *Laelia purpurata* o meio MS/2 superou o KC para o enraizamento.

As espécies *Laelia lobata*, *Laelia purpurata* e *Cattleya intermedia* apresentaram um melhor resultado para o comprimento das raízes no meio de cultura KC do que no meio de cultura MS. Resultados contrastantes foram encontrados por SILVA (2003) e DRONK (2004).

SILVA (2003) afirmou que o meio de cultura KC é inibitório e as vitaminas do meio de cultura MS são benéficas para promover o crescimento do sistema radicular de *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*. Resultado semelhante foi obtido por DRONK (2004) para *Cattleya amethystoglossa*, o meio de cultura KC apresentou o pior resultado para o comprimento de raízes (0,7 cm) e o meio de cultura MS apresentou o melhor resultado (1,8 cm), após 180 dias de cultivo *in vitro*.

## 5.2 EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO

A adição de BAP no meio de cultura MS não foi eficiente para a multiplicação de *Laelia lobata*, *Laelia purpurata* e *Cattleya intermedia*.

De acordo com PIERIK e STEEGMANS (1972), para que os protocormóides formados se desenvolvam em plântulas é necessária a transferência para o meio de cultura sem BAP, pois altas concentrações deste regulador vegetal para algumas espécies provocam anormalidades nos explantes e inibem o desenvolvimento radicular. Segundo VENTURA (2002), o processo de organogênese foi mais eficiente quando os explantes primários e secundários foram transferidos para um meio de cultura sem reguladores vegetais.

SILVA (2003) também não obteve nenhum efeito significativo para a multiplicação de *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow* quando na presença de BAP.

Para a multiplicação de *Laelia lobata*, *Laelia purpurata* e *Cattleya intermedia* se somarmos o número de protocormos, brotações e plantas, o meio MS sem BAP proporcionou o melhor resultado nos três subcultivos. Além disso, também ocorreu a maior altura, porcentagem de plantas, número de plantas, número de raízes e folhas. Mas se observarmos isoladamente a variável número de brotações há um melhor resultado na presença de BAP e dentre as concentrações, a melhor para *Laelia lobata* e *Laelia purpurata* foi 5  $\mu$ M de BAP e para *Cattleya intermedia* foi 10  $\mu$ M de BAP. Resultados semelhantes ao deste trabalho foram obtidos por VENTURA

(2002), para *Brassolaeliocattleya* Sun King Orange x *Laelia purpurata*, onde a melhor concentração para a multiplicação foi de 5,33  $\mu\text{M}$  de BAP.

Para a indução da multiplicação de brotações de *Geodorum densiflorum* no meio de cultura MS as melhores concentrações também foram entre 8,87 - 11,09  $\mu\text{M}$  de BAP (BHADRA e HOSSAIN, 2003). Já para *Cattleya x mesquithae* a concentração de BAP de 8,87  $\mu\text{M}$  de BAP no meio de cultura MS/2 mostrou-se prejudicial, promovendo uma redução de 50% na produção de novas brotações.

Em contrapartida na presença de BAP ocorreram os menores resultados para o número de plantas, isso ocorreu porque o BAP inibiu a formação de raízes e o desenvolvimento da parte aérea, comprometendo o desenvolvimento das plantas fazendo com que os explantes permaneçam na forma de brotações (RAMOS e CARNEIRO, 2007; SUZUKI, 1999; ROY e BANERJEE, 2002).

RAMOS e CARNEIRO (2007) obtiveram resultados semelhantes com segmentos caulinares de 1,0 cm de comprimento de *Cattleya x mesquithae* a variável altura da planta apresentou os melhores resultados no meio de cultura sem adição de BAP (1,98 cm), enquanto que para as outras concentrações a altura da planta diminuiu devido ao aumento da concentração de BAP, com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (1,76 cm) e com 8,87  $\mu\text{M}$  de BAP (1,55 cm). SUZUKI (1999) afirmou que a BAP inibiu de forma significativa o crescimento caulinar das plantas de *Catasetum fimbriatum*, tanto na ausência como na presença de luz.

A multiplicação de *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* e *Dendrobium moschatum* foi realizada com gemas em meio de cultura MS contendo BAP (4,4 - 44  $\mu\text{M}$ ). Altas concentrações de BAP (44  $\mu\text{M}$ ) foram testadas para o enraizamento das brotações, mas a porcentagem de enraizamento foi baixa (58 - 67%) (NAYAK et al., 1997). Também para protocormos de *Geodorum densiflorum* que foram inoculados no meio de cultura MS com BAP, esse regulador vegetal promoveu efeitos inibitórios na formação de raízes (ROY e BANERJEE, 2002).

Mas para *Zygopetalum intermedium* o meio de cultura MS combinado com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP apresentou o maior número de folhas e número de raízes (NAGARAJU e MANI, 2005).

Para *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* e *Dendrobium moschatum* também foram encontrados resultados contrastantes, pois a combinação de ANA (5,4  $\mu\text{M}$ ) com BAP (22 - 44  $\mu\text{M}$ ) promoveu o alongamento das brotações, a



expansão das folhas e induziu a formação de (2 - 3) raízes por brotação no meio de cultura MS para as três espécies de orquídeas (NAYAK et al., 1997).

A combinação de ANA com BAP para diversas espécies apresentou resultados ótimos para a multiplicação e desenvolvimento, diferentemente dos resultados encontrados quando o BAP é utilizado sozinho.

Brotações de *Cattleya aurantiaca* com folhas reduzidas a um 1/3, e utilizando BAP com concentração de 44,38  $\mu\text{M}$  e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA promoveu um maior número de gemas adventícias (MAURO et al., 1994).

Protocormos de *Geodorum densiflorum* foram inoculados no meio de cultura MS com combinações de ANA (0; 2,69; 5,37; 10,74; 21,48 e 42,96  $\mu\text{M}$ ) e BAP (0; 2,22; 4,44; 8,87; 17,74 e 35,48  $\mu\text{M}$ ). Quando combinado ANA com BAP em baixas concentrações (abaixo de 8,87  $\mu\text{M}$ ) promoveu o desenvolvimento de brotações. O aumento do número de brotações ocorreu com o aumento da concentração de BAP (ROY e BANERJEE, 2002).

*Geodorum densiflorum* quando foi cultivada no meio de cultura MS com a adição de 10,74  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -ácido naftalenoacético (ANA) e 8,87  $\mu\text{M}$  de BAP obteve o maior alongamento das plantas (BHADRA e HOSSAIN, 2003).

ÁVILA e SALGADO (2006) multiplicaram protocormos de *Cattleya aurantiaca* no meio de cultura MS com ANA, BAP e GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) combinados em diferentes concentrações. A melhor combinação dos reguladores vegetais nesta sequência para a multiplicação de protocormos de *Cattleya aurantiaca* foi 5,37/ 2,22/ 0  $\mu\text{M}$ ; para *Laelia albida* 0,54/ 2,22/ 0,29  $\mu\text{M}$ ; *Laelia autumnalis* 0,54/ 0,44/ 0,29  $\mu\text{M}$  e *Laelia speciosa* 0,54/ 2,22/ 0  $\mu\text{M}$ . A melhor concentração de BAP foi a de 2,22  $\mu\text{M}$  exceto para *Laelia autumnalis* que foi 0,44  $\mu\text{M}$  de BAP.

Para *Laelia lobata*, *Laelia purpurata* e *Cattleya intermedia* poderiam ser realizados estudos sobre o efeito da combinação de ANA e BAP, pois o estudo realizado por ÁVILA e SALGADO (2006) para *Cattleya aurantiaca*, *Laelia albida*, *Laelia autumnalis* e *Laelia speciosa* mostraram efeitos positivos dessa combinação para os dois gêneros *Cattleya* e *Laelia*.

## 6 CONCLUSÃO

Para *Laelia purpurata*, *Laelia lobata* e *Cattleya intermedia* o meio de cultura que apresentou os melhores resultados para o desenvolvimento da parte aérea e enraizamento foi o WPM.

O meio de cultura MS não foi adequado para a formação de plantas de *Laelia purpurata*, *Laelia lobata* e *Cattleya intermedia* e apresentou uma grande porcentagem de mortalidade.

Com relação a multiplicação e formação de novos protocormos, brotações e plantas o meio de cultura KC para *Laelia purpurata* foi o meio que apresentou a maior soma quando comparado aos outros meios. Para *Cattleya intermedia* foi o meio de cultura WPM, já *Laelia lobata* não ocorreu multiplicação em nenhum dos meios de cultura testados.

Para a multiplicação de brotações de *Laelia lobata*, *Laelia purpurata* e *Cattleya intermedia* não é recomendável à utilização de BAP.

Para as três espécies o meio de cultura MS sem adição de BAP além de apresentar um melhor desenvolvimento da parte aérea e enraizamento da planta, obteve uma maior soma do número de protocormos, brotações e plantas, quando comparada com a dos meios que continham BAP. Isso significa que a adição de BAP nas concentrações testadas diminuiu o desenvolvimento das plantas e também não apresentou uma grande multiplicação do número de protocormos, brotações e plantas que justificasse o seu uso.

Uma vantagem da micropropagação de orquídeas é que não há uma necessidade de haver etapas separadas de multiplicação e enraizamento das espécies, pois em qualquer um dos meios de cultura utilizados e no meio MS sem adição de BAP ocorreu a formação de protocormos, brotações e plantas em grandes quantidades e ao mesmo tempo. Esse fato é uma vantagem econômica e de tempo para o produtor que não vai precisar realizar a transferência dos protocormos e brotações para um meio de cultura que propicie o enraizamento.

Para se conseguir plantas bem desenvolvidas e uma grande quantidade de brotações, recomenda-se multiplicá-las no meio de cultura que proporcionou uma maior multiplicação do número de protocormos, brotações e plantas, já que a adição de BAP não proporcionou um bom resultado nas três espécies. Para *Laelia*

*purpurata* o melhor meio de cultura foi o KC, para *Cattleya intermedia* o meio WPM e a *Laelia lobata* no experimento de multiplicação apresentou bons resultados no meio MS sem adição de BAP. Depois de multiplicadas as brotações de *Laelia purpurata*, *Laelia lobata* e *Cattleya intermedia* poderiam ser subcultivadas para o meio de cultura WPM para se obter um melhor desenvolvimento da parte aérea e enraizamento, assim se tornando plantas bem desenvolvidas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como considerações finais recomenda-se realizar novos estudos sobre o efeito do meio de cultura WPM no desenvolvimento de outros gêneros de orquídeas, já que para *Laelia lobata*, *Laelia purpurata* e *Cattleya intermedia* foram obtidos resultados ótimos de desenvolvimento da parte aérea e enraizamento neste meio.

Também sugere-se novos estudos sobre o efeito do meio de cultura WPM, na multiplicação com combinações de auxinas e citocininas, que são muito utilizadas para a multiplicação de diversas espécies de orquídeas, mas geralmente em meio de cultura MS.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids**. New York; John Wiley & Sons, 1990.
- ARDITTI, J., ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. Wiley, New York, 1993.
- AGRAWAL, D.C., PAWAR, S.S., MORWAL, G.C., MASCARENHAS, A.F. *In vitro* micropropagation of *Delphinium malabaricum* (Huth) Munz. - a rare species. **Ann. Bot.** 68, 243-245, 1991.
- ALAM, M. K.; RASHID, M. H.; HOSSAIN, M. S.; SALAM, M. A.; ROUF, M. A. *In vitro* seed propagation of *Dendrobium (Dendrobium transparens)* orchid as influenced by different media. **Biotechnology**. Vol. 1, Nº 2-4: 111-115, 2002.
- ÁVILA, I. D.; SALGADO, R. G. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. **Biológicas**. No. 8, pp. 138-149, 2006
- BAJAJ, Y.P.S. **High-tech and micropropagation IV (Biotechnology in agriculture and forestry, nº 20)**, New York: Springer-Verlag, 1992. 497 p.
- BARABÉ, D.; SAINT-ARNAUD, M.; LAUZER, D. Sur la nature des protocormes d'Orchidées (Orchidaceae). **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, t. 316, Série III, p. 139-144, 1993.
- BEGUM, A. A.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through *in vitro* culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science**. Vol. 63(3), p. 663-673, 1994.
- BHADRA, S. H.; HOSSAIN, M. M. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. **Plant Tissue Cult.** Vol. 13, n. 2, p.165-171, 2003.
- BLACK, P.M. **Orquídeas**. Rio de Janeiro: Livro Técnico S/A, 1984.128 p.
- BUYUN, L.; LAVRENTYEVA, A.; KOVALSKA, L.; IVANNIKOV, R. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. N.N. Grishko National Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine, **Acta Universitatis Latviensis, Biology**. Vol. 676, pp. 159-167, 2004.
- CASTRO, P.R.C.; SENA, J.O.A.; KLUGE, R.A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. 255 p.

- CARAMASCHI, G.M.C.L.; CALDAS, L.S. Comparação da germinação *in vitro* de sementes provenientes de frutos imaturos de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae) com idades diferentes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília. Vol.11, p.175, 1999. Suplemento.
- CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. 255 p.
- CHANG, C.; CHANG, W. C. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 251-255, 1998.
- CONSTANTINO, P.A.L.; FRAGA, C.N.de. Conservation Strategy for *Laelia lobata* (Lindl.) H.J. Veitch: The Most Endangered Orchid of Rio de Janeiro. **Selbyana, The Journal of the Marie Selby Botanical Gardens**: Vol. 26, No. 1, pp. 85-88, 2005.
- DRESSLER, L.R. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 314 p.
- DRONK, A. G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.** f. Curitiba, 2004. 33 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- ENDSFELDZ W.F. Editorial. **O mundo das orquídeas**, n.12, p.3, 2000.
- GEORGE, E.F. 1993. **Plant propagation by tissue culture** Part 1: The Technology. 2ed. England. Exegetics Ltda. 574 p.
- GOVIL, S.; GUPTA, S.C. Commercialization of plant tissue culture in India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 51:65-73, 1997.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Clif. Agric. Exp. Sta. Califórnia. USA. Circular nº 347**, 1950.
- HUAN, L. V. T.; TAKAMURA, T.; TANAKA, M. Callus formation and formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. **Plant Science**. Vol. 166, p. 1443-1449, 2004.
- HUAN, L. V. T.; TANAKA, M. Callus induction from protocorm-like body segments and plant regeneration in *Cymbidium* (Orchidaceae). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. Vol. 79, n. 3, p. 406-410, 2004.
- HÜBNER, M. Por que cultivamos a *Cattleya intermedia*?. **O mundo das orquídeas**, n.26, p. 6-11, 2003.
- KNUDSON, L. A new nutrient saolution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**. Vol. 14, p. 214-217, 1946.

KRAPIEC, P.V., MILANEZE, M.A., MACHADO, M.F.P.S.M. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. Maringá. Vol.25, nº1, p.179-182, 2003.

KYTE, L.; KLEYN, J. **Plants from test tubes, an introduction to micropropagation**. 3<sup>a</sup> ed. Portland: Timber Press, 1996. 240 p.

LEROUX, G.; DENIS, B.; VIETH, J. Morphogenesis of *Cyripedium acaule* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**. Vol. 73. p. 53-72, 1997.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible, micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings - **International Plant Propagators Society**. Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.

LO SF, MANOHAR NALAWADE S, KUO CL, CHEN CL, TSAY HS. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino - a medicinally important orchid. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**. Vol. 40, No. 5 pp. 528-535, 2004.

MARTIN, C., PEREZ, C. Multiplication *in vitro* of *Limonium estevei* Fdez. casas. **Ann. Bot.** 70, 165-167, 1992.

MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T.S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v. 36, n. 10, p. 1319-1324, out. 2001.

MAURO, M.; SABAPATHI, D.; SMITH, R. Influence of benzylaminopurine and alpha-naphthaleneacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantianca* shoot explants. **Lindleyana**. Vol.9, n.3, p.169-173, 1994.

MAYER, J.L.S. **Anatomia e morfogênese *in vitro* de *Cymbidium 'Joy Polis'* (Orchidaceae)**. Curitiba, 2006. 109f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

MILANEZE, M.A. **Estudos em orquídeas nativas do Brasil: morfologia de sementes e cultivo assimbiótico**. 1997. 234 f.il. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

MIYOSHI, K. e M. MII. Phytohormone pretreatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae** 63: 263-267, 1995.

MOREL, G. M. 1960. **American Orchid Society Bulletin**. 29: 495-497

MUKHERJEE, S.K., 1983, **Orchids**. Indian Council of Agricultural Research, New Delli, 102p.

MUKHOPADHYAY, K., ROY, S.C. *In vitro* induction of 'runner' - a quick method of micropropagation in orchid. **Sci. Hort.** 56, 331-337, 1994.

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

NAGARAJU, V.; MANI, S. K. Rapid *in vitro* propagation of orchid *Zygopetalum intermedium*. **J. Plant Biochemistry & Biotechnology**. Vol. 14, pp. 27-32, 2005.

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

NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Linl. (Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**. Vol. 94, p. 107-116, 2002.

PAEK, K. Y.; YEUNG, E. C. The effects of 1-naphthaleneacetic acid and N<sup>6</sup>-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Vol.24, p. 65-71, 1991.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A. e CARVALHO, G.R. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Introdução - Fundamentos básicos. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 1997. 159 p.

PAULA, C.C.de.; SILVA, H.M.P.da. **Cultivo prático de orquídeas**.3.ed. Viçosa: UFV, 2006, 106p.

PAUW, M.A. de, REMPHREY, W.R., PALMER, C.E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and growth of *Cypripedium candidum*. **Annals of Botany**, London, v.75, p.267-275, 1995.

PIERIK, R.L. M.; STEEGMANS, H.H.M. The effect of 6-benzylamino purine on growth and development of *Cattleya* seedlings grown from unripe seeds. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, 68:228-234, 1972.

PIERIK, R. L. M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: **Martinus Nyjhoff Publishers**, 1987. 344 p.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação "*in vitro*" de *Cattleya x mesquittae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesq Agropec Trop**. 37(1): 10-15, mar., 2007.

RAMSAY, M.M., STEWART, J. Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. **Bot. J. Linn. Soc.** 126, 173-181, 1998.

RAO, A.N. **Tissue culture of the orchid industry**. In: Reinert, J., Bajaj, Y.P.S. (Eds.), *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Springer, Berlin, pp.44-65, 1977.



READ, P.E.; SZENDRACK, E. Micropropagation and biotechnology of tropical and subtropical ornamentals. **Acta Horticultural**. Vol. 461, n. 2, p. 93-103, 1998.

REGO-OLIVEIRA, L. V.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum, Agronomy**. Vol. 27, Nº 1, p. 1- 5, 2005.

REINERT, R. A. e MOHR, H. C. **Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristem**. Pro. Am. Soc. Sci. 91: 664-671, 1967.

ROY, J.; BANERJEE, N. Rhizome and shoot development during *in vitro* propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. **Scientia Horticulturae**. Vol. 94, pp. 181-192, 2002.

SAGAWA, Y.; KUNISAKI J. T. **Clonal Propagation: Orchids**. Cell Culture and Somatic Cell. 3: 61-67, 1984.

SANDER, A.E. A Rainha do Brasil meridional. **O mundo das orquídeas**, n.12, p.5-9, 2000.

SEENI, S., LATHA, P.G. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 29, 167-172, 1992.

SHIMASAKI, K.; UEMOTO, S. Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Vol. 25, p. 49-52, 1991.

SILVA, E.F. **Da Multiplicação e Crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow***. Lavras, 2003.62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Lavras.

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

STANCATO, C. G.; FARIA, T. R. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchids *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae) I: Effects of macro and microelements. **Lindleyana**. 11: 41-43, 1996.

SUZUKI, R.M. **Efeito hormonal endógeno e exógeno sobre o desenvolvimento de plantas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) incubadas na presença e ausência de luz**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 83 p., 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

VAASA, A.; ROSENBERG, V. Preservation of the rare terrestrial orchids *in vitro*. **Acta Universitatis Latviensis, Biology**. Vol. 676, pp. 243-246, 2004.

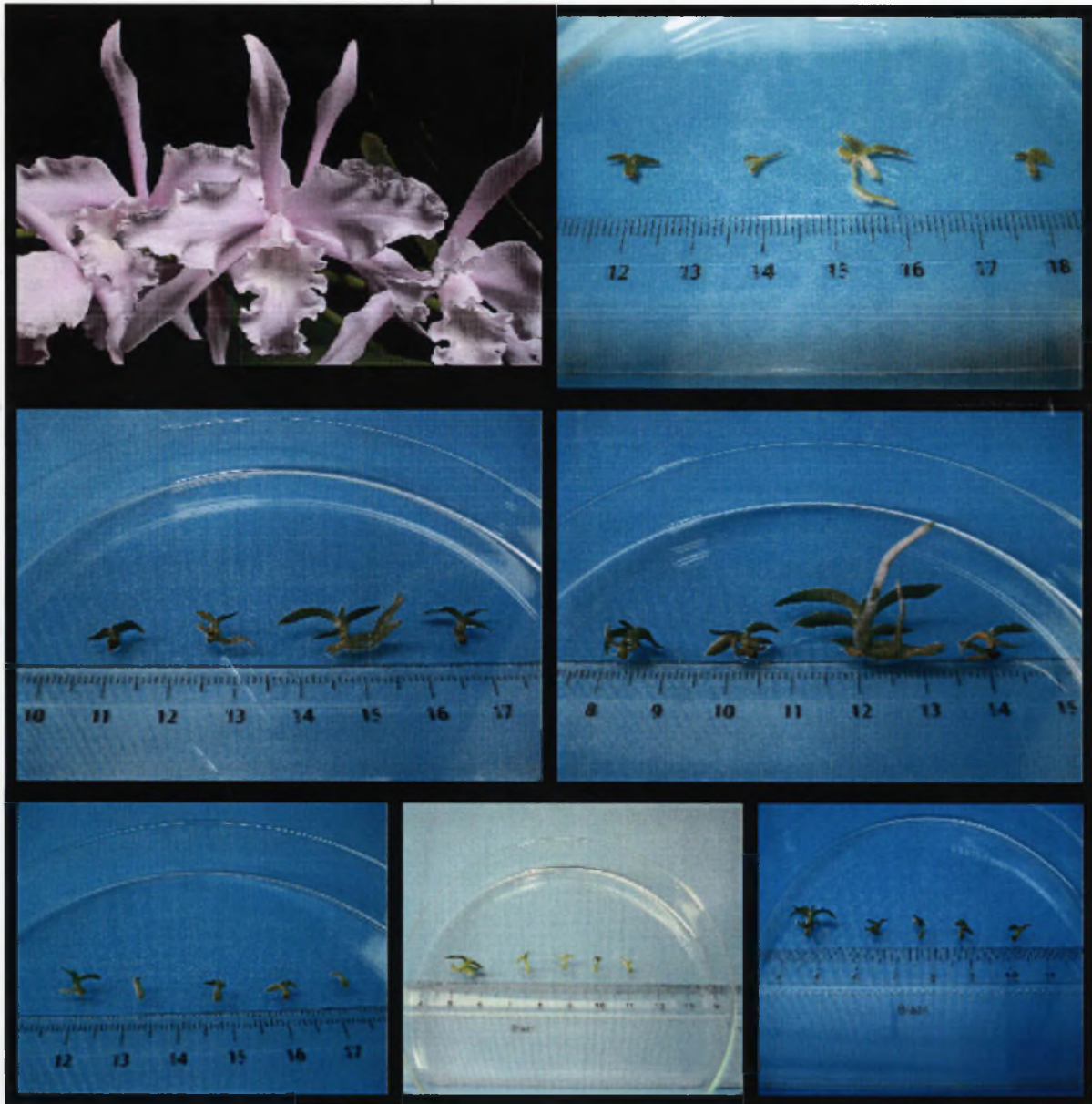
VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. **Bot. Gaz.** Vol.110, p.604-613, 1949.

VENTURA, G.M. **Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo Cattleya**. Viçosa, 2002. 147f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa.

ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. Action of growth regulators. In BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Tissue culture in forestry**. 2. ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p. 231-255.

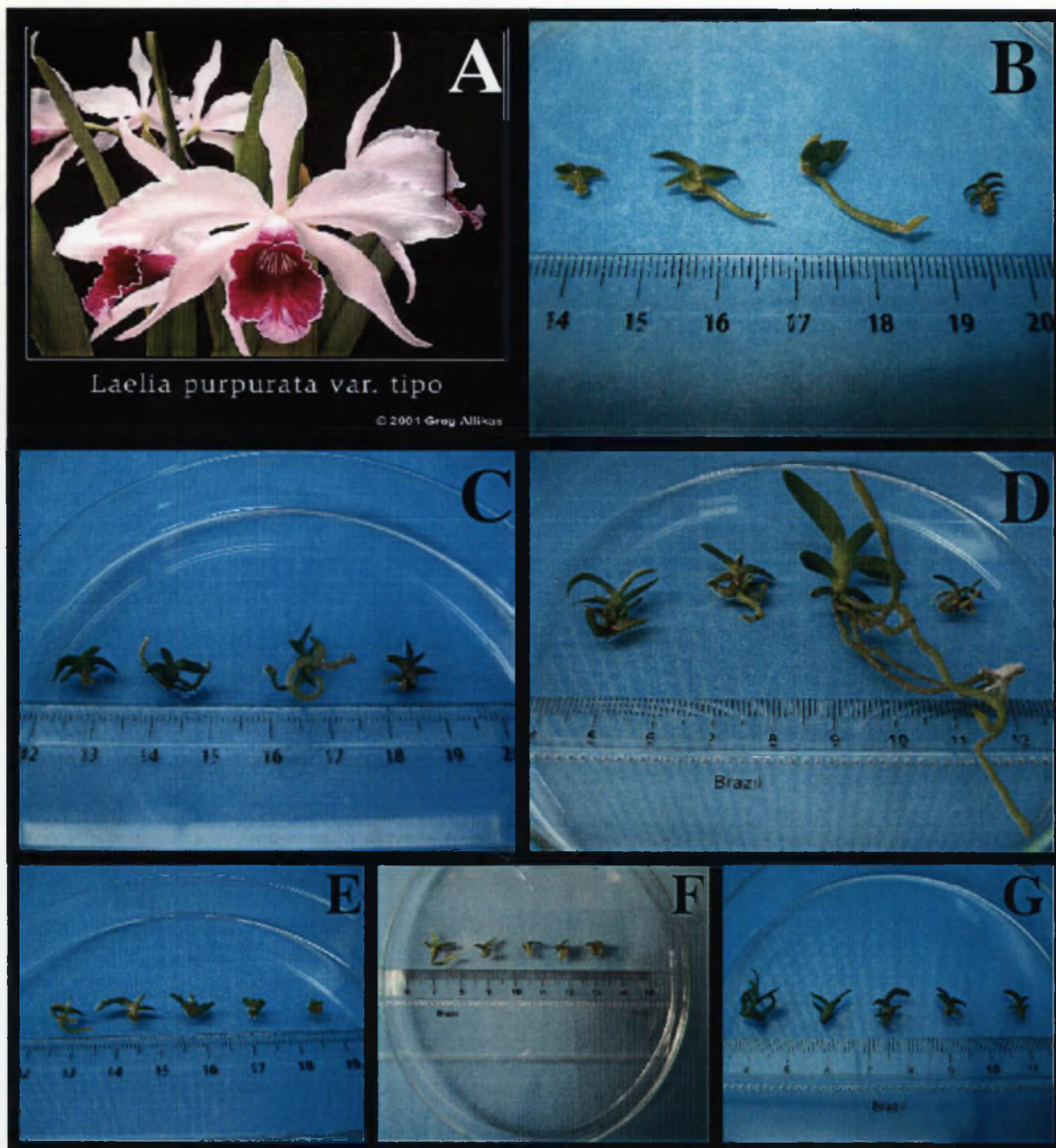
WATANABE, D. **Orquídeas: manual de cultivo: 506 fotos de espécies**, São Paulo: AOSP - Associação Orquidófila de São Paulo, 2002. 296 p.

9 FIGURAS



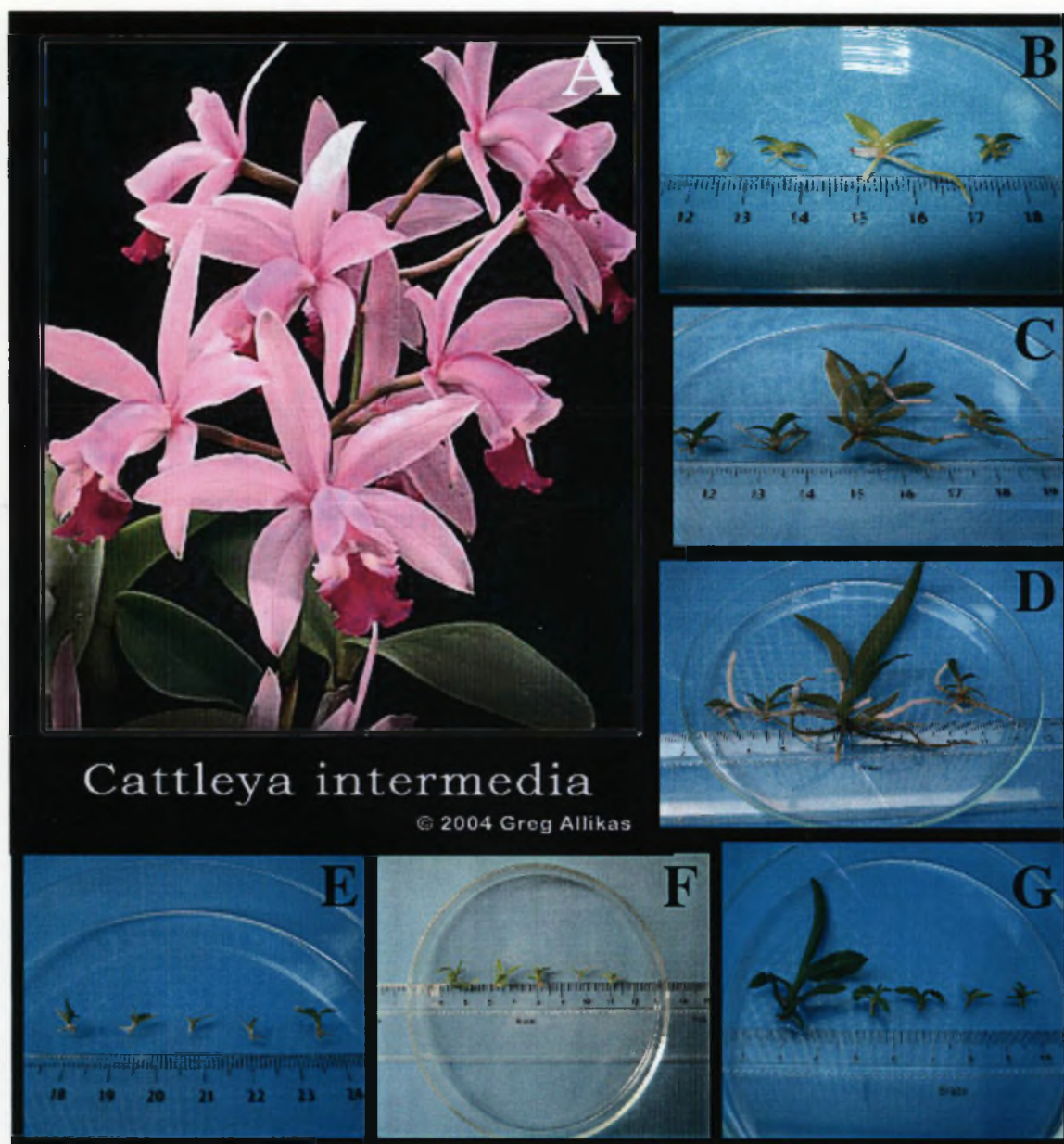
**FIGURA 1** – A. Orquídea *Laelia lobata*; B-D Experimento de desenvolvimento de protocormos em meio de cultura MS, MS/2, WPM e KC (esquerda para a direita); B- 1º subcultivo (90 dias); C- 2º subcultivo (180 dias); D- 3º terceiro subcultivo (270 dias). E-G Experimento de multiplicação de protocormos na seguinte seqüência: 0, 5, 10, 20 e 40  $\mu$ M de BAP; E- 1º subcultivo (90 dias); F- 2º subcultivo (180 dias); G- 3º terceiro subcultivo (270 dias).





**FIGURA 2** – A. Orquídea *Laelia purpurata*; B-D Experimento de desenvolvimento de protocormos em meio de cultura MS, MS/2, WPM e KC (esquerda para a direita); B- 1º subcultivo (90 dias); C- 2º subcultivo (180 dias); D- 3º terceiro subcultivo (270 dias). E-G Experimento de multiplicação de protocormos na seguinte seqüência: 0, 5, 10, 20 e 40  $\mu$ M de BAP; E- 1º subcultivo (90 dias); F- 2º subcultivo (180 dias); G- 3º terceiro subcultivo (270 dias).





**FIGURA 3** – A. Orquídea *Cattleia intermedia*; B-D Experimento de desenvolvimento de protocormos em meio de cultura MS, MS/2, WPM e KC (esquerda para a direita); B-1º subcultivo (90 dias); C- 2º subcultivo (180 dias); D- 3º terceiro subcultivo (270 dias). E-G Experimento de multiplicação de protocormos na seguinte seqüência: 0, 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  de BAP; E- 1º subcultivo (90 dias); F- 2º subcultivo (180 dias); G- 3º terceiro subcultivo (270 dias).

## 10 ANEXOS

### ANEXO 1 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia lobata* NO EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios							
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas	Nº de Raízes (1)	Comp. das 3 Maiores Raízes	Proto-cormos (%)	Brotas-ções (%)	Plantas (%)
Tratamentos	3	0,00*	0,19*	0,01*	0,33*	0,07*	387,32*	1628,08*	3562,48*
Erro Exp.	11	0,001	0,02	0,001	0,01	0,001	54,63	96,19	146,47
Total	14	0,01	0,80	0,04	1,10	0,21	1762,93	5942,32	12298,64
Coef.Var. (%)		10,15	7,26	13,62	12,93	23,96	76,18	26,53	22,69
Bartlett ( $\chi^2$ )		7,40 <sup>ns</sup>	0,37 <sup>ns</sup>	6,15 <sup>ns</sup>	7,44 <sup>ns</sup>	6,29 <sup>ns</sup>	0,63 <sup>ns</sup>	2,03 <sup>ns</sup>	4,59 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

(1) Dados transformados por raiz quadrada para análise.

### ANEXO 2 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia lobata* NO EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios							
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes	Proto-cormos (%)	Brotas-ções (%)	Plantas (%)
Tratamentos	3	0,001*	0,08*	0,02*	2,516*	0,35*	11,63*	2667,40*	2802,39*
Erro Exp.	10	0,001	0,04	0,001	0,08	0,004	23,51	66,88	87,08
Total	13	0,01	0,66	0,07	8,35	1,08	270,03	8670,97	9277,99
Coef.Var. (%)		6,50	6,65	9,93	17,75	16,70	165,38	34,85	12,68
Bartlett ( $\chi^2$ )		1,78 <sup>ns</sup>	2,14 <sup>ns</sup>	1,54 <sup>ns</sup>	6,42 <sup>ns</sup>	2,02 <sup>ns</sup>	5,54 <sup>ns</sup>	5,04 <sup>ns</sup>	5,11 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 3 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia lobata* NO EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios						
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes	Brotasções (%)	Plantas (%)
Tratamentos	3	0,01*	0,18*	0,08*	6,50*	1,48*	1906,83*	1885,61*
Erro Exp.	10	0,002	0,21	0,002	0,08	0,01	12,661	11,75
Total	13	0,06	2,67	0,26	20,26	4,50	5847,11	5774,29
Coef.Var. (%)		9,85	11,08	8,39	10,78	12,27	25,19	3,99
Bartlett ( $\chi^2$ )		1,35 <sup>ns</sup>	6,05 <sup>ns</sup>	2,19 <sup>ns</sup>	5,14 <sup>ns</sup>	4,43 <sup>ns</sup>	5,67 <sup>ns</sup>	5,44 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 4 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia purpurata* NO EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios								
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes	Brotasções (%)	Plantas (%)	Nº de Novas Brotasções	Nº de Novas Plantas
Tratamentos	3	0,001*	0,33*	0,01*	0,49*	0,53*	634,589*	634,589*	0,06*	0,08*
Erro Exp.	10	0,001	0,15	0,003	0,11	31,921	31,92	31,92	0,05	0,04
Total	13	0,01	2,51	0,07	2,56	2222,97	2222,97	2222,97	0,70	0,62
Coef.Var. (%)		6,16	8,57	15,45	20,05	46,68	46,68	6,43	131,14	128,09
Bartlett ( $\chi^2$ )		6,63 <sup>ns</sup>	4,58 <sup>ns</sup>	0,99 <sup>ns</sup>	1,42 <sup>ns</sup>	2,16 <sup>ns</sup>	2,16 <sup>ns</sup>	2,16 <sup>ns</sup>	2,07 <sup>ns</sup>	4,24 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 5 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia purpurata* NO EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios								
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Novas Brotações	Nº de Novas Plantas
Tratamentos	3	0,01*	0,26*	0,07*	1,16*	4,08*	411,943*	411,943*	0,33*	0,48*
Erro Exp.	10	0,002	0,05	0,004	0,15	0,06	8,563	8,56	0,22	0,05
Total	13	0,05	1,28	0,23	4,96	12,86	1321,46	1321,46	3,23	1,94
Coef.Var. (%)		9,25	4,42	13,00	16,04	21,67	54,22	3,09	108,71	32,50
Bartlett ( $\chi^2$ )		2,84 <sup>ns</sup>	7,67 <sup>ns</sup>	4,98 <sup>ns</sup>	2,97 <sup>ns</sup>	5,77 <sup>ns</sup>	3,77 <sup>ns</sup>	3,77 <sup>ns</sup>	6,17 <sup>ns</sup>	4,85 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 6 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia purpurata* NO EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios							
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes	Nº de Novos Proto-cormos	Nº de Novas Brotações (1)	Nº de Novas Plantas (1)
Tratamentos	3	0,13*	0,64*	0,30*	3,00*	14,96*	0,11*	0,59*	0,86*
Erro Exp.	9	0,01	0,22	0,01	0,84	0,14	0,04	0,17	0,17
Total	12	0,43	3,87	0,95	16,53	46,13	0,73	3,25	4,09
Coef.Var. (%)		11,63	7,80	12,77	27,43	17,72	107,56	49,25	54,62
Bartlett ( $\chi^2$ )		1,06 <sup>ns</sup>	4,57 <sup>ns</sup>	4,29 <sup>ns</sup>	3,57 <sup>ns</sup>	2,26 <sup>ns</sup>	2,39 <sup>ns</sup>	1,94 <sup>ns</sup>	1,58 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

(1) Dados transformados por raiz quadrada para análise.



**ANEXO 7 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Cattleya intermedia* NO EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios								
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes	Brotasções (%)	Plantas (%)	Nº de Novas Brotasções	Nº de Novas Plantas
Tratamentos	3	0,02*	0,09*	0,14*	1,82*	0,44*	123,56*	123,56*	0,003*	0,004*
Erro Exp.	12	0,001	0,16	0,003	0,07	0,01	94,42	94,42	0,003	0,01
Total	15	0,06	2,11	0,45	6,26	1,43	1503,71	1503,71	0,05	0,07
Coef.Var. (%)		9,29	10,41	11,51	13,13	23,55	113,86	10,62	249,08	290,95
Bartlett ( $\chi^2$ )		3,15 <sup>ns</sup>	4,31 <sup>ns</sup>	0,96 <sup>ns</sup>	2,83 <sup>ns</sup>	5,23 <sup>ns</sup>	5,68 <sup>ns</sup>	5,68	6,82 <sup>ns</sup>	0,946 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 8 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Cattleya intermedia* NO EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios								
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes (1)	Brotasções (%)	Plantas (%)	Nº de Novas Brotasções	Nº de Novas Plantas
Tratamentos	3	0,17*	0,45*	0,80*	7,21*	0,12*	1,09*	8,437*	0,04*	0,03*
Erro Exp.	11	0,003	0,23	0,01	0,39	0,002	42,94	38,45	0,01	0,02
Total	14	0,54	3,84	2,55	25,92	0,38	475,56	448,29	0,28	0,34
Coef.Var. (%)		10,13	10,04	14,65	19,46	20,07	127,07	6,57	186,13	144,58
Bartlett ( $\chi^2$ )		2,86 <sup>ns</sup>	1,76 <sup>ns</sup>	6,07 <sup>ns</sup>	3,69 <sup>ns</sup>	5,33 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>	0,94 <sup>ns</sup>	1,26 <sup>ns</sup>	7,79 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

(1) Dados transformados por log (x+1) para análise.

**ANEXO 9 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Cattleya intermedia* NO EXPERIMENTO DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios									
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Comp. das 3 Maiores Folhas	Nº de Raízes	Comp. das 3 Maiores Raízes	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Novos Protocormos	Nº de Novas Brotações	Nº de Novas Plantas
Tratamentos	3	0,25*	0,05*	2,75*	9,84*	5,86*	3,97*	3,97*	0,004*	0,33*	0,23*
Erro Exp.	11	0,01	0,34	0,02	0,91	0,11	6,53	6,53	0,01	0,01	0,08
Total	14	0,85	3,17	8,38	37,67	18,54	70,64	70,64	0,10	1,07	1,46
Coef.Var. (%)		14,66	8,08	9,86	21,04	21,13	273,56	2,58	202,34	20,16	71,69
Bartlett ( $\chi^2$ )		5,76 <sup>ns</sup>	2,36 <sup>ns</sup>	5,13 <sup>ns</sup>	2,08 <sup>ns</sup>	7,24 <sup>ns</sup>	4,55 <sup>ns</sup>	4,55 <sup>ns</sup>	6,31 <sup>ns</sup>	2,40 <sup>ns</sup>	2,22 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 10 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia lobata* NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios						
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Brotações	Nº de Plantas
Tratamentos	4	0,01*	0,20*	0,28*	2206,00*	2234,00*	0,22*	0,24*
Erro Exp.	20	0,001	0,06	0,01	47,30	39,30	0,01	0,01
Total	24	0,05	1,97	1,31	9770,00	9722,00	1,10	1,09
Coef.Var. (%)		8,00	9,22	69,56	7,89	50,56	12,86	59,24
Bartlett ( $\chi^2$ )		3,30 <sup>ns</sup>	3,53 <sup>ns</sup>	7,97 <sup>ns</sup>	7,76 <sup>ns</sup>	7,48 <sup>ns</sup>	2,85 <sup>ns</sup>	2,99 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 11 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia lobata* NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios						
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Brotações	Nº de Plantas
Tratamentos	4	0,03*	4,36*	3,03*	6530,71*	6160,11*	0,58*	0,639*
Erro Exp.	20	0,001	0,07	0,03	115,23	127,25	0,03	0,01
Total	24	0,12	18,76	12,81	28427,45	27185,37	2,84	2,75
Coef.Var. (%)		6,53	7,93	41,89	14,04	49,07	21,82	43,28
Bartlett ( $\chi^2$ )		3,83 <sup>ns</sup>	3,46 <sup>ns</sup>	6,47 <sup>ns</sup>	7,79 <sup>ns</sup>	8,85 <sup>ns</sup>	9,36 <sup>ns</sup>	6,34 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 12 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia lobata* NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios							
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Protocormos	Nº de Brotações	Nº de Plantas
Tratamentos	4	0,04*	2,98*	4,09*	5355,27*	5355,27*	0,002*	0,38*	0,57*
Erro Exp.	20	0,002	0,11	0,01	47,29	47,29	0,004	0,06	0,003
Total	24	0,21	14,08	16,49	22366,94	22366,94	0,09	2,73	2,33
Coef.Var. (%)		9,44	9,17	14,98	9,60	24,26	213,67	44,19	21,71
Bartlett ( $\chi^2$ )		3,82 <sup>ns</sup>	1,17 <sup>ns</sup>	5,96 <sup>ns</sup>	1,68 <sup>ns</sup>	1,68 <sup>ns</sup>	2,55 <sup>ns</sup>	4,36 <sup>ns</sup>	4,13 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 13 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia purpurata* NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios							
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Proto-cormos	Nº de Brotações	Nº de Plantas
Tratamentos	4	0,004*	0,84*	0,93*	1661,45*	1666,48*	0,01*	0,20*	0,14*
Erro Exp.	20	0,001	0,15	0,04	300,14	311,47	0,004	0,25	0,03
Total	24	0,04	6,34	4,57	12648,59	12895,37	0,13	5,76	1,21
Coef.Var. (%)		8,62	9,87	29,93	33,02	37,44	55,40	43,62	42,57
Bartlett ( $\chi^2$ )		0,96 <sup>ns</sup>	0,82 <sup>ns</sup>	1,65 <sup>ns</sup>	5,47 <sup>ns</sup>	5,17 <sup>ns</sup>	5,01 <sup>ns</sup>	4,03 <sup>ns</sup>	7,72 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 14 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia purpurata* NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios							
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Proto-cormos	Nº de Brotações	Nº de Plantas
Tratamentos	4	0,01*	0,62*	1,12*	672,01*	672,01*	0,06*	0,55*	0,28*
Erro Exp.	20	0,001	0,30	0,09	407,40	407,40	0,02	0,54	0,05
Total	24	0,05	8,50	6,27	10836,11	10836,11	0,70	12,91	2,09
Coef.Var. (%)		5,85	11,73	33,12	53,23	32,51	121,10	60,66	42,16
Bartlett ( $\chi^2$ )		4,24 <sup>ns</sup>	3,62 <sup>ns</sup>	5,04 <sup>ns</sup>	3,69 <sup>ns</sup>	3,69 <sup>ns</sup>	7,53 <sup>ns</sup>	8,79 <sup>ns</sup>	5,96 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 15 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Laelia purpurata* NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios							
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Proto-cormos	Nº de Brotações	Nº de Plantas
Tratamentos	4	0,01*	1,58*	2,60*	1943,67*	1943,67*	6,25*	1,37*	0,28
Erro Exp.	20	0,001	0,17	0,15	472,33	472,33	0,02	0,26	0,12
Total	24	0,08	9,65	13,31	17221,22	17221,22	25,44	10,61	3,47
Coef.Var. (%)		8,21	8,13	33,78	73,73	30,82	9,88	61,12	70,91
Bartlett ( $\chi^2$ )		2,16 <sup>ns</sup>	3,92 <sup>ns</sup>	6,26 <sup>ns</sup>	8,63 <sup>ns</sup>	8,63 <sup>ns</sup>	4,79 <sup>ns</sup>	8,37 <sup>ns</sup>	7,41 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 16 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Cattleya intermedia* NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO APÓS O PRIMEIRO SUBCULTIVO (90 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios						
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Brotações (%)	Plantas (%)	Nº de Brotações	Nº de Plantas
Tratamentos	4	0,01*	0,36*	0,55*	849,15*	849,14*	0,11*	0,10*
Erro Exp.	20	0,001	0,10	0,08	246,99	246,99	0,04	0,03
Total	24	0,05	3,40	3,90	8336,47	8336,47	1,16	0,93
Coef.Var. (%)		7,57	8,13	27,02	71,90	20,11	80,84	20,84
Bartlett ( $\chi^2$ )		2,83 <sup>ns</sup>	5,41 <sup>ns</sup>	0,80 <sup>ns</sup>	6,29 <sup>ns</sup>	6,29 <sup>ns</sup>	8,80 <sup>ns</sup>	7,57 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 17 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Cattleya intermedia* NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (180 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios						
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Brotas-ções (%)	Plantas (%)	Nº de Brotas-ções	Nº de Plantas
Tratamentos	4	0,02*	1,33*	3,94*	1269,31*	1269,31*	0,07*	0,22*
Erro Exp.	20	0,004	0,14	0,02	401,92	401,92	0,05	0,03
Total	24	0,15	8,19	16,20	13115,63	13115,63	1,21	1,43
Coef.Var. (%)		13,28	9,20	10,74	95,67	25,36	73,24	21,04
Bartlett ( $\chi^2$ )		7,30 <sup>ns</sup>	3,17 <sup>ns</sup>	6,65 <sup>ns</sup>	4,02 <sup>ns</sup>	4,02 <sup>ns</sup>	6,04 <sup>ns</sup>	2,85 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 18 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE BARTLETT DE TODAS AS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA *Cattleya intermedia* NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO APÓS O TERCEIRO SUBCULTIVO (270 DIAS).**

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios							
		Altura da planta (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Brotas-ções (%)	Plantas (%)	Nº de Proto-cormos	Nº de Brotas-ções	Nº de Plantas
Tratamentos	4	0,08*	1,74*	6,82*	885,21*	885,21*	0,02*	0,12*	0,26*
Erro Exp.	20	0,01	0,41	0,06	313,65	313,65	0,01	0,03	0,03
Total	24	0,39	15,08	28,42	9813,80	9813,80	0,30	0,98	0,98
Coef.Var. (%)		12,45	11,82	15,03	99,57	21,54	71,51	53,71	53,71
Bartlett ( $\chi^2$ )		4,65 <sup>ns</sup>	3,95 <sup>ns</sup>	3,96 <sup>ns</sup>	3,07 <sup>ns</sup>	3,07 <sup>ns</sup>	7,70 <sup>ns</sup>	2,00 <sup>ns</sup>	2,00 <sup>ns</sup>

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL – Graus de Liberdade

**ANEXO 19 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), KC (KNUDSON, 1946), E WPM (LLOYD & McCOWN, 1980).**

Nutriente	Quantidade
MEIO MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962)	mg.L
Nitrato de Amônia – $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
Nitrato de Potásio – $\text{KNO}_3$	1900
Cloreto de Cálcio – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Sulfato de Magnésio – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Fosfato de Potássio Monobásico – $\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
Ácido Bórico – $\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
Sulfato de Manganês - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3
Sulfato de Zinco – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
Iodeto de Potássio - KI	0,83
Molibdato de Sódio – $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25
Sulfato de Cobre – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Cloreto de Cobalto – $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina HCL	0,5
Tiamina	0,1
Glicina	2,0
E.D.T.A. Bissódico – Na EDTA	37,3
Sulfato de Ferro – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Mioinositol	100
Sacarose	30000
Agar (Micromed <sup>®</sup> )	6000

Nutriente	Quantidade
<b>MEIO KC (KNUDSON, 1946)</b>	
	mg.L
Sulfato de Amônia – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500
Sulfato de Magnésio – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7400
Nitrato de Cálcio – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000
Fosfato de Potássio Monobásico – $\text{KH}_2\text{PO}_4$	250
Sulfato de Ferro – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25
Sulfato de Manganês - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	7,5
Agar (Micromed <sup>®</sup> )	6000
Sacarose	30000
<b>WPM (LLOYD &amp; McCOWN, 1980)</b>	
	mg.L
Nitrato de Amônia – $\text{NH}_4\text{NO}_3$	20000
Nitrato de Cálcio – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	27800
Sulfato de Potássio – $\text{K}_2\text{SO}_4$	49500
Cloreto de Cálcio – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	19200
Fosfato de Potássio Monobásico – $\text{KH}_2\text{PO}_4$	34000
Ácido Bórico – $\text{H}_3\text{BO}_3$	1240
Molibdato de Sódio – $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50
Sulfato de Magnésio – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	74000
Sulfato de Manganês - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4460
Sulfato de Zinco – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1720
Sulfato de Cobre – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	50
Sulfato de Ferro – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5570
E.D.T.A. Bissódico – Na EDTA	7450
Tiamina	1
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina HCL	0,5
Glicina	2
Mio-inositol	100
Sacarose	20000
Agar (Micromed <sup>®</sup> )	6000