MANUAL TÉCNICO PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS

Lílian de Cássia Silva Breda
Jardim Botânico de Brasília, Diretoria de Manejo de Recursos Naturais.
lilianbreda@gmail.com

Elizabeth Couto Ferraz
Jardim Botânico de Brasília, Diretoria de Manejo de Recursos Naturais.
liseferraz@gmail.com

RESUMO: O Manual Técnico para Produção *in vitro* e Aclimatização de mudas de orquídeas descreve passo a passo a importância de cada procedimento dentro de um Laboratório até a fase de aclimatização de algumas espécies de orquídeas em estufa. Esse Manual Técnico foi desenvolvido com o intuito de mostrar o trabalho que é realizado pela equipe do Laboratório Multidisciplinar do Jardim Botânico de Brasília (JBB). Apresentamos esclarecimentos para que se obtenha o sucesso esperado no cultivo de algumas espécies de orquídea cultivadas como o modo e locais de cultivo e adubação e periodicidade de regas, pois plantas bem cultivadas e floridas sempre despertam o interesse e o desejo das pessoas. A orquídea, não é de difícil cultivo, as várias espécies existentes se adaptam aos mais diversos climas. É ilustrado com fotografias coloridas e ilustrações botânicas, trazendo informações práticas para o leitor.

Palavras-chave: orquídeas, reprodução *in vitro* e aclimatização.

TECHNICAL MANUAL FOR PRODUCTION IN VITROAND IN ORCHIDS ACCLIMATIZATION

ABSTRACT: The Technical Manual for Production *in vitro* and Acclimation of seedlings of orchids describes step by step the importance of each procedure within a laboratory until the acclimatization phase of some species of orchids in the greenhouse. This Technical Manual was developed in order to show the work that is done by the staff of the Laboratory of Multidisciplinary Brasília Botanical Garden (JBB). Here clarifications to obtain the expected success in the cultivation of some species of orchid grown as the mode and sites of cultivation and fertilization and frequency of watering as plants grown and flowered well always arouse the interest and desire of the people. The orchid is not difficult to cultivate, where several existing species adapt to various climates. It is illustrated with color photographs and botanical illustrations, bringing practical information for the reader.

Key words: orchids, *in vitro* reproduction and acclimatization.

INTRODUÇÃO

As orquídeas (Família Orchidaceae) representam o maior grupo de plantas entre as Angiospermas, com cerca de 850 gêneros e mais de 20.000 espécies (Pabst; Dungs, 1977).

Segundo Pabst e Dungs (1975), o Brasil é um dos países mais ricos em orquídeas, compreendendo 236 gêneros e 2.430 espécies (Barros *et al.*, 2011). A família é uma das maiores entre as monocotiledôneas e apresenta, com relativa freqüência, cruzamentos interespecíficos e, até mesmo, intergenéricos. Para as orquídeas brasileiras, Pabst e Dungs (1977) definem quatro províncias ecológicas baseadas nas características climáticas predominantes de cada região. De forma geral, as condições climáticas acabam por definir o padrão de comportamento assumido pelas espécies. Dessa maneira, as formas terrestres são mais comuns nos climas frios e temperados enquanto que as formas epífitas se encontram, com maior freqüência, em climas tropicais, mais amenos.

No Brasil, a província ecológica com maior diversidade de orquídeas abrange a região da Mata Atlântica, seguido da região da Floresta Amazônica, da região dos Cerrados, e por último, da região Sul, representada pelos pampas sulinos (Pabst; Dungs, 1977).

Na região da Mata Atlântica estão concentradas cerca de 60% das espécies de orquídeas do Brasil, pois o clima temperado, associado à altitude de cadeia montanhosa, favorece essa diversidade (Pabst; Dungs, 1975).

A região da Floresta Amazônica possui clima tropical quente e com altos índices de precipitação, fornecendo abundante umidade atmosférica, permitindo o desenvolvimento de uma vegetação densa ou matas sombrias carregadas de ar úmido e bolorento.

A região dos Cerrados possui altitudes variando

de 500-1000m e apresenta acentuadas variações de temperatura. O Cerrado é caracterizado por apresentar chuvas abundantes, mas concentradas em alguns meses do ano, e um período seco bem definido. Dessa forma, durante os períodos de seca as orquídeas utilizam-se da umidade noturna como auxílio na hidratação. Nessa região, a maioria das orquídeas é terrestre e mostra adaptações aos longos períodos de seca como, por exemplo, a perda de folhas em período não propício (redução da perda de água) (Pabst; Dungs, 1977).

As orquídeas epífitas ocorrentes no Cerrado preferem as estreitas matas ciliares e de galeria. As matas ciliares funcionam como vias de migração de orquídeas da região Amazônica e Atlântica possibilitando a troca de material genético aumentando, assim, a variabilidade e a diversidade de espécies no bioma (Pabst; Dungs, 1975).

Desde o trabalho pioneiro de Warming (1892), no final do século XIX, até os levantamentos mais recentes, Orchidaceae tem sido apontada como uma das cinco famílias mais representativas da flora do Cerrado. Apesar da importância florística dessa família no bioma, poucos autores têm tratado do tema, de maneira que o conhecimento sobre Orchidaceae nesta região do país é ainda incipiente (Batista; Bianchetti, 2003).

Dos 493 táxons da família Orchidaceae citados para o bioma Cerrado (Mendonça *et al.,* 1998), cerca de 51,3% estão presentes no Distrito Federal (DF). Embora represente uma área de apenas 0,3% em relação à área total do bioma, o DF apresenta notável riqueza de espécies da família (Batista; Bianchetti, 2003).

Orchidaceae é a terceira maior família, em número de espécies no DF, mas apesar dessa importância florística, as orquídeas não compõem um elemento dominante local e a grande maioria das espécies é localmente rara ou ocasional. No levantamento de Orchidaceae do Distrito Federal (Batista; Bianchetti, 2003) são reconhecidos 72 gêneros, compreendendo 246 espécies, cinco variedades e três formas, totalizando 254 táxons. Quanto ao comportamento adotado, 73,2% são terrestres, 24,4% são epífitas, três apresentam hábito tanto terrestre quanto epifítico, uma espécie é exclusivamente rupícola e duas trepadeiras. Quanto à ocorrência nos diferentes tipos fitofisionômicos 58% do total de espécies ocorrem nas formações savânicas e campestres, 41% em formações florestais e 1% em área de transição entre a mata e o campo (Batista; Bianchetti, 2003).

O DF perdeu cerca de 57,6% da sua cobertura vegetal desde a inauguração de Brasília como resultado da ocupação desordenada e da expansão agrícola (UNESCO, 2000). As coletas indiscriminadas, associadas à destruição do habitat podem estar levando algumas espécies de orquídeas ao risco de extinção (Berg, 1996). Com uma área correspondente a 578.916 hectares, onde o Distrito Federal encontra-se dentro do bioma Cerrado, sendo 45,74% são legalmente protegidos na forma de diversas categorias de Unidades de Conservação (UNESCO, 2002).

Nos últimos dez anos, a rápida urbanização a que está submetido todo o Distrito Federal, tem ameaçado algumas de suas fitofisionomias e flora associada, colocando-as em iminente risco. Existe uma preocupação natural e, mesmo legal, com parte das formações florestais remanescentes, uma vez que as matas de galeria e ciliares, além das veredas, estão diretamente associadas à quantidade de água disponível. Entretanto, é evidente uma preocupação menor em conservar os Campos e o Cerrado (essa última, a fitofisionomia mais afetada no DF, segundo a UNESCO em 2002), e mesmo as matas secas, que também são responsáveis pelo fornecimento e qualidade de água, ainda que indiretamente, mas que são igualmente relevantes. Cada um desses tipos de vegetação contempla uma florística própria, que caracteriza fitofisionomia.

De acordo com Abud *et al.* 2008, o Jardim Botânico de Brasília surgiu no Plano de Lúcio Costa, em 1956, mas em 1976, depois de instituída uma Comissão para escolha do melhor local para implantação do Jardim Botânico, foi indicada a área da Estação Florestal Cabeça de Veado, por possuir uma vasta área de vegetação de Cerrado preservada e recursos hídrocos disponíveis.

O Jardim Botânico de Brasília, inaugurado em 8 de março de 1985, encontra-se localizado no Setor de Mansões Dom Bosco (SMDB) Área Especial – Lago Sul - Brasília/DF, constitui parte do Núcleo da Reserva da Biosfera do Cerrado Distrito Federal e apresenta importante acervo biológico representativo do Bioma Cerrado com espécies nativas.

Porém, a difusão do conhecimento e a sensibilização da comunidade são essenciais para geração de novas iniciativas. Por esta razão, esse trabalho pretende disseminar o conhecimento a respeito tanto da teoria quanto das práticas realizadas no Laboratório Multidisciplinar do Jardim Botânico de Brasília (JBB).

A proposta desse trabalho é reunir informações sobre os métodos utilizados para produção de orquídeas *in vitro*, bem como trazer informações sobre as características morfológicas e ambientais e as adaptações técnicas sobre o cultivo, que permitam a aclimatização de orquídeas, entre as espécies, algumas de ocorrência no bioma Cerrado e no Distrito Federal.

Devido à importância econômica e, principalmente, ecológica da família Orchidaceae para o bioma Cerrado, em especial para o DF, é necessário que mais estudos sejam realizados com o intuito de subsidiar futuros projetos de conservação e de reintrodução de espécies em áreas remanescentes.

1. Família Orchidaceae

O nome orquídea vem do grego *orchis*, palavra criada por Teofrasto, filósofo, na Grécia, por volta de 370 a.C. e significa "testículo", devido à similaridade, deste, com a parte subterrânea de algumas orquídeas que ocorrem no Mediterrâneo (Agarez *et al.*, 1994).

A família Orchidaceae é caracterizada por possuir plantas herbáceas, com hábito epifítico, terrestre ou rupícola. Os caules primários ou rizomas são geralmente reptantes e os caules secundários podem ser intumescidos em pseudobulbos ou não. As folhas são alternas (às vezes ausentes) com limbo inteiro. As flores podem se apresentar de forma isolada ou em inflorescências racemosas ou paniculadas, são zigomorfas e, geralmente, hermafroditas. O perianto é tipicamente tepalóide (sépalas e pétalas similares) e se apresenta sob dois verticilos ou séries: o mais externo, formada por três sépalas e o mais interno, formada por três pétalas, sendo duas iguais e uma diferente no tamanho, forma e coloração (chamada de labelo). A presença de labelo constitui uma característica importante para a família. Possuem coluna ou ginostêmio, formada a partir da fusão do androceu e gineceu e projetada na região central da flor. Os grãos de pólen se apresentam unidos de várias maneiras formando conjuntos de 2-8 políneas e muitos apresentam estruturas ou extensões como caudículos, estipes e viscídios. O ovário é ínfero e os frutos são cápsulas que se abrem por fendas longitudinais. As sementes são minúsculas e numerosas. (Agarez *et al.*, 1994).

Por possuir flores diversas e muitas vezes exuberantes, as orquídeas apresentam um elevado valor econômico para a floricultura sendo bastante utilizadas em ornamentação ou mesmo cultivadas por colecionadores. Algumas espécies fornecem essência como a baunilha (*Vanilla* spp.) e alcalóides utilizados na farmacologia (Arditti, 1979; Mello *et al.*, 2000; Raven *et al.*, 2001).

Orchidaceae apresenta as mais variadas dimensões desde plantas extremamente pequenas, com flores do tamanho de 1 mm até plantas com mais de três metros de altura, capazes de produzir hastes florais de comprimento superior a quatro metros. Apesar de formas tão diferentes elas podem ser reunidas em uma única família por possuírem uma estrutura floral muito conservada (Agarez *et al.*, 1994).

As orquídeas apresentam dois tipos básicos de crescimento: o simpodial e o monopodial. As simpodiais apresentam crescimento limitado ou determinado, ou seja, o crescimento de um ramo ou caule (intumescido em pseudobulbo ou não) cessa pela formação de uma inflorescência. A partir daí, um novo broto desenvolve-se de gemas laterais dando continuidade ao rizoma e a um novo ramo ou caule, que terá o seu crescimento novamente limitado por uma inflorescência e, assim sucessivamente. As monopodias apresentam crescimento ilimitado, ou seja, o crescimento do caule não cessa na formação de uma inflorescência e, por esse motivo, o crescimento é considerado contínuo ou indeterminado (**Figura 1**).

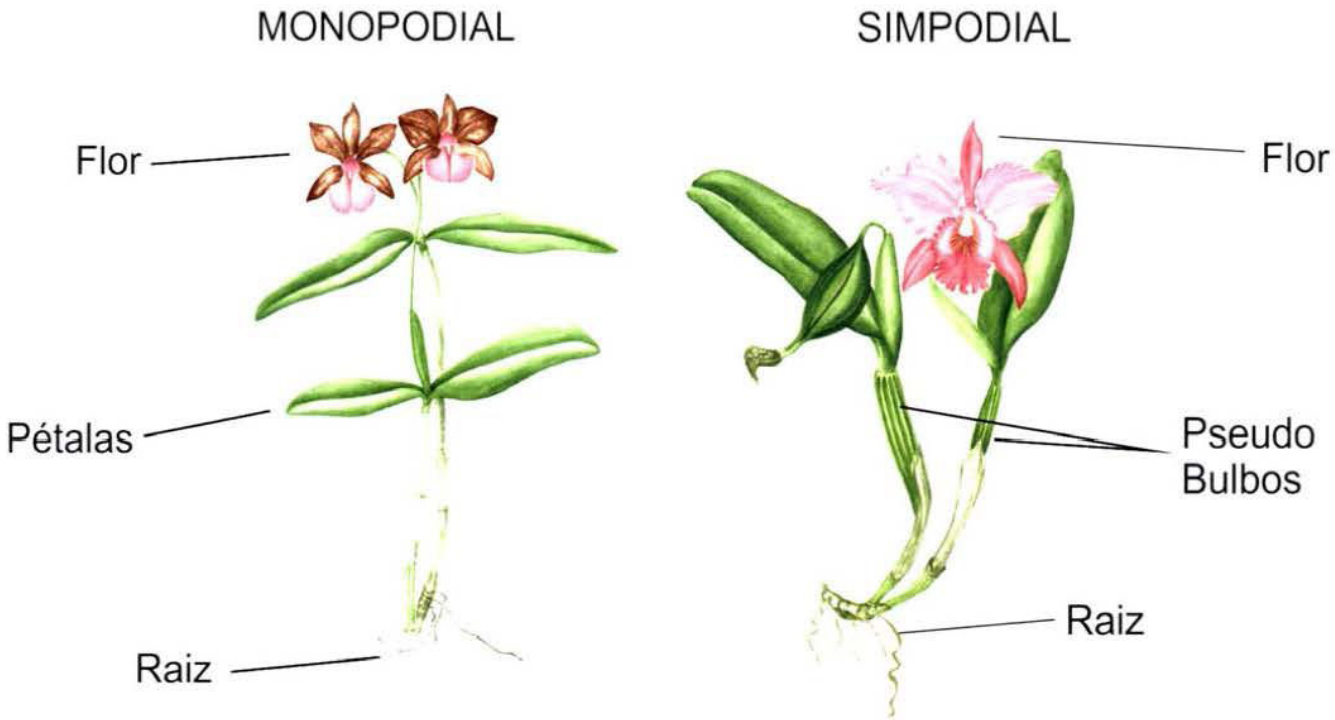

Figura 1. Crescimento monopodial e simpodial com partes da planta. Ilustração: Thereza Carvalho.

As folhas de orquídeas podem ser dispostas em forma de espiral ao longo do caule ou alternas, dispostas em duas fileiras e podem faltar durante o período de floração. Podem ser sésseis ou pecioladas, uninervadas a paralelinérveas (raramente com nervação reticulada) com consistência, textura e aparência muito variadas, desde planas a muito carnosas, até mesmo cilíndricas.

As sépalas (verticilo externo) e pétalas (verticilo interno) podem se encontrar livres ou fundidas de diferentes modos ou ainda bastante reduzidas. Uma das pétalas, o labelo, geralmente maior e mais vistoso, posiciona-se geralmente na parte inferior da flor, em posição oposta à coluna.

Projetando-se do centro da flor, surge um órgão carnudo e claviforme, a coluna ou ginostêmio, como resultado da fusão dos órgãos masculinos (estames) e femininos (carpelos). A presença desse tipo de estrutura (coluna) discrimina espécies de Orchidaceae das demais famílias botânicas. A antera localiza-se no extremo da coluna e protege os grãos de pólen, agrupados em duas a oito massas, chamadas políneas; imediatamente abaixo da antera fica uma pequena depressão de superfície viscosa, o estigma, no qual as políneas são depositadas durante a polinização. O ovário está localizado sob a coluna, que após a fecundação se desenvolve e forma uma cápsula contendo milhares de sementes diminutas (**Figura 2**).

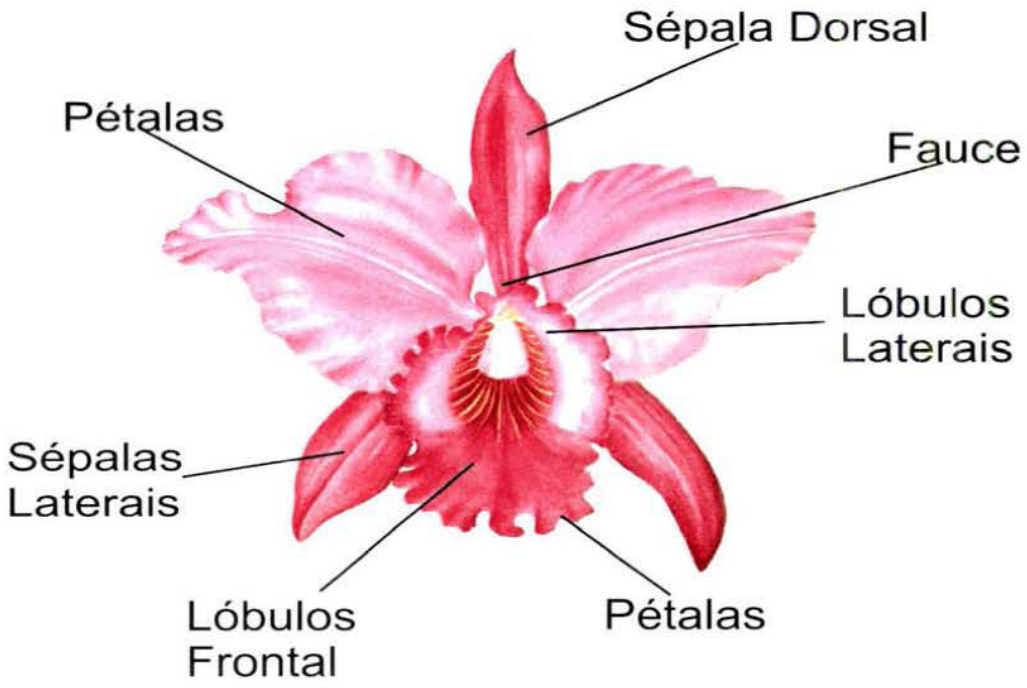

Figura 2. Partes da flor de orquídea. Ilustração: Thereza Carvalho.

As sementes das orquídeas são muito pequenas e contêm poucas reservas de nutrientes. Contêm pequenas quantidades de proteínas e lipídios de alta energia, mas pouco açúcar (Orquidário Damianus, 2010). As sementes da maioria das orquídeas não possuem endosperma e, *in situ*, necessitam manter uma associação simbiótica com alguns fungos (micorriza: *mykes* = fungo e *rhiza* = raízes), para que a germinação ocorra. As Orquidáceas são obrigatoriamente micotrópicas, pelo menos em uma fase do desenvolvimento, visto que suas sementes são extremamente pequenas e não possuem nutrientes em quantidade suficiente para que haja o processo de germinação completo, como nas demais plantas – pode até haver um início de germinação, mas o embrião não se desenvolverá acima do estágio de umas poucas células. O desenvolvimento completo somente será possível em associação com fungos, que provêm os nutrientes necessários. Em algum ponto de seu ciclo de vida, todas as orquídeas são dependentes de fungos. Sejam orquídeas capazes ou não de atividade fotossintética em sua fase adulta, todas as orquídeas possuem um estágio onde são não-fotossintéticas e por isso, dependentes de fontes externas de nutrientes (Smith; Read, 1997). Na maioria dos casos, é somente na fase de desenvolvimento inicial (*seedling*) que se torna obrigatória a associação simbiótica entre a semente e o fungo (micorriza).

Os fungos envolvidos na micorriza são do grupo *Basidiomicelos*, particularmente da espécie *Rhizoctonia*, com os quais muitas orquídeas estão associadas. A infecção de uma semente de orquídea pelos fungos ocorre quando o embrião absorve água e se expande, rompendo a cobertura da semente. Um embrião de semente consiste

em umas poucas centenas células e os fungos espalham-se rapidamente de célula para célula.

Dentro das células, as *hifas* formam novelos chamados de *pelotons*. Cada *peloton* intracelular tem um ciclo de vida curto, durando apenas alguns dias antes de se degenerar. Como resultado da degeneração dos *pelotons* todos os nutrientes envolvidos na constituição dos fungos serão disponibilizados para as células embrionárias da planta. Esses nutrientes suplementares serão essenciais para o desenvolvimento subseqüente do embrião. A grande maioria das espécies de orquídeas desenvolve a clorofila em seu estágio adulto. As que se tornam capazes de realizar fotossíntese, não dependem mais totalmente dos fungos e estes se tornam supérfluos.

Entretanto, muitas orquídeas clorofíticas, mesmo depois de adultas, apresentam determinados fungos em suas raízes. Um dos produtos relacionados às atividades desses fungos é a disponibilização de nutrientes provenientes da degradação de diferentes substratos, como nitrogênio e fósforo, que serão absorvidos pelas raízes das plantas.

A infecção de uma semente por fungos micorríticos não significa que, necessariamente, resultará na germinação e crescimento de uma orquídea. Após a associação fungo-semente, três possibilidades existem: a interação micorrítica descrita acima; a infecção parasitária, na qual as células das orquídeas são invadidas e o embrião morre ou as células das orquídeas rejeitam a infecção pelos fungos.

Todas essas interações podem ocorrer numa população de sementes recém germinadas, realçando a relativa instabilidade da natureza da associação. Uma infecção fúngica bem sucedida resulta no desenvolvimento de uma semente de orquídea. Em relação à terceira possibilidade, acima mencionada, a inibição do crescimento dos fungos pode ser causada pela orquídea, por meio da síntese de uma substância antagônica – ela foi primeiramente denominada orquinol, e mais tarde foi caracterizada por Gaumann e Kern, em 1959, e denominada dehydroxyphenanthrin (Orquidário Damianus, 2010).

2. Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais, apesar de ser uma técnica relativamente recente, possui um histórico bem amplo e a cada dia mais estudos vem sendo elaborados.

A cultura de tecidos vegetais vem sendo estudada desde o início do século XX, mais precisamente em 1902, quando, Haberlandt botânico australiano, utilizou células de tecidos somáticos de diversas espécies de plantas para cultivo *in vitro* em meio nutritivo, entretanto, não obteve muito sucesso em seus experimentos. Este insucesso foi possivelmente causado pela falta de hormônios no meio nutritivo, substâncias não conhecidas até então, ou pela utilização de espécies inadequadas, bem como a baixa densidade de explantes maduros (Torres *et al.,* 1998). O explante pode ser: secções de folhas, flores (pétalas, anteras), sementes (embriões imaturos), raízes e outros e, mesmo, os meristemas apical ou lateral (Torres; Caldas, 1990).

Hannig (1904) foi o primeiro a cultivar *in vitro*, embriões imaturos de crucíferas, no qual constatou a necessidade do acréscimo de sacarose ao meio mineral para o desenvolvimento de embriões. Em 1925, Laibach foi o primeiro a visualizar a aplicação prática da cultura de embriões no melhoramento genético, produzindo plantas híbridas de cruzamentos incompatíveis entre *Linum austriacum* e *L. perenne* (Torres *et al.,* 1998).

A cultura de órgãos isolados, desenvolvida por Robbins e Kotte, em 1922, mostrou resultados tão satisfatórios a tal ponto de ser postulado que ápices radiculares poderiam ser utilizados como explantes para o estabelecimento das culturas *in vitro*. Apesar, dessas culturas terem perdurado durante muito tempo, foi White (1932), o primeiro a desenvolver um meio nutritivo líquido, com capacidade de manter, durante período ilimitado, o crescimento de ápices radiculares de *Lycopersicon esculentum* (Torres *et al.,* 1998).

A descoberta do primeiro fitormônio, o ácido indolacético (auxina), possibilitou o estabelecimento e a manutenção indefinida de culturas de calo de cenoura (Gautheret, 1939 *apud* Torres *et al.,* 1998; Nobécourt, 1939 *apud* Torres *et al.,* 1998). Posteriormente, também utilizando calo de cenoura, em 1959, Reinert observou a formação de embriões somáticos utilizando este mesmo fitormônio (Torres *et al.,* 1998). Em 1941, com os trabalhos de Van Overbeek, foram determinadas as exigências nutricionais para o cultivo de vários tipos de embriões (Torres *et al.,* 1998).

Historicamente, a aplicação prática da cultura de tecidos vegetais teve início quando Morel e Martin (1952) obtiveram êxito na recuperação de plantas de Dália, livres de vírus do mosaico, por meio de cultura de ápices caulinares. Inúmeras descobertas foram realizadas ao longo do século passado na cultura de tecidos em todo o mundo, entretanto, no Brasil, apenas na década de 50, o Dr. Agesilau Bitancourt, do Instituto Biológico de São Paulo, desenvolveu os trabalhos pioneiros sobre cultura de tecidos (Torres *et al.,* 1998). Nos dias atuais, o Brasil conta com diversos laboratórios desenvolvendo pesquisas nessa área.

2.1. A cultura de tecidos na propagação de orquídeas

A cultura de tecidos tem sido aplicada, ao longo de muitos anos, à reprodução assexuada de muitas orquídeas

de interesse comercial, tais como *Cymbidium*, *Cattleya*, *Miltonia*, *Phalaenopsis*, *Vanilla* e *Vanda* (Intuwong; Sagawa, 1974). Do mesmo modo, tem sido utilizada para multiplicação via sementes (reprodução sexuada). Os primeiros estudos nesta área iniciaram-se com Noel Bernard, em 1911, quando promoveu a germinação *in vitro* de sementes de orquídeas em um meio contendo açúcares, minerais, agar e salepo (extrato de tubérculo de *Ophrys* sp.) (Arditti, 1967). Com base nesse experimento, Lewis Knudson, em 1922, obteve a germinação de sementes de orquídeas em um meio sintético, diferente do de Bernard, constituído apenas de açúcares, ágar e sais minerais realizando, assim, com êxito, a primeira reprodução assimbiótica de orquídeas (sem a necessidade de associação com o fungo). Durante décadas, procurou-se aperfeiçoar o meio de cultura inicial de Knudson até que, em 1946, chegou-se ao tradicional, e até hoje, utilizado na cultura de orquídeas, "Knudson C" (**Tabela 1**) (Knudson, 1946; Campos, 2002).

Em 1960, George Morel, modificando o meio de Knudson C e semeando a orquídea *Cymbidium*, conseguiu realizar a primeira reprodução assexuada partindo de gemas apicais desta planta (Campos, 2002), iniciando a produção de orquídeas para comercialização (Torres *et al.*, 1998).

Tabela 1. Composição básica dos meios de White (1932), Vacin e Went (1949), Knudson C (1946), Murashige e Skoog (1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), SH (Schenk e Hildebrandt, 1972) e WPM (Lloyd e McCown, 1980). (Modificada de Caldas *et al.*, 1998; Caramaschi, 2001; Pasqual, 2001).

Componentes	White	VW	KC	MS	B5	SH	WPM
			Macronutrientes (mg/l)				
$CaCl_2.2H_2O$	—	—	—	440	150	200	96
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300	—	992	—	—	—	556
$Ca_3(PO_4)_2$	—	201	—	—	—	—	—
$(NH_4)_2SO_4$	—	502	502	—	—	—	—
NH_4NO_3	—	—	—	1650	—	—	400
KNO_3	80	525	—	1900	2500	2500	—
$MgSO_4.7H_2O$	720	246	246	370	250	400	370
KH_2PO_4	—	245	245	170	—	—	170
KCl	65	—	—	—	—	—	—
K_2SO_4	—	—	—	—	—	—	990
$NaH_2PO_4.H_2O$	19	—	—	—	150	—	—
Na_2SO_4	200	—	—	—	—	—	—
$NH_4H_2PO_4$	—	—	—	—	—	300	—
			Micronutrientes e Ferro (mg/l)				
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	—	—	134	—	—
$CoCl_2.6H_2O$	—	—	—	0,025	0,025	0,1	—
$CuSO_4$	—	—	—	—	—	0,2	
$CuSO_4.5H_2O$	0,001	—	—	0,025	0,025	—	0,25
H_3BO_3	1,5	—	—	6,2	3	5	6,2
KI	0,75	—	—	0,83	0,75	1	—
$MnSO_4.H_2O$	—	5,7	5,7	—	10	10	—
$MnSO_4.4H_2O$	7	—	—	22,3	—	—	22,3
MoO_3	0,0001	—	—	—	—	—	—
$Na_2MoO_4.2H_2O$	—	—	—	0,25	0,25	0,1	0,25
$ZnSO_4.7H_2O$	3	—	—	8,6	2	1	8,6
$Fe(SO_4)_3$	2,5	—	—	—	—	—	—

$FeSO_4.7H_2O$	—	—	250	27,8	27,8	15	27,8
$Fe_2(C_4H_4O_6).2H_2O$	—	0,26	—	—	—	—	—
$Na_2EDTA.\ 2H_2O$	—	—	—	37,2	37,2	20	37,2
Vitaminas e Aminoácidos (mg/l)							
Ácido nicotínico	0,5	—	—	0,5	1,0	5	0,5
Glicina	3,0	—	—	2,0	—	—	—
Piridoxina. HCl	0,1	—	—	0,5	1,0	0,5	0,5
Tiamina. HCl	0,1	—	—	0,5	10,0	5	1,0
Myo-inositol	100	—	—	100	100	1000	100
Sacarose (g/l)	30	20	20	30	20	30	20

3. Micropropagação

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudada em diversas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos a que mais se tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Entre as vantagens de sua utilização estão as possibilidades de obtenção de várias plantas a partir de um único explante inicial, independentemente de condições climáticas, redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie, reprodução do genótipo da planta-mãe, geralmente com fidelidade durante a multiplicação e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (Erig e Schuch, 2010).

A importância da cultura de tecidos vegetais[1] é principalmente a produção de um grande número de mudas em um período relativamente curto e em um espaço físico relativamente pequeno (vidros) de fácil transporte e manuseio (Cid, 2003). Em diversas espécies, o crescimento, na natureza, ocorre muito devagar, como é o caso das orquídeas e a cultura de tecidos passa a ser uma alternativa à sua produção mais rápida e eficiente (Campos, 2002).

Apesar das diferenças morfológicas, fisiológicas e nutricionais existentes entre as espécies vegetais, a cultura de tecidos possui algumas etapas comuns a todas elas. Murashige (1974) *apud* Grattapaglia e Machado (1998), conceitua três estágios da micropropagação:

- primeiro estágio: consiste na seleção de explantes (parte da planta utilizada na micropropagação), desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;

- segundo estágio: corresponde à multiplicação de mudas mediante sucessivas subculturas em meio nutritivo próprio para a multiplicação;

- terceiro estágio: a transferência das plantas produzidas para meio nutritivo de enraizamento. Todas estas etapas são seguidas de aclimatização, que consiste na transferência das plantas produzidas para serem aclimatadas em estufa.

No Laboratório Multidisciplinar do Jardim Botânico de Brasília (JBB) é realizado o desenvolvimento das seguintes etapas: confecção do meio de cultura, germinação e repicagem, para a obtenção das mudas *in vitro*.

4. Meios Nutritivos

Os meios nutritivos ou meios de cultura foram elaborados para fornecer todas as substâncias necessárias para suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro*, mantendo suas funções metabólicas e promovendo sua sobrevivência e desenvolvimento.

Segundo Cid (2003), os elementos que compõem o meio nutritivo da cultura *in vitro* devem pertencer à categoria dos essenciais, isto é, aqueles em que a planta não se desenvolve na ausência de alguns deles.

4.1. Meios líquidos e Meios Sólidos

Os meios de cultura podem ser líquidos ou sólidos. As culturas em meio líquido exigem um suporte através do papel filtro sempre umidecido com meio de cultura ou em constante agitação para renovação do oxigênio necessário ao explante. Os meios líquidos possuem a vantagem de serem mais simples e práticos no preparo, sendo, até mesmo, de custo relativamente

[1]A cultura de tecidos pode fornecer suporte para áreas da bioquímica, como estudos das vias metabólicas; em fisiologia vegetal, para estudos de crescimento e desenvolvimento, efeitos de hormônios e reguladores de crescimento; na fitopatologia, em estudos de toxinas; na citogenética, para estudos de cromossomos ou alterações cromossômicas (Pasqual, 2001) na produção de mudas em larga escala.

mais baixo.

Em comparação com meios sólidos, os meios líquidos mostram-se mais homogêneos, evitando, consideravelmente, a formação do gradiente de concentração dos nutrientes durante o desenvolvimento do explante.

Em contrapartida, pesquisas com *Catasetum pileatum* Reichenbach f., visando à formação de protocormos a partir de ápices radiculares, demonstraram que o meio MS sólido mostrou-se mais favorável que os demais meios menos densos, onde os explantes sofreram oxidação (Kraus e Kerbauy, 1992).

Com relação aos meios sólidos, Pasqual (2001) afirma que, mesmo que o custo seja maior e seu preparo mais demorado, ainda é preferido nas pesquisas devido à facilidade de manejo do explante. Para se obter um meio de cultura sólido, faz-se necessária a utilização de agentes solidificantes. Tradicionalmente, o Agar, um polissacarídeo extraído de algas marrons (Rodophyta), é bastante utilizado para esses propósitos. No Laboratório do JBB é usado apenas o Agar.

Em nosso laboratório, o uso do meio líquido ocorre apenas em situações emergenciais, quando é necessária a aceleração do crescimento da muda de orquídea para posterior aclimatização em estufa. Entretanto, esse tratamento exige ajustes constantes do meio ou trocas freqüentes de frascos enquanto que o uso de meio sólido facilita a manutenção da repicagem/ transferência.

4.1.2. Componentes dos Meios Nutritivos

4.1.2.1. Água

A água é o componente utilizado em maior quantidade na preparação de meios de cultura. A água não tratada por processos específicos contém sais dissolvidos e outras impurezas que variam em quantidade de um local para outro. Por esse motivo, a água deve ser destilada ou bidestilada e deionizada por colunas de troca iônica ou filtrada com filtros de acetato de celulose (tipo "Milli-Q"). Esta última permite que os meios de cultura estejam livres de agentes tóxicos e da influência de outros sais e íons.

4.1.2.2. Macronutrientes

Via de regra, os macronutrientes são fornecidos ao meio de cultura na forma de sais e são necessários em maiores proporções. São eles: cálcio, potássio e magnésio, absorvidos pelas células vegetais como cátions (Ca^{2+}, K^{+}, Mg^{2+}), nitrogênio, absorvido na forma de amônio (NH_4^{+}) ou nitrato (NO_3^{+}), fósforo, absorvido como íons fosfato $(HPO_4)^{2-}$ e $(H_2PO_4)^{-}$ e enxofre, absorvido como íons sulfato $(SO_4)^{2-}$. Os sais usados para fornecer macronutrientes também podem fornecer íons sódio (Na^{+}) e cloro (Cl^{-}).

Entretanto, Waes e Deberg (1986) constataram que as sementes de algumas orquídeas como *Epipactis atrorubens* (Hoffm) Besser germinaram mais rapidamente em um meio básico com baixa concentração de macronutrientes quando comparado com meio contendo alta concentração de macronutrientes. Entretanto, não obtiveram o crescimento subseqüente. Esses fatos nos levam a concluir que, para aquelas espécies, um meio contendo altas concentrações de macronutrientes atua negativamente na germinação *in vitro*, mas não no crescimento subseqüente. Com isso, constata-se que os meios podem ser específicos de acordo com a etapa de desenvolvimento do explante.

Nitrogênio: é o elemento exigido em maior quantidade, pois é constituinte de aminoácidos e ácidos nucléicos, entre outros componentes da célula vegetal. Na maioria das espécies vegetais, a deficiência de nitrogênio causa o aparecimento de clorose (amarelamento das folhas), sobretudo nas folhas mais velhas, próximas à base da planta, pois a planta, nessa condição, redireciona o nitrogênio para as folhas mais jovens (Taiz e Zeiger, 2004). No meio de cultura, o nitrogênio pode apresentar-se sob duas formas inorgânicas: de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato).

Pesquisas realizadas com *Catasetum fimbriatum* Lindley, mostraram que a enzima nitrato redutase obteve maior atividade em plantas que possuem maior habilidade de assimilação de íons nitrato (Majerowicz e Kerbauy, 2002), pois se a planta absorve nitrato, este deve ser reduzido a íon amônio (NH_4^{+}) para incorporação ao esqueleto carbônico (Taiz e Zeiger, 2004).

O nitrogênio pode, também, apresentar-se na forma de amônio. Segundo trabalhos realizados por Yatazawa e Furuhashi (1968), Gamborg (1970) e Gamborg e Shyluk (1970), o íon amônio (NH4+) mostrou-se tóxico às células *in vitro*, quando fornecido como a única fonte de nitrogênio. Entretanto, a combinação de nitrato e amônio no meio de cultura, estimula o crescimento de diversas plantas *in vitro*.

Fósforo: é componente intermediário da respiração e da fotossíntese, além de ser utilizado no metabolismo energético das plantas e fonte para a produção de ácidos nucléicos. As plantas absorvem fósforo na forma do íon fosfato $(H_2PO_4^{-})$ e (H_2PO_4), sendo desta forma acrescida ao meio de cultura de tecidos.

Cálcio: é utilizado pelas plantas na síntese de

novas paredes celulares, em particular a lamela média, que separa células em divisão; é também utilizado no fuso mitótico durante a divisão celular e requerido para o funcionamento normal das membranas celulares. O *déficit* de cálcio nas plantas resulta em crescimento deficiente do sistema radicular e escurecimento das margens das folhas apicais, podendo ocorrer inibição do crescimento e necrose das regiões meristemáticas mais jovens.

Potássio: participa como íon acompanhante do nitrato ou fosfato e tem como principais funções a regulação do P e o equilíbrio osmótico no interior das células, bem como a ativação de muitas enzimas envolvidas na respiração e na fotossíntese.

Magnésio: tem uma função específica na ativação de enzimas envolvidas na respiração, fotossíntese e síntese de ácidos nucléicos. É um componente essencial da molécula de clorofila e um dos constituintes da lamela média.

Enxofre: é constituinte de várias coenzimas e de vitaminas essenciais ao metabolismo e está relacionado com a assimilação do nitrogênio pelas plantas. Muitos dos sintomas provocados pela deficiência de enxofre são semelhantes aos da deficiência de nitrogênio, tais como clorose e redução do crescimento (Taiz e Zeiger, 2004).

4.1.2.3. Ferro

O ferro encontra-se em uma faixa compreendida entre os macros e os micronutrientes, pois é necessário às culturas em concentrações menores que às dos macronutrientes, porém superiores às dos micronutrientes.

O ferro tem um importante papel como componente de enzimas envolvidas na transferência de elétrons, como por exemplo, os citocromos, sendo que a deficiência de ferro caracteriza-se por uma clorose internervural (Taiz e Zeiger, 2004).

O ferro é essencial para a cultura de tecidos de orquídeas, sendo adicionado ao meio de cultura na forma de FeEDTA, um complexo chamado quelato, que evita a precipitação do ferro no meio e facilita sua absorção.

4.1.2.4. Micronutrientes

Os micronutrientes são elementos essenciais à sobrevivência e desenvolvimento da planta, mas em concentrações bem menores que a dos macronutrientes. Fazem parte desse grupo os seguintes elementos essenciais: Boro (B), Cloro (Cl), Cobre (Cu), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo) e Zinco (Zn).

Boro: esse elemento é importante para o alongamento celular, síntese de ácidos nucléicos, respostas hormonais, divisão celular, auxilia na manutenção da estabilidade da membrana celular e no transporte de carboidratos no floema e, é essencial para a síntese de UDP-glicose (precursor da celulose).

Cloro: é importante na fotólise da água e necessário para a divisão celular, tanto em folhas quanto em raízes, além de participar do movimento estomático.

Cobre: está associado com enzimas envolvidas em reações de óxido-redução (transferência de elétrons), como o caso da plastocianina, a qual está envolvida no transporte de elétrons durante as reações da fotossíntese dependentes de luz, sendo também um dos constituintes dos citocromos.

Manganês: participa na ativação de enzimas como as descarboxilases e desidrogenases envolvidas no ciclo de Krebs. Entretanto, sua principal função refere-se à participação na fotólise da água (quebra da água produzindo oxigênio) e na substituição do magnésio na ativação de algumas enzimas.

Molibdênio: é componente de várias enzimas, tais como a nitrato redutase e nitrogenase, sendo que a nitrato redutase catalisa a redução do nitrato a nitrito durante sua assimilação pela célula vegetal e a nitrogenase converte o gás nitrogênio à amônia em microorganismos fixadores de nitrogênio como as micorrizas nas associações simbióticas com as orquídeas.

Zinco: várias enzimas requerem íons de zinco para suas atividades e este elemento pode ser exigido para a síntese de clorofila. A falta do zinco causa a perda da capacidade da planta em produzir quantidades suficientes do hormônio auxina (ácido indolacético). Sua deficiência é caracterizada pela redução do crescimento internodal, bem como pela produção de folhas pequenas e retorcidas, com margens de aparência enrugada.

Vajrabhaya e Vajrabhaya (1970) utilizaram altas concentrações de micronutrientes em um meio básico, na cultura de gemas apicais de *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. e observaram uma grande formação de calos, os quais, posteriormente, não se diferenciaram. Esse fato, mais uma vez, vem corroborar a idéia que as concentrações de nutrientes requeridos dependem de cada etapa de crescimento do explante.

A morfogênese e o crescimento de células de algumas espécies vegetais podem ser promovidos pelo aumento do nível de micronutrientes indicados pelos diferentes meios de cultura. Por exemplo, a indução e manutenção de calos e crescimento de células em suspensão de espécies florestais apresentaram melhor resposta com micronutrientes cinco vezes mais concentrados que a composição verificada no meio MS

(vide Item 6) (Pasqual, 2001).

Caramaschi (2001) utilizou tratamentos de meios VW, KC e MS contendo os micronutrientes do meio MS e tratamentos com estes mesmos meios contendo apenas sulfato de manganês para a germinação de sementes de *Cyrtopodium* sp. e constatou que não houve diferenças significativas na germinação das sementes daquela orquídea.

Infelizmente, a literatura disponível não apresenta muitos experimentos e pesquisas relacionadas exclusivamente à influência dos micronutrientes separadamente na cultura de tecidos de orquídeas. Dessa forma, alguns testes devem ser realizados para otimização dos meios de cultura.

4.1.2.5. Carboidratos

Muitos são os carboidratos que podem ser acrescentados aos meios de cultura: sacarose, glicose, frutose e maltose. Entretanto, o mais utilizado na cultura de tecidos de orquídeas é a sacarose. A sacarose possui certas características benéficas à cultura *in vitro*: alta solubilidade e rápida metabolização, pois é o açúcar mais transportado e armazenado pela maioria das células vegetais. Os produtos da hidrólise da sacarose (glicose e frutose), uma vez dentro da célula, podem entrar na via glicolítica ou na via das pentoses-fosfato ou, ainda, serem armazenados na forma de amido.

A galactose e a lactose, quando utilizadas como fontes de carbono na cultura, promovem a morte de plântulas de grande parte dos gêneros de orquídeas (Arditti, 1967). Por outro lado, a sacarose, frutose, maltose e glicose, promovem uma resposta positiva no desenvolvimento das Orchidaceae (Ernest *et al.*, 1970).

A eficiência de sacarose na germinação de sementes de orquídeas depende, dentre outras coisas, de sua concentração no meio nutritivo, sendo que, de acordo com a cultura, a frutose ou a glicose podem substituir diretamente este carboidrato. A concentração ótima de sacarose para a indução da morfogênese ou do crescimento difere entre as espécies de orquídeas cultivadas. Entretanto, já foi constatado que níveis elevados de sacarose no meio inibem a síntese de clorofila dessas e de outras plantas. Altas concentrações de sacarose inibem o desenvolvimento *in vitro* de *Cymbidium* sp. (Fannesbech, 1972).

Caramaschi (2001), em estudo referente à pré-aclimatização, substituiu a sacarose pela glicose, obtendo bons resultados na sobrevivência de mudas de *Cyrtopodium vernum* Rchb. f. & Warm. As plantas que estavam em meios contendo alta concentração de glicose (25g/l), tiveram uma maior taxa de sobrevivência na aclimatização quando comparadas às plantas que estavam em meios contendo 12,5g/l de glicose.

A frutose quando entra em contato com uma auxina pode contribuir para a diferenciação de câmbio vascular, influenciando a formação de xilema e floema. Essa diferenciação é capaz de promover maior regeneração de protocormos de *Catasetum fimbriatum*, quando comparado à ação dos demais carboidratos (Kraus e Kerbauy, 1992). A frutose utilizada em grande quantidade pode formar calos nas raízes de mudas de orquídeas.

Todos os fatos, acima relatados, mostram que o uso de diferentes fontes de carbono deve ser testado caso a caso.

4.1.2.6. Vitaminas e Myo-inositol

Vitaminas são substâncias necessárias por serem co-fatores catalíticos importantes de vias metabólicas nas células. Nos primeiros trabalhos com cultura de tecidos vegetais, o suprimento de vitaminas nas culturas era proveniente da adição de misturas complexas como a água de coco. Com o decorrer do tempo e das pesquisas, o desenvolvimento de especificações das vitaminas e suas concentrações tornaram-se necessário.

As principais vitaminas utilizadas na cultura de tecidos vegetais são tiamina (vitamina B_1), ácido nicotínico (niacina) e piridoxina (vitamina B_6). Estudos promovidos por Linsmaier e Skoog (1965) *apud* Caldas *et al.* (1998), demonstram que apenas a tiamina mostra-se necessária à grande maioria das culturas.

É de suma importância ressaltar que o fornecimento ou não dessas vitaminas à cultura, dependerá da espécie vegetal com que se está trabalhando, pois às vezes uma ou até mesmo todas as vitaminas podem ser dispensáveis para aquela espécie. Portanto, é sugerido que sejam realizados testes para a checagem da melhor combinação de vitaminas.

Os inositol-fosfolipídios, assim como outros compostos derivados do inositol, têm um papel fundamental no tráfego de membrana e rotas de sinalização, estocagem e transporte de auxinas, biossíntese de ácido fítico e parede celular, e produção de moléculas relacionadas ao estresse (Abreu, 2006).

4.1.2.7. Hormônios Vegetais ou Reguladores de Crescimento

Os hormônios vegetais ou "fitormônios" correspondem às substâncias naturais que são produzidas pelas plantas e são responsáveis por direcionar o processo

morfogenético, pois atuam como sinais químicos que regulam o crescimento e desenvolvimento celular. Atualmente, tem-se o conhecimento de três grandes classes de hormônios indutores do crescimento: as auxinas, as citocininas e as giberilinas; em contrapartida, existem inibidores como: ácido abscísico e etileno (**Tabela 2**). As auxinas e as citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos vegetais.

Alguns reguladores de crescimento celular podem ter origem sintética (ex: ácido indolbutírico (AIB)) e são substâncias que detêm as mesmas funções dos hormônios vegetais (Cid, 2003). Entre eles, o ácido indolacético (AIA), considerado uma auxina instável (pois se degrada facilmente pela luz) e, por essa razão, os demais reguladores de crescimento passam a ser mais utilizados em detrimento do AIA; e o ácido naftaleno acético (NAA), utilizado para enraizamento e indução de calos, formação de células desorganizadas, conforme a **Tabela 2**.

Indutores de Crescimento:

Auxinas: tem por principais funções a promoção da formação de raízes laterais e adventícias, regulação da dominância apical, retardamento do início da abscisão foliar, promoção do desenvolvimento dos frutos com a promoção da síntese de etileno, entre outras funções[2].

As auxinas são frequentemente aplicadas na cultura de tecidos de orquídeas. Em raízes de orquídeas cultivadas *in vitro*, a regeneração de protocormos (é um termo usado para designar um estágio inicial de desenvolvimento do embrião das orquídeas) ocorre, em geral, após um estágio de calo, cuja formação depende da presença de auxinas sintéticas no meio de cultura. Como por exemplo, AIA (ácido 3-indolacético); ANA (ácido alfa-naftaleno-acético); AIB (ácido indol-3-butírico); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ou NOA (ácido naftoxiacético).

Tabela 2. Reguladores de crescimento utilizados na cultura de tecidos de plantas (Caldas *et al.*, 1998; Pasqual, 2001, com adaptações).

Classes de Reguladores	Abreviaturas/ nomes comuns	Nomenclatura
Auxinas	AIA	Ácido 3-indolacético
	ANA	Ácido naftalenoacético
	AIB	Ácido indolbutírico
	CPA	Ácido (4-clorofenoxi) acético
	2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
	Picloran	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
	NOA	Ácido naftoxiacético
Citocininas	Cinetina (KIN)	6-furfurilamino-purina
	BAP (BA)	6-benzilamino-purina ou 6-benziladenina
	2iP	Isopenteniladenina
	Zeatina (ZEA)	N-(4-hidroxi-3-metilibut-2-enil) Aminopurina
	PBA	(6-Benzilamino)-9-2tetraidropiranil-9-H-purina
Giberelinas	Ácido giberélico (GA_3)	2,4α,7-trihidroxi-1-metil-8-metilene-Gib-3-ene-1,10-ácido carboxílico-1-4-lactona
Inibidores	ABA	Ácido Abscísico ($C_{15}H_{20}O_4$)
	Etileno	C_2H_4

[2]As auxinas promovem o crescimento dos tecidos vegetais induzindo a liberação de íons hidrogênio na parede celular, levando à acidificação da parede e à degradação de parte dessa, aumentando a sua plasticidade. As auxinas, quando utilizadas *in vitro*, podem induzir a formação de calos e a embriogênese em várias espécies vegetais.

A auxina 2,4-D é utilizada especificamente para a indução de calos, para regeneração de plantas via embriogenêse somática ou para cultura de protoplastos.

Kerbauy (1991, 1993) constatou que em culturas de ápices radiculares de *Cattleya* sp. e *Oncidium varicosun* Lindley var. *rogersii*, o ácido indolbutírico (AIB) induziu prolongamento e crescimento longitudinal vigoroso nos explantes, cerca de oito vezes maior que o tamanho original.

Citocininas: promove a divisão celular, formação dos órgãos, maturação dos cloroplastos, crescimento de gemas laterais, retardamento da senescência foliar e regulam o crescimento de caules e raízes. Embora as citocininas regulem muitos processos celulares, a sua principal função é o controle da divisão celular. São exemplos de citocininas: BAP [N-Benzil-9-(2-tetrahidropiranyl)-adenina] ou BA ou 6-BA (6-benzilamino-purina) (de acordo com a tabela1); KIN (6-furfurilamino-purina) e Zeatina (N^6 –(4-hidroxi-3-metilbut-2 enil amino-purina).

Giberelinas: compõem um grupo de hormônios que foi descrito pela primeira vez em 1950 e, que atualmente agrupa 125 compostos (Taiz e Zeiger, 2004). As giberelinas são freqüentemente associadas à promoção do crescimento do caule. A aplicação desses hormônios em plantas intactas pode induzir aumentos significativos na altura das plantas. Também, em alguns tipos de plantas, induzem um marcante alongamento dos entrenós como observado em espécies anãs, além de promover alongamento e divisão celular. São, também, os hormônios mais utilizados na promoção da germinação de sementes, como por exemplo, GA_3 (ácido giberélico).

Inibidores de Crescimento:

Ácido abscísico (ABA): pode tanto estimular, quando utilizado em pequenas concentrações, quanto inibir o crescimento de calos em meio de cultura. Em cultura *in vitro* de orquídeas, o ABA possui uma tendência para inibição do desenvolvimento.

Etileno: pode ser produzido de maneira endógena, sem necessidade de fontes externas, dentro do frasco que contenha o meio de cultura e o explante, quando mantido por longos períodos. No entanto, sua ação é muito pouco estudada. Geralmente, promove a oxidação, a inibição de crescimento ou a senescência de órgãos. Em culturas *in vitro* de orquídeas, o etileno induz a conversão de ápices radiculares em protocormos.

4.1.2.8. Misturas Complexas

As misturas complexas constituem-se em conjuntos empíricos de substâncias adicionadas aos meios sem que seja possível precisar-se a concentração de seus componentes. Podem variar desde conjuntos de vitaminas e aminoácidos a diversos sais minerais e hormônios. Vários aditivos podem ser considerados como misturas complexas, tais como: extrato de levedura, extrato de tomate, emulsão de peixe, homogeneizado de banana e de mamão, água de coco, dentre outros.

Segundo Ernest *et al.* (1970), um homogeneizado de banana e abacaxi acrescidos ao meio básico de Knudson C (**Tabela 1**), promove a aceleração do crescimento de protocormos de *Phalaenopsis* sp.

Um tipo de mistura que ainda é muito utilizada é a água de coco, pois possui muitos sais minerais, hormônios, vitaminas e aminoácidos, além de possuir uma propriedade tamponante (manter o pH dentro de uma faixa específica). Para algumas espécies de orquídeas, como *Cattleya* sp. e *Epidendrum* sp., a água de coco revela-se como estimulador no desenvolvimento de embriões, mas possui efeito negativo no desenvolvimento de embriões de *Cyrtopodium eugenii* Rchb.f. & Warm., pois inibe a sua germinação (Caramaschi, 2001).

Churchill *et al.* (1972) utilizaram água de coco e banana homogeneizada como suplemento de nutrientes, mas obtiveram um resultado insatisfatório na micropropagação de ápices radiculares de *Epidendrum* sp.. No entanto, Fannesbech (1972) obteve bons resultados no desenvolvimento de *Cymbidium* sp. em meio MS modificado acrescido com água de coco.

Em pesquisas realizadas no laboratório do JBB foram observados que a utilização de água de coco no meio de cultura traz resultados positivos para o enraizamento de espécies de *Cattleya amethystoglossa* e *Encyclia* sp. Por outro lado, Kerbauy e Handro (1981) constataram um efeito inibitório da água de coco no desenvolvimento *in vitro* de gemas laterais de *Cattleya intermedia*.

O uso de misturas complexas dificulta a padronização dos meios, portanto, as formulações de meios nutritivos devem possuir concentrações preestabelecidas das substâncias isoladas, pois facilitam o controle científico e a fidelidade dos resultados.

4.1.2.9. Outros Aditivos

4.1.2.9.1. Fungicidas e Antibióticos

Os fungicidas e antibióticos são acrescentados aos meios de cultura como agentes de prevenção de fitopatologias provenientes dos explantes utilizados ou de possíveis contaminações externas no momento da manipulação. Apesar de estarem sendo cada vez mais utilizados no combate à contaminação microbiana, não garantem total segurança no combate aos agentes biológicos contaminantes e não podem, de forma alguma, substituir os processos de assepsia.

4.1.2.9.2. Antioxidantes

Os antioxidantes inibem a oxidação de compostos fenólicos produzidos pelos próprios tecidos nos meios de cultura, evitando a perda do cultivo.

O ácido nítrico, o ácido ascórbico, a polivinilpirrolidona (PVP), a cisteína e o carvão ativado, entre outros, são comumente utilizados como antioxidantes. Dentre eles, o carvão ativado, um pó bastante fino e de cor escura, promove a fixação dos compostos fenólicos produzidos pelo explante evitando a oxidação dos tecidos, além de outros benefícios. Por esse motivo, é um produto muito utilizado nas diversas culturas de orquídeas. Quando utilizado em concentrações em torno de 0,3%, evita oxidações, promove o enraizamento e a transformação de ápices radiculares em protocormos em *Catasetum pileatum* Rchb. f. (Kraus e Kerbauy, 1992). Sugere-se, em alguns casos, aumento da concentração de auxina, quando na presença de carvão ativado. A pureza deste produto é variável.

4.2. Diversificação dos Meios de Cultura

Quando realizamos análise dos diferentes meios de cultura existentes percebe-se que não existem composições capazes de apresentar o mesmo desempenho ideal para todas as espécies botânicas. Em condição extrema, um determinado meio de cultura pode ser adequado somente para um tipo de orquídea.

A escolha dos meios a serem utilizados depende, portanto, de diversos fatores tais como: o tipo de cultura, a espécie vegetal a ser cultivada, as exigências nutricionais de cada espécie, bem como o que se deseja obter com a cultura. Há ainda, a possibilidade de se fazer pequenas modificações nos meios básicos, para melhor atender as expectativas sobre a cultura.

Entre os meios mais conhecidos e utilizados na cultura de tecidos vegetais destacam-se: White, VW, Knudson C, MS, B5, SH, WPM.

Os mais utilizados na cultura de tecidos de orquídeas são os meios de Vacin e Went (VW), Knudson C (KC), Murashige e Skoog (MS) e ½ MS (Caramaschi, 2001).

Os micronutrientes mais utilizados na cultura de tecidos são aqueles encontrados nos meios Gamborg *et al.* (1968) e Murashige e Skoog (1962), entretanto suas concentrações são constantemente modificadas. Outros meios, como White, SH e WPM, também apresentam micronutrientes em sua composição (**Tabela 1**).

A fórmula do meio KC vem sendo utilizada há mais de três décadas e ainda hoje é a mais solicitada para cultura de explantes de orquídeas. Entre outros resultados, Ueda e Torikata (1972), observaram um bom crescimento de raízes em *Cymbidium* sp., cultivados em meio KC, levemente modificado pelo acréscimo de 10 mg/l de cinetina.

O meio Murashige e Skoog (1962) possui uma alta concentração de nitrato, amônia, potássio e outros macronutrientes (**Tabela 1**), o que faz deste meio um dos mais eficazes na cultura de tecidos em geral (Pasqual, 2001). Entretanto, para muitos pesquisadores, as exigências de muitos tipos de cultura não são atendidas devido à baixa concentração de fosfato observada no meio MS. (Pasqual, 2001).

Huang (1984) tentou desenvolver um meio de cultura que fosse comum e que atendesse a todas as espécies do gênero *Cattleya*. Obteve sucesso com um meio MS, modificado pelo acréscimo de água de coco, adenina, ácido naftalenoacético (ANA) e glicose.

Gamborg *et al.* (1968) formularam o meio denominado B5 (**Tabela 1**) primeiramente utilizado para cultura de suspensões de células de soja, entretanto, posteriormente passou a ser utilizado em diversos estudos de cultura de tecidos e a inspirar novas formulações (Pasqual, 2001).

Em 1972, Schenk & Hildebrandt formularam um meio SH (**Tabela 1**) destinado a indução e cultura de calos de mono e dicotiledôneas. Entretanto, este meio não se mostrou eficaz na maioria das culturas, sendo hoje utilizado com mais freqüência na cultura de leguminosas (Pasqual, 2001). Entretanto, o meio SH foi utilizado, com sucesso, em 1978, para promover o desenvolvimento de calos a partir da extremidade radicular de *Epidendrum* sp. (Stewart e Button, 1978).

A comparação entre os meios demonstra que o efeito é diverso para o mesmo tipo de explantes. Caramaschi (2001) notou maior germinação de sementes de *Cyrtopodium cristatum* em meios básicos VW e KC, que em meio básico MS.

Do mesmo modo, a germinação de sementes de *Cyrtopodium eugenii*, no meio VW, mostrou-se mais eficaz que para os demais meios comparados, talvez devido a uma maior concentração de fosfato $(H_2PO_4)^-$ ou a maior razão amônia/nitrato no meio VW (Caramaschi, 2001). Já Stemberg e Kane (1998) obtiveram uma maior germinação de sementes de *Encyclia boothiana* var. *erythronioides* em um meio MS, que nos meios VW e KC.

Todos esses exemplos vêm corroborar a idéia que deve existir um meio mais apropriado para um determinado explante e que o maior número de combinações (entre meios e explantes) devem ser testados. Os meios de cultura utilizados no Jardim Botânico de Brasília estão descritos no item 6.

5. Laboratório de Reprodução *in vitro* de Plantas

Com ampla experiência na micropropagação *in vitro*, o JBB possui um laboratório com infraestrutura adequada, uma estufa e orquidários, tendo a capacidade de produzir uma média de 100.000 mudas por ano.

O objetivo do Laboratório é promover a propagação de espécies de orquídeas ameaçadas ou não de extinção através da técnica de micropropagação *in vitro* até a aclimatização das orquídeas para reintrodução na natureza, contribuindo, deste modo, para a preservação e conservação no JBB e para a biodiversidade vegetal.

5.1. Estrutura do Laboratório

O Laboratório Multidisciplinar do JBB é distribuído em 48 m², dentro dos quais estão organizados os diferentes materiais e equipamentos necessários. Abaixo segue a lista de (infraestrutura física e de equipamentos) áreas, equipamentos e materiais que possibilitam o desenvolvimento dos trabalhos.

Sala de Lavagem e Esterilização: autoclave (esterilização de materiais); destilador/bidestilador/ deionizador de água (purificação da água usada nos meio de cultura); pia (lavagem de vidrarias); estufa (secagem de materiais).

Sala de Preparo do Meio de Cultura: potenciômetro (ajuste de pH dos meios de cultura); balança analítica (pesagem de micronutrientes); balança eletrônica (pesagem de macronutrientes); forno (esterilização de ferramenta instrumental); microondas (dissolver o Agar para homogeneizar o meio de cultura); geladeira (conservação dos meios de cultura e de frutos de orquídea); estufa tipo B.O.D (choque térmico e incubação das sementes em cultivo); agitador magnético (homogeneização dos reagentes para preparo do meio de cultura); carrinho de aço de 45 cm com três prateleiras (suporte de materiais).

Sala de Manipulação: capela fluxo laminar horizontal (manipulação asséptica); estereoscópio (amplificação da visualização e seleção do explante).

Sala de Cultura: prateleiras (acomodação de mudas); lâmpadas fluorescentes e incandescentes; timer (controle de fotoperíodo); ar condicionado automático (controle de temperatura); esterilizador de ar (redução de contaminantes).

Almoxarifado: prateleiras (estocagem de vidrarias e materiais de limpeza); estufa para aclimatização: estufa com telado de sombrite (desenvolvimento de condições de aclimatização); controle automático da irrigação.

Vidrarias: balões volumétricos; becker; erlenmeyers; provetas; pipetas; funis; placas de petri de 150 mm; frascos diversos e tubos de ensaio.

Toda vidraria deve ser autoclavada durante 20 a 30 minutos a 121°C e depois secos na Câmara de Fluxo Laminar Horizontal ou em estufa a 150 °C durante 30 minutos.

5.2. Boas práticas de laboratório

As boas práticas no laboratório norteiam uma série de medidas necessárias para que a segurança do trabalhador seja garantida, além de indicar rotinas que propiciem a reprodutibilidade dos testes e rastreabilidade dos protocolos utilizados. A literatura sobre o assunto é vasta e nossa proposta resume-se à apresentação de alguns exemplos seguidos na produção de orquídeas, já que existe legislação específica pormenorizando o assunto.

A rotina básica desenvolvida no laboratório pode ser exemplificada pelos seguintes aspectos:

1) Assepsia do ambiente de trabalho;

1.1) Limpeza periódica do laboratório (chão, prateleiras, bancadas, vidrarias com material inoculado e capelas);

1.2) Eliminação de vetores como formigas, ácaros e pulgões com inseticidas;

1.3) Isolamento de área para evitar fluxo de pessoas não ligadas ao laboratório;

1.4) Troca periódica dos filtros do ar condicionado e da Câmara de Fluxo Laminar Horizontal;

1.5) Descarte de meios de cultura velhos (30 dias);

2) Higiene Pessoal

2.1) Amarrar os cabelos;

2.2) Aparar barba e unhas;

2.3) Retirar adereços: relógio, anel e pulseira;

2.4) Usar sapatos preferencialmente fechado;

2.5) Usar obrigatoriamente jaleco;

2.6) Lavar as mãos e o antebraço com água, sabão e álcool 70%;

2.7) Não se alimentar dentro do Laboratório.

5.3. Fases da Micropropagação

5.3.1. Manutenção de plantas matrizes

As plantas matrizes são plantas selecionadas para compor o banco de germoplasma, onde serão coletados materiais para a multiplicação *in vitro*. As plantas matrizes devem se encontrar livres de pragas e doenças no ato da coleta de explantes. Devem fornecer bons frutos para semeadura e uma boa propagação de brotos laterais com vistas à coleta e multiplicação *in vitro* através de multibrotação direta (indução de multiplicação de gema pré-existente).

Uma das maneiras de multiplicar um explante é via indução de gemas adventícias por organogênese direta

ou indireta. Essas gemas são denominadas adventícias por serem induzidas em regiões nas quais naturalmente, não se formariam. A forma indireta refere-se à fase de calogênese, ou seja, ocorre a formação de calos a qual antecede a regeneração das gemas adventícias.

5.3.2. Coleta de material vegetal (obtenção de explantes)

Nesse processo, deve-se levar em consideração a estação do ano para a coleta, pois o estádio fisiológico do explante varia de acordo com as estações (época de maior atividade vegetativa, reprodutiva ou de repouso). O tamanho do explante também influencia a taxa de contaminação por microorganismos: quanto maior o explante, maior a chance de contaminação, porém maiores são as chances de sobrevivência e crescimento do explante. Além disso, o processo de desinfestação, assim como o estado fisiológico da planta matriz e do explante, são fatores de extrema importância. Para a desinfestação pode ser utilizado o etanol e/ou compostos à base de cloro como, hipoclorito de sódio, dentre outros (Grattapaglia; Machado, 1998). Às vezes, desdiferenciação para existir precisa de organogênese indireta, como, por exemplo, quando se utilizam folhas como explantes (Grattapaglia; Machado, 1998).

5.3.2.1. Sementes

Quanto à semente, deve-se considerar o tamanho, coloração, presença de lesões, estado fitossanitário e idade fisiológica. A coleta de sementes é feita através do fruto. Deve-se observar primeiro se esse fruto tem uma boa maturação, para garantir a germinação.

Os frutos de orquídeas, quando maduros, liberam as sementes por três aberturas longitudinais (linhas de deiscência). Quando próximos da maturação, a região apical dos frutos começa a ficar amarelada e posteriormente se contrai deixando as aberturas mais evidentes, conforme **figura 3**. Os frutos sadios, quando ainda totalmente fechados (imaturos), conforme **figura 4**, apresentam um ambiente interno esterilizado para as sementes e, somente após a formação das aberturas, as sementes entram em contato com o meio externo e passam a ser contaminadas por patógenos comuns (fungos e bactérias).

5.3.2.2. Explantes vegetativos (brotos e folhas)

Na coleta dos brotos ou folhas para multibrotação ou indução de calos para embriogênese direta (processo no qual os embriões se formam diretamente a partir do explante original sem a formação de calo), deve-se coletar os brotos e folhas mais jovens e tenros e mais limpos (para facilitar a desinfecção) para obtenção de melhores resultados.

Para a escolha do explante, alguns parâmetros devem ser seguidos:

- Quanto à planta doadora: considerar a idade, aspecto fitossanitário, estado nutricional e produtividade. A experiência de um profissional na escolha da planta doadora traz mais eficácia e eficiência ao processo de multiplicação *in vitro*. Foram observados que explantes mais velhos, retirados de plantas cultivadas em estufas ou viveiros e/ou de explantes (cultivados *in vitro*) já diferenciados apresentam dificuldades para regeneração de novas plantas.
- Levar em consideração a estação do ano para a coleta, pois o estádio fisiológico do explante varia de acordo com as estações (época de maior atividade vegetativa, reprodutiva ou de repouso).

5.3.3. Desinfecção e tratamento do fruto e de sementes

Seguem abaixo alguns procedimentos de desinfecção de frutos fechados e abertos:



Figura 3. Fruto aberto. Fonte: Lílian Breda.



Figura 4. Fruto fechado de orquídea. Fonte: Lílian Breda.

5.3.3.1. Frutos fechados

Método 1:

A) Em Fluxo Laminar, colocar o fruto em um Becker de 100 ml e submergir em álcool 70% durante três minutos.

B) Logo após, submergir a cápsula em solução de hipoclorito de sódio 2% (preparado com água destilada autoclavada) por 25 minutos.

C) Lavar com água destilada estéril por três vezes.

D) Cortar os frutos em três partes no sentido longitudinal com lâmina de bisturi (esterilizado), número 10, em cima do papel de filtro autoclavado, conforme **figura 5**.

E) Retirar as sementes com ajuda da lâmina de bisturi.

F) Semear em placas de Petri contendo meio de cultura (№ 1 - vide item 6) para germinação. Basta depositar as sementes na superfície do meio de cultura Knudson C, conforme a **figura 6**.

G) Fechar as placas com filtro de PVC e levar para sala de cultura e manter em temperatura ambiente.

Método 2:

A) Em Fluxo Laminar, mergulhar o fruto em um Becker de 100ml com álcool acima de 90%.

B) Levar o fruto até uma chama e flambar até que o álcool seque completamente. Repetir o processo três vezes, conforme **figura 7**.

C) Cortar o fruto em três partes no sentido longitudinal sobre uma placa de Petri com papel de filtro autoclavado, semear em meio de cultura para germinação (№ 1 – vide item 6). Fechar as placas com filtro de PVC e levar para sala de cultura e manter em temperatura ambiente.

A germinação das sementes deve ocorrer em até 60 dias (dependendo das condições ambientais e da qualidade da semente). Após esse período as plântulas deverão ser transferidas para outro meio de cultura (№ 2 - vide item 6) para crescimento das mudas.

5.3.3.2. Frutos abertos

Para desinfectar frutos de orquídea, nos quais as aberturas já se efetivaram (expondo as sementes), o primeiro procedimento a ser realizado é a retirada do ápice ou da extremidade do fruto, para tentar minimizar o grau de infecção e a quantidade de sementes infectadas.

Método 1:

A) Em Fluxo Laminar, diluir para 50% a concentração de álcool acima de 90%.

B) Cortar o fruto em três partes no sentido longitudinal e retirar as sementes com ajuda da lâmina de bisturi.

C) Submergir as sementes e mantê-las submersas em álcool 50% durante 1 minuto.

D) Substituir a solução de álcool 50% por hipoclorito de sódio a 0,5%, durante dez minutos.

E) Lavar as sementes com água destilada estéril três vezes.

F) Ainda em fluxo laminar secar em placa de Petri, com papel de filtro.

G) Semear em placas com meio de cultura (№ 1 – vide item 6) para germinação.

H) Fechar as placas com filtro de PVC, levar para sala de cultura e manter a temperatura ambiente na sala de cultura.

Método 2:

A) Em Fluxo Laminar, cortar o fruto em três partes no sentido longitudinal e retirar as sementes com ajuda da lâmina de bisturi. Devem-se submergir as sementes em solução de sacarose a 5%.

B) Incubar por 12 horas entre 25 °C e 30 °C.

C) Retirar a solução de sacarose com uma seringa estéril.

D) Acrescentar e submergir as sementes em 3% de água oxigenada (10 volumes) e manter por 30 minutos.

E) Descartar a água oxigenada e lavar com água deionizada estéril por três vezes.

F) Retirar a solução de sacarose contendo as sementes lavadas com ajuda de seringa esterilizada e semear em placas de Petri contendo meio MS ½ ou N_3OK, conforme **figura 8** (vide item 6).

Obs.: As sementes que flutuam ou bóiam (aquelas que não ficam no fundo) devem ser desprezadas juntamente com o sobrenadante, pois são sementes estéreis (sem embrião).

Um fator importante a se mencionar são as perdas ocorridas com as possíveis contaminações das culturas, causadas por uma assepsia ineficiente do explante ou da cultura, ou ocorridas no momento de manipulação do material. Mesmo após a manipulação, alguns frascos podem ser perdidos, já que nem todos eles possuem uma vedação perfeita e o ar "contaminado" pode entrar em contato com a cultura (Cid, 2003).

5.3.4. Desinfecção de folhas e brotos

Método 1:

A) Em becker de 100 ml, submergir folhas e brotos



Figura 5. Manipulação do fruto para extração das sementes. Fonte: Lílian Breda.



Figura 6. Extração e semeadura das sementes. Fonte: Lílian Breda.

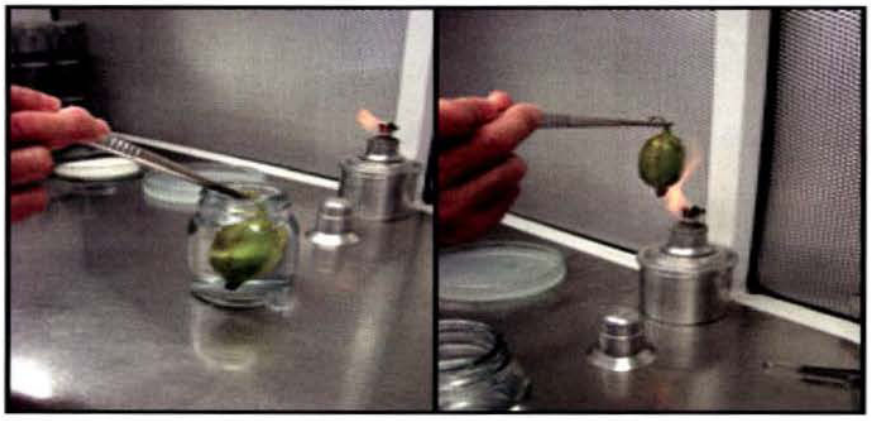

Figura 7. Desinfecção de fruto fechado e flambagem com álcool. Fonte: Lílian Breda.



Figura 8. Extração da solução de sacarose e transferência para o meio de cultura. Fonte: Lílian Breda.

selecionados em solução de álcool 70% por 3 minutos.

B) Lavar em água deionizada estéril.

C) Submergir o material em solução de hipoclorito de sódio 20%, por 20 minutos.

D) Lavar três vezes em água deionizada estéril.

E) Fazer cortes quadrados (de 1 cm^2) na folha ou brotos e incubar em placas de Petri com meio de cultura (vide Meio MS específico para essa etapa – item 6).

F) Incubar as culturas a 25 °C com iluminação (fotoperíodo) de 14 horas.

Repicar/transferir a cada mês para novo meio de cultura (vide item 6 - Meio MS para produção de calos), até o aparecimento dos primeiros calos.

5.3.5. Regeneração de plântulas a partir de calos

Para regenerar as plântulas, devem-se transferir os calos para um meio de cultura com metade da concentração de sacarose e sem reguladores de crescimento (vide Meio MS ½ específico para essa etapa – item 6). Todo o procedimento de transferência deve ser feito em Câmara de Fluxo Laminar Horizontal. Estes calos têm um alto poder de regeneração e produção de plântulas e constituem-se em excelente forma de se obter uma grande quantidade de mudas de orquídeas.

5.3.6. Multiplicação/Repicagem/Transferência

Para uma multiplicação *in vitro*, através da multibrotação devemos selecionar os explantes desenvolvidos, no qual devem ser selecionados e repicados/transferidos (**Figura 9**), usando o meio de cultura MS ½ adicionado de 5 a 10 mg/l de BAP (6-benzilaminopurina).



Figura 9. Frasco contendo mudas de orquídeas isoladas provenientes de atividades de repicagem ou transferência. Fonte: Lílian Breda

5.3.7. Elongamento

Para o elongamento e desenvolvimento dos explantes de orquídeas, essas devem ser acondicionadas utilizando-se o meio de cultura MS ½ acrescidos de (0,5 mg/l de BAP (6-benzilaminopurina) + 0,5 mg/l de GA_3 (ácido giberélico).

Com o crescimento dos explantes devem ser feitas repicagens para diluir em quantidades necessárias para o crescimento dos mesmos, com isso os explantes devem ser colocados em meio de cultura MS (macro 50% + micronutrientes sem alteração + vitaminas + sacarose 20% + Agar 01% + pH 5,2).

5.3.8. Enraizamento

Na fase de enraizamento *in vitro*, devem-se utilizar as seguintes concentrações para o meio de cultura:

- 0,5 mg/l da concentração de citocinina com meio de cultura MS (macro 50% + micronutrientes sem alteração + vitaminas + sacarose 20% + Agar 0,1% + pH 5,2) e 0,1 mg/l de NAA (ácido nafetalenacético).

Quando as raízes começarem a crescer, transferir o material para o meio de cultura sem reguladores (NAA e BAP) e adicionar 0,1% de carvão ativado, pois sem a transferência de meio de cultura ocorrerá a formação de calos nos ápices das raízes, prejudicando o crescimento da muda.

Após o enraizamento, como se pode ver na **figura 10**, e elongamento da parte aérea (folhas) as mudas estão prontas para serem aclimatadas em estufa.



Figura 10. Muda de *Cattleya nobilior* enraizada. Fonte: Lílian Breda.

5.3.9. Aclimatização

A aclimatização é o processo no qual as plântulas são retiradas do meio de cultura e plantadas em condições externas, nas quais a luminosidade é maior e a umidade é menor. Muitas plantas podem ser perdidas nesse processo, pois os principais obstáculos enfrentados pela planta durante a adaptação ao novo ambiente são a hidratação, a necessidade de desenvolver um sistema radicular (a necessidade de se adaptar o sistema radicular às novas condições para que haja um pleno desenvolvimento e absorção de nutrientes mais eficientes) que permita a absorção de nutrientes do substrato e a sujeição à ação de microorganismos.

As mudas de orquídeas germinadas, crescidas e enraizadas *in vitro*, estarão aptas à transferência para os viveiros de aclimatização, geralmente, após 360 dias. Entretanto, esse período pode variar de acordo com cada espécie de orquídea.

A fase de aclimatização das orquídeas germinadas *in vitro* é uma fase crítica na produção de mudas e nesse sentido têm sido testadas diferentes técnicas para favorecer o desenvolvimento individual de cada uma das espécies. Requisito comum entre as técnicas é o plantio das mudas em *Sphagnum* spp. (musgo vermelho, muito utilizado para aclimatar mudas de orquídeas em estufa).

A seção a seguir tem o propósito de mostrar as técnicas comumente utilizadas no JBB:

Os frascos com as mudas de orquídeas são colocados dentro da estufa e abertos permanecendo durante 15 dias com o meio de cultura. Na primeira e segunda semana, cada frasco deverá ser aspergido com solução contendo fungicida de contato à base de mancozebe (1g/l). Deve-se aspergir três vezes por semana (ou um dia sim e outro não). Na terceira semana deve-se utilizar fungicida juntamente com fertilizante. Deve-se regar uma vez por semana. A composição do fertilizante deve ser à base de adubo fosforado durante os dois primeiros meses. No terceiro mês, usar adubo nitrogenado durante dois anos até a primeira floração. Após essa etapa, mudar para adubo à base de NPK + 10 nutrientes (N-8%, P_2O_5 solúvel em água-9%, K_2O-9%, Mg-0,6%, S-1%, B-0,02%, Cl-1%, Co-0,005%, Cu-0,2%, Fe-0,15%, Mn-0,02%, Mo-0,005%, Zn-0,35%).

Cada espécie de orquídea necessita de um local específico dentro da estufa. Por exemplo, a espécie *Cattleya amethystoglossa* permanece na estufa em um local que possui um sombrite 70% duplo, sendo um local bastante sombreado porém quente. A *Cattleya labiata* permanece em um local com sombrite 70% com mais claridade já *Cattleya nobilior* permanece em um local com sombrite 50% e bastante luminosidade.

O clima do Distrito Federal possui estações do ano bem definidas, como o período da seca e chuvas. No JBB as orquídeas cultivadas em estufa são irrigadas uma vez ao dia por meio de aspersores aéreos durante 10 minutos, no início da manhã e 10 minutos no final da tarde, durante o período da seca. No período das chuvas, as regas devem ocorrer apenas duas vezes por semana, no início da manhã ou no final da tarde.

Após 15 dias na estufa, retirar as mudas de orquídeas dos frascos, colocá-las em uma bandeja de plástico com água e fungicida à base de macozeb (com 0,1% de fungicida). Com isso deve-se retirar o meio de cultura lavando-se as raízes com esse líquido e, depois de retirado todo o vestígio do meio de cultura, colocá-las em bandejas de polietileno com 72 células (ou menos, de acordo com o numero de mudas disponíveis), contendo mistura de *Sphagnum* spp. com 50% de fibras de coco desfibrado. Por precaução, é necessário que a fibra de coco esteja desprovida do maior número possível de fitopatógenos e, para isso, deve ser fervida água antes de ser utilizada na mistura.

Os pesquisadores do JBB, em 2007, testaram diversas técnicas de aclimatização para diferentes espécies de orquídeas, tais como: *Cattleya labiata*, *Cattleya nobilior* e *Cattleya amethystoglossa*. Sempre foi uma preocupação constante do JBB a utilização de substratos alternativos provenientes de recursos naturais existentes dentro da área do JBB por questões práticas, ecológicas e econômicas. A seguir, apresentaremos alguns dos resultados identificando a espécie de orquídea e a mistura de substratos utilizada.

A *Cattleya labiata* parece ser uma espécie de fácil aclimatização. Os resultados mais significativos foram alcançados através do uso de bandejas com armação de ripa de madeira, fundo coberto de sombrite e substratos compostos por diferentes misturas, tais como: mistura de corticeira com *Sphagnum* spp. e fibra de coco desfibrado; fibras fervida de casca ou de sementes de árvore ou palmeiras misturadas com *Sphagnum* spp. ou, ainda, casca de arroz lavada misturada com *Sphagnum* spp. e fibra de coco desfibrado.

O uso de bandejas é justificado pelo fato de comportar maior quantidade de mudas do que vasos de cerâmica (número 12, por exemplo). A bandeja de polietileno e a bandeja de isopor são ótimas para aclimatização, porém ocupam bastante espaço na estufa.

A *Cattleya nobilior* apresentou os melhores índices de desenvolvimento em vasos coletivos de cerâmica (número 12), em vasos individuais (número 7) e bandeja de polietileno com substrato composto por mistura de corticeira (*Bulnesia sarmientoi* ou

Enterolobium gummiferum) bem triturada e *Sphagnum* spp.

A *Cattleya amethystoglossa* deve ser aclimatada em vaso de cerâmica individual ou bandeja de polietileno. Como as raízes necessitam de maior aeração, o substrato mais adequado foi a mistura de uma quantidade maior de corticeira (*Bulnesia sarmientoi* ou *Enterolobium gummiferum*) bem triturada com pouca fibra de coco desfibrada. O cultivador deve estar atento para evitar a compactação do substrato.

5.4. Tipos de recipientes e substratos: vantagens e desvantagens

Vasos de cerâmica:

Vasos coletivos de cerâmica (tamanho número 12) (**Figura 11**), com drenagem de 1/3 de seixo lavado e cobertura de *Sphagnum* spp. e corticeira (*Bulnesia sarmientoi* e/ou *Enterolobium gummiferum*).

Vantagem: O espaço na estufa é otimizado, pois em vasos com essas dimensões cabem aproximadamente 20 mudas de orquídeas.

Desvantagem: No momento da retirada das mudas, para transferência para vasos individuais, pode haver o rompimento das raízes, pois é comum que as raízes grudem uma nas outras devido à proximidade das mudas. Para que isso seja amenizado pode reduzir o número de mudas por vaso.



Figura 11. Vaso coletivo de cerâmica (número 12) com substrato misturado de *Sphagnum* spp. e corticeira (*Bulnesia sarmientoi* e/ou *Enterolobium gummiferum* e mudas de *Cattleya labiata* . Fonte: Lílian Breda.

- Vasos individuais de cerâmica (número 7). (**Figura 12**) com drenagem de 1/3 de seixo lavado e cobertura de *Sphagnum* spp. e corticeira (*Bulnesia sarmientoi* e/ou *Enterolobium gummiferum*).

Vantagem: Devido às dimensões do vaso, as mudas são individualizadas, favorecendo o seu desenvolvimento.

Desvantagens:

a) As raízes podem grudar na parede do vaso de cerâmica, causando o rompimento durante a retirada da orquídea;

b) O vaso de cerâmica individual toma muito espaço nas prateleiras da estufa.



Figura 12. Vaso individual de cerâmica (número 7) com substrato misturado de *Sphagnum* spp. e corticeira (*Bulnesia sarmientoi* e/ou *Enterolobium gummiferum* e mudas de de *Cattleya labiata*. Fonte: Lílian Breda.

• Bandejas de isopor:

Vantagens: a) As mudas de orquídeas estão em células individualizadas, sendo que não há competição por espaço, para crescimento de raízes; b) O isopor serve como isolante térmico, favorecendo o controle de temperatura no interior das células, deixando o substrato mais úmido, por mais tempo (**Figura 13**).

Desvantagens:

a) No momento da retirada da muda da célula, algumas raízes podem grudar no isopor, causando o rompimento das mesmas.

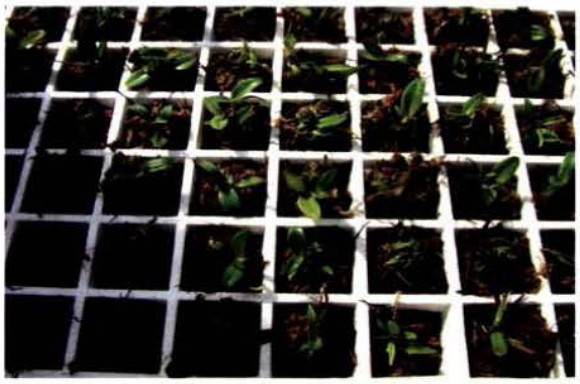

Figura 13. Bandeja de isopor (com 80 células) e plantio de mudas em substrato *Sphagnum* spp. Fonte: Lílian Breda

• Bandejas com armação (perímetro) de madeira e com tela de sombrite 50% no fundo:

Desenvolvimento inicial de mudas para posterior transferência para vasos.

Vantagem: O espaço na estufa é otimizado, pois, por esse método, cabem aproximadamente 100 mudas de orquídeas em uma bandeja com área de 38 x 68 cm. Caso algumas raízes consigam ultrapassar a base (trama ou malha do sombrite), basta cortar o pedaço do sombrite que contém as raízes que a malha ou trama rapidamente se desmanchará, evitando danos às raízes.

Desvantagem: Devido ao grande numero de mudas por área, no momento de sua retirada para transferência para outro tipo de recipiente, as raízes podem estar grudadas uma as outras, provocando o rompimento das raízes (**Figura 14**).



Figura 14. Bandeja com armação de madeira com tela de sombrite 50% no fundo. Fonte: Lílian Breda.

• Bandejas de polietileno (com 72 células):

Vantagem: As mudas de orquídeas estão em células individualizadas, favorecendo o seu desenvolvimento sem que cause danos às raízes, pois a bandeja de polietileno é lisa, não deixa as raízes grudarem a superfície. Outra vantagem que a bandeja em polietileno apresenta sobre a bandeja de isopor é que, ao serem empilhadas, as bandejas se encaixam umas nas outras reduzindo o volume a ser transportado, barateando o frete e facilitando a estocagem. Além dessas, são mais resistentes à quebra e desgaste e menos porosas, portanto, mais duráveis e mais fáceis de serem esterilizadas. (**Figura 15**).

Desvantagem: A bandeja de polietileno não retém calor, tornando a muda suscetível a alterações de temperatura. A manutenção da muda em estufa com controle de temperatura e umidade minimiza esse impacto.



Figura 15. Bandeja de polietileno (com 72 células). Fonte: Lílian Breda.

6. Preparo de meios de cultura

6.1. Meios de Cultura utilizados no Laboratório do JBB, composição e finalidade

A) Meios de cultura Nº1 – Knudson C: utilizado para a germinação de sementes de orquídeas:

• Macronutrientes

Reagentes	Fórmulas	Concentrações
Sulfato de amônio	$(NH_4)SO_4$	500 mg/l
Fosfato de potássio	KH_2PO_4	250 mg/l
Nitrato de cálcio	$Ca(NO_3)_2.4H2O$	1 g/l
Sulfato de magnésio	$MgSO_4.7H_2O$	250 mg/l

• Ferro EDTA

Reagentes	Fórmulas	Concentrações
Sulfato ferroso	$FeSO_4.7H_2O$	27,8 mg/l
Na_2EDTA	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$	37,3 mg/l

• Micronutrientes

Reagentes	Fórmulas	Concentrações
Iodeto de potássio	KI	0,75 mg/l
Ácido bórico	H_3BO_3	3 mg/l
Sulfato de manganês	$MnSO_4.H_2O$	10 mg/l
Sulfato de zinco	$ZnSO_4.7H_2O$	2 mg/l
Molibdato de sódio	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25 mg/l
Sulfato de cobre	$CuSO_4.5H_2O$	0,025 mg/l
Cloreto de cobalto	$CoCl_2.6H_2O$	0,025 mg/l

• Vitaminas

Reagentes	Fórmulas	Concentrações
Myo-inositol	$C_6H_{12}O_6$	100 mg/l
Ácido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	1 mg/l
Piridoxina	$C_8H_{11}NO_3.HCl$	1 mg/l
Tiamina	$C_{12}H_{17}Cl_2N_4O_5.HCl$	10 mg/l

• Outros

Reagentes	Concentrações
Sacarose 2%	20 g/l
Agar 0,7%	07 g/l
pH	5,2 a 5,8

B) Meios de cultura Nº 2 – Knudson C: utilizado para crescimento de plântulas de orquídeas.

• Macronutrientes

Reagentes	Fórmulas	Concentrações
Nitrato de potássio	KNO_3	1.900 mg/l
Nitrato de amônio	NH_4NO_3	1.650 mg/l
Cloreto de cálcio	$CaCl_2.2H_2O$	440 mg/l
Sulfato de magnésio	$MgSO_4.7H_2O$	370 mg/l
Fosfato de potássio	KH_2PO_4	170 mg/l
Na_2EDTA	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$	37,3 mg/l
Sulfato ferroso	$FeSO_4.7H_2O$	27,8 mg/l

• Micronutrientes

Reagentes	Fórmulas	Concentrações
Iodeto de potássio	KI	0,83 mg/l
Ácido bórico	H_3BO_3	6,2 mg/l
Sulfato de manganês	$MnSO_4.H_2O$	16,9 mg/l
Sulfato de zinco	$ZnSO_4.7H_2O$	8,6 mg/l
Molibdato de sódio	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25 mg/l
Sulfato de cobre	$CuSO_4.5H_2O$	0,025 mg/l
Cloreto de cobalto	$CoCl_2.6H_2O$	0,025 mg/l

• Vitaminas

Reagentes	Fórmulas	Concentrações
Myo-inositol	$C_6H_{12}O_6$	100 mg/l
Ácido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	0,5 mg/l
Piridoxina	$C_8H_{11}NO_3.HCl$	0,5 mg/l
Tiamina	$C_{12}H_{17}Cl_2N_4O_5.HCl$	0,1 mg/l
Glicina	$C_2H_5NO_2$	2 mg/l

• Outros

Reagentes	Concentrações
Sacarose 2%	20 g/l
Agar 0,7%	07 g/l
Carvão ativado 0,1%	01 g/l
pH	5,2 a 5,8

C) Meio de Cultura N°3 - ($N_3$0K) Margara (1989): utilizado para germinação de sementes de orquídeas.

Reagentes		Concentração (mg/l)
$CaNO_3.4H_2O$		590
KNO_3		1313
$MgSO_4.7H_2O$		246
KH_2PO_4		136
$NaH_2PO_4.H_2O$		170
$MnSO_4.H_2O$		16,9
$ZnSO_4.7H_2O$		8,6
$CuSO_4.5H_2O$		0,025
$CoCl_2.6H_2O$		0,025
H_3BO_3		6,2
Kl		0,83
$NaMoO_4.2H_2O$		0,25
KCl		74,5
$FeSO_4.7H_2O$		27,8
NaEDTA		37,3
Myo-inositol		100
Sacarose		2%
Bap		05
Vitaminas do meio MS	Tiamina	05
	Piridoxina	25
	Nicotínico	25
pH		5,2 a 5,8

Obs.: Vários meios de cultura são utilizados para germinação de sementes de orquídeas, como: Knudson C, MS modificado e o da Margara.

Existem formulações comerciais prontas de alguns meios nutritivos mais comuns como MS, White, McCown e WPM. Esses produtos existem na forma de pó contendo somente os sais minerais e deverão ser acrescidos de alguns componentes orgânicos. Os pacotes são encontrados no Brasil e no exterior, especialmente nos Estados Unidos e Europa, para o preparo de 1 a 50 litros de meio, bastando que seja adicionada água, algum outro suplemento (quando necessário) e o ajuste do pH. Os meios de cultura prontos deverão ficar estocados por um período máximo de um mês (Caramaschi, 2005).

6.2. Solução-estoque

6.2.1. Preparação de Solução-estoque

Antes de discorrermos sobre os meios nutritivos, faz-se necessária a apresentação de algumas orientações quanto ao preparo de soluções-estoques.

Os estoques de macronutrientes devem-se pesar as soluções $MgSO_4$ (sulfato de magnésio) + KH_2PO_4 (fosfato de potássio) que ficaram no mesmo frasco, diluir em um becker de 100ml essa solução, deve-se completar para 1 litro e pesar separado o $CaCl_2$ (cloreto de cálcio), depois de diluído completar para 1 litro. O reagente KNO_3 (nitrato de potássio) e NH_4NO_3 (nitrato de amônia) devem ser pesados e adicionados diretamente no meio de cultura em preparo. A solução de $MgSO_4$, KH_2PO_4 e $CaCl_2$ ficam armazenadas em frascos na geladeira.

Solução-estoque (50X)

Reagentes	**Quantidades**
(*)NH_4NO_3	1.650mg/l
(*)KNO_3	1.900mg/l
$MgSO_4$	18,5g/l
KH_2PO_4	8,5g/l
$CaCl_2$	22,0g/l

OBS.: (*) Esses reagentes, como são em alta concentração, são pesados, diluídos e acrescentados diretamente no meio de cultura em preparo.

Soluções de fosfato e cálcio normalmente precipitam caso sejam misturadas em pH acima de 6. Dessa forma, soluções-estoque isoladas de sais de cálcio, nitrato de cálcio ou cloreto de cálcio podem ajudar a evitar problemas de precipitação. As soluções-estoque são preparadas com 10 a 50 vezes a concentração final do meio.

O estoque de Fe-EDTA é preparado da seguinte maneira: pesar 3,73g de $Na_2EDTA.2H_2O$ e dissolver em 500ml de água destilada. Após a dissolução, manter a agitação e adicionar lentamente 2,78g de $FeSO_4.7H_2O$ e dissolver em 500ml. Após a dissolução, completar o volume para 1000ml e agitar novamente. Colocar em frascos escuros, cobertos com papel alumínio e armazenar na geladeira.

O estoque de micronutrientes devem-se pesar individualmente os reagentes: KI (iodeto de potássio) + H_3BO_3 (ácido bórico) + $MnSO_4$ (sulfato de manganês) + $ZnSO_4$ (sulfato de zinco) + $NaMoO_4$ (molibdato de sódio) + $CuSO_4$ (sulfato de cobre) + $CoCl_2$ (cloreto de cobalto) e diluídos em um Becker com 50ml de água deionizada e acrescentar no balão volumétrico de 1 litro todas as soluções. Os reagentes $CuSO_4$ e $CoCl_2$ devem ser preparados em um subestoque, pois a concentração é de apenas 2,5mg/l. Todas as soluções diluídas e acrecentadas no balão volumétrico devem ser completadas para 1 litro, sendo acondicionadas em um frasco e armazenada na geladeira.

Solução-estoque (100X)

Reagentes	Quantidades
KI	83mg/l
H_3BO_3	620mg/l
$MnSO_4$	1.690mg/l
ZnSO4	860mg/l
$NaMoO_4$	25mg/l
(*)$CuSO_4$	1ml
(*)$CoCl_2$	1ml

OBS.: (*) Esses reagentes devem ser preparados em um subestoque, pois as quantidades são mínimas não tendo uma precisão na solução final. O subestoque deve ser pesado 250 mg/100 ml. Tomando-se 1 ml de cada solução, você estará pegando 2,5mg que é o necessário para acrescentar na solução de 1 litro.

O estoque de vitaminas e aminoácidos é preparado a partir da dissolução de cada elemento individualmente em 50 ml de água deionizada em cada reagente pesado, depois serão colocadas em um balão volumétrico e completadas para 1 litro, depois dividir em frascos de 50ml e armazenados no frezer.

Solução-estoque (100X)

Reagentes	Quantidades
Inositol	10.000mg/l
Ácido nicotínico	50mg/l
Piridoxina	50mg/l
Tiamina	10mg/l
Glicina	200mg/l

O uso de determinadas vitaminas e de hormônios em laboratório exige que as esterilizações sejam realizadas a frio (filtragem), pois são geralmente substâncias termolábeis. Portanto, essas vitaminas e hormônios devem ser adicionados depois de o meio ter sido autoclavado. Exemplos: Vitaminas (ácido ascórbico); Auxinas (AIA, AIB); Citocininas (TDZ, 2ip e Cinetina); Giberilina (GA_3).

6.2.1.1. Soluções-Estoque de Substâncias utilizadas para Calibragem e Funcionamento de Aparelhos de Precisão, para ajustes de Soluções e outros fins • Solução-estoque de HCl 1N (100ml)

- Usar beker e proveta de vidro;
- Abrir o vidro de HCl dentro do exaustor;
- Retirar 8,3 ml de HCl;
- Misturar em 50 ml de água destilada;
- Obs.: colocar o HCl na água, aos poucos;
- Completar para 100 ml.

• Solução-estoque de KOH 1N (100ml)
- Pesar 5,6g de KOH;
- Dissolver em 50 ml de água destilada;
- Completar para 100 ml.

• Solução-estoque de NaOH 1N (100ml)
- Pesar 4,0g de NaOH;
- Dissolver em 50 ml de água destilada;
- Completar para 100 ml.

• Solução-estoque de álcool 70%
- Retirar 700 ml de álcool 92,8°;
- Acrescentar 300 ml de água destilada.

• Solução de descanso para eletrodo do potenciômetro
- geralmente usa-se KCl 3M.

• **Solução-estoque de hormônios**

- Dissolução dos hormônios:

Dissolver em HCl	Dissolver em KOH ou NaOH
Cinetina	AIA
BAP	ANA
2iP	AIB
Zeatina	2,4-D
Giberilina	GA_3

Pingar duas a quatro gotas do solvente indicado para dissolver o hormônio e completar com água. Às vezes, é necessário aquecer levemente a solução para a completa dissolução.

Exemplos:

•Solução de estoque 1mg/ml de BAP

- Pesar 50mg de BAP;
- Dissolver em duas a quatro gotas de HCl 1N e colocar 10ml de água; agitar (aquecer, se precisar);
- Completar para 50 ml de água;
- Identificar o frasco com BAP (1mg/ml) e datar;
- Guardar no congelador ou levar à capela para filtrar e depois congelar. Se for filtrar, o frasco deve estar autoclavado.

• Solução de estoque 0,1 mg/ml de AIB

- Pesar 05 mg de AIB;
- Dissolver em duas a quatro gotas de KOH ou NaOH 1N e colocar 10ml de água e agitar;
- Completar para 50 ml de água;
- Identificar o frasco com AIB (0,1mg/ml) e datar;
- Guardar no congelador ou levar à capela para filtrar e depois congelar. Se for filtrar, o frasco deve estar autoclavado.

• Solução de estoque 0,01 mg/ml de GA_3

- Pesar 0,5 mg de GA_3;
- Dissolver em duas a quatro gotas de KOH ou NaOH 1N e colocar 10 ml de água e agitar;
- Completar para 50 ml de água;
- Identificar o frasco com GA_3 (0,01 mg/ml) e datar;
- Guardar no congelador ou levar à capela para filtrar e depois congelar. Se for filtrar, o frasco deve estar autoclavado.

6.2.1.2. Solução-estoque de FeEDTA

De acordo com, Caramaschi, 2005, deve-se pesar e dissolver cada reagente separadamente. Depois de dissolvidos, completar cada um para 500 ml. Sob agitação, verter a solução de $FeSO_4$ na solução de Na_2EDTA, aos poucos. Guardar na geladeira em frasco escuro e/ou envolvido com papel alumínio. Identificar o frasco com nome da solução, concentração (neste caso 10mm) e datar.

Reagentes	10mm
Na_2EDTA	3,73g
$FeSO_4.7H_2O$	2,78g

Guardar na geladeira.

O volume a ser tomado depende do meio de cultura usado:

Meio	10mm
MS	10 ml/l
½ MS	5 ml/l
KC	10 ml/l
VW	10 ml/l

COMPOSIÇÃO DIFERENCIADA DO MEIO MS, DE ACORDO COM A ETAPA DE DESENVOLVIMENTO:

Meio MS para produção de calos

- MS (macronutrientes + micronutrientes + FeEDTA + vitaminas + sacarose 2% e gelrite 0,2% + 0,5 mg/l de NAA + 1 mg/l BAP)

Meio ½ MS para regeneração da plântula

- ½ MS (macronutrientes + micronutrientes + FeEDTA + vitaminas + 1% suco de maçã + 1% batata cozida amassada + 0,2% gelrite ou gellan gum + pH 5,4)

7. Aclimatização

O processo de aclimatização de orquídeas desenvolvido no Jardim Botânico de Brasília será repassado como dicas. Foi preciso habilidade para compor uma estrutura de funcionamento dentro da realidade do JBB e arte para observar as plantas e perceber suas necessidades. Trabalhamos principalmente com espécies epífitas ameaçadas de extinção.

7.1. O Processo

Quando as plântulas são retiradas dos frascos do laboratório estão muito entumecidas e enoveladas, com isso têm o risco de quebrar, principalmente as plântulas que possuem raízes grandes.

• **1º Passo:** São espalhadas cuidadosamente sobre uma cama úmida preparada com fibra de coco e *Sphagnum* spp.

• **2º Passo:** Deixar por um ou dois dias num espaço arejado dentro da estufa.

As plântulas vão perder um pouco d'água e ficarão mais flexíveis, facilitando o manuseio.

• **3º Passo:** Foram separadas as plântulas por tamanhos (pequena, média e grande).

As mudas maiores vão para vasos coletivos e quando aparecem os primeiros brotos são transplantadas para pequenos vasos (nº 0) individuais e depois para o viveiro. Nesta fase fixamos as plantas nos vasos com lascas de cortiça (casca de árvores tombadas/morta da espécie *Bulnesia sarmientoi* e *Enterolobium gummiferum*) com um pouco de substrato de fibra de coco e *Sphagnum* spp. envolvendo a raiz para garantir proteção e umidade até que elas se fixem na cortiça.

As mudas médias são acomodadas em bandejas de plástico com 92 células e depois para vasos coletivos, ou diretamente para vasos individuais – depende do desenvolvimento. As mudas menores são espalhadas sobre uma cama úmida de fibra e *Sphagnum* spp. As que sobrevivem a esse processo vão seguindo as mesmas etapas das demais plantas.

7.2. Água

Ao contrário das plantas adultas que suportam longos períodos de estiagem, as que estão em fase de aclimatização (plântulas) necessitam sempre de muita água. Por isso o uso de um substrato com alta capacidade de drenagem é fundamental, já que existe o indesejável acúmulo de água nas raízes. Lembrando que essa experiência é feita dentro do clima seco do nosso Planalto Central, onde o frio e a alta incidência dos raios solares no inverno são danosos as pequenas plântulas em fase de aclimatização. Por outro lado, o excesso de água no período das chuvas não trouxe maiores problemas. Não foi necessário promover uma irrigação extra na estufa. Nesta fase as plantas não suportam períodos de estiagem, mesmo que por poucos dias. A recuperação é lenta e a perda pode chegar a mais de 80%.

7.3. Controle de Pragas

O controle de pragas das plântulas na estufa foi feito da seguinte maneira:

• **1ª e 2ª Semana:** aplicação de fungicida à base de mancozebe, três vezes na semana;

• **3ª Semana:** aplicação de fungicida à base de mancozebe, uma vez por semana e fertilizante deve ser à base de adubo fosforado durante dois meses. No terceiro mês, usar adubo nitrogenado durante dois anos até surgir a floração. Após essa etapa mudar o tipo de adubo.

• Utilizamos óleo de nim para retirar cochonilhas e pulgão e urina de vaca para retirar ferrugem das folhas.

A experiência mais importante, neste caso, foi com plântulas que saem do Laboratório já infestadas por fungos e bactérias tendo sido, antes, autoclavadas. Aproveitamos as plântulas contaminadas dando um tratamento com água sanitária diluída com água destilada retirando o fungo e bactéria e aclimatamos da mesma forma que as plântulas não contaminadas.

Se a contaminação *in vitro* se dava com as plântulas ainda muito pequenas, sem um sistema foliar e radicular bem desenvolvido o aproveitamento era mínimo. Por outro lado, se a contaminação acontecia tardiamente quando as plântulas já estavam bem desenvolvidas o aproveitamento era grande. Semelhante as plântulas sem contaminação.

7.4. O Substrato

No começo trabalhamos com uma mistura de *Sphagnum* spp. e fibra de xaxim, mais tarde substituindo por fibra de coco. Utilizamos, também, casca de árvores (cortiça) trituradas e em lascas (retiradas de árvores tombadas).

A espécie *Cattleya labiata* se desenvolve bem em um substrato de fibra de coco e *Sphagnum* spp.

A espécie de *Cattleya nobilior* se desenvolve melhor com madeira triturada.

Em qualquer das situações o importante no substrato é que ele tenha uma ótima capacidade de drenagem e arejamento, evitando o acúmulo de água nas raízes. Com exceção, da *Cattleya amesthystoglossa* que foi plantada em substrato de carvão, madeira triturada e fibra de coco. Nas demais espécies testadas foram usadas uma mistura à base de fibra de coco, *Sphagnum* spp. e cortiça triturada.

7.5. O Aproveitamento

O aproveitamento esteve ligado à forma como as plântulas saem dos frascos do Laboratório.

Quando abrimos um frasco temos desde plântulas grandes bem formadas até aquelas que germinaram mais tarde e não se desenvolveram adequadamente.

Nas plântulas maiores o aproveitamento é de aproximadamente 90%.

Nas plântulas médias o aproveitamento é de proximadamente 70 a 80%.

Nas plântulas pequenas o aproveitamento é de 10 a 20%.

Se esse tipo de trabalho visar à comercialização, recomendamos que as plântulas muito pequenas e mal formadas, sejam descartadas, pois o aproveitamento não compensa.

7.6. Plantio de Orquídeas em Vaso

7.6.1. O Melhor Modo de Plantio

O xaxim desfibrado é considerado o melhor substrato para o cultivo de orquídeas. Entretanto, a exploração indevida desse recurso (exclusivamente extrativismo) colocou o xaxim (*Dicksonia sellowiana*

(Presl.) Hook.), na lista oficial da flora ameaçada de extinção do Ministério do Meio Ambiente. Um substrato alternativo para o xaxim é a fibra de coco, que pode ser utilizada da mesma forma, tanto em fibras agregadas quanto desfibrado e, por esse motivo, será aqui indicado para esse propósito. O ideal é a fibra de coco desfibrado, pois é fácil de manusear, permite o maior contato das raízes e é fácil de misturar com outros substratos. Todos os substratos, como: fibra de coco agregada ou desfibrada e *Sphagnum* spp. devem ser esterilizados (fervidos ou autoclavados), antes da utilização.

O carvão vegetal é utilizado como complemento de substrato para algumas espécies, como *Cattleya amethystoglossa*, na fase de aclimatização.

A casca de *Pinus* spp. deve ser fervida antes de ser utilizada, com o propósito de se retirar o óleo e o exudado presentes na mesma, pois essas substâncias prejudicam o desenvolvimento das mudas. A casca de pinheiro é utilizada como complemento de substrato para algumas espécies, como *Cattleya labiata*.

A corticeira (*Bulnesia sarmientoi* e/ou *Enterolobium gummiferum*) é utilizada em misturas de substratos. Deve ser esterilizada da seguinte maneira: para cada 1 litro de água, 1 tampa de água sanitária e deixando os pedaços submersos por, no mínimo, 30 minutos.

Como recipientes a serem utilizados, devemos dar preferência aos vasos de cerâmica perfurados no fundo e lateralmente e que apresentem textura bem porosa. Para as plantas que gostam de mais umidade, podemos utilizar vasos de plástico, também, perfurados no fundo. Uma alternativa, para as plantas que apresentam muitas raízes aéreas ou que apreciam muita ventilação, é o uso de cachepô (cesto de madeira em sarrafinhos).

Ao cultivar suas orquídeas, independentemente do tipo de vaso indicado (exceto para cachepôs), não se esqueça de colocar no fundo, em até um terço do recipiente, cacos de cerâmica limpos e picados, ou brita (sem a cal), ou isopor picado, seixo de rio ou ainda pedregulhos ou pequenas pedras com o objetivo de se obter uma boa drenagem. Os *seedlings* (plantas pequenas que ainda não floresceram) prosperam melhor em pequenos vasos plásticos e que tenham como substrato o *Sphagnum* spp.

8. TIPOS DE SUBSTRATOS

8.1. Para o Replantio de Orquídeas

Primeiro passo é separar o vaso a ser replantado (**Figura 16**); escolher um vaso novo e preenche-lo até 1/3 com cacos no fundo do vaso (**Figura 17**); completar vaso novo com fibra de coco desfibrada (**Figura 18**); retirar a planta do vaso velho (**Figura 19**); retirar o substrato velho da planta (**Figura 20**); retirar as bainhas secas (**Figura 21**); lavar e escovar a planta (**Figura 22 e 23**); esterilizar a tesoura de corte (**Figura 24**); cortar as raízes velhas (uns 3 cm de comprimento) com cuidado para não causar danos às raízes novas (**Figura 25**); fixar a planta ao substrato (tendo o cuidado de manter a maior parte do rizoma em contato com o substrato) usando palitos de bambu ou com algum tipo de fio encapado (**Figura 27**), com o cuidado de deixar a parte velha da planta encostada na borda do vaso e a brotação nova ou a "frente" com espaço suficiente para o crescimento de outros brotos (**Figura 28**).

8.1.1. Maneiras de Plantio

1- Antes do plantio, deixar todo o tipo de substrato (fibra de coco desfibrada, casca de *Pinus* spp., folhas secas) e o próprio vaso de molho, no mínimo, uma hora com água sanitária (1/3 de copo para 8 litros de água). Enxaguar em água limpa, quantas vezes forem necessárias, para retirar os resíduos da água sanitária.

2- Utilizar os materiais descritos no item anterior (já escorridos) na seguinte ordem, a partir do fundo do vaso:

1.Certificar-se que o vaso desejado possui furo(s) de drenagem no fundo

2.Quando o vaso for de plástico ou de barro (principalmente o cônico), colocar no fundo: cacos de tijolos, brita, pedregulhos ou equivalentes. (Figura 17)

3.Uma camada de fibra de coco desfibrada.

4.Uma camada de casca de pinus.

5.Uma camada de folhas secas.

6.Uma camada de carvão triturado (moinha de carvão).

7.Meia colher (sopa) de farinha de osso ou outro equivalente.

8.Uma camada de fibra de coco desfibrada, até faltar dois dedos para preencher o vaso.

9.Colocar a muda já preparada na posição correta e prendê-la.

10.Completar com fibra de coco desfibrada (não cobrir totalmente o rizoma).

11.Trançar varetas de bambu ou algum tipo de fio encapado para fixar a muda.

12. Colocar tutores (caso necessário) e amarrar os caules e folhas (posição vertical).

3- Depois de pronto, mergulhar o vaso completo em tanque ou balde, ou regar em torneira. Retirar e deixar escorrer.

4-Conservar o vaso em lugar coberto, sem incidência do sol direto, por um período de 7 (sete) a 10 (dez) dias.

5- Nesse período não são necessárias regas

copiosas, somente borrifar as folhas diariamente.

6- Depois desse período, levar o vaso para o orquidário, evitando o sol direto.

7- Etiquetar o vaso com as seguintes informações:

a) O número do vaso.

b) Data do envasamento.

c) Nome da Orquídea.

d) Data de floração.

8- Para melhor controle, usar um fichário com todos os dados da orquídea e seu histórico.

9- Adubar somente depois de 06 (seis) meses.



Figura 16. Vaso a ser mudado.
Foto: Wilma Pizza.



Figura 17. Colocar cacos no fundo do vaso.
Foto: Wilma Pizza, Brasília.



Figura 18. Completar vaso novo com fibra de coco desfibrada.
Foto: Manuel Lourenço, Portugal.

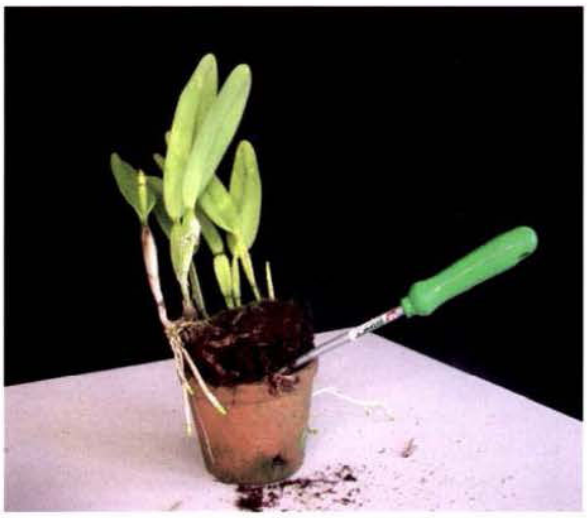

Figura 19. Retirar a planta do vaso velho.
Foto: Wilma Pizza, Brasília.



Figura 20. Retirar o substrato velho da planta.
Foto: Wilma Pizza.



Figura 21. Retirar as bainhas secas.
Foto: Wilma Pizza.



Figura 22. Lavar com uma escova macia.
Foto: Wilma Pizza.

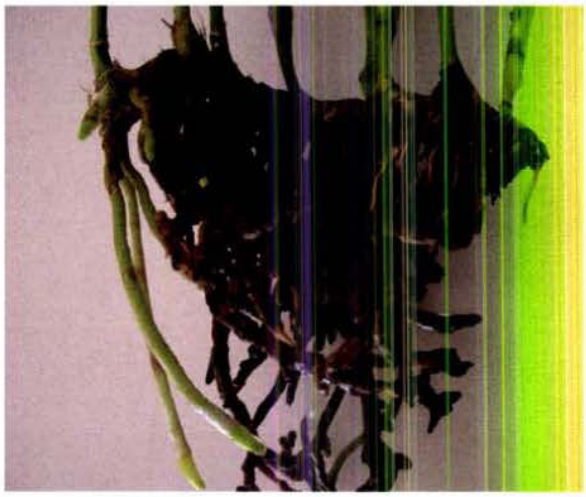

Figura 23. Planta limpa.
Foto: Wilma Pizza.

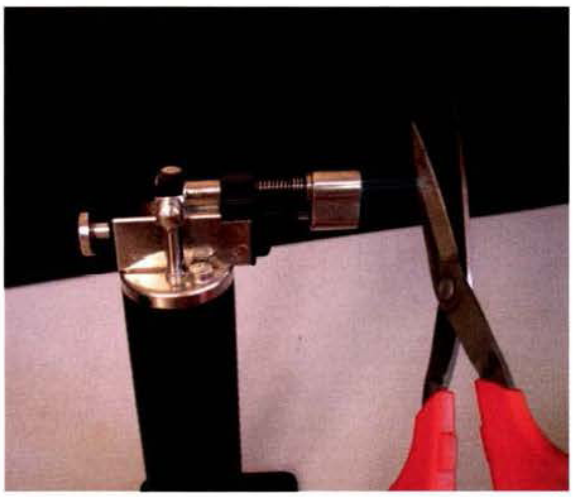

Figura 24. Esterilizar a tesoura de corte.
Foto: Wilma Pizza.

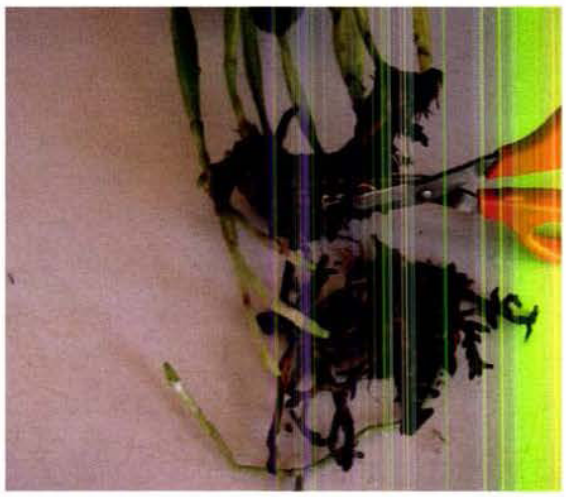

Figura 25. Cortar as raízes velhas, deixar ca. 3cm e manter as novas
Foto: Wilma Pizza.



Figura 26. Raízes cortadas.
Foto: Wilma Pizza.



Figura 27. Amarrar a planta com 1 fio.
Foto: Wilma Pizza.



Figura 28. O broto novo sempre na frente.
Foto: Wilma Pizza.



Figura 29. Brotos novos.
Foto: Wilma Pizza.

8.1.2. Recomendações sobre os Vasos

8.1.2.1. Vasos de Fibra de Coco

a) Ao comprar, procurar aquele mais rígido.

b) Colocar o vaso de fibra de coco de molho (submerso) em água sanitária (1/3 de copo para 8 litros de água).

c) Retirar após uma hora. Deixar escorrer (posição inclinada).

d) Seguir as dicas sobre a ordem dos substratos até o plantio.

8.1.2.2. Vasos de Barro ou de Plástico

a) Para certas orquídeas, o ideal é o vaso de barro redondo com furos de drenagem no fundo e laterais.

b) Caso os furos sejam muito grandes, cobri-los, por dentro, com tela (mosquiteiro) usando cola de sapateiro, evitando assim a saída de substrato e entrada de insetos.

c) Medir a distância entre os furos para o gancho de pendurar.

d) Sendo o vaso de plástico, as pedras servirão também para dar equilíbrio.

e) Para furar um vaso de plástico use uma haste de metal pontiaguda, aquecida na chama do fogão.

8.1.2.3. Vaso Cachepô

Praticamente já está pronto para uso. Verificar se as frestas não são muito largas, pois nesse caso o substrato pode ser perdido. Em caso positivo, procure tampá-las (Nossas Orquídeas, 2011).

8.1.3. Recomendações sobre o Substrato

8.1.3.1. Fibra de Coco Desfibrada

a) Deve ser peneirada antes de ser colocada de molho para retirada do excesso de pó.

b) No tanque ou balde, coloque a fibra de coco de molho (submersa) em água sanitária, no mínimo, por uma hora. Depois, passar em água limpa (enxaguar).

c) Retirar a fibra de coco apertando-a com as mãos, para eliminar o excesso de água. Depois, deixar descansar em uma peneira, para adiantar o processo de secagem.

d) Guardar a fibra de coco, ainda úmida, em um saco plástico ou de ração. Fechar o saco, caso não for usar a fibra de imediato.

e) Cuidado com entupimento do ralo do tanque. Retire a água com caneca e passe na peneira para não desperdiçar fibras (substrato).

8.1.3.2. Casca de *Pinus* spp.

a) Peneirar e se possível separa em tamanho.

b) Colocar de molho com água sanitária ou ferver.

c) Para a completa submersão dos pedaços de casca, colocá-los dentro de um saco poroso (cebola), depois passar em água limpa.

d) Escorrer em uma peneira e deixar secar um pouco, guardando-os em saco plástico.

e) Depois de lavado, esse tipo de substrato pode ser enriquecido colocando-o de molho em água limpa com fertilizante dissolvido.

8.1.3.3. Folhas Secas

a) Dê preferência para folhas miúdas, como aquelas de jabuticabeira.

b) Quando colhidas em lugares limpos (acimentado, por exemplo), onde não há impurezas, não é necessário o processo de lavagem.

c) Caso sejam colhidas sobre terra, devem ser peneiradas e retiradas as impurezas. Se possível, deixa-las de molho em água sanitária.

d) Retirar, escorrer na peneira e deixar secar.

8.1.3.4. Carvão Moído

a) Dê preferência à moinha de carvão ou carvão triturado (quebrado).

b) O carvão servirá para manter a umidade e diminuir a acidez do substrato (pH).

1.6.5 Nutrientes/Fertilizantes

a) Fornecer nutrientes à planta.

b) O nitrogênio (N) estimula a brotação e o enfolhamento.

c) O fósforo (P) incentiva a floração e frutificação.

d) O potássio (K) fortalece os tecidos vegetais e torna as plantas mais resistentes às pragas.

9. DESCRIÇÃO DAS ORQUÍDEAS REPRODUZIDAS NO LABORATÓRIO DO JARDIM BOTÂNICO DE BRASÍLIA

O Laboratório Multidisciplinar do Jardim Botânico de Brasília trabalha com a reprodução *in vitro* das seguintes espécies:

9.1. *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f. ex R.Warner;

9.2. *Cattleya bicolor* Lindl.;

9.3. *Cattleya granulosa* Lindl.;

9.4. *Cattleya labiata* Lindl.;

9.5. *Cattleya nobilior* Rchb.f.;

9.6. *Cattleya walkeriana* Gardner;
9.7. *Mormodes sinuata* Rchb.f. & Warm.;
9.8. *Cyrtopodium cristatum* Lindl..

9.1. *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f. ex R.Warner

História da espécie: Trata-se de uma espécie brasileira classificada por Lindley e Reichenbach f. no fim do ano de 1856, Lindley comprou em Bruxelas, um carregamento de plantas do Brasil. Ela notou que, ao florescer, algumas plantas desse lote na verdade tratava-se de uma nova espécie e enviou a flor para Reichenbach no intuito de que este confirmasse sua suspeita, já que ele era professor catedrático de botânica em Viena. Devido a problemas com o transporte, a flor chegou em suas mãos em péssimas condições de estudo e identificação, mas, mesmo assim, Reichenbach a identificou como sendo a *Cattleya porphyroglossa*. Entretanto, ao enviar a resposta a Lindley, Reichenbach trocou o prefixo latin *amethysto*, ao invés do grego *porphyro*, enviando assim a identificação de *Cattleya amethystoglossa* para Lindley, que adotou esse nome (Orquídea Terra, 2010).

Distribuição: A distribuição dessa espécie se dá somente no Brasil, e vai desde o estado de Pernambuco, descendo por Alagoas, Sergipe, Bahia e Espirito Santo, já que a ocorrência dela se dá preferencialmente em matas litorâneas.

Habitat: Dentro do bioma Mata Atlântica, em altitudes entre 300 e 1.200 metros acima do nível do mar. Entretanto, apresenta ocorrência também em regiões mais interioranas, como no nordeste de Minas Gerais e a Chapada Diamantina, na Bahia (Toscano de Brito; Cribb, 2005). Vegeta como epífita em matas altas e claras, em árvores de médio a grande porte. Também pode ser encontrada como rupícola, vegetando sobre pedras com bastante detrito vegetal, e às margens de rios. Também ocorre em região pobre em vegetação e com estação seca intensa.

Planta (parte vegetativa): quando encontrada na forma epífita, possui pseudobulbos robustos, pouco sulcados e, em alguns casos, podendo ultrapassar um metro de altura. Quando encontrada na forma rupícola, os pseudobulbos são mais sulcados e, em sua maioria, não atingem os 70 cm de altura. Possui sempre duas ou três folhas coriáceas, de colorido sempre verde-oliva, de mais ou menos 15 cm de comprimento e 8 cm de largura, elíptico-lanceoladas (Orquídea Terra, 2010).

Flor e época de floração: Os racemos, geralmente com até 8-10 flores (em casos raros chegando a 20 ou mais), emergem de espatas em meio às folhas, no ápice do pseudobulbo. Flores com aproximadamente 8 cm de diâmetro, apresentam pétalas e sépalas com colorido que pode variar de rosa claro ao rosa intenso (ametista), esparsamente salpicados com máculas púrpuras trilobado de colorido ametista com ápice dos lóbulos laterais e ápice do lóbulo terminal de coloração púrpuro-violáceos; lóbulos laterais recobrindo a coluna. As flores da *Cattleya amethystoglossa* possuem duração, em média, de 15 dias. A floração ocorre entre agosto e outubro (Orquídea Terra, 2010).

Cultivo: necessitam de boa umidade (boas regas em substratos com boa drenagem), ventilação e intensidade luminosa para o pleno desenvolvimento. Necessidades requeridas, principalmente na época da brotação de novos pseudobulbos e no período que antecede a floração. O plantio deverá ser feito em fibra de coco desfibrado ou mesmo placas ou cubos de fibra de coco, em vasos cerâmicos ou cachepôs de madeira, sempre pendurados a mais ou menos 1 metro do sombrite 70% ou penduradas em local sombreado, porém com claridade. Na época de floração, deve-se evitar a rega nas inflorescências, pois o acúmulo de água na base das folhas, quando expostas ao sol, poderá ocasionar o apodrecimento e queda dessas (Orquídea Terra, 2010).

9.2. *Cattleya bicolor* Lindley

História da espécie: a primeira descrição desta espécie foi feita por John Lindley baseada em uma pintura de Decourtiz, de plantas provenientes de Bom Jesus do Bananal - MG. As primeiras plantas foram levadas para a Inglaterra por Loddiges em 1837 (quando então foram para o Kew-Garden). Esta *Cattleya* bifoliada, de tamanho médio a grande, não é vista freqüentemente em cruzamentos (Orquídea Terra, 2010).

Distribuição: pode ser encontrada dispersa pelos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Goiás e no Distrito Federal. No DF, com ocorrência no Setor de Indústria, Sobradinho e Guará. Pode ser encontrada, também, no estado de Goiás, nas divisas com os estados de Minas Gerais e Distrito Federal, e é chamada de *Cattleya bicolor* var. *brasiliensis* (Orquídea Terra, 2010).

Habitat: regiões do cerrado, sempre entre 500 e 1.200 metros acima do nível do mar, porém não tolera luz solar direta, buscando sempre locais protegidos da incidência direta do sol, porém com bastante luminosidade. Espécie de hábito epífita, mas pode, também, ser encontrada na forma terrestre, vegetando sobre detritos de folhas e pedaços de madeira caídos de árvores nas matas de galeria. Também pode ser encontrada na forma rupícola, vegetando sobre rochas (Orquídea Terra, 2010).

Planta (parte vegetativa): o aspecto vegetativo é bem típico, mas tem variações de acordo com a região de origem da planta. Mas, no geral, é uma planta de rizoma forte que emite raízes grossas e flexuosas, pseudobulbos fusiformes, finos e sulcados, eretos ou arqueados, podendo ultrapassar um metro e meio de altura. Os pseudobulbos são coroados com duas ou três folhas oblongo-lanceoladas, coriáceas, rígida, com mais ou menos 15 cm de comprimento, por 8 cm de largura e de colorido sempre verde escuro (Orquídea Terra, 2010).

Flor e época de floração: a inflorescência surge em espata, simples no meio das duas folhas, com hastes florais podendo atingir até 30 cm de altura e podendo ter até 15 flores de mais ou menos 10 cm de diâmetro. Uma particularidade que a diferencia de qualquer outra *Cattleya* bifoliada, é a falta dos lóbulos laterais do labelo, que deixa assim, toda coluna à mostra. O lóbulo frontal em forma de leque e com bastante substância, apresenta uma canaleta que sai por baixo da coluna e que se prolonga até o meio do labelo, sendo outra característica bem marcante dessa espécie. O início da floração é no final do mês de dezembro, atingindo seu ápice no início do mês de fevereiro (Orquídea Terra, 2010).

Cultivo: planta exigente quanto à umidade e aeração de suas raízes, o que torna seu cultivo um pouco mais complexo, que algumas outras espécies de *Cattleya*s bifoliadas. Desenvolve-se bem em vasos de cerâmica ou cachepôs de madeira, desde que preenchidos com substrato à base de fibra de coco desfibrada e lavada, de modo que as raízes fiquem bem aeradas (Orquídea Terra, 2010).

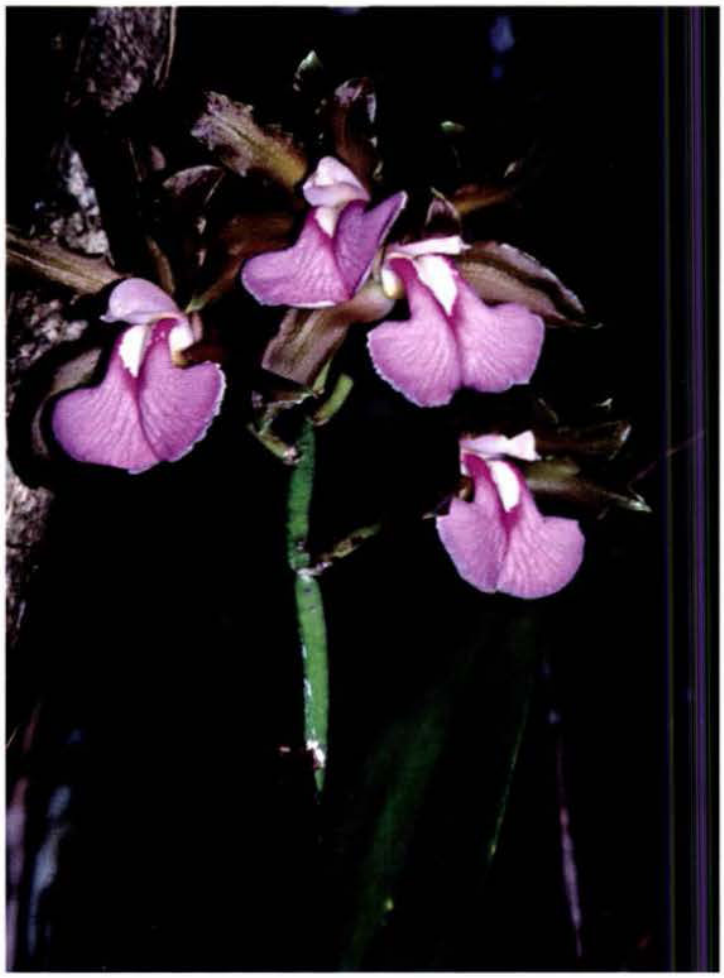

Figura 30. *Cattleya bicolor*.
Foto: João A. N. Batista

9.3. *Cattleya granulosa* Lindley

História da espécie: a descoberta desta espécie foi em 1840, por um coletor de orquídeas a serviço do Horticultural Society of London. As primeiras mudas foram enviadas ao Jardim Botânico da Royal Horticultural Society, Inglaterra, junto com outras plantas coletadas no Brasil e Guatemala. Na época, foram levantadas dúvidas quanto ao verdadeiro habitat da espécie tanto que, em 1842, a publicação da nova espécie indicava ser oriunda da Guatemala, dúvida esta desfeita após alguns anos (Orquídea Terra, 2010).

Distribuição: genuinamente brasileira, mais especificamente do nordeste do Brasil, distribuída nos estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas,

Sergipe e Paraíba. Não há ocorrência nos estados do Ceará, Piauí, Maranhão e Bahia, essa espécie é frequentemente confundida com outra muito parecida, a *Cattleya schofieldiana*, que ocorre nos estados do Espírito Santo e Bahia, e por esse motivo *Cattleya granulosa*, em algumas fontes, é erroneamente registrada também para aqueles estados (Orquídea Terra, 2010).

Habitat: Habita a faixa litorânea do Nordeste brasileiro, predominante nas restingas. No Rio Grande do Norte, ocupa uma faixa de 2 a 20 km que vai desde o município de Canguaretama (ao sul) até o município de Touros (ao norte). Vegeta desde o nível do mar ao topo de algumas dunas. Em Pernambuco e Alagoas ocorre em regiões distintas, tanto ao nível do mar, como em altitudes de 1000m, dividindo espaço com a *Cattleya labiata* (Orquídea Terra, 2010).

Planta (parte vegetativa): é uma planta geralmente robusta, porém, no Rio Grande do Norte, apresenta porte mediano. Seus pseudobulbos não ultrapassam os 50 cm de altura, enquanto que, em outros estados, podem chegar aos 90 cm. Os pseudobulbos são cilíndricos, com mais ou menos 2 cm de diâmetro e pouco sulcados. Encimados sempre por duas folhas de mais ou menos 15 cm de comprimento, por 6 cm de largura, coriáceas e bem rígidas, podendo variar da coloração verde, ao verde-acinzentado (Orquídea Terra, 2010).

Flor e época de floração: espécie brasileira considerada como uma das mais bonitas *Cattleya*s bifoliadas. Espécie pouco florífera, geralmente com três a cinco flores por haste, mas em regiões pode-se encontrar plantas com até 15 flores em uma mesma haste (Orquídea Terra, 2010).

Suas flores têm em média 10 cm de diâmetro, o labelo é trilobado, com sua coluna nem sempre totalmente recoberta. A porção media é mais estreita que o ápice e mede de 2,5 a 3,5 cm de comprimento. A superfície tem aparência rugosa e a cor de um amarelo avermelhado na porção distal, que vai até o ápice coberto por estrias e manchas vermelho - venosas. A borda é geralmente branca. Geralmente florescem entre maio a novembro dependendo do cultivo ou região (Orquídea Terra, 2010).

Cultivo: é de difícil cultivo considerando os métodos tradicionais.

Ao cultivar a *Cattleya granulosa* deve-se dar preferência aos vasos de cerâmica ou cachepô de madeira com fibra de coco e uma boa drenagem. A adubação deve ser aplicada principalmente na fase de desenvolvimento e as regas podem ser diárias, na parte da manhã (Orquídea Terra, 2010).

9.4. *Cattleya labiata* Lindley

História: foi classificada e descrita pelo botânico John Lindley, em 1821. Talvez a *Cattleya labiata* seja uma das mais importantes espécies para a orquidofilia, pois tem participação em alguns melhores híbridos produzidos até o momento (Orquídea Terra, 2010).

Distribuição: nordeste brasileiro, nos estados de Alagoas, Pernambuco, Ceará e Paraíba.

Habitat: ocorre em altitudes de 500 a 1000 metros. Vegeta em áreas específicas como a Zona da Mata, Zona do Agreste e Zona do Sertão do nordeste brasileiro. Ocorrem principalmente como epífitas, vegetando sobre árvores mais altas, que recobrem boa parte das serras do nordeste brasileiro, como também, podem ser encontradas, em menor quantidade, vegetando sobre rochas nas mesmas serras nordestinas (Orquídea Terra, 2010).

Na natureza, a *Cattleya labiata* está sujeita a uma enorme variação à exposição da luz solar, procurando sempre os locais de melhor luminosidade, tendo como temperatura ambiente uma variação entre os 13°C e 35°C. Devido a sua localização geográfica, a *Cattleya labiata* não está sujeita a estações bem definidas como no sul do Brasil, onde parecem bem distintas, as quatro estações. No nordeste brasileiro as plantas em geral, são influenciadas basicamente por duas estações: o verão, época de estiagem e o inverno, época de chuvas (Orquídea Terra, 2010).

Planta (parte vegetativa): no Ceará, as plantas são baixas e robustas, produzindo flores pequenas, de forma mais arredondada e geralmente de coloração escura. Já as plantas do estado de Alagoas e Pernambuco possuem bulbos mais altos e sulcados, com flores maiores e de coloração mais clara (Orquídea Terra, 2010).

As *Cattleya labiata* são plantas com pseudobulbos de 15 a 25 cm de altura, sulcados e afilados. Apresenta uma única folha oblongo-elíptica, de 15 a 25 cm de comprimento, sempre maiores no comprimento que na largura, com a coloração podendo variar de verde-amarelo até o verde-bronzeado (púrpuro). Bulbos e folhas, em sua maioria, apresentam um crescimento vertical (Orquídea Terra, 2010).

Flor e época de floração: a espécie possui de 2 a 5 flores em uma única haste floral, sendo que consegue produzir flores com 12 até 18 cm de diâmetro, algumas vezes ultrapassando os 20 cm. As flores possuem um perfume bem característico e podem permanecer floridas por até 30 dias. As brotações ocorrem, geralmente, nos meses de outubro e novembro, com possíveis variações no período. É a única espécie de *Cattleya* monofoliada que floresce no outono, sendo assim denominada "autumnalis". Em determinadas regiões, no final do mês de novembro e início de dezembro, começam a aparecer floridas; em outras, podem florescer nos meses de março e abril, dependendo assim, da particularidade de cada planta e local de cultivo (Orquídea Terra, 2010).

A coloração é caracterizada por flores de pétalas

e sépalas em tom lilás de intensidade variável. Lóbulo frontal apresenta-se em tom lilás mais escuro que as outras extremidades, deixando espaço para duas manchas de cor branca nos lóbulos laterais, que encontra assim, com o amarelo do interior do tubo, que pode variar do amarelo ouro ao cobre (Orquídea Terra, 2010).

Cultivo: planta bem rústica, de fácil cultivo, sendo uma das mais indicadas para orquidófilos iniciantes.

No sul do Brasil (Joinville, Mata Atlântica) elas adaptam-se melhor quando cultivadas em vasos plásticos não muito grandes, com boa drenagem (brita) e lugar de cultivo protegido por cobertura plástica.

Para uma boa florada, a iluminação deve ser intensa. As folhas devem apresentar um tom verde claro amarelado. Em orquidários, no verão, devem receber uma proteção de sombrite 50%. No inverno este sombreamento é retirado deixando-se apenas a proteção de plástico agrícola. As mudas (*seedlings*) devem receber sombreamento todo o ano. Para adubação utiliza-se o adubo orgânico de dois em dois meses ou adubação química de boa qualidade (NPK balanceado + micro nutrientes), (Orquídea Terra, 2010).

De modo geral, as *Cattleyas labiatas* crescem, sob cultivo, em quase todo o território brasileiro. Necessitam de muita iluminação e umidade relativa alta, especialmente à noite, boa ventilação e muita irrigação durante o período de brotação. Manter as plantas espaçadas e ventiladas para evitar a proliferação de insetos e pragas. As *Cattleyas labiatas* são "espaçosas" e crescem rapidamente quando bem cultivadas, desse modo, necessita-se replantá-las periodicamente.



Figura 31. *Cattleya labiata.*
Foto: Lílian Breda

9.5. *Cattleya nobilior* Reichenbach f.

História da espécie: foi descrita por Reichenbach, em 1883, na revista francesa *L'illustration Horticole*. Foi ilustrada por Lucien Linden (filho de M.J.J. Linden), botânico, que desde o primeiro momento preocupou-se em mostrar as diferenças morfológicas que a distinguiam da *Cattleya walkeriana*, de Gardner. *Nobilior*, em latim, significa "mais nobre", provavelmente uma comparação com a *Cattleya walkeriana* em que o autor fez questão de ressaltar: ser mais nobre que a *Cattleya walkeriana* (Brazilian Orchids, 2010).

Distribuição: ocorre em países sulamericanos como Bolívia, Paraguai e Brasil. No Brasil é natural dos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (estendendo-se até a fronteira com o Paraguai), Pará, Maranhão, sudeste da Bahia e Tocantins. Não ocorre no Distrito Federal.

Habitat: ocorre em áreas do bioma cerrado, como epífita, em vegetação florestal (matas) e na forma rupícola, em regiões rochosas. A variedade '*amaliae*' é encontrada numa

área restrita, no estado de Tocantins. Esta variedade possui um labelo, largo e colorido, além de produzir mais flores, com pétalas mais largas e mais planas (Brazilian Orchids, 2010).

Planta (parte vegetativa): muito confundida com a *Cattleya walkeriana*, pois apenas essas duas espécies de *Cattleya* apresentam inflorescências emergindo de uma estrutura, pouco convencional (representada por um pseudobulbo não intumescido), dando-nos a impressão que a inflorescência emerge diretamente do rizoma. Entretanto, a inflorescência emerge do ápice desse pseudobulbo não intumescido (Brazilian Orchids, 2010).

Flor e época de floração: as sépalas e pétalas são róseo-púrpureas ou arroxeadas. O labelo é róseo com venações púrpuras e as bordas brancas. A haste floral caracteriza-se por apresentar uma ou duas flores, sendo que a variedade '*amaliae*' carrega, em geral, mais flores. O tamanho da flor varia entre 10 a 12 cm de diâmetro A variedade típica floresce em julho/agosto e a variedade '*amaliae*', floresce em setembro/outubro (Brazilian Orchids, 2010).

Cultivo: pode ser cultivada em clima temperado ou mais quente, sendo que a temperatura ideal está em torno de uma média de 21ºC ou mais elevada. Vegeta muito bem quando colocada em casca rugosa (viva ou morta). No período de repouso, de maio a setembro, a rega deve ser reduzida. É uma planta perfeitamente adaptada aos rigores climáticos do Cerrado (Planalto Central), onde se alternam fortes extremos, dias quentes e secos e noites muito frescas ou mesmo muito frias dependendo da estação. Esta região possui duas estações bem definidas: uma chuvosa e uma extremamente seca que pode durar até sete meses. Neste período, o sereno da noite é a fonte de umidade, para suportar a seca prolongada. Nesse período desfavorável, *Cattleya nobilior* vai absorvendo lentamente suas reservas e chega a ter suas folhas e pseudobulbos enrugados, diminuindo de volume. A aparência normal (folhas e pseudobulbos túrgidos) retornará somente quando começam as chuvas, em meados da primavera até o final do verão (março).

Considerando as características climáticas do Cerrado, bem como os típicos tipos de vegetação mais abertas *Cattleya nobilior* é uma planta que necessidade de luminosidade e ventilação elevadas (Brazilian Orchids, 2010).

Variedade: as duas variedades ("típica" e "*amaliae*") não podem ser cultivadas de maneira análoga, pois as exigências ambientais são ligeiramente diferentes.

- típica: adapta-se melhor em vasos de barro, bem drenados e com substrato leve e bem poroso (entre os mais comuns, xaxim desfibrado, fibra de coco e casca de *pinus* (fervido), que devem ser trocados a cada dois anos) (Brazilian Orchids, 2010).

- *amaliae*: prefere ser montada em palitos de xaxim, corticeira, toras de peroba ou outro suporte rústico (Brazilian Orchids, 2010).



Figura 32. *Cattleya nobilior*.
Ilustração: Thereza Carvalho



Figura 33. *Cattleya nobilior.*
Foto: João A. N. Batista

9.6. *Cattleya walkeriana* Gardner

História da espécie: descrita pelo botânico e médico inglês George Gardner, que entre 1839 e 1840, em visita à região diamantífera do estado de Minas Gerais, coletou plantas que vegetavam sobre árvores às margens de um pequeno afluente do Rio São Francisco. A descrição original foi publicadano Journal Botanyc of London, no ano de 1843, e o nome dado à espécie foram uma homenagem de Gardner ao seu fiel assistente, Edward Walker (Orquídea Terra, 2010).

Distribuição: espécie exclusivamente brasileira com distribuição geográfica nos estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e de São Paulo, além do Distrito Federal.

Habitat: as plantas suportam grandes variações de temperatura e umidade nos seus diversos habitats. Em média, as temperaturas variam em torno de 32°C a 40°C, durante o dia, e mais ou menos 5 °C, durante a noite. A *Cattleya walkeriana* é uma espécie de habitat diversificado, podendo ser encontrada vegetando tanto na forma epífita (a forma mais comum), sobre árvores e arbustos em mata seca, como também na forma rupícola, sobre rochas calcárias ou arenito. Sua raiz adere totalmente ao tronco ou rocha, mantendo aí a sustentação para seu desenvolvimento (Orquídea Terra, 2010).

Resiste com certa facilidade aos longos períodos secos. Por esta razão, é muito bem adaptada ao cerrado brasileiro, normalmente em altitude superior a 600m (Orquídea Terra, 2010).

Planta (parte vegetativa): para esse tópico ver observações realizadas para *Cattleya nobilior*. Possuem pseudobulbos que são relativamente curtos, cilíndrico-fusiformes, muitas vezes sulcados e com curta distância entre um e outro, o rizoma não é muito espessado, o que dá a planta um aspecto desordenado, chegando a formar grandes touceiras; as folhas, geralmente uma por pseudobulbo, são elíptico-lanceoladas até arredondadas, coriáceas e rígidas, de comprimento variável (geralmente de 4-15 cm de comprimento x 3-6 cm de largura), atingindo, muitas vezes, o dobro do pseudobulbo e com coloração variando de verde-amarelado ao verde-escuro de acordo com a quantidade de luz recebida (Orquídea Terra, 2010).

Flor e época de floração: Em sua maioria, é no ápice dos pequenos pseudobulbos que surgem as inflorescências, sem espata, em hastes com altura média de seis centímetros. Cada haste apresenta geralmente duas ou três flores e cada flor com mais ou menos oito a 12 centímetros de diâmetro; pétalas e sépalas lilases com tonalidade variável; labelo branco na região central e magenta ou rosa purpúreo no restante, sendo a zona marginal mais escura. A floração, geralmente tem início no começo do mês de abril, atingindo

seu ápice no mês de maio e, em alguns casos, pode prolongar-se até julho (Orquídea Terra, 2010).

Cultivo: a melhor época para o plantio é a partir dos meses de agosto e setembro (primavera no Brasil) e estendida até abril. Segundo a experiência do laboratório de micropagação do JBB, todo o plantio deve ser realizado em bandejas de polietileno permitindo melhor manejo e racionalidade de espaço. Quando as condições ambientais, tais como o clima, a água, a altitude e o calor forem propícios, esta espécie pode atingir bons tamanhos de mudas (*seedlings*) num curto período de tempo (Orquídea Terra, 2010).

Aceita bem uma ampla gama de substrato, desde o *Sphagnum* até a fibra de xaxim, mas por ser uma espécie epífita, responde melhor ao plantio em madeira, como os troncos ou cascas de árvores de casca rugosa. A peroba, por exemplo, é a mais utilizada por orquidófilos (Orquídea Terra, 2010).

Por ser uma planta de fácil adaptação, pode ser cultivada em diversos locais, como: sombrites, estufas, ripados ou mesmo ao natural, desde que fixadas em árvores como palmeiras, dracenas, ipês, laranjeiras, dentre outras. Quando cultivadas em orquidários, respondem melhor quando colocadas em locais com maior luminosidade, temperaturas não muito baixas e umidade relativa acima dos 60%, principalmente durante a noite (Orquídea Terra, 2010).

Devido ao metabolismo de exemplares de *Cattleya walkeriana*, os estômatos permanecem fechados durante o dia evitando, assim, a perda excessiva de água no período. Daí a vantagem de se molhar as plantas somente no período do crepúsculo, pois além de aumentar a umidade durante esse período, é também nesse período que os estômatos estão abertos, facilitando assim uma maior absorção da água e nutrientes (Orquídea Terra, 2010).



Figura 34. *Cattleya walkeriana*.
Foto: Lílian Breda.

9.7. *Mormodes sinuata* Rchb.f. & Warm.

Distribuição: espécie exclusiva do Brasil com distribuição geográfica nos estados de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo.

Habitat: a maior parte das espécies do gênero é quase que exclusivamente de ocorrência amazônica. Exceção deve ser registrada para *Mormodes sinuata* que é encontrada em matas úmidas e secas do Planalto Central. Espécie epífita; vegeta nas matas ciliares e matas de galeria distribuídas pelo bioma Cerrado (Miranda, 1996).

Planta (parte vegetativa): pseudobulbos mais ou menos robustos, depois de desfolhados, com anéis transversais mostrando as cicatrizes de onde as folhas se encontravam inseridas e, na época seca, com rugas

e sulcos longitudinais; as folhas possuem de 5-7 nervuras longitudinais e são, recurvadas (Orchidaceae Brasilienses, 2011).

Flor e época de floração: a título de curiosidade, a inflorescência não emerge nem da base nem do ápice dos pseudobulbos. Geralmente emerge em posição lateral, em meio às folhas. Racemo floral ascendente e arcado; a inflorescência possui cerca de oito flores marrom-avermelhadas; o labelo tem um curto unguículo é trilobalo e uniformemente avermelhado (Orchidaceae Brasilienses, 2011).

A época de floração coincide com o começo das chuvas, em abril, algumas vezes estendendo-se até junho.

Cultivo: as espécies pertencentes ao gênero *Mormodes* geralmente se adaptam aos climas quentes e intermediários, com ventilação e muita luminosidade, mas nunca sob o sol direto, principalmente na fase final de seu ciclo de crescimento. Durante a época de crescimento, necessitam de mais calor e mais água, para produzir grandes pseudobulbos. (Orchidaceae Brasilienses, 2011).

As regas devem ser frequentes durante o período de formação das folhas e reduzidas gradualmente quando os pseudobulbos estiverem maduros. Com o tempo as folhas irão amarelar e cair. Rega excessiva provocará seu apodrecimento.

Durante o período de crescimento, o melhor adubo é o N-P-K, na proporção 30-10-10 e é recomendada a utilização da metade da quantidade preescrita pelo fabricante. Durante o repouso da planta não é necessária adubação. Mudar para 10-30-20 cerca de um mês antes da floração. Normalmente devem ser divididas e replantadas na época de brotação. Podem ser plantadas em uma mistura de *Sphagnum* spp., casca de árvores e fibra de xaxim.



Figura 35. *Mormodes sinuata.* Foto: João A. N. Batista.

9.8. *Cyrtopodium cristatum* Lindley

História da espécie: foi descrita por Lindley, em 1841. O Brasil é o país mais diverso para o gênero com cerca de 35 espécies. O Planalto Central é o centro geográfico de distribuição do gênero.

Distribuição: a espécie encontra-se distribuída em países da América do Sul, tais como Guyanas, Colômbia, Venezuela e Brasil. No Brasil, ocorrem nos estados de Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Mato Grosso, Roraima e Pará.

Habitat: espécie terrestre; prefere solos rasos, bem drenados e secos, ligeiramente pedregosos e em declive como aqueles encontrados nos campos limpos e campos sujos que cobrem as encostas dos morros na região do Cerrado. É uma espécie adaptada à muita luminosidade e

aos rigores do clima predominante do bioma Cerrado. A maior parte das espécies do gênero *Cyrtopodium* resiste às queimadas, surgindo novos brotos tão logo ocorra o início do período chuvoso.

Planta (parte vegetativa):os pseudobulbos são cônico-ovóides, pequenos, expostos, acuminados, eretos, de 3 a 4 cm de altura e perto da base com 1 cm de diâmetro; folhas eretas, coriáceas, lineares, com nervuras espessas.

Flor e época de floração: a inflorescência é simples, marrom-esverdeada; as flores são predominantemente amarelas, levemente perfumadas, as pétalas e sépalas são amarelas vivo e às vezes amarronzadas nas extremidades e na parte externa; o labelo e as expansões laterais são amarelos, às vezes as expansões são amarronzadas. O labelo possui um calo carnoso-granuloso no formato de uma crista.

Na região Centro-Oeste, a espécie floresce no fim de agosto e durante o mês de setembro, embora algumas plantas possam ser encontradas floridas ainda no início de outubro.

Curiosidades: no Brasil, as plantas do gênero *Cyrtopodium*, recebem diferentes nomes como "sumaré" (Rio de Janeiro e São Paulo), no Nordeste é conhecido por "rabo-de-tatu" pela semelhança do pseudobulbo com o rabo daquele animal. Em Goiás é popularmente conhecido por "cola-de-sapateiro" pela utilização do sumo extraído dos pseudobulbos para colagem do couro, papel e madeira.

A muscilagem extraída dos pseudobulbos de algumas espécies do gênero é utilizada para fins medicinais, servindo para cicatrização de lesões, coagulação do sangue e cortes. Do sumo se faz uma pomada que é usada no tratamento do terçol. Alfons Balbach cita em seu livro "A Flora Nacional na Medicina Doméstica" (Edificação do Lar, 1974), o uso do suco do *Cyrtopodium* no tratamento de abcesso e a fabricação de xarope para tosse e coqueluche.



Figura 36. *Cyrtopodium cristatum*.
Foto: João A. N. Batista.

ANEXO

GLOSSÁRIO RELACIONADO À MORFOLOGIA

Acuminado: que apresenta uma ponta fina, aguda e comprida.

Adventícia: que nasce em lugar indevido.

Androceu: conjunto dos órgãos masculinos da flor.

Antera: parte do androceu que contém os grãos de pólen.

Apical: referente ao ápice.

Axila: ângulo formado pelo encontro de 2 partes da planta.

Bainha: base da folha que a prende ao caule.

Bráctea: uma folha modificada em cuja axila nasce uma flor ou uma inflorescência.

Caudículo: pequeno eixo entre as políneas e o retináculo.

Coriácea: com consistência semelhante à do couro.

Dorsal: do lado superior.

Elíptico: em forma de elipse.

Epífita: que vive sobre outra planta, sem retirar dela alimento.

Espata: bráctea que protege a inflorescência.

Fusiforme: em forma de fuso.

Herbácea: que tem o porte e consistência de erva; caule tenro, não lenhoso.

Hermafrodita: que possui ambos os sexos na mesma flor.

Lanceolado: em forma de lança.

Pecíolo: parte da folha que a prende ao caule.

Pedicelo: haste que suporta a flor numa inflorescência.

Pedúnculo: haste que suporta uma inflorescência.

Pseudobulbo: "falso bulbo". Corresponde à dilatação do caule de muitas orquídeas.

Racemosa: inflorescência onde as flores são pedunculadas e não se inserem no mesmo ponto.

Retináculo: pequena massa viscosa junto ao rostelo que se liga às políneas pelo caudículo.

Rizoma: caule rasteiro com a aparência de raiz.

Rostelo: parte estéril do estigma que projeta-se em ponta e produz uma substância viscosa.

Rupícola ou rupestre: que vive sobre rochas.

***Sphagnum* spp.:** musgo que pode ter cor de verde a vermelho e serve para aclimatização de mudas de orquídeas. Antes de ser utilizado deve ser fervido ou autoclavado, para que seja esterilizado.

Venação ou nervação: distribuição das nervuras nas folhas.

GLOSSÁRIO RELACIONADO À BIOTECNOLOGIA E À CULTURA DE TECIDOS

Aclimatização: consiste na transferência das plantas produzidas *in vitro* (sob condições controladas), para serem aclimatadas ou adaptadas às condições *ex vitro*, geralmente em estufa.

Alongamento celular: crescimento celular causado por auxina e/ou giberelina.

Ápice caulinar: segmento do ápice do caule, composto pelo meristema apical juntamente com os primórdios foliares e folhas em desenvolvimento (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

Biotecnologia: em seu sentido mais amplo compreendem a manipulação de microorganismos, plantas e animais, objetivando a obtenção de processos e produtos de interesse. Desta maneira, toda atividade que envolva a aplicação dos conhecimentos de fisiologia, bioquímica e genética, é considerada como técnica biotecnológica. Em seu senso mais restrito a biotecnologia está associada ao emprego de técnicas modernas de biologia molecular e celular.

Calos (cultura de tecidos desorganizados): aglomerados de células com crescimento ativo e de forma desorganizada, oriundos de tecidos meristemáticos ou mais raramente parenquimáticos sob a ação de substâncias reguladoras do crescimento, principalmente as do grupo das auxinas e citocininas.

Célula diferenciada: é aquela que desenvolveu forma especializada (morfologia) ou função especializada (fisiologia).

Célula indiferenciada: célula ainda não especializada, que apresenta características embrionárias. Refere-se ao estado caracterizado por células isodiamétricas, com pouco ou nenhum vacúolo e grande núcleo, geralmente localizadas no meristema (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

Condições assépticas: condições livres de microorganismos, tais como bactérias e fungos.

Crescimento desorganizado: quando, tecidos formados *in vitro*, não apresentam estruturas claramente definidas e contém um número limitado de células especializadas e diferenciadas (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

Crescimento organizado: Tecido ou órgão de crescimento determinado em produzir um novo órgão (desenvolvimento) de forma a resultar novas estruturas vegetais. Crescimento pós-meristemático. Um tecido organizado é a agregação de células diferenciadas (ex.: xilema ou epiderme) (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

Cultura de órgãos (cultura de tecidos organizados): Formas organizadas de crescimento que podem ser mantidas continuamente *in vitro*. Inclui o isolamento asséptico de estruturas definidas como primórdios e segmentos foliares. Para os propósitos da cultura de tecidos, os mais importantes tipos são:

a) Cultura de meristemas: o meristema é o conjunto de células indiferenciadas e de características embrionárias.

b) Cultura de ápices caulinares: iniciada a partir de ápices caulinares ou gemas laterais. Empregada para estabelecer culturas que originam multigemas, gema, eixos ou brotações caulinares múltiplos.

c) Culturas de segmentos nodais: contém segmentos caulinares que carregam gemas simples ou múltiplas.

d) Cultura (ou resgate) de embriões: embriões zigóticos são excisados e cultivados para dar origem às plântulas.

e) Cultura de raízes isoladas: raízes cultivadas sem conexão com os eixos caulinares, originando novos tecidos.

Explante: corresponde a qualquer segmento de tecido oriundo de uma planta para dar início a uma cultura *in vitro*, podendo ser um segmento de folha jovem, uma antera ou um ovário, um embrião zigótico, um ápice radicular ou caulinar, uma gema axilar, entre outros (Cid, 2003). Os explantes poderão gerar novas plantas diretamente, ou passarão por um estágio intermediário denominado de calo, antes da obtenção da planta (Cid, 2003).

Desdiferenciação celular: retorno de células diferenciadas ao estado meristemático não diferenciado (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

Desinfestação: tratamento que elimina os microorganismos.

Determinação celular: processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica (Christianson, 1985). A determinação celular diz respeito a uma canalização progressiva no desenvolvimento.

Diferenciação celular: Processo de diversificação das características bioquímicas, anatômicas, morfológicas e fisiológicas, ocorrida nas células, nos tecidos ou órgãos durante o desenvolvimento a partir do estado meristemático ou juvenil para o adulto. As células do embrião e do meristema apical são exemplos de estado indiferenciado, as quais ganham novas competências se tornando diferenciadas (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

Fitormônios ou hormônios vegetais: substâncias reguladoras da divisão e do crescimento celular, naturalmente produzida pela planta.

Fitorreguladores ou reguladores de crescimento: são substâncias sintéticas que mimetizam os efeitos dos hormônios no metabolismo celular (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

Hormônios vegetais: os hormônios são moléculas regulatórias de ocorrência natural que agem como sinais químicos para regular o crescimento e o desenvolvimento (morfogênese).

Indução[3]: é o desencadeamento de um processo morfogenético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico.

Inibidores de crescimento: são substâncias inibidoras da divisão e crescimento celular naturalmente encontrada nas plantas ou sintéticas.

Meio nutritivo ou meio de cultura: é um meio que contém todos os elementos minerais essenciais, vitaminas, açúcar e reguladores de crescimento, que permitem o crescimento e desenvolvimento dos explantes em cultivo. O meio pode ser líquido ou gelificado.

Meristema: tecido composto de células não diferenciadas que mantém permanentemente as características embrionárias primárias, envolvido com síntese protoplasmática e formação de novas células por divisão mitótica (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

Micropropagação: ver item 3.3.

Morfogênese: integração entre crescimento (mudanças quantitativas) e diferenciação (alterações qualitativas), mediada por divisão e especialização celular. A morfogênese é o resultado de um complexo controle hormonal múltiplo, espacial e temporal, através da regulação e expressão de sistemas gênicos múltiplos. A morfogênese na planta intacta é mediada pela ação correlativa dos meristemas e de seus produtos. Na cultura de tecidos vegetais, ao se romper as correlações endógenas, os tecidos ficam sujeitos às condições exógenas, representadas no caso pelos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura. A morfogênese *in vitro* passa então a ser modulada pelo balanço de fitorreguladores adicionados ao meio de cultura.

Protocormo: é um termo usado para designar um estádio inicial de desenvolvimento do embrião das orquídeas (Kraus *et al.*, 2006; Morel, 1964).

[3]A indução envolve o controle da expressão gênica, embora não seja um fenômeno genético, pois não ocorre ganho ou perda genética (modificação alélica ou genotípica). Refere-se somente a expressão dos genes pré-existentes. Em cultura de tecidos, é a sinalização por um fitormônio a uma resposta específica em nível celular.

Regeneração: a regeneração por substituição permite a reconstrução de extremidades e partes dos organismos, e, no caso de algumas plantas, a possibilidade de, a partir de uma pequena parte do corpo do vegetal, se regenerar todo o organismo: processo de propagação vegetativa (Infopédia, 2010).

Reguladores de crescimento: são substâncias reguladoras da divisão e do crescimento celular vegetal (o mesmo que fitorreguladores).

Repicagem: transferência de um explante mantido em um determinado frasco por um certo tempo para um frasco contendo meio fresco.

Subcultura: subdivisão do explante em duas ou mais porções após o crescimento em um meio por certo período de tempo e transferência para novos frascos contendo meio fresco.

Suspensões (cultura de tecidos desorganizados): proliferação de células isoladas ou pequenos aglomerados dispersos em um meio líquido, sob agitação (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

Totipotencialidade: princípio biológico creditado ao fisiologista vegetal alemão Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para reproduzir um organismo inteiro. Como corolário, este fisiologista elaborou previsões de que tecidos, células e órgãos poderiam ser mantidas indefinidamente em cultura. De certa forma o conceito de totipotencialidade já era inerente à teoria celular de Schleiden e Schwan (1838 *apud* Vasil *et al.*, 1979) ao postularem que algumas células eram capazes de serem separadas do organismo e continuar a crescer independentemente (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2010).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA - Ácido abscísico
AIA - Ácido indolbutírico
AIB - Ácido indolacético
ANA - Ácido alfa-naftaleno-acético
BA ou **6-BA** - 6-benzilamino-purina
BAP - N-Benzil-9-(2-tetrahidropiranyl)-adenina
B.O.D - Demanda Bioquímica do Oxigênio
CDC - Ciclo de Divisão Celular
DF - Distrito Federal
GA_3 - Giberilina
JBB - Jardim Botânico de Brasília
KIN - 6-furfurilamino-purina
NAA - Ácido naftaleno acético
NOA - Ácido naftoxiacético
PCMs - Protocormos
PVP - Polivinilpirrolidona

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao pesquisador da Embrapa Dr. Luciano Bianchetti pela revisão, orientação e cessão das fotos; ao Dr. João A. N. Batista e à Wilma Pizza pela cessão das fotos; à Violeta Bidart Braga pelo fornecimento de bibliografia; à Vânia de Araujo Soares, Ralim Armed Silva e Josué Inácio Lemos pela ajuda na revisão do texto; à Thereza Carvalho pelas ilustrações botânicas e ao Serviço Florestal Brasileiro pelo apoio técnico-financeiro na estruturação e manutenção do Laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E.F.M. **Clonagem e Estudo da Expressão do Gene da mio-Inositol 3-Fosfato Sintase (MIPS) em maracujazeiro (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener)**. Universidade de Brasília – UnB. Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Botânica. 2006.

ABUD, D.; LIMA, A.A.M.; GONÇALVES, C.L.; LIMA, F.S.; CASTRO, I.V.; SILVA, I.O.; BREDA, L.C.S.; MARTINS, R.C.; LEDO, R.M.D.; MENDES, V. J. M. **Roteiro de Educação Ambiental do Jardim Botânico de Brasília.** 2008.

AGAREZ, F.V.; RIZZINI, C.M.; PEREIRA, C. **Botânica Angiospermae: Taxonomia, morfologia e reprodução-chave para determinação das famílias.** Rio de Janeiro: **Âmbito Cultural,** 256 p. il. 1994.

ARAÚJO, D.; ARAÚJO, S. BRAZILIAN ORCHIDS. Site elaborado por Disponível em: <http://www.delfinadearaujo.com>. Acesso em set 2010.

ARDITTI, J. Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. **Botanical Review**, 33: 1 -97. 1967.

ARDITTI, J. Aspects of the Physiology of Orchids. **Advances in Botanical Research**, 7: 421-655. 1979.

BALBACK, A. A flora nacional na medicina doméstica. 17 ed. São Paulo, **Edificação do Lar**. 919p. 1974.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M. **Orchidaceae** *in* Lista de espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2011. Disponível em: http://floradobrasil.jbrj.

gov.br/2011/fb000179.

BATISTA, J.A.N; BIANCHETTI, L. de B. Lista Atualizada das Orchidaceae do Distrito Federal. **Acta Botânica Brasilica**, 17(2): 183 – 201. 2003.

BERG, C. VAN DEN. **Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* Lindl.** (Orchidaceae - Laeliinae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 1996.

BERNARD, N. Sur la fonction fongicide des bulbes d'ophrydées. **Ann Sci Nat Bot.**, 9:221–234. 1911.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (orgs). **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. v.1. Ed. Embrapa, Brasília, p. 87-132. 1998.

CAMPOS, D.M. **Orquídeas: micropropagação e quimioterapia de meristemas**. Ed. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro, 111p. 2002.

CARAMASCHI, G.M.C.L. **Propagação *in vitro* de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 110p. 2001.

CARAMASCHI, G.M.C.L. **Projeto Orquídeas do Cerrado** – Manual de uso do Laboratório. 2005.

CHURCHILL, M.; BALL, E.A.; ARDITTI, J. Tissue Culture of Orchids – II. Methods for root tips. **American Orchid Society Bulletin**, 41: 726-730. 1972.

CHRISTIANSON, M.L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.J.; HOLLAENDER, A. (eds). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. Plenum Press. New York. p. 83-103. 1985.

CID, L.P.B. **Cultura de Tecidos Vegetais** – Uma Ferramenta Fundamental no Estudo da Biologia Moderna de Plantas. 2003. [Internet]. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br>. Acesso em jan 2010.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. **Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural**. [Internet]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n4/a39v35n4.pdf>. Acesso em out 2010.

ERNEST, R.; ARDITTI, J.; HEALEY, P.L. The nutricion of *Seedlings*. **American Orchid Society Bulletin**, 39 (8): 691-700. 1970.

FANNESBECH, M. Organic Nutrients in the Media for Propagation of *Cymbidium in vitro*. **Physiologia Plantarum**, 27: 360-364. 1972.

GAMBORG, O.L. The Effects of Amino Acids and Ammonium on the Growth of Plant Cells in Suspension Culture. **Plant Physiology**, 45: 372-375. 1970.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158. 1968.

GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J. The Culture of Plant Cells with Ammonium Salts as the Sole Nitrogen Source. **Plant Physiology**, 45:598-600. 1970.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v.1, p.183-260. 1998.

HANNIG, E. Zur physiologie pflanzlicher embryonen. I. Ueber die kultur von cruciferen embryonen ausserhalb des embryosacks. **Botanische Zeitung**, v.62, p.45-80. 1904.

HUANG, L. Alternative Media and Method for *Cattleya* Propagation by Tissue Culture. **American Orchid Society Bulletin**, 43: 893-895. 1984.

INFOPÉDIA: Enciclopédia e Dicionários Porto Editora. (**Regeneração celular**). Disponível em: <http://www.infopedia.pt/>. Acesso em out 2010.

INTUWONG, O.; SAGAWA, Y. Clonal Propagation of *Phalaenopsis* by shoot Tip Culture. **American Orchid Society Bulletin**, 43: 893-895. 1974.

KERBAUY, G.B.; HANDRO, W. Estudo do Desenvolvimento *in vitro* de Embriões de Orquídeas. In: **Anais do 1º Encontro Nacional de Orquidófilos e Orquidólogos**. Ed. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro, p.145-152. 1981.

KERBAUY, G.B. In vitro Conversion of *Cattleya* Root Tip Cells into Protocorm-like Bodies. **Plant Physiology**, 138: 248-251. 1991.

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

KNUDSON, L.A. New Nutrient Solution for the Germination of Orchid Seed. **American Orchid Society Bulletin**, 15: 214-217. 1946.

KRAUS, J.E.; KERBAUY, G.B. Formation of Protocorm-Like Bodies from Roots Apices of *Catasetum pileatum* (Orchidaceae) Cultivated *in vitro*. II. Some Non-Hormonal Requirements Involved in the Regeneration. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, 13:31-40. 1992.

KRAUS, J.E.; KERBAUY, G.B.; MONTEIRO, W. R. Desenvolvimento de protocormos de Catasetum pileatum Rchb.f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, p. 177-184. 2006.

KOTTE, W. **Kulturversuch isolierten Wurzelespitzen**. Beitr. Allg. Bot. 2: 413–434. 1922.

Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal. Material Didático de Apoio à Disciplina de Biotecnologia, Apostila de BIOTECNOLOGIA 1 - **Cultura de tecidos vegetais**. In GUERRA, MIGUEL P.; NODARI, RUBENS O. [Internet]. Disponível em: <http://www.lfdgv.ufsc.br/>. Acesso em out 2010.

LAIBACH, F. Das taubwerden von bastardsamen und die künstliche aufzucht früh absterbender bastardembryonen. **Zetschrift fuer Botanik**, v.17, p.417-459. 1925.

LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Conpenhagen, v. 18, p. 100-127. Issue 1. 1965.

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

MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G.B. Effects of Nitrogen Forms on Dry Matter Partitioning and nitrogen Metabolism in Two Contrasting Genotypes of Catasetum fimbriatum (Orchidaceae). **Environmental and Experimental Botany**, 47: 249 – 258. 2002.

MARGARA, J. Bases de la multiplication vegetative. les méristèmes et l'organogènese. Paris: **Institut National de la Recherche Agronomique**. 1989.

MELLO-SILVA, P.A.K.X. de; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya* intermedia Lindl (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 30, n.1, jan./mar. p. 105-111. 2000.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JUNIOR, M.C.; RESENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. **Flora vascular do Bioma Cerrado.** In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (eds.). Cerrado: ambiente e flora. Embrapa, Planaltina. p.289-556. 1998.

MIRANDA, F. **Orquídeas da Amazônia Brasileira**. Ed. Expressão e Cultura. Rio de Janeiro, RJ. 192p. 1996.

MOREL, G.; MARTIN, C. **Guerison de dahlias atteints d'ume Maladie a Virus**. pp. 235, 1324-1325. C. R. Acad. Sci., Paris. 1952.

MOREL, G. M. Tissue culture: a new means of clonal propagation of orchids. **American Orchid Society Bulletin**, v. 33, p. 473-478. 1964.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobbaco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-479. 1962.

NOSSAS ORQUÍDEAS - **Plantio de Orquídeas**. [Internet]. Disponível em: <http://orquidea.base33.net/duvidas/98-plantio-de-orquideas>. Acesso em out 2011.

ORCHIDACEAE BRASILIENSES. [Internet]. Disponível em: http: //www.dalholl.hpg.ig.com.br/generos/*Mormodes*>. Acesso em jun 2011.

ORQUIDÁRIO DAMIANUS. (**Raízes e Micorriza** - por Ricardo Cruz). [Internet]. Disponível em: <http://www.damianus.bmd.br>. Acesso em out 2010.

ORQUÍDEAS TERRA. Site elaborado por Fernando Terra Manzan. [Internet]. Disponível em: <http://www.orquideasterra.com>. Acesso em jun 2010.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. ***Orchidaceae Brasiliensis***. Germany, Hildesheim: Kurt Schmersow. v. 1, 408p. 1975.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. ***Orchidaceae Brasiliensis***. Germany, Hildesheim: Kurt Schmersow. v. 2, 418p. 1977.

PASQUAL, M. **Cultura de Tecidos Vegetais: tecnologia e aplicações – Meios de Cultura**. Ed. UFLA/FAEPE, Lavras, 74p. 2001.

RAVEN, R.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Ed. Guanabara Koogan, São Paulo. 906p. 2001.

ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. **(Plants/Plant-science/Plant-registration)**. [Internet]. Disponível em: <http://www.rhs.org.uk>. Acesso em jan 2010.

REINERT, J. Uber die Kontrolle der Morphogenes und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. **Planta,** 53: 318-333. 1959.

ROBBINS, W.J. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. **Bot. Gaz.,** 73: 376–390. 1922.

SCHENK, R.V.; HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, v.50, p.199-204. 1972.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis.** London: Academic Press. 605 p. 1997.

STENBERG, M.L.; KANE, M.E. *In vitro* Seed Germination and Greenhouse Cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, in Endangered Florida Orchid. **Lindleyana**, 13 (2): 101-112. 1998.

STEWART, J.; BUTTON, J. Development of Callus and Plantles from Epidendrum Root Tips Cultured *in vitro*. **American Orchid Society Bulletin,** 47 (7): 607 – 612. 1978.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Ed. Artmed, Porto Alegre, 719pp. 2004.
TOSCANO DE BRITO, A.L.V.; CRIBB, P.J. **Orquídeas da Chapada Diamantina**. Rio de Janeiro, Nova Fronteira. 399p. Ilustr. 2005.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília, ABCTP e EMBRAPA/CNPH. 433p. 1990.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da Cultura de Tecidos de Plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (orgs). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.1 Ed. Embrapa, Brasília, p.11-20. 1998.

UEDA, H.; TORIKATA, H. Effects of Light and Culture Medium on Adventicious Root Formation by *Cymbidiums* in Aseptic Culture. **American Orchid Society Bulletin,** 41: 322-327. 1972.

UNESCO. **Vegetação no Distrito Federal**: tempo e espaço. 2a edição, Unesco, Brasília, 80p. 2000.

VASIL, I.K.; AHUJA, M.R.; VASIL, V. Plant tissue culture in genetics and plant breeding. **Adv. Gen.,** 20:127-215. 1979.

VACIN, E.; WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, 110: 605-613. 1949.

VAJRABHAYA, M.; VAJRABHAYA, T. Tissue Culture of Rhynchostylis gigantea, a Monopodial Orchid. **American Orchid Society Bulletin**, 39: 907-910. 1970.

WAES, J.M.V.; DEBERGH, P.C. *In vitro* Germination of Some Western European Orchids. **Physiologia Plantarum**, 67: 253-261. 1986.

WARMING, E. **Lagoa Santa: Et Bidrag til den biologiske Plantegeografi**. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skr., Raekke, naturvidensk. og math. Afd 6(3). Kjøbenhavn, Bianco Lunos Kgl. Hof-Bogtrykkeri. 1892.

WHITE, P.R. Influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat *seedlings* in liquid media. **Plant Physiology**, 7: 613-628. 1932.

YATAZAWA, M.; FURUHASHI, K. Nitrogen Sources for the Growth of Rice Callus Tissue. **Soil Science and Plant Nutrition**, 14: 73-79. 1968.