



Revista Agrária Acadêmica

[Agrarian Academic Journal](#)

Volume 3 – Número 3 – Mai/Jun (2020)



doi: 10.32406/v3n32020/262-273/agrariacad

Propagação *in vitro* e aclimatização de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). *In vitro* propagation and acclimatization of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae),

[Michele Cagnin Vicente](#)^{1*}, João Sebastião de Paula Araujo²

^{1*} Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR 465, KM 7, Seropédica – RJ, CEP: 23897-000, Brasil. E-mail: michelecagnin@gmail.com.

² Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Resumo

Cattleya walkeriana é uma orquídea endêmica do Brasil de alto valor ornamental e comercial, estando entre as espécies da flora brasileira em risco de extinção na natureza. Este trabalho buscou avaliar o desempenho de plântulas de *Cattleya walkeriana* subcultivadas em diferentes meios de cultura durante a fase de propagação *in vitro* e posteriormente na fase *ex vitro*, fase esta conhecida como aclimatização. Constatou-se que, dentre os meios de cultura testados, o meio à base do fertilizante Kristalon™ Laranja se mostrou o mais indicado na propagação *in vitro* da espécie e que a inoculação bacteriana realizada durante a fase de aclimatização não promoveu efeitos positivos e/ou negativos no desenvolvimento das plantas.

Palavras-chave: Orquídeas. Meios de cultura. Potencial hidrogeniônico. Aclimatização. Inoculação bacteriana.

Abstract

Cattleya walkeriana is an endemic orchid from Brazil with high ornamental and commercial value, being among the species of Brazilian flora at risk of extinction in nature. This work sought to evaluate the performance of *Cattleya walkeriana* seedlings subcultured in different culture media during the *in vitro* propagation phase and later in the *ex vitro* phase, this phase known as acclimatization. It was found that, among the culture media tested, the Kristalon™ Orange fertilizer-based medium proved to be the most suitable for *in vitro* propagation of the species and that the bacterial inoculation performed during the acclimatization phase did not promote positive and/or negative effects on the plant development.

Keywords: Orchids. Culture mediums. Hydrogen potential. Acclimatization. Bacterial inoculation

Introdução

Cattleya walkeriana Gardner é uma espécie endêmica do Brasil que possui alto valor ornamental e comercial, fatos que somados às especificidades reprodutivas da família a coloca entre as espécies da flora nacional com risco de extinção elevado na natureza (CNCFLORA, 2012). As sementes das orquídeas são diminutas e não possuem endosperma, deste modo, na natureza essas sementes germinam e desenvolvem-se através da relação com fungos simbiotes específicos, assim, apesar de produzirem milhares de sementes por cápsula, apenas aproximadamente 5% delas germinam (FARIA et al., 2012). Desse modo, a técnica de semeadura *in vitro* desenvolvida por KNUDSON (1922) se tornou imprescindível para propagação de orquídeas em escala comercial, por proporcionar alto percentual de germinação e produção de mudas com qualidade fitossanitária. E, além disso, uma importante ferramenta de preservação, por reduzir, de forma indireta, a extração das mesmas da natureza e permitindo, caso necessário, a reintrodução dessas plantas em seu habitat natural (*in situ*), uma vez que a técnica mantém a variabilidade genética das plantas produzidas (FREITAS et al., 2014; CORREIA et al., 2012; FARIA et al., 2012; SCHNEIDERS et al., 2012).

A última fase da propagação *in vitro* é conhecida por aclimatização, nesta fase as plântulas obtidas são transferidas das condições *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, geralmente para condições de casa de vegetação, trata-se de uma etapa crítica, representando, em muitos casos, as maiores perdas no cultivo *in vitro* de muitas espécies (COUTO e ARAUJO, 2018).

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

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

A atividade fotossintética das plantas *in vitro* é limitada principalmente pela reduzida intensidade luminosa, baixa concentração de CO₂ no recipiente de cultivo e presença de sacarose no meio de cultura que é, em geral, a única ou principal fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento das plantas neste ambiente (LIMA-BRITO et al., 2016; SOUTO et al., 2010). Além disso, comumente, as raízes de plantas provenientes da propagação *in vitro* são fracas e pouco funcionais (BOSA et al., 2003), uma vez que no meio de cultura as plântulas, em geral, encontram facilmente disponíveis todo o suprimento necessário para seu desenvolvimento (ZANDONÁ et al., 2014). Logo, torna-se relevante testar diferentes técnicas para favorecer o desenvolvimento de plântulas provenientes de propagação *in vitro* durante a fase de aclimatização.

Plântulas propagadas em condições *in vitro*, ou seja, em condições assépticas são, portanto, privadas de potenciais microrganismos patogênicos (LONE et al., 2008), mas também daqueles que possam apresentar efeitos benéficos ao seu desenvolvimento. De acordo com Galdiano Júnior et al. (2011) e Galdiano Júnior (2009) a técnica de inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) têm se mostrado favorável na aclimatização de plântulas micropropagadas de diferentes espécies vegetais. Segundo Galdiano Júnior (2009), tais contribuições podem ser traduzidas em incremento da biomassa, maior aquisição de nutrientes, biocontrole de fitopatógenos

e resistência a estresses ambientais, consequentemente com maior de sobrevivência das mesmas. A utilização de microrganismos na forma de inoculantes se mostra como uma ferramenta promissora no mercado agrícola, sendo uma das tecnologias mais eficientes na substituição de métodos tradicionais de adubação com fertilizantes, visando o incremento da produtividade vegetal de forma econômica e sustentável (COSTA et al., 2014; SILVEIRA, 2008).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner cultivadas em diferentes meios de cultura em sistema de propagação *in vitro* e, posteriormente o efeito destes diferentes meios de cultura e da inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal, durante a fase de aclimatização das plântulas.

Material e métodos

O experimento de propagação *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), no Departamento de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica - RJ. Em outubro de 2017 plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner apresentando altura média de 1,0 cm de comprimento, foram subcultivadas nos meios de cultura MURASHIGE e SKOOG (1962) (*Phyto Technology Laboratories*[®]) - MS; KNUDSON C, 1946 modificado por MOREL (1965) (*Phyto Technology Laboratories*[®]) - KC; Fertilizante Peters[®] Forth Orquídeas (20-20-20) (3 g.L⁻¹) - PE; Fertilizante Kristalon[™] Laranja (6-12-36) (3 g.L⁻¹) - KL.

Todos os meios utilizados foram suplementados com 1 g.L⁻¹ de carvão ativado (Vetec[®]), 30 g.L⁻¹ de sacarose (Isofar[®]), 7,5 g.L⁻¹ de ágar (Isofar[®]) e tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do ágar. Em sequência os meios foram colocados em aparelho micro-ondas até a terceira fervura, quando então se transferiu cerca de 35 ml de cada meio para frascos de 268 ml que, posteriormente, foram esterilizados em autoclave a 121°C, a 1,1 atm, durante 15 minutos.

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

Foram avaliados a massa fresca total (MFT), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF), o número de raiz (NR), o comprimento da maior raiz (CMR) e o pH dos meios de cultura após o subcultivo das plântulas (pH_{final}). Para avaliação do MFT foi utilizada balança eletrônica digital de precisão da marca Bioprecisa modelo FA2104N com quatro casas decimais, a avaliação do CMF e do CMR foram feitas manualmente com uso de régua graduada em milímetros, já a avaliação do NF e NR foram feitas manualmente por contagem, em todos os casos as avaliações foram feitas planta por planta, obtendo-se a média de 4 plantas/frasco (repetição). Para aferição do pH_{final} a metodologia foi adaptada da EMBRAPA (1997), a aferição foi feita em água (1: 2,5 v/v), onde o meio de cultura foi homogeneizado com ajuda de um bastão de vidro, em seguida 10 ml do meio homogeneizado foram transferidos para copo descartável de 150 ml, então colocou-se 25 ml de água destilada deionizada, agitou-se com bastão de vidro, lavando-se ao passar de uma amostra

para outra. Deixou-se em repouso por 1 hora e em seguida agitou-se novamente com bastão de vidro, sendo feita a aferição de pH com uso de eletrodo combinado imerso em suspensão, a leitura foi feita em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e 20 repetições, sendo considerado cada frasco uma repetição, contendo quatro protocormos/frasco, totalizando ao final 320 plântulas. Para a avaliação do pH_{final} selecionou-se ao acaso 10 frascos de cada tratamento, totalizando 10 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias com teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 5%, com auxílio do *software* Rbio (BHERING, 2017).

Ao término das avaliações biométricas as plântulas obtidas *in vitro* foram transferidas para a fase de aclimatização, sendo transplantadas para bandejas de polietileno com 40 células cada, totalizando seis bandejas (duas bandejas por tratamento MS, PE e KL), o substrato utilizado foi o *Sphagnum*. Mediante os resultados obtidos na etapa *in vitro*, as plântulas obtidas do tratamento KC não foram consideradas nessa etapa.

As plântulas obtidas permaneceram no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Agronomia da UFRRJ (LCTV-IA/UFRRJ) por uma semana, em sequência foram levadas para casa de vegetação, no setor de Horticultura da UFRRJ, onde permaneceram pelo período de 28 dias sem receber nenhum tipo de tratamento. Sendo mantidas em casa de vegetação provida de sistema de exaustão e de irrigação do tipo nebulização intermitente, sendo ambos controlados automaticamente através de sensores e do controlador e indicador digital de umidade e temperatura da marca Fullgauge modelo MT-530 *super*, o sistema de irrigação era acionado sempre que a umidade relativa do ar no ambiente era menor que 70%, permanecendo em funcionamento pelo tempo de cinco minutos ou até que a umidade atingisse 80%, o sistema de exaustão era ativado sempre que a temperatura fosse superior a 30 °C.

Aos 28 dias após o transplantio das mudas (DAT), com o auxílio de seringa esterilizada, plântulas de cada tratamento foram inoculadas com 1,0 ml da suspensão de *Azospirillum brasilense* SP 245 BR 11005 (concentração de 10⁸ células ml⁻¹) (AZ); com 1,0 ml da suspensão de *Microvirga vignae* BR 3299 (concentração de 10⁸ células ml⁻¹) (MV); e com zero ml de inoculante, sendo utilizada apenas H₂O destilada, este último foi designado de tratamento Controle (CO).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x3, sendo o fator A, inoculação da suspensão de *Azospirillum brasilense* (AZ), inoculação da suspensão de *Microvirga vignae* (MV) e ausência de inoculação (CO) e o fator B, mudas produzidas *in vitro* nos meios de cultura MS, PE e KL. Foram feitas quatro repetições, sendo considerado cada repetição uma bandeja de polietileno contendo seis células com uma planta cada, totalizando assim 216 plântulas. As mesmas permaneceram na casa de vegetação por mais 92 dias, totalizando 120 dias (28 dias + 92 dias), quando então foram avaliadas as variáveis percentual de sobrevivência (SB), massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR) e comprimento da maior raiz (CMR). Para avaliação do MFT foi utilizada balança eletrônica digital de precisão da marca Bioprecisa modelo FA2104N com quatro casas decimais, a avaliação do CMF e do CMR foram feitas manualmente com uso de régua graduada em milímetros e as avaliações do NF e NR foram feitas manualmente por contagem, em todos os casos as avaliações foram feitas planta por planta, obtendo-se a média de 6 plantas/bandeja (repetição).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias ao teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 5%, com auxílio do *software* Rbio (BHERING, 2017).

Resultados

Ao final da fase de experimentação *in vitro* pode-se constatar que no tratamento KC houve clorose seguida de oxidação de 34 plantas (44,74%) e que as 42 plantas (55,26%) que permanecem vivas apresentam desenvolvimento bastante reduzido quando comparadas aos demais tratamentos. Deste modo, optou-se por excluir os resultados desse tratamento da análise estatística, exceto para variável pH_{final} .

A análise de variância mostrou resultado significativo para todos os parâmetros avaliados, ou seja, mostrou que o meio utilizado influenciou nos resultados de todas as variáveis analisadas. Assim, na tabela 1, podemos observar o resumo da análise da comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de significância para as variáveis MFT, NF, CMF, NR e CMR para os tratamentos MS, PE e KL. E as médias da variável pH_{final} para esses tratamentos e para o tratamento KC.

O meio à base do fertilizante Kristalon™ Laranja (KL) foi o que apresentou as maiores médias para todas as variáveis, exceto para a variável número de folhas (NF), cujo meio Murashige e Skoog (1962) (MS) foi o que apresentou média superior para esta variável. Os meios à base do fertilizante Kristalon™ Laranja (KL) e do fertilizante Peters® (PE) não diferiram significativamente entre si para a variável número de folhas (NF). O meio de cultura à base do fertilizante Peters® (PE) apresentou médias iguais ao do meio Murashige e Skoog (1962) (MS) para as variáveis massa fresca total (MFT) e comprimento da maior raiz (CMR), sendo o que apresentou as menores média para as variáveis comprimento da maior folha (CMF) e número de raiz (NR).

Em relação à variável pH_{final} pode-se constatar que houve variação de pH em todos os meios de cultura testados, todos sofreram redução de pH quando comparados ao pH_{inicial} dos meios. Nessa análise, o pH_{final} do meio à base do fertilizante Peters® (PE) foi o que se manteve mais elevado, enquanto o meio KNUDSON C, 1946 modificado por MOREL (1965) (KC) foi o que sofreu maior redução de pH. Contudo, não houve respostas lineares, positivas ou negativas, entre os resultados das variáveis biométricas obtidos e o pH do meio de cultura.

Tabela 1 - Médias da massa fresca total (MFT), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e do potencial hidrogeniônico dos meios de cultura (pH_{final}) após oito meses de cultivo de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner *in vitro*. UFRRJ, Seropédica - 2019.

Meios de Cultura (Tratamentos)	Média das Variáveis Analisadas*					
	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)	pH_{final}
MS	0.48 b	6.89 a	1.71 b	6.70 b	2.55 b	3.81 c
PE	0.47 b	4.47 b	1.20 c	4.53 c	2.73 b	4.60 b
KL	1.03 a	4.94 b	2.09 a	7.89 a	3.99 a	3.89 c
KC	-	-	-	-	-	3.47 d
Controle***	-	-	-	-	-	5.80 a
Média Geral	0,66	5,43	1,67	6,37	3,09	4,24
CV (%)	40.05	20.53	24.16	20,89	28.38	6.19

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de significância.

MS – Murashige e Skoog (1962); KC - Knudson C (1946) modificado por Morel (1965); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja.

Para a fase de experimentação *ex vitro*, a análise de variância mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa para os fatores interação e para o fator inoculação, havendo resultado estatisticamente significativo para o fator meio de cultura, pelo teste F a 5%, para todas as variáveis analisadas. Ou seja, a análise estatística mostrou que pelo menos um dos meios de cultura utilizado durante a fase de propagação *in vitro* influenciou nos resultados de todas as variáveis analisadas durante a aclimatização das plantas, independentemente da presença e/ou ausência de inoculação. Deste modo na tabela 2 estão expressos os resultados da comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância para o fator meio de cultura.

Tabela 2 - Teste de média para as variáveis analisadas após quatro meses de aclimatização de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner provenientes do cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura. UFRRJ, Seropédica - 2019.

Meios de Cultura (Fator B)	Média das Variáveis Analisadas*					
	SB (%)	MFT (g)	NF (unid.)	CMF (cm)	NR (unid.)	CMR (cm)
MS	62.50 b	0.94 b	3.84 a	1.65 b	3.29 ab	4.64 a
PE	73.58 b	0.61 b	3.05 b	1.26 c	3.00 b	3.50 b
KL	95.75 a	1.46 a	3.46 ab	2.16 a	4.32 a	5.25 a
Média Geral	77.28	1.00	3.45	1.69	3.54	4.46
CV (%)	20.65	34.57	21.63	20.38	28.98	23.00

* médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV (%) coeficiente de variação. Os dados representam a média de 04 repetições para as variáveis biométricas de cada tratamento.

Percentual de sobrevivência (SB); massa fresca total (MFT); número de folhas (NF); comprimento da maior folha (CMF); número de raiz (NR); comprimento da maior raiz (CMR).

MS – Murashige e Skoog (1962); KC - Knudson C (1946) modificado por Morel (1965); PE - Fertilizante Peters®; KL - Fertilizante Kristalon™ Laranja.

O meio à base do fertilizante Kristalon™ Laranja (KL) mostrou resultados superiores para as variáveis percentual de sobrevivência (SB), massa fresca total (MFT) e comprimento da maior folha (CMF), sendo que para os dois primeiros parâmetros os meios Murashige e Skoog (1962) (MS) e o meio à base de fertilizante Peters® (PE) não diferiram estatisticamente entre si, tendo o meio PE apresentado a menor média para a variável comprimento da maior folha (CMF). Quanto à variável número de folhas (NF), o meio à base do fertilizante Kristalon™ Laranja (KL) não diferiu estatisticamente do meio Murashige e Skoog (1962) (MS), contudo não diferiu também do meio à base de fertilizante Peters® (PE), sendo que este apresentou média inferior ao meio Murashige e Skoog (1962) (MS) para essa variável. Não houve diferença estatística para as variáveis número de raiz (NR) e comprimento da maior raiz (CMR) entre os resultados observados para os meios KL e MS, entretanto para a variável número de raiz (NR) a média do meio Murashige e Skoog (1962) (MS) também não diferiu estatisticamente da média obtida para o meio à base de fertilizante Peters® (PE).

Na tabela 3 podemos comparar os resultados das variáveis biométricas obtidos antes e depois da aclimatização das mudas, houve incremento nas médias das variáveis massa fresca total (MFT) e comprimento da maior raiz (CMR), após o período de aclimatização das mudas, provenientes de todos os meios de cultura utilizados. Entretanto, para as demais variáveis, houve

queda nos valores médios após a aclimatização. Logo, pode-se observar que o aumento das médias da variável massa fresca total (MFT) se deu em razão do aumento nos valores médios da variável comprimento da maior raiz (CMR).

Tabela 3 - Resultado das variáveis analisadas ao final do Experimento *in vitro* e depois ao final do experimento *ex vitro* das mudas de *Cattleya walkeriana* Gardner.

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

MS – Murashige e Skoog (1962); PE - Fertilizante Peters[®]; KL - Fertilizante Kristalon[™] Laranja.

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

Discussão

De acordo com Freitas et al., (2014), embora o meio Knudson C possua diferentes sais minerais e, seja muito utilizado na germinação de sementes de orquídeas, parece não proporcionar as condições ideais para o desenvolvimento de plântulas de algumas espécies, esses autores observaram que o tratamento KC foi o que alcançou a segunda menor média na propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya intermedia*. Santos (2009) cultivou protocormos de *Cattleya walkeriana* nos meios de cultura Murashige e Skoog (1962) e no meio à base de fertilizante Peters[®] 10-30-20 (3,0 g.L⁻¹) e avaliou a concentração de alguns nutrientes na massa seca dos tecidos das plântulas obtidas, o autor observou que no meio à base de fertilizante Peters[®] houve maior número de nutrientes deficitários (6 de 10 nutrientes avaliados), e que os dois meios apresentaram déficit dos nutrientes Ca, Mg e Mn.

Pedroso-de-Moraes et al. (2009) concluíram que o meio de cultura à base de fertilizante Kristalon Laranja demonstrou ser mais eficaz na propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya tigrina*, considerando as variáveis massa fresca da raiz, número de raiz e comprimento da maior da raiz, quando comparado ao meio de cultura à base do fertilizante Hyponex (NPK 6,5-9-19) e ao meio Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes. Schneider (2014) verificou que o melhor meio de cultivo para o desenvolvimento *in vitro* de mudas de *Cattleya intermedia* a partir de protocormos foi o meio a base do suplemento para orquídeas B&G e que o meio à base do fertilizante comercial Krystalon Laranja apresentou resultados similares a este no desenvolvimento das mudas, esses meios foram testados pela autora em comparação aos meios Murashige e Skoog (1962) e Knudson C (1946).

Santos (2009) e Rodrigues (2005) em estudos com *Cattleya walkeriana* observaram que a relação Raiz/Folha aumenta com a redução da concentração de sais no meio de cultura, para os mesmos trata-se de uma capacidade das plântulas em se adaptarem às condições de baixo suprimento nutricional, ou seja, investem mais em raiz do que em parte aérea. Assim, comparando

os resultados obtidos neste trabalho, o tratamento KL com o tratamento (MS), pode-se observar a tendência do meio à base do fertilizante comercial Krystalon™ Laranja (KL) à maior relação Raiz/Folha, fato que corrobora com o observado por esses autores, uma vez que o meio à base do fertilizante comercial Krystalon™ Laranja é um meio com menor concentração de sais quando comparado ao meio Murashige e Skoog (1962).

Bettão (2009) também verificou que não houve correlação entre o pH final de diferentes meios de cultura com as variáveis biométricas número de folha e de raiz e comprimento de folha e de raiz das plântulas de *Cattleya walkeriana* propagadas *in vitro*. Lone et al. (2008), testando diferentes substratos para a aclimatização de *Cattleya intermedia*, relataram que os valores médios de pH, apresentaram-se muito variados, e não influenciaram no desenvolvimento das plantas. Um conjunto de fatores estão envolvidos na variação de pH do meio de cultura, dentre eles fatores físicos (autoclavagem do meio de cultura) e/ou químicos (adição de ágar e pela própria dinâmica do balanço nutricional e exsudados liberados pela planta no meio) (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2017; ADAMUCHIO, 2015). Deste modo, outros estudos precisam ser realizados para que se possa entender a dinâmica pH *versus* desenvolvimento de plantas em sistema de propagação *in vitro*.

A comparação entre as fases *in vitro* e *ex vitro* (tabela 3) nos ajudar a compreender melhor os resultados obtidos durante a fase de aclimatização, uma vez que se esperava que o desempenho das mudas provenientes do meio à base de fertilizante Krystalon™ Laranja (KL) pudessem ser superiores na fase de aclimatização, apresentando médias superiores para todas as variáveis analisadas, contudo isso não foi o que ocorreu. Sugere-se que a queda do valor médio em algumas variáveis pode ser devido ao estresse sofrido pelas plântulas durante a fase de aclimatização, resultados semelhantes foram observados por Dorneles e Trevelin (2011) na aclimatização de *Cattleya intermedia*, cujo substrato utilizado também foi o *Sphagnum* spp., estes autores observaram que o número médio de folhas e de raízes e o comprimento médio de folhas e de raízes sofreram redução ao longo do tempo de aclimatização.

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

Em se tratando do percentual de sobrevivência obtido na fase de aclimatização, podemos considerar que houve grande eficácia na etapa de aclimatização, uma vez que os percentuais de sobrevivência, independentemente do tratamento do fator inoculação, foram de 62.50% para plântulas provenientes de cultivo *in vitro* no meio Murashige e Skoog (1962) (MS), 73.58% para plântulas provenientes de cultivo *in vitro* no meio à base de fertilizante Peters® (PE) e de 95.75% para plântulas provenientes de cultivo *in vitro* no meio à base de fertilizante Krystalon™ Laranja

(KL). Os resultados relativos à porcentagem de sobrevivência observados nesse trabalho se aproximam aos obtidos por Galdiano-Júnior et al. (2011). Estes autores obtiveram o seguinte percentual de sobrevivência ao final de 90 dias de aclimatização de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner provenientes de cultivo *in vitro* em meio Murashige e Skoog (1962) e inoculadas com rizobactérias em casa de vegetação: *Bacillus* (80%), *Burkholderia* (57.5 %), *Enterobacter* (75.5%), *Curtobacterium* (55%) e na ausência de inoculação (60%).

Considerações finais

Pode-se constatar o meio Knudson C (1946) modificado por Morel (1965) não é adequado para propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner e que o meio de cultura alternativo a base de fertilizante KristalonTM Laranja se mostrou o mais indicado na propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner sob as condições testadas, permitindo sobretudo obter maior sobrevivência de mudas durante a fase de aclimatização. Constatou-se que há redução do pH dos meios de cultura ao final do subcultivo, contudo não houve correlação entre a variável pH_{final} dos meios de cultura e as respostas biométricas das plantas de *Cattleya walkeriana* Gardner avaliadas, sendo necessário outros estudos para que se possa entender a dinâmica pH *versus* desenvolvimento de plantas em sistema de propagação *in vitro*. A inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Microvirga vignae* não influenciou positivamente e/ou negativamente no desenvolvimento das plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner durante etapa de aclimatização, sendo fundamentais estudos que busquem selecionar estirpes bacterianas e/ou outras técnicas de inoculação que contribuam para produção comercial mais eficiente e sustentável de orquídeas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa à primeira autora, à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF).

Referências bibliográficas

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

AMARAL, M. B.; SILVA, E. NOVAIS, D. B.; MONTEIRO, E. C.; CASTILHO, G. J. M.; BALDANI, V. L. D. Inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em variedades de arroz. **XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação à Docência** – Universidade do Vale do Paraíba, 2017.

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

BHERING, L. L. Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 187-190, 2017.

BOSA, N.; CALVETE, E. O.; NIENOW, A. A.; SUZIN, M.; Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 207-210, 2003.

CNCFLORA. *Cattleya walkeriana* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_walkeriana>. Acesso em: 18 nov. 2018.

CORASSA, G. M.; BERTOLLO, G. M.; GALLON, M. BONA, S. D.; SANTI, A. L. Inoculação com *Azospirillum brasilense* associada à adubação nitrogenada em trigo na região norte do Rio Grande do Sul. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 1298-1308, 2013.

CORREIA, D.; ARAÚJO, J. D. M.; NASCIMENTO, E. H. S.; TUPINAMBÁ, J. M.; BESSA, M. C. Otimização da Produção de Mudas de *Cattleya labiata*: Efeito da sacarose no crescimento *in vitro* e na aclimatização. **EMBRAPA: Circular Técnica 38**. Fortaleza CE, outubro, 2012. 8p.

COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; ESTEVES, J. A.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta da soja a inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e *Bradyrhizobium*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 10, n. 19, p. 1678-1689, 2014.

COUTO, T. R. do; ARAUJO, J. S. de P. Aclimatização de mudas micropropagadas de genótipos de gérbera. **Revista Agrária Acadêmica**, v. 1, n. 4, p. 52-63, 2018.

DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham *ex* Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 66, n. 2, p. 167-174, 2011.

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

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

FREITAS, E. M.; HERRMANN M. H., BRUISMA, G.; PÉRICO E.; ARAUJO, A. G. Propagação *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham *ex* Hook. (Orchidaceae) em diferentes meios de cultura. **Caderno Pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 30-41, 2014.

GALDIANO-JÚNIOR, R. F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas as raízes de orquídeas**. Dissertação (Mestrado) Genética e Melhoramento de Plantas, 67p. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, SP: Jaboticabal, 2009.

GALDIANO-JÚNIOR, R. F.; PEDRINHO, E. A. N.; CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, n. 03, p. 729-737, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SCHNEIDER, L.; ARAUJO, J. S. P.; ZAFFARI, G. R. Seed germination of *Cattleya intermedia* and *Cattleya warneri* in alternative culture media. **American International Journal of Contemporary Research**, v. 4, p. 60-66, 2014.

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

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

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

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

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

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

VIEIRA, R. F. **Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas**. Brasília, DF: Embrapa Meio Ambiente, 2017, 163p.

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

Recebido em 29 de abril de 2020

Retornado para ajustes em 5 de junho de 2020

Recebido com ajustes em 5 de junho de 2020

Aceito em 12 de junho de 2020