

**JOSÉ ARCANJO NUNES**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA BAUNILHEIRA (ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Romais Schimldt.

**ALEGRE**  
**ESPÍRITO SANTO – BRASIL**  
**2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

N972p Nunes, José Arcanjo,  
Propagação in vitro da baunilheira (Orquidaceae) / José Arcanjo  
Nunes. – 2014.  
99f.: il.

Orientador: Edilson Romais Schmidt.

Co-orientadores: José Augusto Teixeira do Amaral; José Carlos  
Lopes.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal  
do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Vanilla planifolia. 2. Carboidrato. 3. Gema Axilar. 4. Substrato. I.  
Schmidt, Edilson Romais. II. Amaral, José Augusto Teixeira do. III.  
Lopes, José Carlos. IV. Universidade Federal do Espírito Santo.  
Centro de Ciências Agrárias. V. Título.

CDU: 63

---

**JOSÉ ARCANJO NUNES**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA BAUNILHEIRA (ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 17 de dezembro de 2013.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Profa. Virginia Silva Carvalho  
Universidade Estadual do Norte Fluminense

---

Prof. Paulo Cezar Cavatte  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof. José Augusto Teixeira do Amaral  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof. José Carlos Lopes  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof. Edilson Romais Schmidt  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

## DEDICO

À memória dos meus pais, Edis e Rosa, e da minha irmã Penha.

À minha querida mulher, Regina, pelo apoio e companheirismo.

Aos meus filhos, Rafael e Fernanda, presentes de Deus na minha vida.

Aos meus irmãos, José Maria, José Antônio, Maria de Fátima e Maria Madalena.

Nossa união é a força que nos faz continuar a viver com alegria.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, criador do sol, do ar, da água, da terra, da semente, do homem e do amor.

Ao povo brasileiro que com o pagamento de seus impostos me deu a oportunidade de estudar um pouco mais. Espero retribuí-lo com o meu trabalho.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade, acolhimento e contribuição para minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt, pelo apoio, incentivo, conselhos, amizade e, sobretudo, pela oportunidade que me proporcionou ao realizar um dos meus maiores sonhos, o curso de doutorado.

Aos Professores José Augusto Teixeira do Amaral e José Carlos Lopes e Paulo Cezar Cavatte, pela atenção, incentivo, aconselhamentos e companheirismo.

Aos professores do curso, pelas valiosas informações passadas e por sempre terem acreditado no meu potencial.

Aos meus colegas de curso, pelo apoio principalmente nas horas mais difíceis.

Ao casal, Maria Cristina Duchêne-Veauvy e Jean-Marie François Pascal Veauvy, da empresa Clonagri, pela enorme contribuição nas pesquisas e por terem me mostrado que o mais importante não é o tempo, mas “o fazer bem feito”.

Aos agricultores familiares da comunidade da Fortaleza, Muqui-ES, que me deram a oportunidade de conhecer e divulgar a baunilha.

Aos companheiros e amigos, Dr. Omar Schmildt, Dr. Marcos Oliveira Athayde, Rafael Fonsêca Zanotti, Giuliano da Silva Ribeiro, Luciana Ferreira da Silva, Camila Aparecida da Silva Martins, e aos meus filhos, Rafael Dalvi Nunes e Fernanda Dalvi Nunes, pela amizade, companheirismo e apoio nos trabalhos de campo e de laboratório e pelos valiosíssimos esclarecimentos.

Aos funcionários do CCA-UFES, Madalena Caetano Capucho, Paulo Cezar de Oliveira e Silvio Rogério Ferraz, pelo acolhimento, carinho, atenção e presteza nas minhas necessidades.

À Professora Virginia Silva Carvalho, pela amizade e pelas preciosas informações acerca da micropropagação de plantas.

Ao companheiro e amigo José Carlos Correa Cardoso, pelo apoio incondicional para que minhas pesquisas pudessem ser realizadas.

Ao INCAPER, pela oportunidade de realizar um dos experimentos na Fazenda Experimental “BANANAL DO NORTE”, em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo.

Ao Prefeito Municipal de Cachoeiro de Itapemirim, Carlos Roberto Casteglione Dias, pela amizade, companheirismo, apoio, confiança e pelas oportunidades que tem me conferido.

À Regina Celi Dalvi Nunes, minha eterna namorada. O apoio que me destes foi mais uma prova do amor que sentes por mim.

## **A Baunilha**

Vês como aquela baunilha

Do tronco rugoso e feio

Da palmeira - em doce enleio

Se prendeu!

Como as raízes meteu

Da úsnea no musgo raro,

Como as folhas - verde-claro -

Espalmou!

Como as bagas pendurou

Lá de cima! como enleva

O rio, o arvoredado, a relva

Nos odores!

Que inspiram falas de amores!

Dá-lhe o tronco - apoio, abrigo.

Dá-lhe ela - perfume amigo,

Graça e olor!

E no consórcio de amor

- Nesse divino existir -

Que os prende, vai-lhes a vida

De uma só seiva nutrida,

Cada vez mais a subir!

Se o verme a raiz lhe ataca,  
Se o raio o cimo lhe ofende,  
Cai a palmeira, e contudo  
Inda a baunilha recende!  
Um dia só! \_ que mais tarde,  
Exausta a fonte do amor,  
Também a baunilha perde  
Vida, graça, encanto, olor!

*Antônio Gonçalves Dias, 1861.*

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1 Considerações gerais ( <i>Vanilla planifolia</i> ).....	5
1.2 Descrição botânica da <i>Vanilla planifolia</i> .....	7
1.3 Cultivo de <i>Vanilla planifolia</i> .....	9
1.4 Propagação da <i>Vanilla planifolia</i> .....	10
1.5 Importância econômica.....	11
1.6 Condições do ambiente de cultivo <i>in vitro</i> .....	14
1.6.1 Carboidratos.....	16
1.6.1.1 Destino dos carboidratos adicionados ao meio de cultura durante o metabolismo de explantes de baunilheira.....	17
1.6.2 pH.....	20
1.6.3 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	20
1.7 Substrato.....	21
1.8 Referências bibliográficas.....	22
CAPÍTULO II – Sacarose no crescimento <i>in vitro</i> de baunilheira (Orchidaceae).....	33
Resumo.....	34
Abstract.....	35
2.1 Introdução.....	36
2.2 Material e métodos.....	37
2.3 Resultados e discussão.....	42
2.4 Conclusões.....	55
2.5 Referências bibliográficas.....	55
CAPÍTULO III – Crescimento de mudas de baunilheira (Orchidaceae): recipiente, substrato e tipo de muda.....	63
Resumo.....	64
Abstract.....	65
3.1 Introdução.....	66
3.2 Material e métodos.....	69
3.3 Resultados e discussão.....	72
3.4 Conclusões.....	78
3.5 Referências bibliográficas.....	78
4. Conclusões gerais.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Produção mundial de baunilha (ton).....	12
Tabela 2 -	Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca total da planta (MSTP), amido, eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm), taxa de transferência de elétrons (TTE), rendimento fotoquímico do FSII ( $\Phi_{FSII}$ ), rendimento não fotoquímico associado à dissipação de energia pelo ciclo das xantofilas ( $\Phi_{NPQ}$ ), outros mecanismos de dissipação energética ( $\Phi_{NO}$ ), clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e clorofila total, de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> provenientes de micropropagação, submetidas a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, e pH do meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo, em Arthur Nogueira, SP, 2013.....	42
Tabela 3 -	Resumo das análises de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), massa da matéria fresca do caule (MFC), massa da matéria fresca da raiz (MFR), massa da matéria fresca da folha (MFF), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca do caule (MSC), massa da matéria seca da raiz (MSR), massa da matéria seca da folha (MSF), massa da matéria seca total da planta (MSTP) e relação parte aérea/raiz (RPAR), de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> , provenientes de micropropagação de gema axilar e plântula, aos 90 dias após o plantio, em Cachoeiro de Itapemirim, ES, 2013.....	73
Tabela 4 -	Comprimento da parte aérea (CPA) de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> , em função do substrato (S) e do tipo de muda (M), em Cachoeiro de Itapemirim, ES, 2013.....	74
Tabela 5 -	Número de folhas (NF) de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> , em função do tipo de muda (M), em Cachoeiro de Itapemirim, ES, 2013.....	75
Tabela 6 -	Comprimento da maior raiz (CMR) de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> , em função do recipiente (R), em Cachoeiro de Itapemirim, ES, 2013.....	75
Tabela 7 -	Massa da matéria fresca do caule (MFC), massa da matéria fresca da folha (MFF), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca do caule (MSC), massa da matéria seca da folha (MSF) e massa da matéria	

seca total da planta (MSTP) de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> , em função do recipiente (R), do substrato (S) e do tipo de muda (M), em Cachoeiro de Itapemirim, ES.....	77
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da vanilina.....	7
Figura 2 -	Distribuição da produção mundial de baunilha, em 2011.....	12
Figura 3 -	Distribuição das importações de baunilha, em 2011.....	13
Figura 4 -	Mudas de <i>Vanilla planifolia</i> provenientes de micropropagação, cultivadas em meio MS na concentração de 30 g L <sup>-1</sup> de sacarose: (A) dia da inoculação; (B) aos 35 dias; e (C) aos 60 dias de subcultivo.....	39
Figura 5 -	(A) - comprimento da parte aérea (CPA), (B) - número de folhas (NF), (C) - número de raízes (NR), (D) - massa da matéria fresca total da planta (MFTP) e (E) - massa da matéria seca total da planta (MSTP), de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> provenientes de micropropagação, submetidas a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo.....	44
Figura 6 -	Mudas de <i>Vanilla planifolia</i> provenientes de micropropagação, cultivadas em diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L <sup>-1</sup> ), no meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo.....	46
Figura 7 -	(A) - Fv/Fm (eficiência fotoquímica máxima do FSII), (B) - qP (coeficiente de extinção fotoquímico), (C) - TTE (taxa de transporte de elétrons), (D) - $\Phi_{FSII}$ (rendimento fotoquímico do FSII), (E) - $\Phi_{NPQ}$ (rendimento não fotoquímico associado à dissipação de energia pelo ciclo das xantofilas) e (F) - $\Phi_{NO}$ (outros mecanismos de dissipação energética) de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> provenientes de micropropagação, submetidas a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo.....	49
Figura 8 -	(A) - Clorofila a, (B) - clorofila b, (C) - clorofila total e (D) - conteúdo de amido em mudas de <i>Vanilla planifolia</i> provenientes de micropropagação, cultivadas em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo.....	52
Figura 9 -	Taxa de perda de água (TPA) de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> provenientes de micropropagação, cultivadas em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura.....	53
Figura 10 -	pH do meio de cultivo de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> , com	

diferentes concentrações de sacarose..... 54

## RESUMO

Foram realizados dois experimentos com os objetivos de avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de mudas de *Vanilla planifolia*, e analisar as variáveis morfológicas de mudas de *V. planifolia* cultivadas em diferentes recipientes e diferentes substratos. Para isso, no experimento 1, mudas provenientes da proliferação de gemas axilares foram cultivadas *in vitro* em cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>), com quatro repetições de dez mudas, em delineamento inteiramente casualizado. Variáveis morfológicas, fluorescência da clorofila *a*, teor de amido, taxa de perda de água e o pH do meio de cultura foram avaliados 60 dias após a inoculação das mudas. As diferentes concentrações de sacarose influenciaram todas as características morfológicas e os parâmetros fisiológicos estudados. Os dados relativos aos aspectos morfofisiológicos de mudas de *V. planifolia* provenientes de micropropagação sugerem a viabilidade técnica para a propagação em larga escala de mudas dessa espécie. No experimento 2, estudou-se as variáveis morfológicas de mudas de *V. planifolia* provenientes da proliferação de gemas axilares e da propagação seminífera *in vitro*, cultivadas em diferentes recipientes e diferentes substratos. O experimento foi realizado em esquema de parcelas subdivididas, constituídas pelas combinações entre os fatores: recipiente (sacola e bandeja), substrato (preparado I e preparado II) e muda (micropropagada e plântula), num delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de oito mudas. A combinação de recipiente sacola, substrato II (solo, areia, esterco de galinha e serrapilheira de mata) e muda micropropagada de gema axilar pode ser usada na produção de mudas de *V. planifolia*.

Palavras-chave: *Vanilla planifolia*. Carboidrato. Gema axilar. Substrato.

## ABSTRACT

Two experiments were used to evaluate the effects of different concentrations of sucrose on *in vitro* growth of seedlings of *Vanilla planifolia*, and to analyze the morphological variables of *V. planifolia* seedlings grown in different containers, with different substrates. For such, in experiment 1, seedlings from the proliferation of axillary buds were cultivated under *in vitro* conditions using five concentrations of sucrose (0, 15, 30, 45 and 60 g L<sup>-1</sup>), with four replicates of ten seedlings in a completely randomized design. Morphological variables, chlorophyll a fluorescence, content of starch, rate of water loss and the pH of the culture medium were assessed 60 days after the inoculation of the seedlings. The different concentrations of sucrose affected all morphological traits and physiological parameters studied. The data related to the morphophysiological seedlings of *V. planifolia* obtained from micropropagation suggest the technical feasibility for large-scale propagation of seedlings of this species. In experiment 2, we studied the morphological variables of *V. planifolia* seedlings from axillary bud proliferation and *in vitro* seminiferous propagation, grown in different containers and different substrates. The experiment was arranged in a split-plot design, formed by the combinations of the following factors: container (bag and tray), substrate (preparation I and preparation II) and seedling (micropropagated and seedling), in a completely randomized design with four replications of eight seedlings. The combination of bag, substrate II (soil, sand, chicken manure and litter from forest) and micropropagated seedling from axillary buds can be used in the production of seedlings of *V. planifolia*.

Keywords: *Vanilla planifolia*. Carbohydrate. Axillary bud. Substrate.

## INTRODUÇÃO GERAL

A baunilheira é uma planta de clima tropical, pertencente à família Orchidaceae, de crescimento monopodial, cultivada sob a sombra das árvores, principalmente. Ela se destaca entre as plantas aromáticas, cujo aroma e sabor foram descobertos há séculos pelos povos astecas e maias, habitantes da América Central. A principal espécie comercial é a *Vanilla planifolia*, nativa do México.

A baunilha é uma importante especiaria utilizada na culinária, principalmente, na fabricação de sorvetes, chocolates e produtos de confeitarias. Também tem uso na produção de perfumes e fármacos. Possui alto valor comercial e gera mão de obra constante, seja nas lavouras, ou no processo de cura das cápsulas.

Para se obter boas produções, torna-se necessário realizar a polinização manual, devido à taxa de polinização natural ser de apenas 1%. As flores polinizadas resultam em frutos do tipo cápsulas que, ao serem submetidos a um longo processo de cura, produzem uma mistura de substâncias aromáticas, cujo principal componente é a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído).

O Brasil possui condições edafoclimáticas ideais para a produção de baunilha, mas esse potencial ainda é pouco explorado. Entre os anos de 1937 e 1941, algumas exportações brasileiras de baunilha foram realizadas para os Estados Unidos. Infelizmente, hoje, nosso país é um importador dessa especiaria. A Mesorregião Sul do Estado da Bahia, já estabelecida como área de produção de diversas especiarias, é onde a cultura da baunilheira está sendo desenvolvida e fornecendo ao mercado nacional cápsulas de excelente qualidade, tanto no que se refere ao padrão da cápsula como no aroma.

Tradicionalmente, a baunilheira é propagada pelo método da estaquia. Entretanto, é possível produzir mudas por meio da micropropagação, utilizando-se ápice meristemático ou gema axilar, e também pela via seminífera *in vitro*.

A micropropagação tem sido amplamente utilizada para a multiplicação rápida de muitas espécies de plantas, bem como para estudos relacionados aos aspectos fisiológicos referentes ao desenvolvimento vegetal. É uma alternativa que maximiza

a propagação de várias espécies, tendo como vantagens a fixação de ganhos genéticos em populações clonais e a obtenção de grande número de plantas sadias e de alta qualidade em pequeno espaço físico. A micropropagação é a modalidade dentro da cultura de tecidos que mais tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas, que consiste em formar mudas com as mesmas características da planta-matriz.

Em sistema convencional de micropropagação, as plantas são cultivadas *in vitro* em condições de ambiente fechado, sem trocas gasosas, com alta umidade do ar, baixa luminosidade e com a utilização de açúcares no meio de cultura como fonte de carbono e energia. Devido às condições de cultivo, as plantas apresentam alterações anatômicas e metabólicas que as tornam organismos heterotróficos. Essas alterações impossibilitam que a maquinaria fotossintética opere normalmente.

A micropropagação tradicional tem como premissa a presença de carboidrato no meio de cultivo, uma vez que este composto eleva a produção de biomassa e pode contribuir para aumentar o enraizamento de muitas espécies *in vitro*. Todavia, quando a concentração deste composto apresenta-se em excesso, ele pode aumentar o grau de contaminação do meio de cultivo, promover alteração no estado hídrico, inibir a síntese de clorofila, diminuir as atividades de algumas enzimas do ciclo de Calvin e, desta maneira, comprometer significativamente a capacidade fotoautotrófica dos explantes. Com base nessas informações, o conhecimento da concentração adequada de sacarose no meio de cultivo é fundamental para o sucesso da micropropagação.

As condições especiais durante o cultivo *in vitro* ao promoverem um crescimento rápido resultam na formação de plantas anormais. Essas plantas são frequentemente caracterizadas pela pobre eficiência fotossintética, mau funcionamento dos estômatos e uma acentuada diminuição na cera epicuticular. O cultivo de explantes em regime fotomixotrófico origina plantas com o conteúdo de água elevado, com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização.

Neste contexto foram realizados dois experimentos com os objetivos de avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de mudas

de *Vanilla planifolia*, e analisar as variáveis morfológicas de mudas de *V. planifolia* cultivadas em diferentes recipientes e diferentes substratos.

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Considerações gerais (*Vanilla planifolia*)

A baunilha é considerada como uma das principais especiarias. Seu sabor e aroma remonta há séculos na história da humanidade. Nas Américas, os Astecas e os Maias, utilizavam cápsulas da planta para aromatizar suas bebidas e tinham também variado emprego na culinária, no preparo de certas iguarias, assim como na elaboração dos primitivos cosméticos que as mulheres usavam, principalmente, em ocasiões de festas e de certos rituais religiosos. Com o domínio espanhol sobre esses povos, cápsulas foram introduzidas na Europa, sendo muito utilizadas, principalmente no preparo de doces finos e chocolates (FIGUEIREDO, 1957).

Os antecedentes históricos da baunilheira estão ligados a quatro etapas distintas, que são: I - o descobrimento de sua utilização pelos espanhóis; II - a introdução da planta na Europa; III - a descoberta da polinização artificial; IV - e como consequência, a introdução da cultura em larga escala nas antigas possessões europeias, na África e Oceania (CHILDERS; CIBES, 1948; CORRELL, 1953; BOURIQUET, 1954). A descoberta da polinização manual e a facilidade da multiplicação vegetativa levaram a Inglaterra, a Bélgica e a França a incrementar a cultura em suas possessões, como Bourbon (1822), Java (1819), Mauritius (1880), Seychelles (1890), Ilhas Comores (1893) e outras da Costa Sudeste Africana (BICALHO, 1969).

A primeira polinização artificial registrada da baunilheira foi realizada em 1836 no Jardim Botânico de Liège, pelo naturalista belga Charles Morren, por meio de uma técnica bastante complexa e de difícil aplicação em cultivos de grande escala. Foi em 1841 que um jovem escravo de Reunião (Ilha), com doze anos de idade, Edmond Albius, criou uma técnica de polinização manual (CHILDERS; CIBES; HERNÁNDEZ-MEDINA, 1959; BICALHO, 1969), que é utilizada até hoje.

Existem 110 espécies do gênero *Vanilla* distribuídas em áreas tropicais e subtropicais da América do Norte, América Central, América do Sul (algumas são

nativas do Brasil), África e Ásia, sendo que as mais usadas para fins comerciais são *V. planifolia*, *V. pompona* e *V. tahitensis* (CAMERON, 2011). Nos Estados Unidos somente as espécies *V. planifolia* e *V. tahitensis* são permitidas para uso em produtos alimentícios (BELANGER; HARVKIN-FRENKEL, 2011).

De acordo com a ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuária) (2002), no âmbito mundial, existe uma ampla variedade de *Vanilla planifolia* cultivada em diversos países. Todavia, do ponto de vista comercial, apenas três são consideradas importantes:

- Bourbon-Madagascar: proveniente de Madagascar, na Costa Sudeste da África, é a mais rica em açúcar, assim como a mais delgada das três, sendo a mais produzida no mundo, com 75% do total.
- Mexicana: a grande maioria da produção desta variedade é proveniente da região de Veracruz, no México. Possui sabor mais suave e a sua disponibilidade no mercado é menor que a de Bourbon-Madagascar. Isso se deve ao fato de o cultivo realizar-se em áreas onde existem outros produtos, como plantações de laranjeiras.
- Thaitiana: esta variedade alcança um diâmetro maior que a primeira, sendo a mais escura das três. Seu aroma é intenso, porém, o sabor é menos acentuado que das outras duas. Seu odor não evapora muito facilmente, por isso é muito utilizada para aromatizar produtos alimentícios.

A baunilha destinada ao comércio é obtida basicamente a partir dos frutos curados e desidratados de *Vanilla planifolia* e, em menor quantidade também *V. tahitensis* e *V. pompona*. Outras 35 espécies de baunilhas americanas produzem frutos aromáticos (SOTO ARENAS, 2003). É do interior do fruto da baunilheira que saem as minúsculas sementes que exalam um cheiro perfumado, doce e delicado. A substância química que exala o aroma é a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), (Figura 1), sendo que cápsulas em ótimas condições podem render de 2 a 2,5% de vanilina (RANADIVE, 2011). Esse componente químico foi isolado pela primeira vez por Goble em 1858 (HOFFMAN; ZAPF, 2011). Klimes e Lamparsky (1976) identificaram, por meio de cromatográfica, 196 constituintes químicos na baunilha, entre eles, hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos alifáticos

e aromáticos, terpenos e fenóis. Essa mistura de substâncias aromáticas é que torna tão diferente a vanilina natural da vanilina artificial. Segundo Soto Arenas, 2006, aparentemente, as baunilhas produzem frutos aromáticos para atrair seus dispersadores, os morcegos frugívoros.

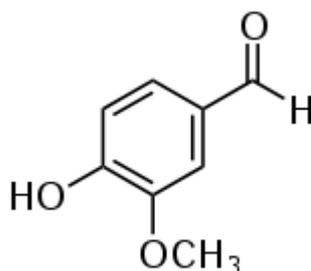


Figura 1 - Estrutura química da vanilina.

A baunilha é usada largamente na aromatização de sorvetes, chocolate, bebidas e produtos de confeitaria, além de ser também utilizada em perfumaria e, em pequena escala, como planta medicinal. Ela interfere de forma benéfica no sabor final da comida, além de permitir a conservação dos alimentos (FIGUEIREDO, 1957), devido as suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). Pesquisas realizadas por Menella e Beanchamp (1996) comprovam que bebês passam mais tempo anexados ao mamilo e succinam mais leite, 25 e 20%, respectivamente, durante as três horas que se seguem a ingestão de sabor baunilha pela mãe em comparação ao consumo do diluente sozinho.

A essência de baunilha é extraída dos frutos de algumas espécies do gênero *Vanilla*, isto é, são orquídeas que possuem interesse comercial fora do contexto ornamental (HOFFMAN; ZAPF, 2011). Seu aroma é um dos mais conhecidos e comercializados do mundo (KAHANE et al., 2008). Depois do açafrão, a baunilha é a segunda especiaria mais cara do mercado mundial, devido sua produção ser muito trabalhosa (ASERCA, 2002; PARTHASARATHY; CHEMPAKAM; ZACHARIAH, 2008).

## 1.2 Descrição botânica da *Vanilla planifolia*

A baunilheira pertence ao Reino Plantae, Filo Magnoliophyta, Classe Liliopsida (Monocotyledonae), Subclasse Liliidae, Ordem Orchidales, Família Orchidaceae,

Subfamília Vanilloideae, Tribo Vanilleae, Subtribo Vanillineae, Gênero *Vanilla* e Espécie *Vanilla planifolia* (BORY et al., 2008; CAMERON, 2011).

As espécies do gênero *Vanilla* são terrestres, epífitas ou hemiepífitas e trepadeiras perenes. (KAHANE et al., 2008). *Vanilla planifolia* G. Jackes ex ANDREWS é uma planta herbácea, hemiepífita secundária, perene, de crescimento monopodial. Possui sistema radicular terrestre, caule glabro, com até 2 cm de diâmetro, podendo atingir até 20 m de comprimento, entrenós de aproximadamente 15 cm, e com uma a duas raízes adventícias em cada nó; folhas curto-pecioladas ou sésseis, oblongo-lanceoladas, longo-acuminadas, carnosas, coriáceas, podendo atingir até 22 cm de comprimento e 6 cm de largura. As flores são verde-amareladas, com três sépalas e três pétalas oblongo-lanceoladas e labelo de mais ou menos 5 cm, amarelado com estrias alaranjadas, dispostas em racimos. Uma pétala, chamada de labelo, é moldada como uma corneta e é ligada à coluna ou gynandrium (estrutura em que os estames estão ligados ao pistilo), tendo um estigma e um estame com dois sacos de pólen. Tal conformação requer insetos específicos como polinizadores, como abelhas dos gêneros *Euglossa* e *Eulaema* nativas da América.

Após a polinização, o ovário se desenvolve em uma fruta, botanicamente chamada cápsula, e popularmente de feijão ou vagem, que contém milhares de sementes. O fruto é linear, aromático, do mesmo comprimento das folhas e com 6 a 8 mm de largura, com formato cilíndrico e curvado nas extremidades. Estando maduros, os frutos são cápsulas siliquiformes, de cor pardo-escura ou quase preta, polposas e úmidas ao tato, contendo milhares de sementes pequeninas e pretas (HOENNE, 1945; CHILDERS; CIBES; HERNANDÉZ-MEDINA, 1959; CORRÊA, 1984; SOTO ARENAS, 2003).

A baunilheira apresenta hábito de crescimento monopodial, caracterizado por ausência de ramificações laterais ao longo do caule (CRIBB, 2001). Essa característica é resultante da dominância apical exercida pelo ápice sobre as gemas laterais (TAIZ; ZEIGER, 2009). Em seus experimentos iniciais, Arteca (1995) mostrou que, quando a gema apical era removida, ocorria o desenvolvimento da gema lateral. Entretanto, posteriormente, essa gema lateral tornava-se novamente dominante inibindo o crescimento das gemas laterais subsequentes.

### 1.3 Cultivo de *Vanilla planifolia*

A baunilheira é uma planta de clima tropical, vegetando bem em regiões que apresentam temperatura média superior a 21°C e precipitação anual de 1.500-2.500 mm. Um período seco de aproximadamente dois meses é fundamental para induzir um bom florescimento, que se inicia no terceiro ano após o plantio e a máxima produção de flores é alcançada aos 7-8 anos (CEPLAC, 2013). Suas raízes aéreas ajudam na escalada dos troncos das árvores, onde se fixam, e contribuem para absorver a água (KAHANE et al., 2008).

Para o seu pleno desenvolvimento, a baunilheira necessita de sombreamento que permita a entrada de 50% da luz solar (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, 2011). As temperaturas mais elevadas, que podem ser alcançadas quando o sombreamento não é suficiente, são fatais para a planta. Sombra em excesso estimula o crescimento vegetativo em detrimento da floração. Entretanto, radiação solar direta induz a queima das folhas e caules (KAHANE et al., 2008).

Todo cultivo de baunilha no mundo localiza-se em regiões situadas, no máximo, a 25° ao Norte e ao Sul da linha do Equador, regiões essas de clima tropical. Grande parte do Brasil encontra-se dentro desses limites (BICALHO, 1969).

A baunilha suporta a maioria dos tipos de solos, mas é altamente dependente da associação com fungos simbiotes do gênero *Rhizoctonia*, presentes nas camadas superficiais do solo e na matéria orgânica (KAHANE et al., 2008; McCORMICK et al., 2012).

O cultivo da baunilha deve ser conduzido na sombra das copas de árvores perenifólias, que poderão servir também como tutores. Ressalta-se que a escolha de tutores vivos deve ser bastante cuidadosa. Recomenda-se não utilizar árvores de folhas e casca caducas, uma vez que o excesso de raios solares faz a planta entrar em declínio vegetativo (FIGUEIREDO, 1957).

Bicalho (1969) sugere o uso de suportes vivos (árvores e arbustos) que possuam as seguintes características: I - sistema radicular amplo e abundante; II - resistência a insetos-praga e doenças; III - não exigir muitos cuidados de poda; IV - não ser de

altura muito elevada; V - ser suficientemente forte para aguentar o desenvolvimento da planta trepadeira; VI - ter folhagem ampla e bem distribuída, permitindo uma insolação em torno de 50%; VII - ter um desenvolvimento rápido e não perder todas as folhas em época de seca; e VIII - não ser frutífera, ou permitir qualquer atividade comercial, a não ser aquela de sustentação da baunilheira. Para o Brasil, ele propõe espécies nativas do gênero *Erythrina*.

A baunilheira também é cultivada sob sombra artificial em países como a Costa Rica e o México. Para tal, utiliza-se tela de sombreamento que permite a passagem de 50% de luz solar.

As flores da baunilheira são autoférteis. No entanto, a localização do rostelo sobre o estigma é um entrave à polinização natural. Devido a isso, na produção comercial, a polinização é feita manualmente, sendo executada com o auxílio de pequenos palitos ou dedais de madeira próprios para esta operação, com os quais se liberta o rostelo e se pressiona a antera contra o estigma. Deve ser realizada nas primeiras horas da manhã, assim que a flor estiver completamente aberta (FIGUEIREDO, 1957).

No Brasil, especialmente no sul da Bahia, a floração ocorre durante os meses de setembro e outubro. Geralmente, em plantas vigorosas, são polinizadas de 8 a 10 flores em cada inflorescência e 10 a 20 inflorescências em cada planta. O rendimento médio dessa prática varia de 800 a 900 polinizações diárias (CEPLAC, 2013). Um mês e meio após a polinização, a cápsula da baunilheira atinge o comprimento máximo; um total de 8 a 9 meses é necessário para alcançar a maturidade. A mudança de cor do verde para o amarelo é um sinal visual para processar as cápsulas, ainda inodoras (KAHANE, 2008).

#### **1.4 Propagação da *Vanilla planifolia***

Tradicionalmente, a baunilha é propagada pelo método da estaquia, a partir de estacas caulinares. As estacas devem ser retiradas de plantas altamente produtivas e vigorosas. Normalmente, as estacas possuem de 6 a 8 nós, 20 a 80 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro (KAHANE et al., 2008; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, 2011). No entanto, este método de propagação não é econômico

(devido ao corte de ramos produtivos da planta) e também tem a desvantagem de ser lento (KALIMUTHU; SENTHILKUMAR; MURUGALATHA, 2006).

A germinação *in vitro* vem sendo utilizada com sucesso desde 1922, quando o pesquisador Lewis Knudson obteve a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas (FARIA; STANCATO, 1998). A germinação das sementes da baunilheira, assim como da grande maioria das orquídeas, é extremamente baixa ou quase nula, em condições naturais. Não obstante, podem ser obtidos altos índices de germinação quando se utiliza o cultivo *in vitro*, adaptando-se o meio de cultura para a espécie que se deseja propagar. Até 1937, quando Bouriquet e Boiteau apresentaram um documento produzido por eles sobre a germinação assimbiótica de sementes de *Vanilla planifolia*, as sementes desta planta eram consideradas inviáveis (LUGO, 1955).

As técnicas de cultura de tecidos, entre elas a micropropagação, representam uma alternativa para contornar obstáculos que limitam a propagação convencional de algumas espécies (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). A micropropagação tem sido amplamente utilizada para a multiplicação rápida de muitas espécies de plantas (KAUR; ANAD; GOYAL, 2011), bem como para estudos relacionados aos aspectos fisiológicos relacionados ao desenvolvimento vegetal (SUZUKI et al., 2010). Na Costa Rica há três laboratórios privados que produzem mudas por meio de cultura de tecidos. As mudas são doadas para o agricultor quando atingem 3 cm de comprimento. Antes do plantio, as mudas são previamente aclimatizadas em uma área separada provida com 80% de sombra até que se tornem fortes o suficiente para suportar chuva, sol, pragas e doenças (QUIRÓS, 2011).

### **1.5 Importância econômica**

De acordo com o banco de dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a área global destinada ao cultivo de baunilheira, em 2011, foi de 78.124 ha. Os principais países produtores, conforme tabela 1 e figura 2, em ordem de importância são: Indonésia, Madagascar, China, México e Tonga, que em conjunto produzem aproximadamente 95% da baunilha do mundo (FAO, 2013).

Tabela 1 – Produção mundial de baunilha (ton)

PAÍS	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Indonésia	3.600	3.700	3.894	4.146	3.341	2.600	3.500
Madagascar	2.613	2.534	2.800	3.055	2.800	2.900	3.000
China	1.000	1.200	1.350	1.400	1.658	1.300	1.385
México	280	291	637	600	524	395	362
Tonga	133	140	150	199	263	202	202
Outros	362	411	444	403	486	487	262
Mundial	7.988	8.276	9.275	9.803	9.072	7.884	8.913

Fonte: FAO (2013).

A produção de baunilha da Indonésia representa quase 40% da produção mundial, com média anual de 3.540 toneladas. Um elemento importante que justifica essa produção é a produtividade do cultivo, que é bem superior em comparação à produtividade observada em Madagascar, que possui uma área de cultivo três vezes superior à da Indonésia.

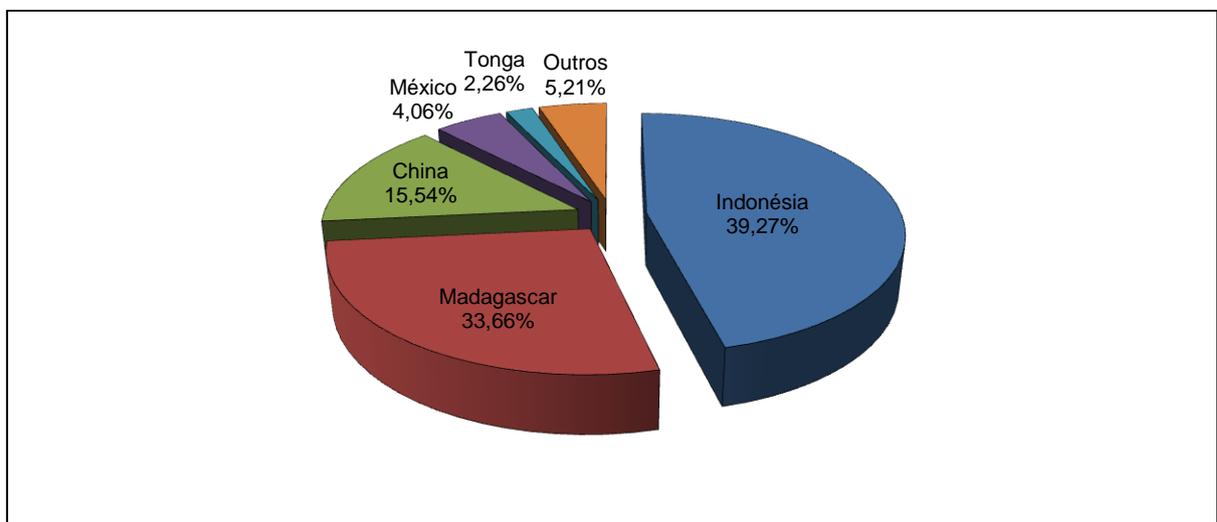


Figura 2 – Distribuição da produção mundial de baunilha (FAO, 2013).

Com relação às exportações mundiais de baunilha, no ano de 2009, os principais fornecedores foram Indonésia e Madagascar, seguidos por grandes importadores como a Alemanha e Estados Unidos (FAO, 2013).

Segundo a ASERCA (2002), os principais consumidores de baunilha não são os grandes produtores dessa especiaria e sim os países industrializados com grandes empresas dedicadas à fabricação de produtos de confeitaria, bebidas e perfumes. É o caso de alguns países da Europa, Ásia e América do Norte.

Segundo dados da FAO (2013), no ano de 2011, Estados Unidos, França, Reino Unido, Alemanha e Canadá foram responsáveis por quase 65% das importações mundiais de baunilha, conforme ilustra a figura 3.

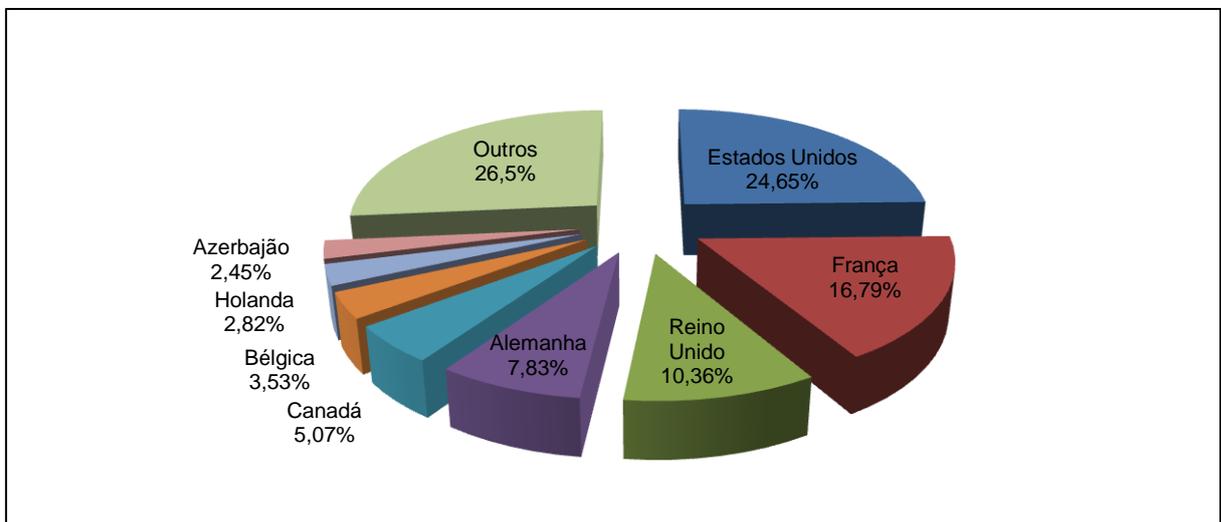


Figura 3 – Distribuição das importações de baunilha (FAO, 2013).

A produção de baunilha no Brasil é muito reduzida, tanto que não consta nas estatísticas oficiais. As necessidades do país de baunilha natural são supridas via importação, cujo valor e quantidade retratam o mercado potencial que poderia ser desenvolvido pela agricultura familiar na região Amazônica e nas áreas remanescentes da Mata Atlântica (HOMMA; MENEZES; MATOS, 2006). Segundo dados do MDIC (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior), entre os anos de 2007 e 2011, o Brasil importou 13.624 kg de cápsulas de baunilha, em valor equivalente a US\$403,884.00 (Aliceweb, 2013).

Apesar de possuir grande potencial e condições edafoclimáticas favoráveis para produzir e exportar baunilha em larga escala, o Brasil figurava em 2008 como

importador da ordem de US\$194,974.00, correspondentes a 7.973 kg, segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (Aliceweb, 2013).

Segundo Bicalho (1969), o Brasil fez algumas exportações de baunilha para os Estados Unidos, em quantidades muito pequenas, em 1937, 1940, 1941 e 1942, sendo que o maior valor foi em 1941, de 9.652 libras, aproximadamente 4,3 toneladas. Ainda, de acordo com o autor, não foi possível recolher dados a respeito de produtores e localidades de cultivo.

A Mesorregião Sul do Estado da Bahia, já estabelecida como área de produção de diversas especiarias, é onde a cultura da baunilheira vem se desenvolvendo e fornecendo ao mercado nacional cápsulas de excelente qualidade, tanto no que se refere ao padrão do fruto como do aroma.

## **1.6 Condições do ambiente de cultivo *in vitro***

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudada nas mais diversas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos que mais tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas, que consiste em formar mudas com as mesmas características da planta-matriz entre as quais se destacam: obtenção de mudas saudáveis, mesmo se provenientes de matrizes infectadas, por meio de tecidos meristemáticos; obtenção de várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; a redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; maior vigor das mudas; multiplicação de plantas difíceis de serem propagadas por métodos convencionais; e auxílio em programas de melhoramento vegetal (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ERIG; SCHUCH, 2005).

Os explantes, na micropropagação convencional, são cultivados em frascos com alta umidade relativa do ar (acima de 70%), acúmulo de etileno, baixa disponibilidade de gás carbônico (que decresce de 3.000 a 9.000 ppm no período escuro, para menos de 100 ppm durante o fotoperíodo), baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, isto é, baixa luminosidade ( $40 - 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), e com sacarose como maior fonte de energia metabólica (ARIGITA; GONZÁLEZ; TAMÉS,

2002). A presença de sacarose nos meios de cultura de tecidos inibe especificamente a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética potencial do explante, tornando o crescimento autotrófico menos provável e o seu excesso pode ser prejudicial ao crescimento das culturas *in vitro* (DESJARDINS; HDIDER; De RIEK, 1995; KOZAI; NGUYEN, 2003; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008). Os explantes cultivados neste ambiente podem desenvolver desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas que faz com que a maquinaria fotossintética não opere normalmente (ARIGITA; GONZÁLEZ; TAMÉS, 2002; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; RADOCHOVÁ; TICHÁ, 2009).

Plantas crescidas em ambientes considerados “heterotróficos”, normalmente, apresentam parte aérea muito pequena, menor quantidade de cera cuticular e epicuticular nas folhas, tecidos com reduzida resistência mecânica (menos colênquima e esclerênquima), estômatos não funcionais, folhas finas e pequenas com poucos tricomas e com baixa atividade fotoautotrófica (ZIV; SCHWARTZ; FLEMINGER, 1987; POSPISILOVÁ; SOLAROVÁ; CATSKY, 1992; KITAYA et al., 2005). Além disso, pode ocorrer significativa perda de plantas causada pela contaminação microbiana (KOZAI; KUBOTA, 2001), potencializada pela presença da sacarose no meio de cultura. Segundo Kubota e Kozai (1992), mudas formadas no sistema heterotrófico possuem elevado conteúdo de água com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização.

O sucesso da técnica de propagação *in vitro* requer que as plantas que se desenvolvem heterotroficamente, sob condições de alta umidade, posteriormente se adaptem, venham a ser autotróficas e cresçam sob condições de moderada umidade (ZIMMERMAN, 1988). A transferência da condição *in vitro* para o ambiente *ex vitro* é a etapa mais crítica da micropropagação, podendo ser um fator limitante para a produção de mudas de algumas espécies, pois as plantas são expostas a mudanças súbitas nas condições ambientais, sendo a perda de água o principal problema (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

### 1.6.1 Carboidratos

Na micropropagação convencional, as mudas se desenvolvem como organismos heterotróficos, utilizando a sacarose no meio de cultura como principal fonte de carboidrato, uma vez que esse composto eleva a produção de biomassa *in vitro* (KITAYA; SAKAMI; KOZAI, 1995; KOZAI, 1991). Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento das células, além de atuarem como um componente osmótico do meio de cultura (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Segundo Kozai (1991), a alta concentração de sacarose no meio de cultura pode promover alteração no status hídrico, inibir a síntese de clorofila, diminuir as atividades de algumas enzimas do ciclo de Calvin e, conseqüentemente, comprometer significativamente a capacidade fotoautotrófica dos explantes. De acordo com George, Hall, De Klerk (2008), a quantidade elevada de carboidrato adicionada ao meio de cultura pode elevar a pressão osmótica do meio e, assim, reduzir o crescimento das plantas, por meio de redução na absorção de água e de nutrientes devido à alteração de potencial hídrico entre o meio de cultivo e a planta, desfavorecendo a absorção desses.

Langford e Wainright (1987) sugeriram que as alterações anatômicas e fisiológicas que podem surgir nos explantes cultivados sob regime heterotrófico não possibilitam que o aparato fotossintético opere normalmente, porque a utilização do dióxido de carbono é reprimida pela presença de sacarose exógena. Grout e Donkin (1987) e Hdidier e Desjardins (1994), complementam afirmando que esta repressão ocorre devido ao acúmulo de amido e à inibição da enzima Rubisco. Os autores esclarecem, porém, que em plantas cultivadas *in vitro* sob altas concentrações de sacarose, a síntese reduzida dos açúcares favorece o acúmulo de carboidratos no tecido, o que reduz as taxas fotossintéticas.

O amido é o principal carboidrato de reservas nas plantas e se acumula em diferentes tecidos fotossintéticos ou não fotossintéticos, sendo depositado transitoriamente nos cloroplastos na forma de grânulos insolúveis (ORZECOWSKI, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009). Nos cloroplastos, o amido é produzido durante o

período fotossintético, sendo rapidamente metabolizado durante o período noturno (WEISE; VAN WIJK; SHARKEY, 2011).

A micropropagação sem açúcar (fotoautotrófica), em relação aos sistemas de micropropagação convencionais (heterotróficas ou fotomixotróficas), apresenta as seguintes vantagens: o crescimento e o desenvolvimento de plantas *in vitro* são mais rápidos e mais uniformes, as plantas *in vitro* têm menos distúrbios morfológicos e fisiológicos, a contaminação biológica *in vitro* é menor, as plântulas têm uma maior percentagem de sobrevivência durante a aclimatização *ex vitro*, a redução do risco de contaminação microbiana, a melhoria das características fisiológicas da planta e a redução do estresse da planta durante a aclimatização. Assim, os custos de produção poderiam ser reduzidos e a qualidade da planta poderia ser melhorada significativamente com a micropropagação fotoautotrófica (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997; AFREEN; ZOBAYED; KOZAI, 2002; KHAN et al., 2002).

#### **1.6.1.1 Destino dos carboidratos adicionados ao meio de cultura durante o metabolismo de explantes de baunilheira**

As plantas na micropropagação convencional se desenvolvem como organismos heterotróficos, isto é, realizam pouca ou nenhuma fotossíntese, utilizando a sacarose no meio de cultura como principal fonte de carboidrato (KOZAI, 1991; KITAYA; SAKAMI; KOZAI, 1995). A presença de açúcares exógenos limita a fotossíntese e impede o correto desenvolvimento do aparato fotossintético (HDIDER; DESJARDINS, 1994). As fontes de carbono (glicose, sacarose ou frutose) são adicionadas ao meio de cultura, devido à deficiência de energia luminosa e a baixa concentração de CO<sub>2</sub> presente em condições *in vitro* (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

Em culturas *in vitro* as plantas são expostas a condições divergentes das do ambiente natural (GASPAR et al., 2002). Uma das diferenças mais importantes encontra-se na composição dos meios nutritivos. Os hidratos de carbono são biomoléculas essenciais necessários para o crescimento e o desenvolvimento das plantas *in vitro* (ŚLESIAK; PRZYWARA, 2003). Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais, como celulose, ou seja, todos os compostos orgânicos

para o crescimento das células, servem também como moléculas de sinalização durante o desenvolvimento e influenciam os processos fisiológicos e expressão gênica (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Devido à reduzida ou nula capacidade fotossintética dos explantes cultivados *in vitro*, os hidratos de carbono são a fonte de energia dos tecidos e funcionam ainda como um regulador do potencial osmótico do meio de cultura. A sacarose funcionando como um agente osmótico permite uma redução gradual da pressão osmótica do meio nutritivo à medida que os açúcares são consumidos (VASIL; VASIL, 1980; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008).

A sacarose é o açúcar mais comum translocado em plantas e, muitas vezes, representa mais de 95% da massa da matéria seca de materiais translocados (ZIMMERMANN; ZIEGLER, 1975). Nos meios nutritivos também é o açúcar mais utilizado, sendo que esse carboidrato suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. A sacarose é o carboidrato mais comum utilizado na cultura de tecidos vegetais (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998; GEORGE; HALL; De CLERK, 2008).

Segundo Vu, Niedz e Yelenosky (1995) e Sung et al. (1988), existem duas vias para a clivagem enzimática da sacarose. A primeira é a chamada via clássica, em que a reação da invertase produz glicose e frutose, com a perda da energia glicosídica. Esses produtos são fosforilados por glucoquinase e frutoquinase antes da metabolização subsequente (HUBER; AKAZAWA, 1986); a segunda é a chamada via alternativa, em que a sacarose sintase cliva a sacarose em frutose e UDP-glicose, por conseguinte, conservando a energia glicosídica. A UDP-glicose gerada fornece glicose-1-fosfato diretamente na glicólise por meio da reação catalisada por UDP-glicose pirofosforilase (SUNG et al., 1988).

Outro passo importante no metabolismo da sacarose é definido como a interconversão de frutose-6-fosfato formando a frutose 1,6-bisfosfato. Nesse caso, duas vias alternativas também são conhecidas. Uma alternativa é catalisada por uma enzima irreversível, a nucleotídeo-trifosfato, dependente da fosfofrutoquinase (PFK) que é descrito como uma reação de manutenção. A segunda é catalisada por

uma enzima dependente de pirofosfato (PPi), a fosfofrutoquinase (PFK), prontamente reversível, que é descrita como uma via adaptativa, na qual uma reação de equilíbrio conserva energia através da utilização e síntese de pirofosfato (BLACK et al., 1987). Logo, quando se trabalha em PFK a direção gliconeogênica poderia produzir PPi para dirigir a quebra de sacarose por meio da UDP-glicose pirofosforilase (XU; SUNG; BLACK, 1989).

Ao estudarem a utilização de carboidratos para culturas de células em suspensão de *Phaseolus vulgaris*, Botha e O'Kennedy (1998) verificaram que a absorção de açúcar pelas células em suspensão, a partir de meio suplementado com sacarose, acontece predominantemente na forma de hexose. Esses autores concluíram que a glicose é preferencialmente absorvida, levando a uma acumulação de frutose no meio. No entanto, quando a glicose se esgota as células utilizam a frutose, a uma taxa semelhante à da glicose.

Quando a glicose ou a frutose é fornecida individualmente a culturas de células, ambas são utilizadas de forma muito eficiente, com um crescimento ligeiramente melhor com o meio contendo frutose. Absorção de hexose é em grande parte um processo ativo, mesmo nas concentrações mais elevadas. O sistema de captação de hexose das células tem uma maior afinidade para a glicose ( $K_m = 240 \mu\text{M}$ ) do que para a frutose ( $K_m = 960 \mu\text{M}$ ), mas a absorção máxima ( $V_{max}$ ) é semelhante. As diferenças nas propriedades cinéticas do sistema de captação para as duas hexoses podem largamente explicar o padrão observado de utilização de hexose quando a glicose e a frutose estão presentes no meio (BOTHAS; O'KENNEDY, 1998).

De Riek, Piqueras e Debergh (1997), ao investigarem a absorção e o metabolismo da sacarose em rosas micropropagadas, utilizando a técnica de camada dupla, observaram que na multiplicação, bem como na fase de indução de raízes, ocorreu a hidrólise da sacarose no meio de cultura. Um modelo matemático foi desenvolvido para quantificar a hidrólise de sacarose e a absorção de glicose, sacarose e frutose, com base na série de tempo para os diferentes açúcares no meio de cultura. Um gradiente decrescente de enzimas metabolizadoras de sacarose, a partir das raízes para com as folhas, deu uma boa indicação de como os diferentes tecidos dependem da sacarose absorvida a partir do meio.

### 1.6.2 pH

Para um crescimento adequado da maioria das espécies, o melhor valor de pH deve estar entre 5 e 6,5 e valores inferiores a 4,5 e superiores a 7 pode ocorrer paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (MURASHIGE, 1974; PIERIK, 1987). O pH é considerado um fator crítico do meio de cultura (MURASHIGE, 1974).

O pH do meio de cultura deve ser tal que não danifique o explante. Dentro dos limites aceitáveis, o pH determina se os sais permanecerão na forma solúvel, influencia a absorção de reguladores de crescimento de plantas, tem efeito sobre as reações químicas, especialmente aquelas catalizadas por enzimas, e afeta a eficiência da geleificação do ágar (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008).

O pH do meio tem um efeito sobre a disponibilidade de muitos minerais (SCHOLTEN; PIERIK, 1998). Em geral, a absorção de ânions é favorecida por um pH ácido, enquanto cátions é melhor absorvido quando o pH tende à neutralidade. Devido à absorção diferencial de ânions e cátions pelos tecidos vegetais, o pH do meio de cultura costuma não permanecer constante, mas mesmo com as mudanças, íons e compostos são absorvidos pela planta. (GEORGE; HALL; De KLERK, 2008).

Durante o crescimento das células, o pH do meio se altera à medida que diferentes íons são absorvidos pelas células e os produtos metabólicos são excretados para o meio (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

### 1.6.3 Fluorescência da clorofila a

As clorofilas localizam-se nos cloroplastos, sendo este o sítio da fotossíntese, onde ocorrem duas reações importantes: a fotoquímica, nas membranas dos tilacóides, e a bioquímica, no estroma do cloroplasto. Além das clorofilas, tais organelas contêm outros pigmentos chamados acessórios, como os carotenóides (carotenos e xantofilas). Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são as clorofilas *a* e *b*, os carotenóides e as ficobilinas (STREIT, 2005).

As plantas desenvolveram mecanismos para suportar o excesso de energia no aparato fotossintético, com os quais pode dissipar a energia como calor (dissipação não fotoquímica), ou reemitir-la como luz, mediante um processo conhecido como fluorescência da clorofila (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Vários estudos foram realizados sobre a base teórica e as aplicações na ecofisiologia relacionados à fluorescência (MOHAMMED; BINDER; GILLIES, 1995). Segundo Krause e Weis (1991), a mensuração da fluorescência pode ser considerada como uma medida de complemento às medições do processo fotossintético.

A fluorescência emitida pela molécula de clorofila permite uma avaliação não destrutiva da fotossíntese *in vivo*, fornecendo dados sobre o rendimento e a capacidade fotossintética, por meio da quantificação da eficiência fotoquímica do fotossistema II, da eficiência do transporte de elétrons (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989), e dos coeficientes de extinção fotoquímica (qP) e não fotoquímica (NPQ) (BILGER; SCHREIBER, 1986), além de ser utilizada como um indicador da fotoinibição (BJÖRKMAN; DEMMIG, 1987). As variações no conteúdo total de clorofila e carotenóides são bons indicadores do estresse em plantas (HENDRY; PRICE, 1993).

## **1.7 Substrato**

Durante a fase de aclimatização e crescimento das mudas, é necessário o uso de um meio de sustentação e fornecedor de nutrientes: o substrato. Ele pode facilitar ou impedir o crescimento das plantas conforme suas propriedades físico-químicas. A escolha e o manejo correto do substrato irão afetar a sobrevivência, o crescimento e o desenvolvimento das plantas, sendo de suma importância o uso de um bom substrato para a obtenção final de mudas de qualidade (ALDRUFEU, 1987; BACKES; KÄMPF, 1991).

Vários são os trabalhos realizados com o objetivo de avaliar qual o melhor substrato no processo de aclimatização de plantas provenientes de micropropagação. Na verdade o que se busca é dar resposta às exigências nutricionais e ambientais para que essas plantas possam sobreviver e com conseqüente estabelecimento no

campo. Muitos desses trabalhos conjugam substrato e o ambiente de aclimatização, como por exemplo, se sombreado ou não.

Skrebsky, Nicoloso e Maldaner (2006), ao selecionarem substratos para a aclimatização de plantas de *Pfaffia glomerata* produzidas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose concluíram que as combinações dos substratos vermiculita e solo (1:1), e substrato comercial e solo (1:1), proporcionaram maior crescimento às plantas durante a última fase de aclimatização, em cultivo sob sombrite. Segundo os autores, o uso isolado do substrato comercial aumentou a sobrevivência das plantas cultivadas em campo, devido esse substrato possuir os maiores valores de capacidade de retenção de água, de água facilmente disponível e de água disponível.

Seidel Júnior e Venturieri (2011), ao identificarem substratos alternativos ao xaxim, que poderiam ser usados para o estabelecimento *ex vitro* de plântulas de *Cattleya forbesii* e *Laelia purpurata*, concluíram que xaxim é o melhor substrato para *Cattleya forbesii*, mas que pode ser substituído, contudo com pequena redução no desempenho dessa espécie, pelo substrato formado por cascalho e mistura de turfa. O cascalho com mistura de turfa foi o melhor substrato para *Laelia purpurata*.

Díaz et al. (2010) desenvolveram um protocolo eficiente para a aclimatização de mudas de *Phalaenopsis* e *Cattleya* (Orchidaceae) obtidas de protocormóides provenientes de estacas florais, cultivadas em meio MS modificado, e concluíram que os substratos que deram melhor resposta ao crescimento foram uma mistura de musgo, aparas de madeira e perlita, para *Phalaenopsis*, e, mistura de musgo e perlita, para *Cattleya*.

## 1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, v. 90, n. 1, p. 21-19. 2002.

ALDRUFEU, A. Rooting and acclimatization of *Pelargonium zonale* plantlets. **Acta Horticulturae**, v. 212, p. 361-366. 1987.

ALICEWEB - SISTEMA DE ANÁLISE DAS INFORMAÇÕES DE COMÉRCIO EXTERIOR. Secretaria de Comércio Exterior. Sistema Integrado de Comércio Exterior (SISCOMEX). Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Importações 1997-2013**. 2013. Disponível em: <<http://aliceweb2.desenvolvimento.gov.br//consulta-ncm/consultar>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 1, p. 166-173. 2002.

ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. New York: Chapman & Hall, 1995. 332p.

ASERCA. La Vainilla, un “extracto” ampliamente utilizado por la industria de alimentos en el mundo. **Claridades Agropecuarias**, v. 101, p. 17-26. 2002. 1995.

BACKES, M. A.; KÄMPF, A. N. Substratos à base de composto de lixo urbano para a produção de plantas ornamentais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 5, p. 753-758. 1991.

BELANGER, F. C.; HAVKIN-FRENKEL, D. Molecular analysis of a *Vanilla* hybrid cultivated in Costa Rica. In: HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F. C. (Eds.). **Handbook of vanilla science and technology**. New Brunswick: Wiley-Blackwell, 2011. p. 256-265.

BICALHO, H. D. Cultivo e bases para o melhoramento da baunilha. In: KERR, W. E. (Ed.). **Melhoramento e genética**. São Paulo: EDUSP/Melhoramentos, 1969. p. 169-185.

BILGER, W.; SCHREIBER, U. Energy-dependent quenching of dark-level chlorophyll fluorescence in intact leaves. **Photosynthesis Research**, v. 10, n. 3, p. 303-308. 1986.

BLACK, C. C.; MUSTARDY, L.; SUNG, S. S.; KORMANIK, P. P.; XU, D. P.; PAZ, N. Regulation and roles for alternative pathways of hexose metabolism in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 69, n. 2, p. 387-394. 1987.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v. 170, n. 4, p. 489-504. 1987.

BORY, S.; GRISONI, M.; DUVAL, M. F.; BESSE, P. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. **Genetic resources and crop evolution**, v. 55, n. 4, p. 551-571. 2008.

BOTHA, F. C.; O'KENNEDY, M. M. Carbohydrate utilisation by cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v. 102, n. 3, p. 429-436. 1998.

BOURIQUET, G. **Le vanillier et la vanille dans le monde**. Paris: Lechevalier, 1954. 748p.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. p. 87-132.

CAMERON, K. M. *Vanilla* phylogeny and classification. In: HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F. C. (Eds.). **Handbook of vanilla science and technology**. New Brunswick: Wiley-Blackwell, 2011. p. 243-255.

CEPLAC. **Baunilha**. 2006. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/baunilha.htm>>. Acesso em: 18 de nov. 2013.

CHILDERS, N. F.; CIBES, H. R.; HERNÁNDEZ-MEDINA, E. Vanilla - The orchids of commerce. In: WITHNER, C. L. (Ed.). **The orchids - A Scientific Survey**. New York: The Ronald Press Company, 1959. p. 477-508.

CHILDERS, N. F.; CIBES, H. R. **Vanilla culture in Puerto Rico**. U. S. Department of Agriculture, Circular 28, 1948. 94p.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 5, 1984. p. 282-285.

CORRELL, D. Vanilla - Its botany, history and economic import. **Economy Botany**, v. 7, n. 4, 1953. p. 291-358.

CRIBB, P. Morphology of orchidaceae. In: PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (Eds.). **Genera orchidacearum**. Oxford: Oxford University Press, v. 1, 2001. p. 225-233.

De RIEK, J.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 47, n. 3, p. 269-278. 1997.

DESJARDINS, Y.; HDIDER, C.; De RIEK, J. Carbon nutrition *in vitro* - regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI T.; SMITH, M. A. L. (Eds.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 441-472.

DÍAZ, L. P.; NAMUR, J. J.; BOLLATI, S. A.; ARCE, O. E. A. Acclimatization of *Phalaenopsis* and *Cattleya* obtained by micropropagation. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 12, n. 2, p. 27-40. 2010.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965. 2005.

FAO. **Produção mundial por culturas**. 2011. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

FARIA, R. T.; STANCATO, G. C. Orquídea - sementeira. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. (Eds.). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: IAC, 1998. p. 37-39.

FIGUEIREDO, E. R. **Especiarias**: cultura da baunilha (*Vanilla planifolia* Andr.). 2. ed. São Paulo: Chácaras e Quintais, 1957. 17p.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 3, p. 263-285. 2002.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, n. 1, p. 87-92. 1989.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; De KLERK, J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer. 2008. 501p.

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

GROUT, B. W. W.; DONKIN, M. E. Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures *in vitro* and at transplanting into soil. **Acta Horticulturae**, v. 212, p. 323-327. 1987.

HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, n. 1, p. 27-33. 1994.

HENDRY, G. A. F.; PRICE, A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G. A. F., GRIME, J. P. (Eds.). **Methods in Comparative Plant Ecology**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 148-152.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. Mexican vanilla production. In: HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F. C. (Eds.). **Handbook of vanilla science and technology**. New Brunswick: Wiley-Blackwell, 2011. p. 3-25.

HOENNE, F. C. **Flora Brasileira - orchidaceas**. Vol. XII. S. A. São Paulo: Indústria "Graphicars - F. Lanzara", 1945. 65 p.

HOFFMAN, P. G.; ZAPF, C. M. Flavor, quality, and authentication. In: HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F. C. (Eds.). **Handbook of vanilla science and technology**. New Brunswick: Wiley-Blackwell, 2011. p. 162-182.

HOMMA, A. K. O.; MENEZES, A. J. E. A.; MATOS, G. B. **Cultivo de baunilha**: uma alternativa para a agricultura familiar na Amazônia. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 24 p. 2006.

HUBER, S. C.; AKAZAWA, T. A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, v. 81, n. 4, p. 1008-1013. 1986.

KAHANE, R.; BESSE, P.; GRISONI, M.; LE BELLEC, F.; ODOUX, E. Bourbon vanilla: Natural flavour with a future. **Chronica horticultrae**, v. 48, n. 2, p. 23-29. 2008.

KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; MURUGALATHA, N. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. - a tropical orchid. **Current Science**, v. 91, n. 10, p. 1401-1403. 2006.

KAUR, H.; ANAND, M.; GOYAL, D. Optimization of potting mixture for hardening of *in vitro* raised plants of *Tylophora indica* to ensure high survival percentage. **International Journal of Medical and Aromatic Plants**, v. 1, n. 2, p.83-88. 2011.

KHAN, S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, O. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* smith under photomixotrophic and various photoautrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, n 2, p. 141-146. 2002.

KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, n. 3, p. 251-257. 2005.

KITAYA, Y.; SAKAMI, K.; KOZAI, T. Development of photoautotrophic Plant Tissue Culture System Using CO<sub>2</sub> from Shiitake Mushroom. **Acta Horticulturae**, v. 393, p. 195-202. 1995.

KLIMES, I.; LAMPARSKY, D. Vanilla volatiles - a comprehensive analysis. **International Flavours and Food Additives**, v. 7, n. 6, p. 272-291. 1976.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation-technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 447-469.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v. 114, n. 4, p. 525-537. 2001.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, n. 1, p. 49-56. 1997.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Eds.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 757-781.

KRAUSE, G. H.; WEISS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349. 1991.

KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1312-1314. 1992.

LANGFORD, P. J.; WAINRIGHT, S. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. **Annals of Botany**, v. 60, p. 633-640. 1987.

LUGO, H. L. The effect of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia*. **American Journal of Botany**, v. 42, n. 7, p. 679-684. 1955.

MAXWEEL, K.; JOHNSON, G. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668. 2000.

McCORMICK, M. K.; LEE TAYLOR, D.; JUHASZOVA, K.; BURNETT, R. K.; WHIGHAM, D. F.; O'NEILL, J. P. Limitations on orchid recruitment: not a simple picture. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 6, p. 1511-1523. 2012.

MENNELLA, J. A.; BEAUCHAMP, G. K. The human infants' response to vanilla flavors in mother's milk and formula. **Infant Behavior and Development**, v. 19, p. 13-19. 1996.

MOHAMMED, G. H.; BINDER, W. D.; GILLIES, S. L. Chlorophyll fluorescence: A review of its practical forestry applications and instrumentation. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 10, n. 1-4, p. 383-410. 1995.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166. 1974.

ORZECZOWSKI, S. Starch metabolism in leaves. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 3, p. 435-445. 2008.

PARTHASARATHY, V. A.; CHEMPAKAM, B.; ZACHARIAH, T. J. **Chemistry of spices**. Biddles Ltd, King's Lynn, 2008. 445p.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceito e aplicações**. São Paulo: Makron, v. 1, 2 ed. 1997. 556p.

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

POSPISILOVÁ, J.; SOLAROVÁ, J.; CATSKY, J. Photosynthetic responses to stress during in vitro cultivation. **Photosynthetica**, v. 26, p. 3-18. 1992.

QUIRÓS, E. V. Vanilla production in Costa Rica. In: HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F. C. (Eds.). **Handbook of vanilla science and technology**. New Brunswick: Wiley-Blackwell, 2011. p. 40-49.

RADOCHOVÁ, B.; TICHÁ, I. Leaf anatomy during leaf development of photoautotrophically *in vitro*-grown tobacco plants as affected by growth irradiance. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 1, p. 21-27. 2009.

RANADIVE, A. S. Quality control of vanilla beans and extracts. In: HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F. C. (Eds.). **Handbook of vanilla science and technology**. New Brunswick: Wiley-Blackwell, 2011. p. 141-161.

SCHOLTEN, H. J.; PIERIK R. L. M. Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 77, n. 1-2, p. 109-116. 1998.

SEIDEL JÚNIOR, D.; VENTURIERI, G. A. *Ex vitro* acclimatization of *Cattleya forbesii* and *Laelia purpurata* seedlings in a selection of substrates. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 1, p. 97-103. 2011.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1416-1423. 2006.

ŚLESIAK H., PRZYWARA, L. The effect of carbohydrate source on the development of *Brassica napus* L. immature embryos *in vitro*. **Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica**, v. 45, p. 183-190. 2003.

SOTO ARENAS, M. A. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. **Biodiversitas**, v. 66, p. 1-9. 2006.

SOTO ARENAS, M. A. Vanilla. In: PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (Eds.). **Genera Orchidacearum: Orchidoideae**. Oxford: Oxford University Press, v. 2, 2003. p. 321-334.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755. 2005.

SUNG, S. S.; XU, D. P.; GALLOWAY, C. M.; BLACK, C. C. A reassessment of glycolysis and gluconeogenesis in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 72, n. 3, p. 650-654. 1988.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico. 72 p. (Boletim Técnico, nº 174). 1998.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, 509 p.

VASIL, I. K.; VASIL, V. Isolation and culture of protoplasts. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 56, n. 3, p. 97-99. 1980.

VU, J. C. V.; NIEDZ, R. P.; YELENOSKY, G. Activities of sucrose metabolism enzymes in glycerol-grown suspension cultures of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Environmental and Experimental Botany**, v. 35, n. 4, p. 455-463. 1995.

WEISE, S. E.; VAN WIJK, K. J.; SHARKEY, T. D. The role of transitory starch in C3, CAM, and C4 metabolism and opportunities for engineering leaf starch accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3109-3118. 2011.

XU, D. P.; SUNG, S. S.; BLACK, C. C. Sucrose metabolism in lima bean seeds. **Plant Physiology**, v. 89, n. 4, p. 1106-1116. 1989.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, v. 227, p. 489-499. 1988.

ZIMMERMANN, M. H., ZIEGLER, H. List of sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: ZIMMERMANN, M. H., MILBURN, J. A. (Eds.). **Encyclopedia of plant physiology: new series**. Berlin: Springer, 1975, v. 1. p. 480-503.

ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata *in vitro* leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. **Plant Science**, v. 52, n.1-2, p. 127-134. 1987.

## **CAPÍTULO II**

### **SACAROSE NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE BAUNILHEIRA (ORCHIDACEAE)**

## RESUMO

O conhecimento da concentração adequada de sacarose no meio de cultivo é fundamental para o sucesso da micropropagação. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação. Para isso, cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>), com quatro repetições de dez mudas, foram utilizadas em delineamento inteiramente casualizado. A unidade experimental foi constituída de um frasco com capacidade de 500 ml, contendo 80 ml de meio MS completo. Variáveis morfológicas, fluorescência da clorofila *a*, teor de amido, taxa de perda de água e o pH do meio de cultura foram avaliados 60 dias após a inoculação das mudas no meio de cultura. Após análise de variância, os dados foram analisados por meio da análise de regressão. As diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura influenciaram todas as características morfológicas e parâmetros fisiológicos estudados. A ausência e a concentração de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio são prejudiciais ao crescimento das plantas. A ausência de sacarose estimula o comportamento autotrófico em mudas de baunilha. A maior média para eficiência fotoquímica máxima do FSII ocorre na concentração estimada de 19,72 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Os dados relativos aos aspectos morfológicos e fisiológicos de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação sugerem a viabilidade técnica para a propagação em larga escala de mudas dessa espécie.

Palavras-chave: *Vanilla planifolia*. Cultivo *in vitro*. Carboidrato. Amido.

## ABSTRACT

Knowledge of the appropriate concentration of sucrose in the culture medium is critical to successful micropropagation. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of different concentrations of sucrose on *in vitro* growth of seedlings of *Vanilla planifolia* derived from micropropagation. For such, five concentrations of sucrose (0, 15, 30, 45 and 60 g L<sup>-1</sup>) were used, with four replicates of ten seedlings, in a completely randomized design. The experimental unit consisted of a bottle with a capacity of 500 ml, containing 80 ml of complete medium MS. Morphological variables, a chlorophyll fluorescence, content of starch, rate of water loss and the pH of the culture medium were assessed 60 days after the inoculation of the seedlings in the culture medium. After being submitted to the analysis of variance, the data were analyzed by regression analysis. Different concentrations of sucrose in the culture medium affected all the morphological traits and physiological parameters under study. The absence and the concentration of 60 g L<sup>-1</sup> of sucrose in the medium are harmful to plant growth. The absence of sucrose favors the autotrophic behavior in seedlings of vanilla. The highest mean for maximum photochemical efficiency of PSII is found at the estimated concentration of 19.72 g L<sup>-1</sup> of sucrose. The data related to morphological and physiological aspects of seedlings of *Vanilla planifolia* derived from micropropagation suggest that large-scale propagation of seedlings of this species is technically feasible.

Keywords: *Vanilla planifolia*. *In vitro* cultivation. Carbohydrate. Starch.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O método de propagação mais utilizado para baunilheira é a estaquia. Os propágulos são estacas caulinares obtidas pelo seccionamento da haste da planta. Todavia, esse método de propagação não é econômico e também tem a desvantagem de ser moroso (KNORR et al., 1993; KALIMUTHU; SENTHILKUMAR; MURUGALATHA, 2006).

A micropropagação tem sido amplamente utilizada para a multiplicação rápida de muitas espécies de plantas (KAUR; ANAND; GOYAL, 2011), bem como para estudos relacionados aos aspectos fisiológicos relacionados ao desenvolvimento vegetal (SUZUKI et al., 2010). É uma alternativa que maximiza a propagação de várias espécies, tendo como vantagens a fixação de ganhos genéticos em populações clonais e a obtenção de grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade, em pequeno espaço físico (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na micropropagação convencional, as mudas se desenvolvem como organismos heterotróficos, utilizando a sacarose no meio de cultura como principal fonte de carboidrato, uma vez que esse composto eleva a produção de biomassa *in vitro* (KITAYA; SAKAMI; KOZAI, 1995; KOZAI, 1991). Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento das células, além de atuarem como um componente osmótico do meio de cultura (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Plântulas cultivadas *in vitro* podem apresentar um metabolismo heterotrófico caso essas cresçam em condições específicas, como elevadas concentrações de carboidratos, baixa irradiância, limitada troca de gases, alta umidade relativa do ar, alta concentração de etileno, baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e baixa concentração de CO<sub>2</sub> (KUBOTA; KOZAI, 1992; MAJADA et al., 2000; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008). A presença de sacarose nos meios de cultura de tecidos inibe especificamente a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética potencial do explante, tornando o crescimento autotrófico menos viável e o seu excesso pode ser prejudicial ao crescimento das culturas *in vitro* (DESJARDINS; HDIDER; De RIEK, 1995; KOZAI; NGUYEN, 2003; GEORGE; HALL;

De KLERK, 2008). Os explantes cultivados em ambiente heterotrófico podem desenvolver desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas que fazem com que a maquinaria fotossintética não opere normalmente (ARIGITA; GONZÁLEZ; TAMÉS, 2002; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; RADOCHOVÁ; TICHÁ, 2009).

Plantas crescidas em ambientes considerados “heterotróficos”, normalmente, apresentam parte aérea muito pequena, menor quantidade de cera cuticular e epicuticular nas folhas, tecidos com reduzida resistência mecânica (menos colênquima e esclerênquima), estômatos não funcionais, folhas finas e pequenas com poucos tricomas e com baixa atividade fotoautotrófica (ZIV; SCHWARTZ; FLEMINGER, 1987; POSPISILOVÁ; SOLAROVÁ; CATSKY, 1992; KITAYA et al., 2005). As plântulas formadas no sistema heterotrófico possuem elevado conteúdo de água com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (KUBOTA; KOZAI, 1992). Além disso, uma quantidade elevada de sacarose no meio de cultura pode elevar a pressão osmótica do meio e, assim, reduzir o crescimento das plântulas, por meio de redução na absorção de água e de nutrientes devido à alteração de potencial hídrico entre o meio de cultivo e a plântula, desfavorecendo, assim, a absorção desses (GEORGE; HALL; De KLERK, 2008).

Com base nessas informações, torna-se necessário utilizar no meio de cultivo uma concentração adequada de sacarose, evitando, assim, o comprometimento no metabolismo fotossintético do material micropropagado. O objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos morfofisiológicos do cultivo *in vitro* de mudas micropropagadas de baunilheira, relacionados ao crescimento, fluorescência, concentração de amido e taxa de perda de água, em resposta a utilização de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas da empresa Clonagri, localizada em Arthur Nogueira, São Paulo, em sala de crescimento com temperatura variando entre 23 a 26°C, umidade relativa em torno

de 50-60% e fotoperíodo de 12 horas, sob lâmpadas fluorescente tipo luz do dia e intensidade luminosa de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e avaliado 60 dias após a inoculação das mudas nos meios de cultura. Foram utilizadas mudas de *Vanilla planifolia* G. Jacks ex ANDREWS produzidas nesse mesmo laboratório, provenientes da proliferação de gemas axilares de planta adulta. A coleta dos dados foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre, Espírito Santo.

A metodologia utilizada para a produção de mudas provenientes da proliferação de gemas axilares de planta adulta consistiu na retirada das gemas e posterior lavagem em água corrente, seguida de desinfestação com álcool 70% durante 3 minutos, solução comercial de hipoclorito a 0,6% com 5 gotas de Tween, para cada 100 mL da solução desinfestante por 25 minutos e 3 enxagues em água destilada e estéril. Com auxílio de bisturi e lupa, as gemas foram isoladas nas dimensões de 0,2 a 0,5 mm de comprimento e 2,5 a 5,0 mm de diâmetro, e procedeu-se a nova desinfestação com solução comercial de hipoclorito a 0,3% com 5 gotas de Tween, por 10 minutos e 3 enxagues em água destilada e estéril. Terminada a desinfestação, as gemas foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, solidificado com  $6 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e esterilizado em autoclave com pressão de 1,5 atm e temperatura de  $121^\circ\text{C}$ , por 20 minutos. No cultivo foram utilizados frascos de tampa plástica transparente com capacidade de 100 ml, contendo 15 ml de meio de cultura.

Após o estabelecimento da gema e o meio de cultura não apresentando contaminação aparente, transferiu-se a gema para frasco com capacidade de 190 ml contendo 30 ml de meio MS completo, com  $2 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado. De cada gema surgiu uma única brotação, formando um único ramo. Os ramos foram fracionados em 1,5-2 cm e inoculados na posição deitada para multiplicação em frasco com capacidade de 190 ml contendo 30 ml de meio MS completo, com  $2 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado.

Entre 4-6 semanas novos ramos foram formados a partir das gemas axilares. Seis multiplicações foram realizadas, a fim de se obter mudas em quantidade suficiente para a montagem do experimento e para novos estudos. A temperatura da sala de

crescimento ficou entre 23 a 26°C, com umidade relativa em torno de 50-60% e fotoperíodo de 12 horas, sob lâmpadas fluorescente tipo luz do dia e intensidade luminosa de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Não foi utilizado nenhum tipo de fitorregulador em nenhuma fase desde a inoculação das gemas até o final das multiplicações. O material vegetal utilizado para extração das gemas consistiu de um único ramo de *Vanilla planifolia* de 2 m de comprimento, 1 cm de diâmetro, e entrenós de aproximadamente 15 cm de comprimento, de cinco anos de idade, coletado em Muqui, Espírito Santo.

O experimento foi constituído de cinco tratamentos, com as variações de 0, 15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100% de meio MS cada um. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada tratamento foi composto por quatro frascos de tampa plástica transparente, com capacidade de 500 ml, contendo 80 ml de meio MS, sendo que cada frasco continha dez mudas com tamanho médio de 1,5-2 cm de comprimento, oriundas do sexto subcultivo de mudas provenientes de gemas axilares. Com auxílio de bisturi e pinça, os explantes foram obtidos após separação das ponteiros de agrupamento de mudas. O pH do meio de cultivo foi ajustado em  $5,7 \pm 0,1$ . A figura 4 ilustra o crescimento de mudas de *Vanilla planifolia* na concentração de 30 g L<sup>-1</sup>.

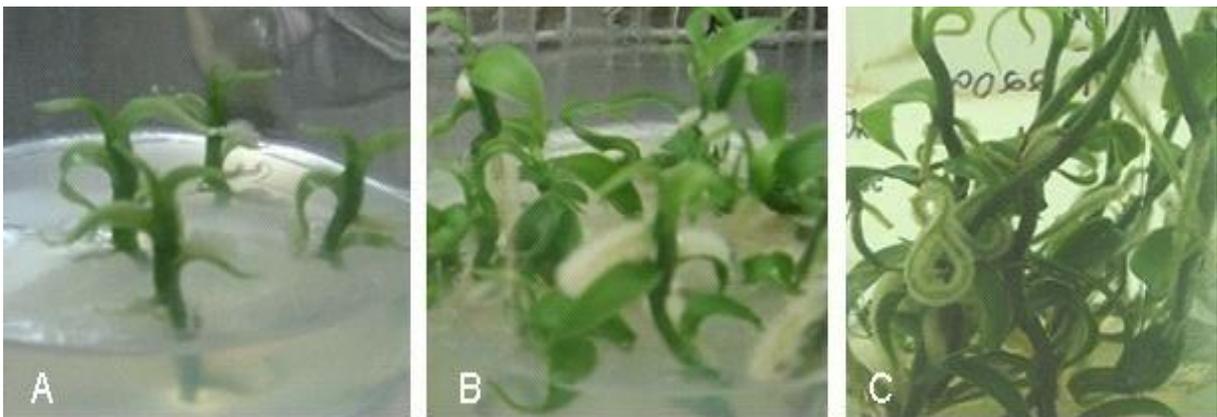


Figura 4 – Mudanças de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação, cultivadas em meio MS completo na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose: (A) dia da inoculação; (B) aos 35 dias; e (C) aos 60 dias de subcultivo.

Os dados foram coletados da seguinte forma: sete mudas de cada frasco foram utilizadas para as medidas morfológicas, sendo que uma folha de cada planta foi

retirada para a medição da taxa de perda de água. As outras três mudas foram utilizadas para as medidas dos parâmetros fisiológicos e teor de amido. Antes de se iniciar a coleta dos dados, cada muda foi lavada com água destilada para retirada do meio de cultura ainda aderido às raízes.

As variáveis morfológicas avaliadas foram: comprimento médio da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR), massa da matéria fresca total da planta (MFTP) e massa da matéria seca total da planta (MSTP). Utilizou-se régua milimetrada para medição do comprimento de muda. Para determinação da massa da matéria fresca total foi utilizada balança analítica com quatro casas decimais. A massa da matéria seca total da planta foi obtida após secagem das mudas em saco de papel colocado em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, até atingir massa constante. Assim que as mudas foram retiradas dos frascos procedeu-se a medição do pH do meio de cultura com auxílio de um peagâmetro de bancada da marca MARCONI, modelo PA200. O eletrodo foi colocado diretamente no meio de cultura para determinação do pH.

Os parâmetros de fluorescência foram medidos entre 9:00-11:00h, em sistema aberto, sob radiação fotossinteticamente ativa (RFA) equivalente à do ambiente ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e pressão parcial de  $\text{CO}_2$  de 40 Pa, com um analisador de gases a infravermelho (Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, EUA). Após serem adaptados ao escuro, por 30 minutos, tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante ( $0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para a determinação da fluorescência inicial ( $F_0$ ). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de  $6000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e duração de 0,8 s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ). Procedeu-se, ainda, a determinação da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) ( $F_v/F_m$ ) e dos coeficientes de extinção fotoquímica ( $q_P$ ) e não fotoquímica (NPQ) e da taxa de transporte de elétrons (TTE). O rendimento das três vias concorrentes de desexcitação de clorofilas no FSII, isto é, rendimento fotoquímico do FSII ( $\Phi_{\text{FSII}}$ ), rendimento não fotoquímico associado à dissipação de energia pelo ciclo das xantofilas ( $\Phi_{\text{NPQ}}$ ) e outros mecanismos de dissipação energética ( $\Phi_{\text{NO}}$ ) foram também calculados

(KRAMER et al., 2004). Clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total também foram medidas.

As mesmas mudas utilizadas para medição dos parâmetros fisiológicos foram usadas para determinação do teor de amido, segundo metodologia desenvolvida por Yemm e Willis (1954). As mudas foram secadas em estufa a 65°C, durante 48 horas, e maceradas em cadinho. Em seguida, pesou-se aproximadamente 100 mg de cada amostra, sendo colocadas em tubos eppendorf de 2000 µL. Adicionou-se 1000 µL de álcool etílico, 92,8 INPM, agitando-se em agitador de tubos, e logo após, centrifugados durante cinco minutos a 4000 *g*, eliminando-se o sobrenadante em seguida. Esse procedimento foi realizado por duas vezes e teve como objetivo a lavagem das amostras. Imediatamente adicionou-se 1000 µL de HCl a 3% em cada amostra que foram colocadas em banho-maria a 95°C durante quatro horas. Procedeu-se a nova centrifugação durante cinco minutos a 4000 *g*. O líquido sobrenadante foi coletado e disposto em tubos eppendorf de 2000 µL. Coletou-se 10 µL dessa solução, colocando-a em novos tubos eppendorf de 2000 µL, e em seguida foi feita a diluição em 490µL de água destilada. Dessa diluição coletou-se 10 µL, sendo depositados em tubos eppendorf de 2000 µL. A essa diluição, adicionou-se 1000 µL de solução de antrona (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 76% + reagente de antrona). Os tubos foram colocados em banho-maria a 95°C por 10 minutos. Após esfriamento foi feita a leitura dos açúcares solúveis em espectrofotômetro FEMTO 700 PLUS, a 620 nm.

De cada muda utilizada para as medidas morfológicas, retirou-se uma folha para a medida da taxa de perda de água, segundo metodologia proposta por Eliasson, Beyl e Barker (1994), em que a massa da matéria fresca (MF) de cada folha foi determinada em uma balança analítica, em intervalos de 30 minutos, até que a massa se estabilizasse. As medidas foram realizadas na bancada do laboratório em temperatura de 25,2°C e 78% de umidade relativa. Finalizadas as determinações da massa da matéria fresca das folhas, estas foram colocadas em estufa a 70°C por 48 h para determinação da massa da matéria seca (MS). A taxa de perda de água foi calculada segundo a equação:  $TPA = \left\{ \left[ \frac{M_F - M_X}{M_F - M_S} \right] 100 \right\}$ , em que  $M_F$  corresponde à massa da matéria fresca inicial,  $M_X$  corresponde à massa fresca a cada trinta minutos entre as medições, e  $M_S$  corresponde à massa da matéria seca.

Os dados referentes às variáveis morfológicas, parâmetros fisiológicos, teor de amido e pH foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial. As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância demonstrou diferença significativa entre as doses de sacarose para as médias de todas as variáveis estudadas. A análise foi desmembrada para estudo das respostas de cada variável diante das doses por meio de regressão polinomial até grau 3, conforme ilustra a tabela 2. Os resultados dessa análise para as variáveis morfológicas e parâmetros fisiológicos, ao final de 60 dias de cultivo de mudas de baunilheira, provenientes de micropropagação, demonstram que houve diferenças significativas para todas as variáveis e parâmetros analisados, obtendo-se respostas lineares ou quadráticas.

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca total da planta (MSTP), amido, eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm), taxa de transferência de elétrons (TTE), rendimento fotoquímico do FSII ( $\Phi_{FSII}$ ), rendimento não fotoquímico associado à dissipação de energia pelo ciclo das xantofilas ( $\Phi_{NPQ}$ ), outros mecanismos de dissipação energética ( $\Phi_{NO}$ ), clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação, submetidas a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, e pH do meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo, em Arthur Nogueira, SP, 2013

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio						
		CPA (cm)	NF	NRA	MFTP (g)	MSTP (g)	Amido	pH
Sacarose	4	9,3052	5,2127	10,5024	0,4783	0,0048	440,6907	0,1938
Regressão Linear	1	4,5368	0,4292	26,765	1,0154	0,0161	1580,049**	0,2341
Regressão Quadrática	1	30,0799**	19,4469**	13,0564**	0,7009**	0,0023**	146,5778	0,5363**
Regressão Cúbica	1	2,263	0,3718	0,0048	0,1793	0,0006	5,776	0,0018
Resíduo	15	1,4707	1,2153	1,4482	0,068	0,0002	42,77	0,0326
Médias		8,2	7,13	6,07	1,11	0,08	6,16	3,90
C.V. (%)		14,78	15,44	19,82	23,41	17,58	10,57	4,63

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio				
		Fv/Fm	TTE	$\Phi_{FSII}$	$\Phi_{NPQ}$	( $\Phi_{NO}$ )
Sacarose	4	0,0634	1758,7585	0,0369	0,0779	0,02

Tabela 2 – Continuação.....

Regressão Linear	1	0,1217	1566,9	0,0334	0,1537	0,0548
Regressão Quadrática	1	0,0918**	2713,3978**	0,0565**	0,1126**	0,0126**
Regressão Cúbica	1	0,0227	2,5735	0,00007	0,015	0,0048
Resíduo	21	0,0015	33,0732	0,0007	0,0018	0,0015
Médias		0,71	35,31	0,16	0,4	0,43
C.V. (%)		5,51	16,29	16,76	10,45	8,79
Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio				
		Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total		
Sacarose	4	11853,7124	719,1632	18054,2737		
Regressão Linear	1	59913,6**	3058,776**	90047,256**		
Regressão Quadrática	1	4099,2171	461,0743	7287,5		
Regressão Cúbica	1	11179,35	722,454	17585,664		
Resíduo	20	2765,7	242,2153	4225,6573		
Médias		216,5	71,04	287,52		
C.V. (%)		24,29	21,91	22,61		

\*\* Significativo pelo teste F a 1%; GL = Grau de liberdade.

Nenhuma das variáveis morfológicas apresentou relação direta com o aumento dos níveis de sacarose, e sim resposta quadrática (Tabela 2; Figura 5). Os pontos de máxima eficiência técnica em  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose foram: 33,02 para comprimento da parte aérea, correspondente a 9,66 cm (Figura 5A); 28,88 para número de folhas, correspondente a 8,33 folhas (Figura 5B); 43,64 para número de raízes, correspondente a 7,47 raízes (Figura 5C); 40,5 para massa da matéria fresca total, correspondente a 1,3911 g (Figura 5D); e, 53,57 para massa da matéria seca total, correspondente a 0,1118 g (Figura 5E).

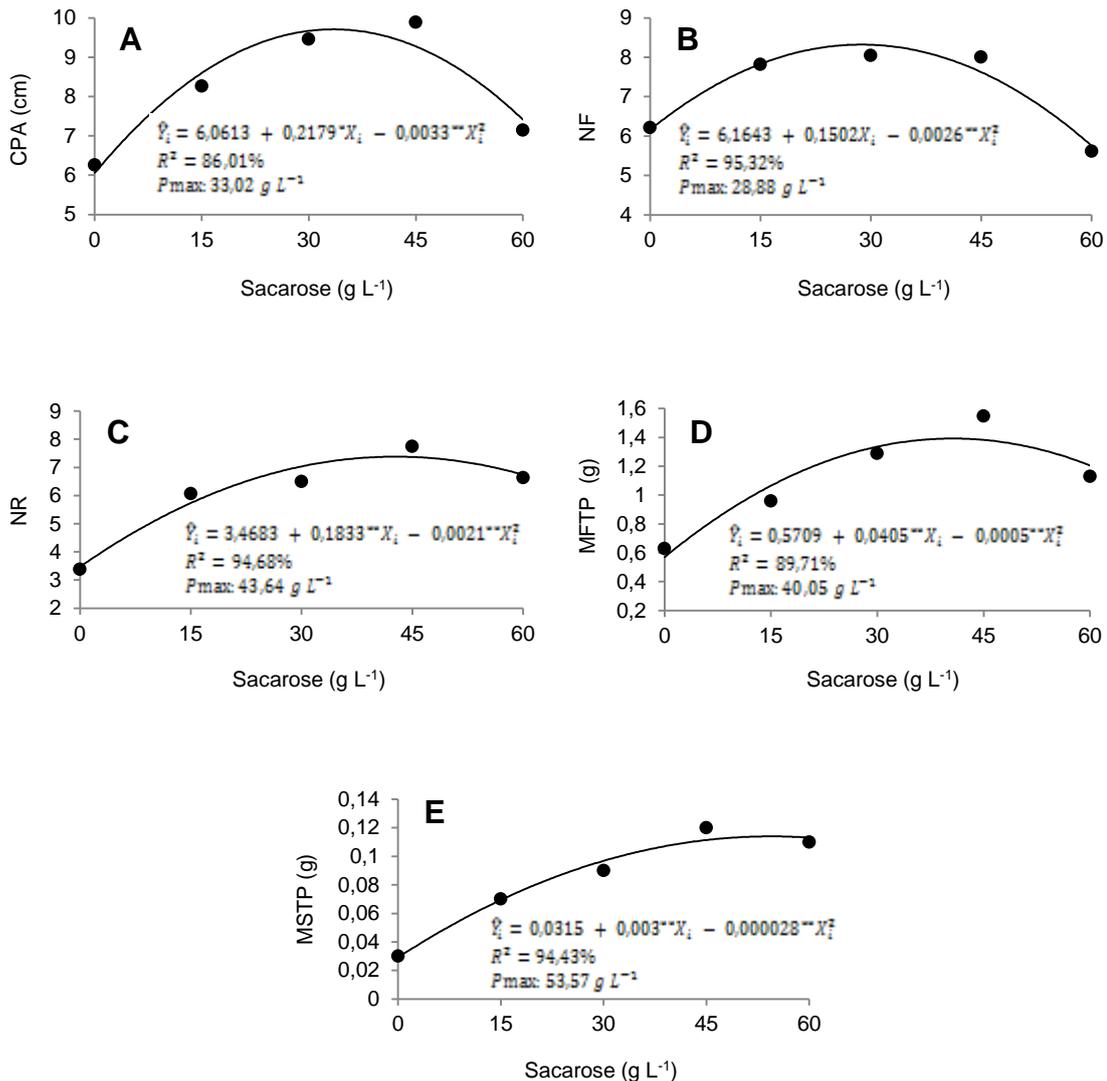


Figura 5 – (A) - comprimento da parte aérea (CPA), (B) - número de folhas (NF), (C) - número de raízes (NR), (D) - massa da matéria fresca total da planta (MFTP) e (E) - massa da matéria seca total da planta (MSTP), de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação, submetidas a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo.

Diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de identificar as melhores respostas de plantas de orquídeas cultivadas em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. Ao cultivarem *Miltonia flavescens* Lindl *in vitro*, Besson et al. (2010) identificaram que a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose resultou em maior comprimento da parte aérea. Galdiano Júnior et al. (2013a e 2013b) concluíram que a concentração de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura foi a de maior eficiência entre as concentrações estudadas, tanto para o crescimento *in vitro* para *Cattleya violacea*, como para o crescimento *in vitro* quanto ao estabelecimento

*ex vitro* de *Cattleya loddigesii*. Pivetta et al. (2010) encontraram nas concentrações estimadas de 13 a 29 g L<sup>-1</sup> de sacarose os maiores valores médios para número de raízes, comprimento de raízes e comprimento da parte aérea em plântulas de *Caularthron bicornutum*. Fráguas et al. (2003) também identificaram que a concentração de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou crescimento satisfatório de plântulas em híbridos de *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*.

No presente estudo a maior concentração estimada, 53,57 g L<sup>-1</sup>, proporcionou o melhor resultado para massa da matéria seca total. Isso pode ser devido a uma maior concentração de amido nesse nível.

O tratamento contendo 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose foi o mais eficiente para o desenvolvimento vegetativo e a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> promoveu maior massa da matéria seca de plântulas da orquídea *Oncidium baueri* (SORACE et al. 2008). Entretanto, Correia et al. (2012), estudando o efeito da sacarose no crescimento de *Cattleya labiata* cultivada *in vitro*, em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas com radiação ativa fotossintética de 30 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W, observaram que plântulas desenvolvidas em meio de cultura sem adição de sacarose mostraram ganhos de crescimento significativos quando comparadas àquelas crescidas em meio de cultura contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

O valor mais elevado, 60 g L<sup>-1</sup>, reduziu todas as variáveis morfológicas avaliadas, provavelmente pelo decréscimo do potencial osmótico do meio, dificultando a absorção de sais e água pelas mudas. Entretanto, Faria et al. (2004) relataram que o maior comprimento da parte aérea de plântulas de *Dendrobium nobile* foi obtido na concentração de 60g L<sup>-1</sup>. Brown, Leung e Thorpe (1979) demonstraram o efeito osmótico da sacarose na cultura de calos de tabaco. Verificaram que as taxas de crescimento e regeneração era ideal na concentração de 3% de sacarose no meio de cultura, em que o potencial osmótico variou entre -0.4 e -0.6 MPa. Contudo, com o aumento dos níveis de sacarose acima de 3% ocorreu uma diminuição progressiva na regeneração de brotos.

Segundo Arigita, González e Tamés (2002), os explantes cultivados em ambiente heterotrófico desenvolvem desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas que fazem com que a maquinaria fotossintética não opere normalmente.

Verifica-se na figura 6 que a concentração de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, proporcionou pequeno crescimento de área foliar da planta, apenas folíolos, e as raízes menos desenvolvidas em comparação às plantas que cresceram nas demais concentrações. Uma analogia também pode ser feita em relação a esse aspecto entre as figuras 5B e 5C, em que há um decréscimo do número de raízes e de folhas, de 45 g L<sup>-1</sup> para 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, da ordem de 14,32% e 29,88%, respectivamente. Ou seja, na dosagem de 60 g L<sup>-1</sup>, ocorre alteração morfológica, em que a muda desenvolve menos folha e raiz. Isso pode ser devido à alta concentração de sacarose no meio de cultura, que pode levar a um aumento do potencial osmótico do meio, dificultando a absorção de água e sais, promovendo limitações no crescimento de folhas e raízes.



Figura 6 – Mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação, submetidas a diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>), no meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo.

O alto teor de açúcar no meio diminui a absorção de água, causando déficit hídrico. Em folhas pequenas, e ainda com déficit hídrico, não há turgescência,

consequentemente, não há crescimento celular. Em compensação, em mudas com poucas folhas há perda mínima de água. Segundo George, Hall e De Klerk (2008), os açúcares são responsáveis por grande parte do potencial osmótico do meio de cultura e quando a concentração de sacarose em um meio, como MS, é aumentada acima de 4-5%, começa a haver uma inibição progressiva do crescimento da célula, e isso pode estar relacionado a um efeito osmótico do meio.

Embora a maior concentração de sacarose,  $60 \text{ g L}^{-1}$ , tenha promovido maior crescimento de raiz, plântulas híbridas de *Calanthe* (Orchidaceae) foram induzidas a anormalidades (BAQUE et al., 2011). Ao estudarem a produção *in vitro* de biomassa e fenóis em raízes adventícias de *Echinacea angustifolia*, Wu et al. (2006) verificaram que a maior quantidade de fenóis e flavonoides foi acumulada com 5% de sacarose. Concluíram que a adição de sacarose no meio de cultura é uma importante fonte de carbono para cultura de raízes adventícias e que sua concentração inicial pode afetar vários parâmetros *in vitro*, como por exemplo, o crescimento e a produção de metabólitos secundários. Léo et al. (2007) constataram que o aumento da concentração de sacarose de  $60 \text{ g L}^{-1}$  para  $80 \text{ g L}^{-1}$ , no meio de cultura para o coqueiro-anão, provavelmente tenha promovido um efeito depressivo no metabolismo das plântulas, o que resultou em maior porcentagem de plântulas anormais.

O nível de sacarose no meio pode ter um efeito direto sobre o tipo da morfogênese. Assim, 87 mM de sacarose favoreceu a organogênese, enquanto que um nível mais elevado, 350 mM, favoreceu a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturos de girassol (JEANNIN; BRONNER; HAHNE, 1995).

Não houve relação direta para nenhum dos parâmetros fisiológicos com o aumento dos níveis de sacarose, mas sim uma resposta quadrática, com exceção para clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total que apresentaram resposta linear (Tabela 2; Figura 7). Os pontos de máxima eficiência em  $\text{g L}^{-1}$  foram: 19,72 para eficiência fotoquímica máxima do FSII, correspondente a 0,8 (Figura 7A); 23,89 para coeficiente de extinção fotoquímico, correspondente a 0,31 (Figura 7B); 23,28 para taxa de transporte de elétrons, correspondente a  $47,93 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Figura 7C); 23,21 para rendimento fotoquímico do FSII, correspondente a 0,22 (Figura 7D); e

10,17 para outros mecanismos de dissipação energética, correspondente a 0,48 (Figura 7F). O ponto de mínima eficiência em  $\text{g L}^{-1}$  foi de 19,5 para rendimento não fotoquímico associado à dissipação de energia pelo ciclo das xantofilas, correspondente a 0,31 (Figura 7E).

Os valores de  $F_v/F_m$  de 0 a  $45 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose foram muito próximos, variando de 0,74 a 0,76, mas apresentou forte redução em  $60 \text{ g L}^{-1}$ , ficando bem abaixo da faixa considerada ótima (0,75 a 0,85), em plantas não submetidas a estresses (BOLHAR-NORDENKAMPF et al., 1989), o que causou comprometimento da eficiência fotoquímica máxima do FSII. Valores inferiores a esses indicam uma diminuição na eficiência fotoquímica do FSII e um distúrbio ou danificação no aparato fotossintético, bem como de um aumento no processo de fotoinibição (MAXWELL; JOHNSON, 2000; LICHTENTHALER et al. 2005), o qual é atribuído à degradação da proteína D1 (ESTELLE, 2001). Ao cultivarem batata-doce *in vitro*, sob duas concentrações de sacarose ( $20$  e  $40 \text{ g L}^{-1}$ ) e duas densidades diferentes de fluxos de fótons ( $21$  e  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), Cassana et al. (2010) observaram que as folhas tanto *in vitro* como *ex vitro* apresentaram alta eficiência fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ), indicando um bom desenvolvimento do aparato fotossintético.

O coeficiente de extinção fotoquímico ( $qP$ ) representa a proporção da energia dos fótons capturada pelos centros de reação do FS II abertos e dissipada via transporte de elétrons (JUNEAU; GREEN; HARRISON, 2005). Zanandrea et al. (2007), ao estudarem características fotossintéticas em macieira, verificaram que a concentração de sacarose em relação a esse parâmetro foi significativamente maior no meio contendo  $30 \text{ g L}^{-1}$ . Altas concentrações de sacarose diminuem a eficiência fotoquímica máxima, que por consequência reduz o coeficiente de extinção fotoquímico ( $qP$ ) e a taxa de transporte de elétrons (TTE).

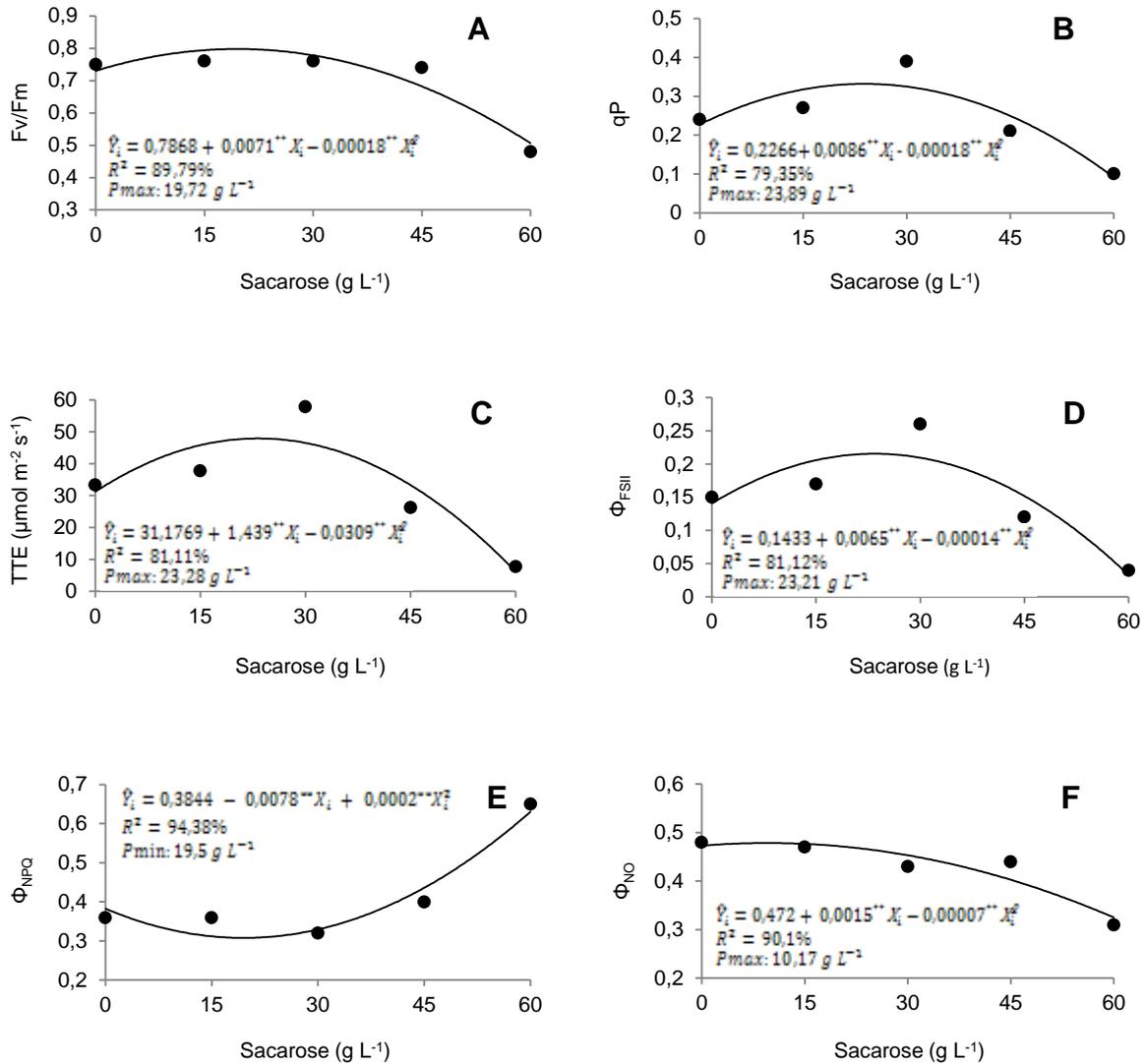


Figura 7 – (A) -  $F_v/F_m$  (eficiência fotoquímica máxima do FSII), (B) -  $qP$  (coeficiente de extinção fotoquímico), (C) - TTE (taxa de transporte de elétrons), (D) -  $\Phi_{FSII}$  (rendimento fotoquímico do FSII), (E) -  $\Phi_{NPQ}$  (rendimento não fotoquímico associado à dissipação de energia pelo ciclo das xantofilas) e (F) -  $\Phi_{NO}$  (outros mecanismos de dissipação energética), de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação, submetidas a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo.

Mothé et al. (2008), ao avaliarem a eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose observaram que não houve comprometimento da sacarose no meio sobre as características relacionadas à fotossíntese, entre elas o rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ), e que isso pode estar relacionado com a alta capacidade dessa espécie em armazenar sacarose nos tecidos.

Houve relação direta para clorofila *a*, *b* e totais e para concentração de amido com o aumento dos níveis de sacarose (Tabela 2; Figura 8). Nas figuras 8A, 8B e 8C verifica-se que o maior índice ICF (Índice de Clorofila Falker) ocorreu na ausência de sacarose. Isso é uma evidência de que mudas de *Vanilla planifolia* cultivadas *in vitro*, na ausência de carboidrato, exercem comportamento autotrófico. Nesse ambiente as mudas tiveram menor crescimento em relação às concentrações de 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup>, mas a possibilidade de sucesso no processo de aclimatização das mesmas tende a ser menos traumático. Resultado diferente foi encontrado por Dignart et al. (2009) ao constatarem que a ausência de sacarose resultou em menores teores de clorofila em plântulas de *Cattleya walkeriana*.

Diversos trabalhos têm reportado que, para muitas espécies, a presença de sacarose no meio de cultivo tem sido considerada a principal causa da redução nos teores de clorofila e, conseqüentemente, na fotossíntese (YAMADA; SATO, 1978; DESJARDINS; HDIDER; De RIEK, 1995; KOZAI; NGUYEN, 2003; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008). Segundo Campostrini e Otoni (1996), vários autores têm sugerido que a fonte de carboidrato no meio de cultura impede o metabolismo fotossintético do carbono, como a inibição da fotossíntese potencial *in vitro*, redução da atividade da Rubisco, inibição do acúmulo de clorofila, diminuição da fixação do carbono inorgânico por meio da inibição da atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato e do Ciclo de Calvin, e ainda, a redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II quando avaliada pela fluorescência da clorofila *a*. Todavia, a redução ou até mesmo a eliminação da sacarose do meio deve ser utilizada com a finalidade de facilitar a passagem das mudas para o estágio fotoautotrófico na fase de aclimatização (DEBERGH, 1991). De acordo com Kozai et al. (1991), na presença de açúcares as mudas não desenvolvem a capacidade fotoautotrófica, podendo causar crescimento reduzido e morte de mudas durante a fase de aclimatização, uma vez que tais plantas necessitam de um metabolismo fotoautotrófico quando são postas no ambiente *ex vitro*.

Observa-se também que na maior concentração de sacarose a quantidade de clorofila *a* e clorofila *b* foram baixas. Isso pode ser devido à alta concentração de amido no nível de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, o que fez com que o sistema fotossintético não funcionasse bem, provocando o crescimento diminuto de folha.

Na figura 8D, verifica-se que as concentrações crescentes de sacarose promoveram um acréscimo de amido, com valor máximo na maior concentração. O amido em alta concentração nos cloroplastos leva a retroinibição da eficiência fotoquímica máxima, culminando com a fotoinibição, como pode ser visto pelo baixo valor de  $F_v/F_m$  na concentração de  $60 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 7A). Com a redução da eficiência fotoquímica máxima ocorre também a queda do rendimento fotoquímico do fotossistema II.

Capellades, Lemeur e Debergh (1991) relataram que a elevada concentração de sacarose no meio poderia ter promovido uma maior concentração de amido no cloroplasto. Uma explicação para a inibição da fotossíntese pode ser a baixa taxa de regeneração da carboxilação RuBP substrato, devido à acumulação de açúcares solúveis nas folhas (AZCÓN-BIETO, 1986). A outra explicação para a baixa taxa de fotossíntese líquida poderia ser a inibição da atividade e, ou síntese da Rubisco (CAPELLADES; LEMEUR; DERBERGH, 1991).

Hdider e Desjardins (1994) encontraram resultados semelhantes ao verificarem uma redução de 50% na fotossíntese potencial máxima quando a concentração de sacarose passou de 0% para 5%, ao estudarem o efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a fotossíntese em plântulas de morango. La Rosa, Hasegawa e Bressan (1984) relataram que aparentemente a presença da sacarose no meio de cultivo inibe a fotossíntese, independente do acúmulo de clorofila.

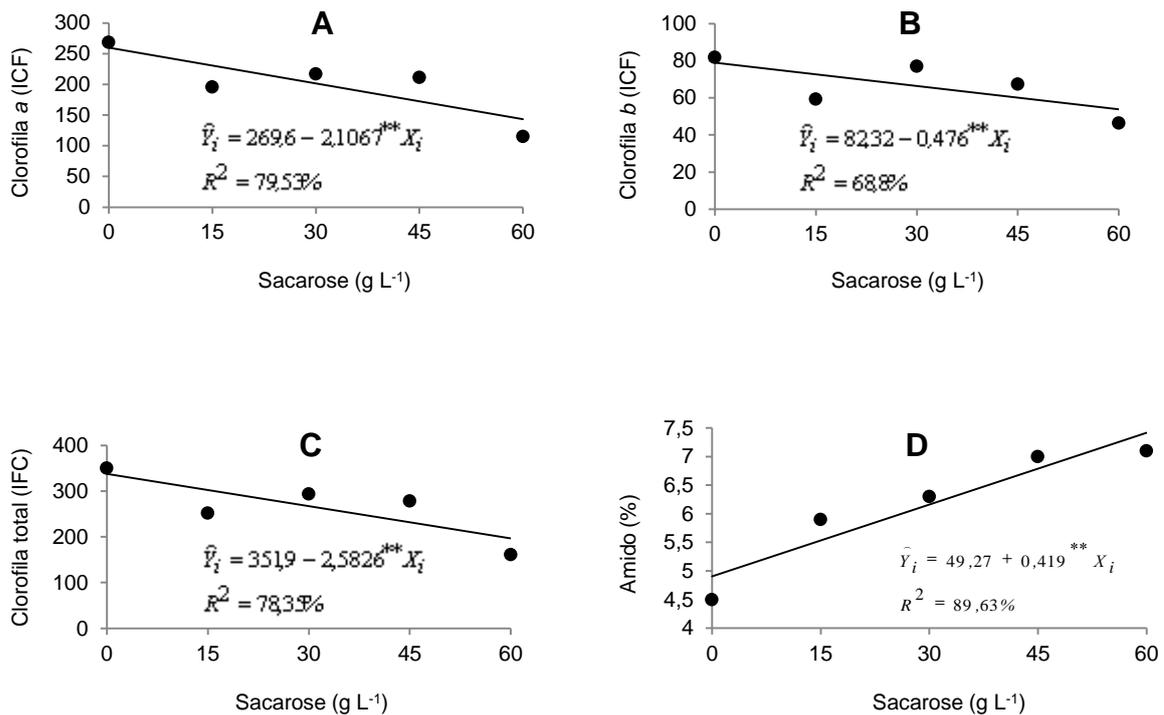


Figura 8 – (A) - Clorofila a, (B) - clorofila b, (C) - clorofila total e (D) - conteúdo de amido, de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação, submetidas a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo.

No intervalo de 0 a 150 minutos as menores taxas de perda de água ocorreram nas concentrações de 15 g L<sup>-1</sup> e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 9), o que pode ser um dado importante para a aclimação dessas mudas quando forem transferidas para condições *ex vitro*. A concentração de 45 g L<sup>-1</sup> foi a que apresentou a maior taxa de perda de água. Isso pode ser devido a um maior acúmulo de massa de matéria seca, possivelmente associado à maior fotossíntese e abertura estomática. Entretanto, Crespo (2007), ao cultivar cana-de-açúcar *in vitro* verificou nos tratamentos em que se utilizou a menor concentração (1,5%) de sacarose no meio de cultivo, uma taxa de perda de água (TPA) superior em comparação com os de 3% e 4,5%.

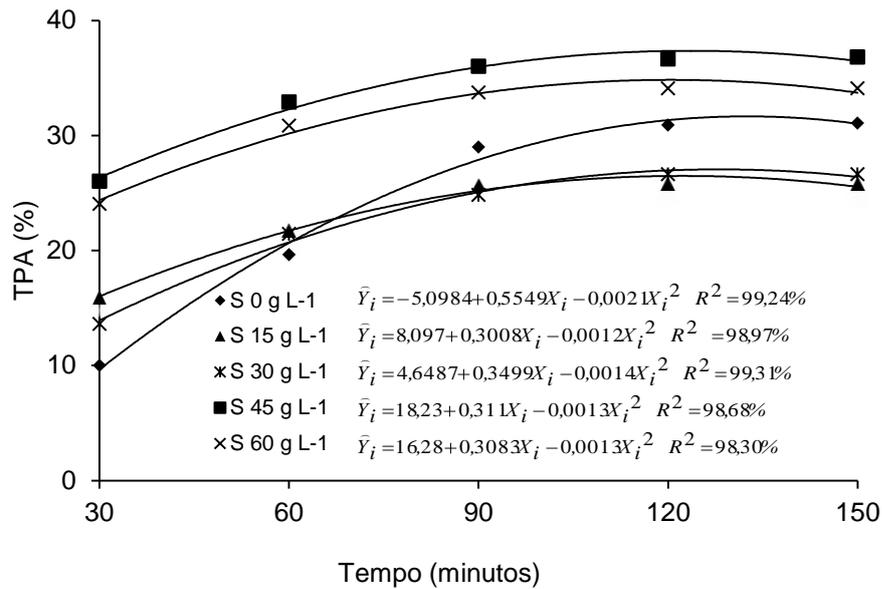


Figura 9 – Taxa de perda de água (TPA) de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação, submetidas a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, aos 60 dias de subcultivo.

Explantos cultivados sob regime heterotrófico originam plantas com elevado conteúdo de água, com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (KUBOTA; KOZAI, 1992). Plantas cultivadas *in vitro* perdem água rapidamente pela transpiração, quando são transferidas para a condição *ex vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GROUT, 1988; SUTTER, 1988).

Na última fase da cultura de tecidos ocorre a transferência das mudas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para um substrato adequado (MURASHIGE, 1974). De acordo com Grattapaglia e Machado (1990), nessa fase a planta passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório, devido à baixa irradiância e à elevada umidade relativa, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, ficando muito suscetível ao estresse hídrico.

Além do aparelho fotossintético ineficiente, as folhas das plantas *in vitro* também possuem menor quantidade de cera epicuticular do que as plantas crescidas em casa de vegetação ou câmaras de crescimento (BAKER, 1974; SUTTER; LANGHANS, 1980). Segundo Campostrini e Otoni (1996), tal fato é responsável pela transpiração excessiva que, aliada à redução no número de estômatos, ao mau

funcionamento no mecanismo de abertura e fechamento estomático e à má estruturação do clorênquima, levam ao dessecamento e murchamento das folhas.

Quanto aos valores de pH do meio de cultura, observa-se que não ocorreu uma relação direta com o aumento dos níveis de sacarose, e sim uma resposta quadrática (Tabela 2, Figura 10). O ponto de mínima eficiência em  $\text{g L}^{-1}$  foi 39, correspondente a um pH de 4,37. Em todos os tratamentos, mesmo no que não se adicionou sacarose ao meio, os valores do pH variaram entre 4,42 e 4,97, 30 e  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, respectivamente. Isso pode ser devido à eliminação de compostos ácidos pelas raízes no meio de cultura. Em se tratando de uma planta hemiepífita isso é perfeitamente possível.

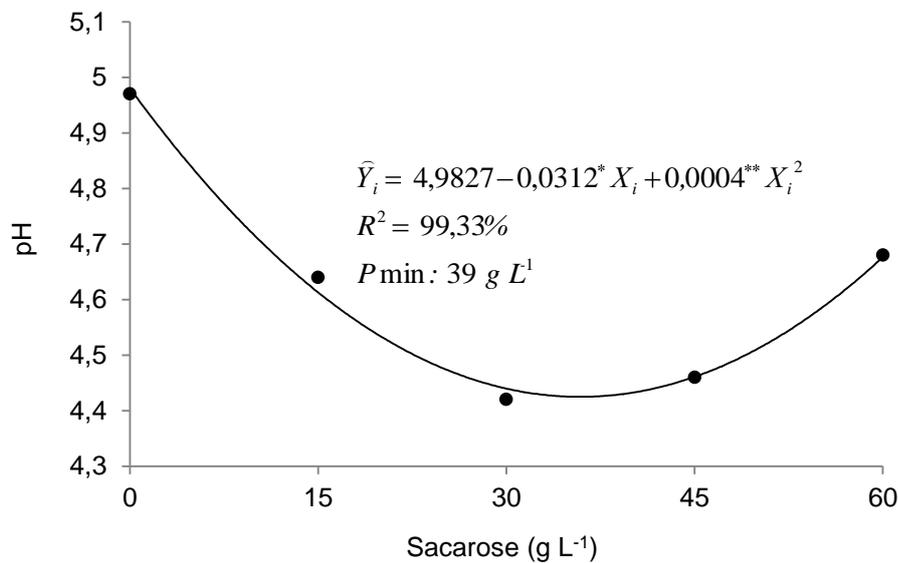


Figura 10 – pH do meio de cultura de mudas de *Vanilla planifolia*, com diferentes concentrações de sacarose.

Segundo Pasqual (2002), durante o crescimento das células, o pH do meio de cultura se altera à medida que diferentes íons são absorvidos e os produtos metabólicos são excretados para o meio. Esse mesmo autor obteve melhor desenvolvimento de embriões de tangerineira ‘Poncã’, em pH ácido, entre 3,7 e 5,7.

## 2.4 CONCLUSÕES

- Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, observa-se que as concentrações de sacarose utilizadas são suficientes para os estudos dos aspectos morfofisiológicos analisados e que as concentrações estimadas de 28,88 a 53,57 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura proporcionam as maiores médias para comprimento da parte aérea, número de folhas, número de raízes, massa da matéria fresca total e massa da matéria seca total das mudas de *Vanilla planifolia*.
- A concentração de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura é prejudicial ao crescimento de mudas de baunilha e a sua ausência no meio induz a planta a ter comportamento autotrófico.
- As menores taxas de perda de água ocorreram nas concentrações de 15 g L<sup>-1</sup> e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. As mudas podem ter melhor adaptação quando forem cultivadas sob condição *ex vitro*.
- O pH não é um fator limitante direto para o crescimento das mudas visto que os melhores resultados dos aspectos morfofisiológicos também ocorreram em pH ácido.
- Os dados relativos aos aspectos morfológicos e fisiológicos de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação sugerem a viabilidade técnica para a propagação de mudas em larga escala.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 1, p. 166-173. 2002.
- AZCÓN-BIETO, J. The control of photosynthetic gas exchange by assimilate accumulation in wheat. In: MARCELLE, R.; CLIJSTERS, H.; VAN POUKE, M. (Eds.). **Biological Control of Photosynthesis**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p. 231-240.

- BAKER, E. A. The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. **New Phytologist**, v. 73, n. 5, p. 955-966. 1974.
- BAQUE, A.; SHIN, Y. K.; ELSHMARI, T.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the micropropagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' x 'Hyesung' and 'Chunkwang' x 'Hyesung'). **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 10, p. 1247-1254. 2011.
- BESSION, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; BONETT, L. P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 9-13. 2010.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; OQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, E. G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, v. 3, n 4, p. 497-514. 1989.
- BROWN, D. C. W.; LEUNG, D. W. M.; THORPE, T. A. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. **Physiologia Plantarum**, v. 46, n. 1, p. 36-41. 1979.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimatização de plantas**: abordagens recentes. Brasília: Embrapa-CNPq, 1996. 12p. (ABCTP Notícias, n. 25).
- CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DERBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in rosa cultured *in vitro*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 25, n. 1, p. 21-26. 1991.
- CASSANA, F. F.; FALQUETO, A. R.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A.; BACARIN, M. A. Chlorophyll a fluorescence of sweet potato plants cultivated *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 3, p. 167-170. 2010.
- CORREIA, D.; ARAUJO, J. D. M.; NASCIMENTO, E. H. S.; SILVA JUNIOR, J. M. T.; BESSA, M. C. **Otimização da Produção de Mudas de *Cattleya labiata*: Efeito da**

**sacarose no crescimento *in vitro* e na aclimatização.** Fortaleza: Embrapa, 2012. 8 p.

CRESPO, L. E. C. **Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) em ambientes que favorecem condições heterotróficas e mixotróficas:** um estudo relacionado à fotossíntese, à eficiência fotoquímica e às relações hídricas. 2007. 64 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276. 2013.

DEBERGH, P. C. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 289, p. 291-300. 1991.

DESJARDINS, Y.; HDIDER, C.; De RIEK, J. Carbon nutrition *in vitro* - regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI T.; SMITH, M. A. L. (Eds.). **Automation and environmental control in plant tissue culture.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 441-472.

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

ELIASSON, M. K.; BEYL, C. A.; BARKER, P. *In vitro* responses and acclimatization of *Prunus serotina* with paclobutrazol. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 13, n. 3, p. 137-142. 1994.

ESTELLE, M. Proteases and cellular regulation in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 3, p. 254-260. 2001.

FARIA, R. T.; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. V. R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 4, p. 780-783. 2004.

FRÁGAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, v. 50, n. 292, p. 719-726. 2003.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; CASSANO, A. O.; LEMOS, E. G. M. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 127-134. 2013a.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T.; LEMOS, E. G. M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 583-592. 2013b.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; De KLERK, J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer. 2008. 501 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. 1990. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH. 1990. p. 99-169.

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, 1998. p. 183-260.

GROUT, B. W. W. Photosynthesis of regenerated plantlets "in vitro", and the stresses of transplanting. **Acta Horticulturae**, v. 230, p. 129-155. 1988.

HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, n. 1, p. 27-33. 1994.

JEANNIN, G.; BRONNER, R.; HAHNE, G. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: Role of Sugar. **Plant Cell Reports**, v. 15, n. 3-4, p. 200-204. 1995.

JUNEAU, P.; GREEN, B. R.; HARRISON, P. J. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. **Photosynthetica**, v. 43, n. 1, p. 75-83. 2005.

KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; MURUGALATHA, N. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andrews - a tropical orchid. **Current Science**, v. 91, n. 10, p. 1401-1403. 2006.

KAUR, H.; ANAND, M.; GOYAL, D. Optimization of potting mixture for hardening of *in vitro* raised plants of *Tylophora indica* to ensure high survival percentage. **International Journal of Medical and Aromatic Plants**, v. 1, n. 2, p.83-88. 2011.

KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, n. 3, p. 251-257. 2005.

KITAYA, Y.; SAKAMI, K.; KOZAI, T. Development of photoautotrophic Plant tissue culture system using CO<sub>2</sub> from Shiitake Mushroom. **Acta Horticulturae**, v. 393, p. 195-202. 1995.

KNORR, D.; CASTER, C.; DORNENBURG, H.; DORN, R.; GRÄF, S.; HAWKIN-FRENKEL, D.; PODSTOLSKI, A.; WERRMANN, U. Biosynthesis and yield improvement of food ingredients from plant cell and tissue cultures. **Food Technology**, v. 47, n. 12, p. 57-63, 1993.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation-technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 447-469.

KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANUBE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 25, n. 2, p. 107-115, 1991.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Eds.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 757-781.

KRAMER, D. M.; JOHNSON, G.; KIIRATS, O.; EDWARDS, G. E. New fluorescence parameters for the determination of  $Q_A$  redox state and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research**, v. 79, n. 2, p. 209-218. 2004.

KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1312-1314. 1992.

LA ROSA, P. C.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Photoautotrophic potato cells: transition from heterotrophic to autotrophic growth. **Physiologia Plantarum**, v. 61, n. 2, p. 279-286. 1984.

LÉDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 147-154. 2007.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C.; KNAPP, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RfD of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica**, v. 43, n. 3, p. 379-393. 2005.

MAJADA, J. P.; TADEO, F.; FAL, M. A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, n. 3, p. 207-214. 2000.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668. 2000.

MOTHÉ, G. P. B.; NETTO, A. T.; CRESPO, L. E. C.; CAMPOSTRINI, E. Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum*

*officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 4, n. 2, p. 84-91. 2008.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p.135-166. 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497. 1962.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 3, p. 199-202. 2002.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, R.; FARIA, R. T.; TAKANE, R. J. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1897-1902. 2010.

POSPISILOVÁ, J.; SOLAROVÁ, J.; CATSKY, J. Photosynthetic responses to stress during *in vitro* cultivation. **Photosynthetica**, v. 26, p. 3-18. 1992.

RADOCHOVÁ, B.; TICHÁ, I. Leaf anatomy during leaf development of photoautotrophically *in vitro*-grown tobacco plants as affected by growth irradiance. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 1, p. 21-27. 2009.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; DAMASCENO JÚNIOR, C. V.; GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L. S. A.; JENNIFFER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 775-782. 2008.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweet gum plants after removal in vitro culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 113, n. 2, p. 234-238.1988.

SUTTER, E.; LANGHANS, R. W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot-tip culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 104, n. 4, p. 493-496. 1979.

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

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, 509 p.

WU, C. H.; DEWIR, Y. S.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. **Journal Plant Biology**, v. 49, n. 3, p. 193-199. 2006.

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiology**, v. 19, n. 4, p. 691-699, 1978.

YEMM E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v. 57, n. 3, p. 508-514. 1954.

ZANANDREA, I.; BACARIN, M. A.; FALQUETO, A. R.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A. Características fotossintéticas de macieira cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 885-887. 2007.

ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata *in vitro* leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; Implications for hardening. **Plant Science**, v. 52, n.1-2, p. 127-134. 1987.

### **CAPÍTULO III**

#### **CRESCIMENTO DE MUDAS DE BAUNILHA (ORCHIDACEAE): RECIPIENTE, SUBSTRATO E TIPO DE MUDA**

## RESUMO

Tradicionalmente, a baunilha é propagada pelo método da estaquia. No entanto, a sua propagação também é possível por meio da proliferação de gemas axilares *in vitro* e propagação seminífera *in vitro*. Com base nesse contexto, este estudo objetivou avaliar o crescimento de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes da proliferação de gemas axilares e da propagação seminífera *in vitro*, cultivadas em diferentes recipientes e substratos, por meio de variáveis morfológicas. O experimento foi realizado em esquema de parcelas subdivididas, constituído pelas combinações entre os fatores recipiente (2 níveis: sacola e bandeja, nas parcelas), substrato (2 níveis: preparado I e preparado II, nas subparcelas) e tipo de muda (2 níveis: proliferação de gemas axilares e propagação seminífera *in vitro*, nas subsubparcelas), num delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de oito mudas. As avaliações foram realizadas aos 90 dias após o plantio e os dados foram submetidos à análise de variância. Quando significativos, foi utilizado o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Ocorreu interação tripla significativa para massa da matéria fresca do caule (MFC), massa da matéria fresca da folha (MFF), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca do caule (MSC), massa da matéria seca da folha (MSF) e massa da matéria seca total da planta (MSTP). A combinação de recipiente sacola de polietileno (30x15 cm), substrato II (solo, areia, esterco de galinha e serrapilheira de mata) e muda micropropagada de gema axilar pode ser utilizada na produção de mudas de *V. planifolia*.

Palavras-chave: *Vanilla planifolia*. Propagação. Embalagem. Serrapilheira de mata.

## ABSTRACT

Vanilla has traditionally been propagated from cuttings. However, it can also be propagated through *in vitro* axillary bud proliferation and *in vitro* seminiferous propagation. Therefore, this study aimed to evaluate the growth of seedlings of *Vanilla planifolia* from axillary bud proliferation and *in vitro* seminiferous propagation, grown in different containers and substrates, through morphological variables. The experiment was arranged in a split-plot design, consisting of combinations of the following factors: container (2 levels: bag and tray, in the plots), substrate (2 levels: preparation I and preparation II, in the subplots) and type of seedling (2 levels: proliferation of axillary bud and *in vitro* seminiferous propagation, in subsubplots) in a completely randomized design with four replications of eight seedlings. Evaluations were performed at 90 days after planting and the data were subjected to the analysis of variance. The significant data were submitted to the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). Significant triple interaction was verified for fresh weight of stem (MFC), fresh weight of leaf (MFF), total fresh weight of plant (MFTP), dry weight of the stem (MSC), dry weight of the leaf (MSF) and total dry weight of the plant (MSTP). The combination of polyethylene bags (30x15 cm), substrate II (soil, sand, chicken manure and litter from forest) and seedling micropropagated from axillary buds can be used in the production of seedlings of *V. planifolia*.

Keywords: *Vanilla planifolia*. Propagation. Packaging. Forest litter.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa, pelo processo convencional de estaquia ou pela técnica da micropropagação, facilita a multiplicação de genótipos desejados. O processo da propagação vegetativa não inclui meiose, portanto, as brotações originárias são geneticamente idênticas à planta matriz (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000). Entretanto, a propagação sexuada gera maior variabilidade entre os indivíduos o que possibilita maior distribuição e adaptação do material em condições de solo e clima diferentes (SILVA, 2005).

Tradicionalmente, a baunilha é propagada pelo método da estaquia a partir do seccionamento do caule da planta. No entanto, esse método de propagação não é econômico e também tem a desvantagem de ser moroso (KALIMUTHU; SENTHILKUMAR; MURUGALATHA, 2006).

Para Chandra et al. (2010), o sucesso de micropropagação em escala comercial depende da capacidade de transferência em larga escala de plântulas, a baixo custo e com altas taxas de sobrevivência. Todavia, o cultivo *in vitro* pode promover alterações anatômicas, morfológicas, fisiológicas e variações somaclonais nas plantas, o que dificulta o desenvolvimento das mesmas (GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; RADOCHOVÁ; TICHÁ, 2009), levando, algumas vezes, à consequências negativas ao crescimento e ao desenvolvimento das culturas, comprometendo assim a obtenção de taxas de estabelecimento e de multiplicação satisfatórias (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996).

As condições do ambiente de cultivo *in vitro* ao promoverem um crescimento rápido resultam na formação de plantas anormais. Essas plantas são frequentemente caracterizadas pela pobre eficiência fotossintética, mau funcionamento dos estômatos e uma acentuada diminuição na cera epicuticular (HAZARIKA, 2006). O cultivo de explantes em regime fotomixotrófico origina plantas com o conteúdo de água elevado, com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (KUBOTA; KOZAI, 1992; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A etapa da aclimatização das mudas é a última fase da micropropagação, sendo uma fase crítica e limitante no processo da micropropagação e é essencial para a sobrevivência e o sucesso do estabelecimento das plantas. Esse processo deve ser progressivo de forma que as plântulas não sofram estresse ou venham à morte devido às mudanças de ambiente (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; DEB; IMCHEN, 2010).

Durante a fase de aclimatização e crescimento das plantas, é necessário o uso de um meio de sustentação e fornecedor de nutrientes: o substrato. Ele pode facilitar ou impedir o crescimento das mudas conforme suas propriedades físico-químicas. A escolha e o manejo correto do substrato irão afetar a sobrevivência, o crescimento e o desenvolvimento das plantas (CALVETE, 2004).

Características físicas e químicas relacionadas à espécie a ser cultivada, além de aspectos econômicos, devem ser observadas ao se escolher um substrato. Tais características estão relacionadas à homogeneidade, baixa densidade, alta porosidade, boa capacidade de retenção de água, alta capacidade de troca catiônica, boa agregação das partículas nas raízes, nutrientes em quantidades suficientes para o bom desenvolvimento das mudas, isenção de pragas, agentes fitopatogênicos e sementes indesejáveis, de fácil manipulação a qualquer tempo, disponibilidade e baixo custo por unidade (MINAMI, 1995; CALVETE, 2004; GOMES; SILVA, 2004). Essas características definem o êxito ou o fracasso da utilização do substrato (CALVETE, 2004).

O substrato deve ser suficientemente poroso, a fim de permitir trocas gasosas eficientes, evitando falta de ar para a respiração das raízes e para a atividade dos microrganismos no meio (KÄMPF, 2000). O pH, a capacidade de troca de cátions (CTC), a salinidade e o percentual de matéria orgânica presentes são utilizados para qualificar e quantificar as propriedades químicas do substrato (SHMITZ; SOUZA; KÄMPF, 2002).

Entre os substratos mais utilizados, pode-se citar vermiculita, perlita, areia, turfa, casca de eucalipto ou de pinus curtida, casca de arroz carbonizada e pó de carvão, cujas proporções variam conforme a espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Entre as propriedades físicas utilizadas para caracterização de um substrato, destacam-se: a densidade, a porosidade, o espaço de aeração e a economia hídrica (SHMITZ; SOUZA; KÄMPF, 2002).

A produção de mudas em recipientes é o sistema mais utilizado, principalmente por permitir a melhor qualidade, devido ao melhor controle da nutrição e à proteção das raízes contra os danos mecânicos e a desidratação, além de propiciar o manejo mais adequado no viveiro, no transporte, na distribuição e no plantio (GOMES et al., 2003). O recipiente, além de suporte, proporciona melhores condições para a nutrição das mudas, além de permitir maior proteção das raízes contra injúrias mecânicas e dessecação e oferece conformação vantajosa para as raízes das mudas (CALVETE, 2004). Deve-se ressaltar que o maior volume promove a melhor arquitetura do sistema radicular (PARVIAINEN, 1976), apesar de grandes dimensões acarretarem maiores custos de produção, de transporte, de distribuição e de plantio. Em geral, a altura da embalagem é mais importante do que o seu diâmetro para o crescimento de mudas de várias espécies (GOMES et al., 2003).

Em geral os produtores de baunilha estabelecem a cultura plantando as estacas diretamente no campo. Essa prática apresenta baixo índice de pegamento e ocasiona grandes perdas de material propagativo, gerando prejuízos financeiros (SILVA, 2005). Uma boa alternativa é a produção de mudas provenientes de micropropagação, em recipiente plástico, devido ao baixo custo desse material e fácil manuseio, e em substrato com teor adequado de nutrientes, boa capacidade de retenção de água, suficiente aeração e fácil drenagem.

Não foram identificados trabalhos científicos que tenham avaliado os aspectos morfológicos de diferentes tipos de mudas de *Vanilla planifolia* cultivadas em diferentes recipientes e substratos. Com base nessa informação, este estudo objetivou verificar qual a melhor combinação entre tipo de muda, tipo de recipiente e tipo de substrato, por meio de avaliações das variáveis morfológicas.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em Cachoeiro de Itapemirim-ES, na Fazenda Experimental do INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), em casa de vegetação revestida lateralmente com filme de poliolefina transparente e coberta com tela de sombreamento preta capaz de interceptar 50% da radiação. Mudanças de *Vanilla planifolia* G. Jacks ex ANDREWS, de 4-5 cm de comprimento, obtidas por meio de proliferação de gemas axilares e propagação de plântulas *in vitro*, produzidas no Laboratório de Micropropagação de Plantas da Empresa Clonagri, em Arthur Nogueira, São Paulo, foram plantadas em diferentes recipientes e diferentes substratos para avaliação do crescimento.

A metodologia utilizada para a produção de mudas provenientes da proliferação de gemas axilares de planta adulta consistiu na retirada das gemas e posterior lavagem em água corrente, seguida de desinfestação com álcool 70% durante 3 minutos, solução comercial de hipoclorito a 0,6% com 5 gotas de Tween, para cada 100 mL da solução desinfestante por 25 minutos e 3 enxagues em água destilada e estéril. Com auxílio de bisturi e lupa, as gemas foram isoladas nas dimensões de 0,2 a 0,5 mm de comprimento e 2,5 a 5,0 mm de diâmetro, e procedeu-se a nova desinfestação com solução comercial de hipoclorito a 0,3% com 5 gotas de Tween, por 10 minutos e 3 enxagues em água destilada e estéril. Terminada a desinfestação, as gemas foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e esterilizado em autoclave com pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C, por 20 minutos. No cultivo foram utilizados frascos de tampa plástica transparente com capacidade de 100 ml, contendo 15 ml de meio de cultura.

Após o estabelecimento da gema e o meio de cultura não apresentando contaminação aparente, transferiu-se a gema para frasco com capacidade de 190 ml contendo 30 ml de meio MS completo, com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. De cada gema surgiu uma única brotação, formando um único ramo. Os ramos foram fracionados em 1,5-2 cm e inoculados na posição deitada para multiplicação em frasco com capacidade de 190 ml contendo 30 ml de meio MS completo, com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

Entre 4-6 semanas novos ramos foram formados a partir das gemas axilares. Seis multiplicações foram realizadas, a fim de se obter mudas em quantidade suficiente para a montagem do experimento e para novos estudos. A temperatura da sala de crescimento ficou entre 23 a 26°C, com umidade relativa em torno de 50-60% e fotoperíodo de 12 horas, sob lâmpadas fluorescente tipo luz do dia e intensidade luminosa de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Não foi utilizado nenhum tipo de fitorregulador em nenhuma fase desde a inoculação das gemas até o final das multiplicações. O material vegetal utilizado para extração das gemas consistiu de um único ramo de *Vanilla planifolia* de 2 m de comprimento, 1 cm de diâmetro, e entrenós de aproximadamente 15 cm, de cinco anos de idade, coletado em Muqui, Espírito Santo.

Para a produção de mudas originárias de plântulas de *V. planifolia*, utilizou-se da seguinte metodologia: lavagem de cápsulas com água corrente e desinfestação com álcool 70% durante 1 minuto, solução comercial de hipoclorito a 0,6% com 5 gotas de Tween, para cada 100 mL da solução desinfestante por 15 minutos e 3 enxagues em água destilada e estéril. Após desinfestação, as cápsulas foram abertas e as sementes foram coletadas sob lupa. Em seguida, sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e esterilizado em autoclave com pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C, por 20 minutos. No cultivo foram utilizados frascos de tampa plástica transparente com capacidade de 190 ml contendo 30 ml de meio de cultura. Foram utilizados 10 frascos para inoculação.

Transcorridos 270 dias após a inoculação, as sementes começaram a germinar. Uma vez germinadas, foram transferidas para frascos de tampa plástica transparente com capacidade de 190 ml contendo 30 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 2g L<sup>-1</sup> de carvão ativo, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativo, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e esterilizado em autoclave com pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C, por 20 minutos. Entre 4-6 semanas foi selecionada, de cada frasco, a plântula que apresentou o maior desenvolvimento. As plântulas foram fracionadas em tamanho de 1,5-2 cm e inoculadas na posição deitada para multiplicação em

frasco com capacidade de 190 ml contendo 30 ml de meio MS completo, com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

Entre 4-6 semanas, ramos foram formados a partir da gema axilar presente em cada explante. Seis multiplicações foram realizadas, a fim de se obter mudas em quantidade suficiente para a montagem do experimento e para novos estudos. A temperatura da sala de crescimento permaneceu entre 23 a 26°C, com umidade relativa em torno de 50-60% e fotoperíodo de 12 horas, sob lâmpadas fluorescente tipo luz do dia e intensidade luminosa de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Não foi utilizado nenhum tipo de fitorregulador em nenhuma fase desde a germinação das sementes até o final das multiplicações. O material vegetal utilizado constituiu-se de duas cápsulas de *V. planifolia* de aproximadamente 20 cm, em início de maturação, coletadas em Muqui, Espírito Santo.

O experimento foi realizado em esquema de parcelas subdivididas, constituído pelas combinações entre os fatores recipiente (2 níveis: sacola e bandeja, nas parcelas), substrato (2 níveis: preparado I e preparado II, nas subparcelas) e tipo de muda (2 níveis: proliferação de gemas axilares e propagação de plântulas *in vitro*, nas subsubparcelas), num delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de oito plantas.

No fator recipiente foram testados sacola de polietileno preta, apresentando 15 cm de diâmetro e 30 cm de altura, com capacidade volumétrica de 2,8 L e com orifícios de 5 mm de diâmetro, distribuídos regularmente no fundo e até a 1/3 da altura, visando o arejamento e a drenagem do excesso de umidade, e bandeja com 32 células, de polipropileno rígido, apresentando 7,0 cm de diâmetro de boca, 16 cm de altura, capacidade volumétrica de 0,28 L e um orifício de 1 cm de diâmetro, no fundo, para o arejamento e a drenagem do excesso de umidade.

Para o fator substrato foram testados o substrato preparado I, constituído de uma mistura de substrato comercial Vivatto Slin Pro-20<sup>®</sup>, musgo e pó de xaxim, na proporção de 3:0,5:0,5 (v/v), e substrato preparado II, feito da mistura de solo, areia fina lavada, esterco de galinha e serrapilheira de mata, na proporção de 1:1:1:1 (v/v). As análises químicas desses substratos apresentaram os seguintes resultados:

substrato preparado I (8,7 dag dm<sup>-3</sup> de matéria orgânica, pH 6,0, 349,3 mg dm<sup>-3</sup> de P, 560 mg dm<sup>-3</sup> de K, 9,0 cmol dm<sup>-3</sup> de Ca, 4,5 cmol dm<sup>-3</sup> de Mg, 54 mg dm<sup>-3</sup> de S, 0,86 mg dm<sup>-3</sup> de B, 19,3 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, 38,4 mg dm<sup>-3</sup> de Mn, 3,5 mg dm<sup>-3</sup> de Cu e 113 mg dm<sup>-3</sup> de Fe) e substrato preparado II (4,1 dag dm<sup>-3</sup> de matéria orgânica, pH 5,90, 132,6 mg dm<sup>-3</sup> de P, 810 mg dm<sup>-3</sup> de K, 3,5 cmol dm<sup>-3</sup> de Ca, 1,7 cmol dm<sup>-3</sup> de Mg, 53 mg dm<sup>-3</sup> de S, 0,39 mg dm<sup>-3</sup> de B, 11,7 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, 44,1 mg dm<sup>-3</sup> de Mn, 4,3 mg dm<sup>-3</sup> de Cu e 23 mg dm<sup>-3</sup> de Fe). Dois níveis foram utilizados para tipo de muda de *V. planifolia*: mudas produzidas a partir de proliferação de gemas axilares de planta adulta e mudas produzidas por meio de multiplicação de plântulas *in vitro*.

As variáveis morfológicas avaliadas, aos 90 dias após o plantio, foram comprimento total médio da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento médio da maior raiz (CMR), massa da matéria fresca do caule (MFC), massa da matéria fresca da raiz (MFR), massa da matéria fresca da folha (MFF), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca do caule (MSC), massa da matéria seca da raiz (MSR), massa da matéria seca da folha (MSF) e massa da matéria seca total da planta (MSTP) e relação parte aérea/raiz (RPAR). Utilizou-se régua milimetrada para medição do comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz. Para determinação da massa da matéria fresca do caule, da raiz e da folha foi utilizada balança analítica. A massa da matéria seca do caule, da raiz e da folha foi obtida após secagem individual em saco de papel colocado em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, até atingir massa constante.

Os dados referentes às variáveis analisadas foram submetidos à análise de variância. Quando significativos foi utilizado o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002).

### 3.3 RESULTADOS E DICUSSÃO

Os resultados obtidos na análise de variância para as características avaliadas ao final de 90 dias após o plantio das mudas são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Resumo das análises de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), massa da matéria fresca do caule (MFC), massa da matéria fresca da raiz (MFR), massa da matéria fresca da folha (MFF), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca do caule (MSC), massa da matéria seca da raiz (MSR), massa da matéria seca da folha (MSF), massa da matéria seca total da planta (MSTP) e relação parte aérea/raiz (RPAR), de mudas de *Vanilla planifolia*, provenientes de micropropagação de gema axilar e plântula, aos 90 dias após o plantio, em Cachoeiro de Itapemirim, ES, 2013

Fontes de variação	GL	Quadrado Médio			
		CPA (cm)	NF	NR	CMR (cm)
Recipiente (R)	1	7,54661*	3,11875 <sup>ns</sup>	0,37845 <sup>ns</sup>	11,64453**
Resíduo a	6	1,1968	2,61205	2,17549	0,59491
Substrato (S)	1	0,89111 <sup>ns</sup>	0,72903 <sup>ns</sup>	11,02151 <sup>ns</sup>	0,23917 <sup>ns</sup>
R x S	1	2,94031 <sup>ns</sup>	0,83528 <sup>ns</sup>	10,3968 <sup>ns</sup>	0,00185 <sup>ns</sup>
Resíduo b	6	1,28845	3,78834	2,28983	1,95167
Muda (M)	1	0,02645 <sup>ns</sup>	6,41715*	2,67961 <sup>ns</sup>	0,10391 <sup>ns</sup>
R x M	1	0,26645 <sup>ns</sup>	0,0034 <sup>ns</sup>	8,28245 <sup>ns</sup>	2,79277 <sup>ns</sup>
S x M	1	19,845**	0,0075 <sup>ns</sup>	4,48501 <sup>ns</sup>	1,7877 <sup>ns</sup>
R x S x M	1	2,95245 <sup>ns</sup>	0,10695 <sup>ns</sup>	10,44245 <sup>ns</sup>	0,43396 <sup>ns</sup>
Resíduo c	12	1,05285	1,31139	2,86692	1,18016
CV (%) R		15,52	28,01	34,76	35,78
CV (%) S		16,10	33,73	35,66	64,81
CV (%) M		14,56	19,85	39,90	50,40

Fontes de variação	GL	Quadrado Médio			
		MFC (g)	MFR (g)	MFF (g)	MFTP (g)
Recipiente (R)	1	0,04333 <sup>ns</sup>	0,00006 <sup>ns</sup>	0,29313 <sup>ns</sup>	0,55535 <sup>ns</sup>
Resíduo a	6	0,01127	0,00071	0,05494	0,11476
Substrato (S)	1	0,01937 <sup>ns</sup>	0,00005 <sup>ns</sup>	0,06164 <sup>ns</sup>	0,1376 <sup>ns</sup>
R x S	1	0,03233 <sup>ns</sup>	0,00008 <sup>ns</sup>	0,08011 <sup>ns</sup>	0,22234 <sup>ns</sup>
Resíduo b	6	0,00642	0,00141	0,05253	0,10289
Muda (M)	1	0,00017 <sup>ns</sup>	0,00003 <sup>ns</sup>	0,32114**	0,30961*
R x M	1	0,00052 <sup>ns</sup>	0,00537 <sup>ns</sup>	0,05545 <sup>ns</sup>	0,08568 <sup>ns</sup>
S x M	1	0,03123*	0,00776 <sup>ns</sup>	0,12806 <sup>ns</sup>	0,39139*
R x S x M	1	0,03984*	0,00195 <sup>ns</sup>	0,2567*	0,57256*
Resíduo c	12	0,00601	0,00113	0,02919	0,0639
CV (%) R		27,76	37,73	55,55	38,60
CV (%) S		20,95	53,09	54,31	36,55
CV (%) M		20,28	47,39	40,49	28,81

Fontes de variação	GL	Quadrado Médio				
		MSC (g)	MSR (g)	MSF (g)	MSTP (g)	RPAR
Recipiente (R)	1	0,0001 <sup>ns</sup>	0,00096 <sup>ns</sup>	0,00117*	0,00249*	0,1301 <sup>ns</sup>
Resíduo a	6	0,00004	0,00075	0,00012	0,00034	3,1552
Substrato (S)	1	0,00003 <sup>ns</sup>	0,00115 <sup>ns</sup>	0,00005 <sup>ns</sup>	0,00001 <sup>ns</sup>	19,8135 <sup>ns</sup>
R x S	1	0,00029*	0,00109 <sup>ns</sup>	0,00026 <sup>ns</sup>	0,00169*	0,0378 <sup>ns</sup>
Resíduo b	6	0,00003	0,00079	0,00015	0,00026	9,4298
Muda (M)	1	0,00000 <sup>ns</sup>	0,00058 <sup>ns</sup>	0,00072*	0,00067 <sup>ns</sup>	0,3121 <sup>ns</sup>
R x M	1	0,00000 <sup>ns</sup>	0,00029 <sup>ns</sup>	0,00013 <sup>ns</sup>	0,00015 <sup>ns</sup>	5,2813 <sup>ns</sup>
S x M	1	0,00023**	0,00186 <sup>ns</sup>	0,00038 <sup>ns</sup>	0,00274**	3,934 <sup>ns</sup>
R x S x M	1	0,00016*	0,0003 <sup>ns</sup>	0,0008*	0,00188*	12,8271 <sup>ns</sup>
Resíduo c	12	0,00002	0,00073	0,0001	0,00024	4,4788
CV (%) R		26,00	174,37	46,78	30,27	35,01
CV (%) S		22,16	180,04	51,77	26,76	60,52
CV (%) M		17,31	172,74	42,06	25,67	41,71

<sup>ns</sup> não significativo a 5% pelo teste F; \* Significativo pelo teste F ( $p < 0,05$ ); \*\* Significativo pelo teste F ( $p < 0,01$ ); e GL = Grau de liberdade.

Não houve diferença significativa para as médias do número de raiz (NR), massa da matéria fresca da raiz (MFR), massa da matéria seca da raiz (MSR) e relação parte aérea/raiz (RPAR), para nenhum dos fatores ou interação entre os fatores estudados. Entretanto, Lone et al. (2008) constataram que para a variável número de raízes, os substratos fibra de coco e casca de pinus + fibra de coco foram superiores ao esfagno e à casca de arroz carbonizada, não diferindo dos substratos xaxim e casca de pinus. Assis et al (2011), ao cultivarem orquídea em substratos à base de casca de café verificaram que não houve diferença entre a casca de café e as suas misturas com relação à massa seca de raízes. Sorace et al. (2013), ao avaliarem o crescimento de *Cattleya* (Orchidaceae) em diferentes tipos de recipientes, observaram que as mudas aclimatizadas em bandeja de plástico com 120 células apresentaram maior número de raízes quando comparado com bandeja de plástico transparente com tampa.

Para a variável comprimento da parte aérea (CPA), houve interação significativa entre substrato (S) e tipo de muda (M), ao nível de 1%, em que mudas provenientes de micropropagação de gema axilar desenvolveram melhor no substrato I e mudas de micropropagação de plântula apresentaram melhor desempenho no substrato II (Tabela 4).

Tabela 4 – Comprimento da parte aérea (CPA) de mudas de *Vanilla planifolia*, em função do substrato (S) e do tipo de muda (M), em Cachoeiro de Itapemirim, ES, 2013

Substrato	CPA (cm)	
	Muda	
	Gema Axilar	Plântula
Substrato I	7,975 aA	6,4575 bB
Substrato II	6,0663 bB	7,6988 aA

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, em nível de 1% de probabilidade. [Substrato I: mistura de substrato comercial Vivatto Slin Pro-20<sup>®</sup>, musgo e pó de xaxim, na proporção de 3:0,5:0,5 (v/v); e Substrato II, feito da mistura de solo, areia fina lavada, esterco de galinha e serrapilheira de mata, na proporção de 1:1:1:1 (v/v)].

Assis et al. (2005), ao avaliarem a eficiência dos substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile*, verificaram que nenhum dos substratos diferiram

estatisticamente do xaxim em relação à altura de planta. Da mesma forma, o trabalho desenvolvido por Colombo et al. (2005), mostrou não haver diferença significativa entre xaxim e os demais substratos compostos por pó de coco, fibra de coco e esfagno na aclimação de híbridos de *Cattleya sp.* Souza e Jasmim (2004) concluíram que a mistura de mesocarpo de coco triturado e substrato comercial proporcionou maior desenvolvimento em altura, número de folhas e área foliar, ao avaliarem o crescimento de singônio em diferentes substratos.

Mudas provenientes de micropropagação de gema axilar apresentaram maior número de folhas (NF), do que mudas oriundas de plântula (Tabela 5).

Tabela 5 – Número de folhas (NF) de mudas de *Vanilla planifolia*, em função do tipo de muda (M), em Cachoeiro de Itapemirim, ES, 2013

Muda	Variável analisada
	NF
Gema Axilar	6,2181 a
Plântula	5,3225 b

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Para a variável comprimento da maior raiz (CMR), houve diferença significativa para tipo de recipiente (Tabela 6). Isso é explicado pelo maior volume de substrato presente em sacola em comparação com o volume de substrato presente na célula da bandeja.

Tabela 6 – Comprimento da maior raiz (CMR) de mudas de *Vanilla planifolia*, em função do recipiente (R), em Cachoeiro de Itapemirim, ES, 2013

Recipiente	Variável analisada
	CMR (cm)
Sacola	2,7587 a
Bandeja	1,5522 b

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

As dimensões do recipiente trazem implicações de ordem técnica e econômica, sendo ótimas as que harmonizam o custo de produção e a possibilidade de obter maior número de mudas de qualidade. Observa-se, na literatura, que mudas de espécies perenes cultivadas em recipientes de maior dimensão possuem maior qualidade (PEREIRA et al., 2010). Esses autores, ao estudarem o efeito de substratos e tamanho de recipiente no desenvolvimento de mudas de tamarindeiro, constataram que o substrato composto com esterco de gado, o composto com cama de frango e o composto com húmus de minhoca proporcionaram mudas de melhor qualidade em relação ao substrato composto Plantmax<sup>®</sup>, e que o recipiente de maior tamanho (18 x 30 cm) proporcionou maior produção de matéria seca do sistema radicular.

Silva et al. (2010), trabalhando com diferentes substratos e recipientes na produção de mudas, verificaram que o maior comprimento de raiz de maracujazeiro amarelo ocorreu na combinação substrato comercial e recipiente de maior volume. Os autores acreditam que isso se deva a uma maior estabilidade física do substrato. Santos et al. (2012), também trabalhando com o desenvolvimento inicial de mudas de maracujazeiro, verificaram que o desenvolvimento vegetativo, avaliado por meio do comprimento das brotações e número de folhas, foi maior em saco de polietileno em comparação com tubete.

O crescimento em recipiente de maior volume geralmente é mais expressivo (GOMES et al., 2003). Entretanto, Cunha et al. (2005) recomendam o uso de recipientes de maiores volumes somente para espécies que apresentam desenvolvimento lento, necessitando permanecer no viveiro por um longo tempo, ou quando se deseja mudas bem desenvolvidas. Carvalho Filho et al. (2003) indicam para produção de mudas de jatobá, uma mistura de substrato contendo solo, areia e esterco (1:2:1) em sacos de polietileno (15 x 20 cm) e a pleno sol.

Ocorreu interação tripla significativa para massa da matéria fresca do caule (MFC), massa da matéria fresca da folha (MFF), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca do caule (MSC), massa da matéria seca da folha (MSF) e massa da matéria seca total da planta (MSTP), conforme tabela 5.

Para a interação sacola, substrato I e tipo de muda não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis. Na interação sacola, substrato II e tipo de muda ocorreu diferença significativa para massa da matéria fresca da folha (MFF), massa da matéria fresca total da planta (MFTP) e massa da matéria seca da folha (MSF).

Na interação bandeja, substrato I e tipo de muda houve diferença significativa para todas as variáveis, com maiores valores médios para mudas provenientes de proliferação de gema axilar. Já para a interação bandeja, substrato II e tipo de muda ocorreu diferença significativa para massa da matéria fresca do caule (MFC), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca do caule (MSC) e massa da matéria seca total da planta (MSTP), em que mudas provenientes de micropropagação de plântula apresentaram maiores valores médios.

Tabela 7 – Massa da matéria fresca do caule (MFC), massa da matéria fresca da folha (MFF), massa da matéria fresca total da planta (MFTP), massa da matéria seca do caule (MSC), massa da matéria seca da folha (MSF) e massa da matéria seca total da planta (MSTP), de mudas de *Vanilla planifolia*, em função do recipiente (R), do substrato (S) e tipo de muda (M), em Cachoeiro de Itapemirim, ES, 2013

R x S	M					
	MFC (g)		MFF (g)		MFTP (g)	
	Gema Axilar	Plântula	Gema Axilar	Plântula	Gema Axilar	Plântula
Sacola x Substrato I	0,4017 A	0,4224 A	0,627 A	0,396 A	1,1184 A	0,8646 A
Sacola x Substrato II	0,4241 A	0,4287 A	0,6919 A	0,3557 B	1,2003 A	0,8538 B
Bandeja x Substrato I	0,4703 A	0,3337 B	0,6316 A	0,2088 B	1,1857 A	0,6038 B
Bandeja x Substrato II	0,2245 B	0,354 A	0,1381 A	0,3266 A	0,3991 B	0,7946 A
R x S	MSC (g)		MSF (g)		MSTP (g)	
	Gema Axilar	Plântula	Gema Axilar	Plântula	Gema Axilar	Plântula
	Sacola x Substrato I	0,0242 A	0,0244 A	0,0335 A	0,023 A	0,0700 A
Sacola x Substrato II	0,0274 A	0,0295 A	0,0398 A	0,0232 B	0,0823 A	0,0721 A
Bandeja x Substrato I	0,0315 A	0,0219 B	0,033 A	0,0106 B	0,0779 A	0,0392 B
Bandeja x Substrato II	0,0138 B	0,0239 A	0,008 A	0,0194 A	0,0306 B	0,0595 A

Médias seguidas de mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Muitos são os substratos utilizados na produção e, ou aclimatização de mudas de orquídeas. O pó de xaxim feito com samambaiçu (*Dicksonia sellowiana* Hook) atende a todos os requisitos físicos e químicos de um bom substrato para a produção de mudas. Entretanto, seu uso está proibido desde o ano de 2001, por meio da resolução N<sup>o</sup>. 278, do CONAMA (SANTOS; TEIXEIRA, 2010). Diante desse

contexto muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de se buscar alternativas aos substratos comerciais e ao pó de xaxim.

Casca do fruto da mamoneira e fibra de coco foram usadas como substrato na aclimatização de mudas micropropagadas de bromélia (COUTO; JASMIM; CARVALHO, 2012). Casca de café foi utilizada com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de orquídea híbrida (*C. forbesii* x *C. labiata*) x *C. labiata* (ASSIS et al., 2011). Diferentes substratos, tais como: fibra de coco, carvão vegetal e casca de pinus foram utilizados para avaliar o desenvolvimento de clones de *BLC Nan Chang Silk 'Olimpic Torch'*, obtidos do cruzamento entre *BLC. Bryce Canyon* x *BLC. Pamela Hetherington*, em que todos foram eficientes para o cultivo de *BLC Nan Chang Silk 'Olimpic Torch'* (DRONK et al., 2012).

O substrato preparado II proporcionou os melhores resultados para a maioria das variáveis morfológicas avaliadas, tornando-se dessa forma uma alternativa ao uso de outros substratos.

### 3.4 CONCLUSÕES

- A combinação de recipiente tipo sacola de polietileno (30 x 15 cm), substrato II (solo, areia, esterco de galinha e serrapilheira de mata) e muda micropropagada de gema axilar pode ser utilizada na produção de mudas de *Vanilla planifolia*.
- O substrato II, composto de elementos naturais, pode ser utilizado como alternativa ao uso de outros substratos.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, A. M.; FARIA, R. T.; COLOMBO, L. A.; CARVALHO, J. F. R. P. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 27, n. 2, p. 255-260. 2005.

ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; YAMAMOTO, L. Y.; LONE, A. B.; SOUZA, G. R. B.; FARIA, R. T.; ROBERTO, S. R.; TAKAHASHI, L. S. A. Cultivo de orquídea em substratos à base de casca de café. **Bragantia**, v. 70, n. 3, p. 544-549. 2011.

CALVETE, E. O. Sistemas de produção de mudas de hortaliças. In: BARBOSA, J. G.; MARTINEZ, H. E. P.; PEDROSA, M. W.; SEDIYAMA, M. A. (Eds.). **Nutrição e adubação de plantas cultivadas em substrato**. Viçosa: UFV, 2004. 435p.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimatização de plantas: abordagens recentes**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1996. 12p. (ABCTP Notícias, n. 25).

CARVALHO FILHO, J. L.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; RANGEL, M. S. A. Produção de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos. **Cerne**, v. 9, n. 1, p.109-118.2003.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205. 2010.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSCECA, I. C. B. Aclimação de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, n.1, p.145-150. 2005.

COUTO, T. R.; JASMIM, J. M.; CARVALHO, V. S. Resíduos da agroindústria como substrato na aclimatização de mudas micropropagadas de bromélia. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 2, p. 242-246. 2012.

CUNHA, A. E.; ANDRADE, L. A. A.; BRUNO, R. L. A.; SILVA, J. A. L.; SOUZA, V. C. Efeitos de substratos e das dimensões dos recipientes na qualidade das mudas de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex D.C.) Standl. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p.507-516, 2005.

DEB, C. R.; IMCHEN, T. An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 79-83. 2010.

DRONK, A. G.; SILVA, A. P. V.; CUQUEL, F. L.; FARIA, R. T. Desenvolvimento vegetativo de híbrido de orquídea em diferentes substratos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2109-2114. 2012.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; De KLERK, J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer. 2008. 501p.

GOMES, J. M.; COUTO, L.; LEITE, H. G.; XAVIER, A.; GARCIA, S. L. R. Crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* em diferentes tamanhos de tubetes e fertilização N-P-K. **Revista Árvore**, v. 27, n. 2, p. 113-127. 2003.

GOMES, J. M.; SILVA, A. R. Os substratos e sua influência na qualidade das mudas. In: BARBOSA, J. G.; MARTINEZ, H. E. P.; PEDROSA, M. W.; SEDIYAMA, M. A. N. (Eds.). **Nutrição e adubação de plantas cultivadas em substrato**. Viçosa: UFV, 2004. p.190-225.

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

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120. 2006.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de Eucalyptus: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Piracicaba: IPEF, 2000. (Circular Técnica, n. 192).

KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; MURUGALATHA, N. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. - a tropical orchid. **Current Science**, v. 91, n. 10, p. 1401-1403. 2006.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 245p.

KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1312-1314. 1992.

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

MINAMI, K. **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura**. São Paulo: Queiroz, 1995. 136p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497. 1962.

PARVIAINEN, J. V. Initial development of root systems of various types of nursery stock for scots pine. **Folia Forestalia**, v. 268, p. 2-21, 1976.

PEREIRA, P. C.; MELO, B.; FREITAS, R. S.; TOMAZ, M. A.; TEIXEIRA, I. R. Tamanho de recipientes e tipos de substrato na qualidade de mudas de tamarindeiro. **Revista Verde**, v. 5, n.3, p. 136-142. 2010.

RADOCHOVÁ, B.; TICHÁ, I. Leaf anatomy during leaf development of photoautotrophically *in vitro*-grown tobacco plants as affected by growth irradiance. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 1, p. 21-27. 2009.

SANTOS, J. L.; MATSUMOTO, S. N.; D'AREDE, L. O.; LUZ, I. S.; VIANA, A. E. S. Propagação vegetativa de estacas de *Passiflora cincinnata* MAST em diferentes recipientes e substratos comerciais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 581-588. 2012.

SANTOS, M. N.; TEIXEIRA, M. L. F. Semente de amendoeira (*Terminalia catappa* L.) (*Combretaceae*) como substrato para o cultivo de orquídeas epífitas. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 339-343. 2010.

SCHMITZ, J. A. K.; SOUZA, P. V. D.; KÄMPF, A. N. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 932-934. 2002.

SILVA, E. A.; MARUYAMA, W. I.; MENDONÇA, V.; FRANCISCO, M. G. S.; BARDIVIESSO, D. M.; TOSTA, M. S. Composição de substratos e tamanho de recipientes na produção e qualidade das mudas de maracujazeiro 'amarelo'. **Ciência Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 588-595. 2010.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71-78. 2002.

SILVA, M. D. D. **Enraizamento de estacas da baunilheira (*Vanilla planifolia* ANDREWS)**: ácido indolbutírico, recipientes, meio de enraizamento, tamanho e tipo de estaca. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B.; PADOVANNI, N.; ECKER, A. E. A. Acclimatization of *Cattleya* (orchidaceae) in plastic, styrofoam and ceramic containers. **Varia Scientia Agrárias**, v. 3, n. 2, p. 95-103. 2013.

SOUZA, N. A.; JASMIM, J. Crescimento de singônio com diferentes tutores e substratos à base de mesocarpo de coco. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.1, p. 39-44. 2004.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Com base nos estudos realizados foi observado que a sacarose influencia todas as variáveis morfológicas e parâmetros fisiológicos estudados em relação ao crescimento *in vitro* de mudas micropropagadas de baunilheira. Observa-se, ainda, que as concentrações de sacarose utilizadas são suficientes para os estudos dos aspectos morfofisiológicos analisados e que as concentrações estimadas de 28,88 a 53,57 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura proporcionam as maiores médias para comprimento da parte aérea, número de folhas, número de raízes, massa da matéria fresca total e massa da matéria seca total das mudas de *Vanilla planifolia*. Tal estudo pode contribuir para a produção de mudas em larga escala, visto que no Brasil não há disponibilidade de mudas de *Vanilla planifolia* e a importação é onerosa e burocrática.
- A concentração de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura é prejudicial ao crescimento de mudas de baunilha e a sua ausência no meio induz a planta a ter comportamento autotrófico.
- A menor taxa de perda de água ocorre na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose. As mudas podem ter melhor adaptação quando forem cultivadas sob condição *ex vitro*.
- O pH não é um fator limitante direto para o crescimento das mudas visto que os melhores resultados dos aspectos morfofisiológicos também ocorreram em pH ácido.
- Os dados relativos aos aspectos morfológicos e fisiológicos de mudas de *Vanilla planifolia* provenientes de micropropagação sugerem a viabilidade técnica para a propagação de mudas em larga escala.
- A combinação de recipiente tipo sacola de polietileno (30 x 15 cm), substrato II (solo, areia, esterco de galinha e serrapilheira de mata) e muda micropropagada de gema axilar pode ser utilizada na produção de mudas de *Vanilla planifolia*.
- O substrato II, composto de elementos naturais, pode ser utilizado como alternativa ao uso de outros substratos.

- Em vista da escassez de estudos comparativos entre mudas provenientes de gemas axilares e propagação seminífera *in vitro* de *Vanilla planifolia*, torna-se necessária a realização de novos estudos que busquem avaliar comparativamente o desenvolvimento das mudas em campo bem como suas produtividades. Ressalta-se que nesses estudos deve-se levar em conta a metodologia de produção das mudas, a idade das gemas axilares utilizadas e a qualidade das cápsulas.