

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**



**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE
EPIDENDROIDEAE (ORCHIDACEAE) DO ESTADO DE
SERGIPE**

THAYS SAYNARA ALVES MENEZES

2014



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**



THAYS SAYNARA ALVES MENEZES

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE EPIDENDROIDEAE
(ORCHIDACEAE) DO ESTADO DE SERGIPE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora
Profa. Dra. Maria de Fátima Arrigoni-Blank

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2014

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M543c Menezes, Thays Saynara Alves
Conservação *in vitro* e Aclimatização de epidendroideae
(Orchidaceae) do Estado de Sergipe / Thays Saynara Alves
Menezes ; orientadora Maria de Fátima Arrigoni-Blank. – São
Cristóvão, 2014.
43 f. : il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) –
Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Agrobiodiversidade. 2. Orquídea - Cultivo. 3. Orquídea -
Aclimatização. 4. Sorbitol. 5. Melhoramento genético vegetal. 6.
Manitol. 7. Sergipe, SE. I. Arrigoni-Blank, Maria de Fátima,
orient. II. Título

CDU: 635.92:582.594(813.7)

THAYS SAYNARA ALVES MENEZES

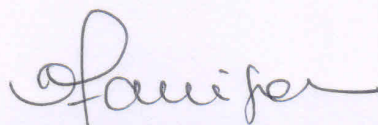
**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO EPIDENDROIDEAE
(ORCHIDACEAE) DO ESTADO DE SERGIPE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 31 de Julho de 2014.

Profa. Dra. Ana Catarina Lima de Oliveira
IFS

Profa. Dra. Maria Aparecida Moreira
UFS



Profa. Dra. Maria de Fátima Arrigoni-Blank
UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*Aos meus pais, Jailton e Silvana, pelo apoio e
incentivo à minha formação. Ao meu irmão,
Thyeres, pela força, confiança e carinho a
mim dedicados.*
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo que ele me proporcionou a cada dia, pela capacidade de resolver todos os problemas e de transformar as dificuldades em lições de vida.

Aos meus pais Jailton e Silvana, por todo incentivo, dedicação e amor, nos quais busquei forças para que nunca desistisse dos meus ideais, agradeço, sem sequer encontrar palavras que expressem completamente o meu profundo sentimento de gratidão.

Ao meu irmão Thyeres, pelo carinho e amizade, que sempre me apoia, me incentiva e me faz ver que tudo é possível com seu otimismo.

Ao meu namorado Alexandre, que em todo esse período, esteve ao meu lado, com paciência, me incentivando e me fortalecendo. Agradeço por me estimular a tornar mais esse sonho realidade.

À Professora Dr^a. Maria de Fátima Arrigoni-Blank, minha orientadora, meu agradecimento todo especial, por seu apoio, carinho, incentivo, amizade, paciência e oportunidade desde a iniciação científica que foi essencial na formação do meu conhecimento ao longo desses anos.

Ao Professor Dr. Arie Fitzgerald Blank, meu apreço, pela contribuição com seu conhecimento. Meu muito obrigada.

Aos meus queridos amigos e companheiros do Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal pelo apoio e pelas muitas risadas que me faziam esquecer todas as minhas angústias, Ítala, Clézia, Raquel, Magna, Andrea, Elton. Em especial Fran, Mariana, Rosana, Jefferson, Matheus e Ana Catarina pelas longas tardes de conversa e por estarem sempre dispostas a me ajudar. Foi um prazer conviver com vocês todos os dias desde a graduação até hoje.

À minha prima Íris pela amizade, carinho e apoio que de perto ou de longe sempre sabemos que podemos contar.

Às queridas amigas, Sandra e Gleiciene, pela amizade e pelo apoio.

A minha tia Tarciane (*in memoria*) pela amizade, companheirismo, apoio, conversas e risadas, e por esta comigo nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Sergipe por possibilitar o desenvolvimento do trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida, possibilitando assim o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, a minha eterna gratidão a vocês.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1. Orchidaceae.....	2
2.2. Subfamília Epidendroideae.....	2
2.2.1. <i>Catasetum macrocarpum</i> Rich. ex Kunth.....	3
2.2.2. <i>Oeceoclades maculata</i> Lindl.....	3
2.2.3. <i>Polystachya estrellensis</i> Rchb.f.....	3
2.3. Conservação de Recursos Genéticos.....	4
2.4. Conservação <i>in vitro</i>	4
2.5. Aclimatização.....	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1. Material Botânico.....	8
3.2. Local e condições dos experimentos.....	8
3.3. Estabelecimento <i>in vitro</i>	8
3.4. Conservação <i>in vitro</i>	8
3.4.1. Redução de sais e temperatura de cultivo.....	9
3.4.2. Reguladores osmóticos e temperatura de cultivo.....	9
3.5. Aclimatização das plântulas.....	9
3.6. Variáveis analisadas.....	9
3.7. Análises estatísticas.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4.1 Conservação <i>in vitro</i>	11
4.1.1 Redução de Sais do meio MS e temperatura de cultivo.....	11
4.1.2. Reguladores Osmóticos e temperatura de cultivo.....	19
4.2. Aclimatização de plântulas.....	24
5. CONCLUSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Sobrevivência de plântulas (%) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	11
2 Coloração das folhas (notas 1 a 5*) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	13
3 Presença de raiz de plântulas (%) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	14
4 Altura de plântulas (notas 1 a 4*) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	15
5 Sobrevivência de plântulas (%) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	16
6 Coloração das folhas (notas 1 a 5*) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	17
7 Presença de raiz de plântulas (%) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	18
8 Altura de plântulas (notas 1 a 4*) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	19
9 Sobrevivência de plântulas (%) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	20
10 Coloração das folhas (notas 1 a 5*) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	21
11 Presença de raiz de plântulas (%) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	21
12 Altura (notas 1 a 4*) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	22

13	Sobrevivência de plântulas (%) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	22
14	Coloração das folhas (notas 1 a 5*) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	23
15	Presença de raiz de plântulas (%) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	23
16	Altura das plântulas (notas 1 a 4*) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.....	24
17	Sobrevivência (%), Altura (cm), número de folhas, número de raiz de <i>Catasetum macrocarpum</i> Rich. ex Kunth. e <i>Oeceoclades maculata</i> Lindl. em função de diferentes misturas de substratos aos 180 dias de cultivo. São Cristóvão, UFS, 2014.....	26
18	Comprimento de raiz (cm), comprimento de folha (cm), massa seca de parte aérea (mg), massa seca de raiz (mg) de <i>Catasetum macrocarpum</i> Rich. ex Kunth. e <i>Oeceoclades maculata</i> Lindl. em função de diferentes misturas de substratos. São Cristóvão, UFS, 2014.....	28
19	Clorofila A, clorofila B e total de clorofila de <i>Catasetum macrocarpum</i> Rich. ex Kunth. e <i>Oeceoclades maculata</i> Lindl. em função de diferentes misturas de substratos. São Cristóvão, UFS, 2014.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

MS- Meio de cultura estabelecido por Murashige e Skoog (1962)

DIC- Delineamento Inteiramente Casualizado

RESUMO

MENEZES, Thays Saynara Alves. **Conservação *in vitro* e aclimatização de Epidendroideae (Orchidaceae) do Estado de Sergipe**. São Cristóvão: UFS, 2014. 49p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

As orquídeas são consideradas as mais antigas entre as espécies ornamentais, sendo plantas herbáceas e perenes e de alto valor comercial. Diante disso objetivou-se com o presente trabalho desenvolver protocolos de conservação *in vitro* sob crescimento lento e aclimatização de espécies da subfamília Epidendroideae (Orchidaceae) do Estado de Sergipe. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agrônômica (DEA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Foram realizados dois experimentos de conservação, ambos em delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro em esquema fatorial 4x3x2, testando quatro concentrações de sais do meio MS (100%, 75%, 50%, 25% dos sais), três espécies (*Catasetum macrocarpum*, *Oeceoclades maculata* e *Polystachya estrellensis*) e duas temperaturas (18 e 25°C), e o segundo em fatorial 3x3x2, testando três combinações de fontes de carbono e reguladores osmóticos (20 g.L⁻¹ de sacarose; 10 g.L⁻¹ de sacarose + 5 g.L⁻¹ de manitol; 10 g.L⁻¹ de sacarose + 5 g.L⁻¹ de sorbitol), três espécies (*C. macrocarpum*, *O. maculata* e *P. estrellensis*) e duas temperaturas (18 e 25°C). Para a aclimatização o experimento também foi implantado em delineamento inteiramente casualizado, testando oito misturas de substratos [areia e húmus de minhoca (4:1); areia, pó de coco e húmus de minhoca (2:2:1); areia, casca de pinus triturada e húmus de minhoca (2:2:1); areia, casca de pinus triturada, pó de coco e húmus de minhoca (2:1:1:1); areia; areia e pó de coco (1:1); areia e casca de pinus triturada (1:1); areia, casca de pinus triturada e pó de coco (2:1:1)] e duas espécies (*C. macrocarpum* e *O. maculata*). Para conservação *in vitro* de *C. macrocarpum*, *O. maculata* e *P. estrellensis* por um período de 450 dias, deve-se utilizar meio de cultura contendo 25% dos sais MS à temperatura de 25°C ou 20 g.L⁻¹ de sacarose à 25°C. A aclimatização de plântulas de *C. macrocarpum* pode ser realizada utilizando areia : casca de pinus triturada : húmus de minhoca (2:2:1) como substrato e para *O. maculata* recomenda-se somente a utilização de areia.

Palavra-chave: Orquídeas, crescimento lento, sais MS, manitol, sorbitol, aclimatização.

*Comitê Orientador: Maria de Fátima Arrigoni-Blank – UFS (Orientadora), Ana Catarina Lima de Oliveira – IFS e Maria Aparecida Moreira – UFS.

ABSTRACT

MENEZES, Thays Saynara Alves. ***In vitro* conservation and acclimatization of Epidendroideae (Orchidaceae) of the Sergipe State.** São Cristóvão: UFS, 2014. 49p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Orchids are considered the oldest among the ornamental species, and are herbaceous and perennial plants of high commercial value. The objective of this work was to develop protocols for *in vitro* conservation using the slow growth technique, and acclimatization of species of the subfamily Epidendroideae (Orchidaceae) of Sergipe State. The experiments were conducted in the Laboratory of Tissue Culture and Plant Breeding, Department of Agronomic Engineering, Federal University of Sergipe. We conducted two conservation experiments, both in a completely randomized design, the first in a 4x3x2 factorial scheme, testing four concentrations of salts of MS medium (100%, 75%, 50%, 25% salts), three species (*Catasetum macrocarpum*, *Oeceoclades maculata* and *Polystachya estrellensis*) and two temperatures (18 and 25°C), and the second in a 3x3x2 factorial scheme, testing three combinations of carbon sources and osmotic regulators (20 g.L⁻¹ sucrose, 10 g.L⁻¹ sucrose + 5 g.L⁻¹ mannitol, 10 g.L⁻¹ sucrose + 5 g.L⁻¹ sorbitol), three species (*C. macrocarpum*, *O. maculata* and *P. estrellensis*) and two temperatures (18 and 25°C). For acclimatization, the experiment also was conducted in a completely randomized design, testing eight substrates [sand and earthworm castings (4:1); sand, coconut coir and earthworm castings (2:2:1); sand, crushed pine bark and earthworm castings (2:2:1); sand, crushed pine bark, coconut coir and earthworm castings (2:1:1:1); sand; sand and coconut coir (1:1); sand and crushed pine bark (1:1); sand, crushed pine bark and coconut coir (2:1:1)] and two species (*O. macrocarpum* and *C. maculata*). For *in vitro* conservation of *C. macrocarpum*, *O. maculata* and *P. estrellensis* for a period of 450 days, we should use culture medium containing 25% of MS salts at a temperature of 25°C or 20 g.L⁻¹ of sucrose at 25°C. Acclimatization of micropropagated seedlings of *C. macrocarpum* can be performed using sand, crushed pine bark and earthworm castings (2:2:1) as the substrate, and for *O. maculata* we recommend to use only sand.

Keywords: orchid, slow growing, MS salt, mannitol, sorbitol, acclimatization.

*Guidance Committee: Maria de Fátima Arrigoni-Blank – UFS (Supervisor), Ana Catarina Lima de Oliveira – IFS and Maria Aparecida Moreira – UFS.

1. INTRODUÇÃO

As orquídeas são consideradas as mais antigas entre as espécies ornamentais, abrangendo cerca de 7% do total das angiospermas. Estão entre as plantas mais exploradas comercialmente, apresentando além do potencial ornamental, características medicinais, alimentícias e para fins ornamentais.

A subfamília Epidendroideae compreende a mais ampla e diversificada de Orchidaceae, superior em número ao conjunto de espécies de todas as outras subfamílias juntas, sendo representada no Estado de Sergipe por 24 gêneros e 41 espécies (MONTEIRO et al., 2012).

O alto número de espécies e híbridos tropicais possibilita variadas formas, cores e flores, exploradas comercialmente em todo mundo. Com o grande desenvolvimento econômico, a exploração dos recursos naturais por parte do homem, vem sendo feita de forma exagerada, o que destrói o ecossistema e altera as condições climáticas. A utilização inadequada dos recursos biológicos são fatores que prejudica o meio ambiente e os ecossistemas existentes, por isso é crescente a preocupação em minimizar ou buscar soluções que reduzam os efeitos dos desmatamentos que ocorrem em todo mundo. Contudo, algumas espécies de orquídeas encontram-se ameaçadas de extinção, devido à devastação das matas ou por grande atividade extrativista, desempenhadas por colecionadores e comerciantes (COLOMBO et al., 2004), proporcionando uma perda acelerada do material genético de populações nativas e consequentemente da sua variabilidade genética.

A conservação de recursos genéticos pode ser *in situ* ou *ex situ*. Esta última que ocorre fora do local de origem pode se dar *in vivo* (em campo ou em casa de vegetação) ou *in vitro*, que envolve a manutenção de plantas em laboratório, permitindo estudos e experimentações variadas a cerca das espécies bem como maior facilidade de intercâmbio do material e constitui uma ferramenta biotecnológica importante já que é uma aliada em programas de melhoramento e conservação de muitas espécies vegetais. Dentre as técnicas de conservação *in vitro* está o método de crescimento lento que consiste em reduzir o metabolismo da planta, aumentando ao máximo os intervalos de subcultivos ou estendendo-o indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plantas.

A semeadura *in vitro* de orquídeas vem sendo praticada nas últimas décadas com intenção de promover maior aproveitamento das sementes, aumentando o percentual de germinação em comparação à germinação simbiótica que ocorre na natureza, no entanto, ainda são poucos os trabalhos voltados para conservação destas espécies e mesmo com resultados promissores não existe um protocolo que possa ser aplicado a todas as espécies, pois os resultados variam em função de fatores como tipo de explante, espécie e genótipo.

A adaptação das plantas procedentes do cultivo *in vitro* para o ambiente *ex vitro* é denominada aclimatização. Este processo é de extrema importância para o sucesso da cultura de tecidos vegetais. No processo de aclimatização, exige mais cuidado devido à mudança da condição em que as plantas estão inseridas, ou seja, condição *in vitro* para condição *ex vitro*.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver protocolos de conservação *in vitro* sob crescimento lento e aclimatização de espécies da subfamília Epidendroideae (Orchidaceae) do Estado de Sergipe.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Orchidaceae

A família Orchidaceae é a mais diversa dentre todas as famílias de angiospermas, sendo estimadas 35.000 espécies distribuídas em mais de 1.800 gêneros e mais de 100.000 híbridos (SHERLOCK, 2009), agrupada em cinco subfamília, dispersa por todo o mundo (MOREIRA et al., 2007) e com maior diversidade na região tropical (RECH et al., 2011), destacando-se como importante planta ornamental, de interesse econômico e botânico (SILVA, 2003b), inclusive de importância para indústria medicinal, cosmética e alimentícia (GALDIANO-JUNIOR, 2012).

No Brasil ocorrem cerca de 2.437 espécies distribuídas em 236 gêneros, com registro para o Nordeste de 639 espécies e 148 gêneros, e para Sergipe especificamente, 64 espécies e 36 gêneros (BARROS et al., 2014).

São bastante diversificadas quanto ao tamanho, forma e cor das flores, sendo cultivadas tanto para a produção de plantas de corte como de vaso, apresentando alto valor comercial em todo mundo (SOARES et al., 2011), sendo ainda consideradas o mais antigo grupo entre as ornamentais cultivadas (MOREIRA et al., 2007).

Tal família engloba ervas perenes, terrícolas, rupícolas, epífitas ou hemiepífitas, monopodiais ou simpodiais. As raízes são cilíndricas ou achatadas, delgadas ou espessadas e folhas alternas, articuladas ou não, crassas, membranáceas ou coriáceas. As flores são trímeras, zigomorfas, ressupinadas ou não, hermafroditas, unissexuada. Os frutos são cápsulas elipsoides ou globosas, deiscentes ou não e polispérmicas (MONTEIRO, 2013).

Em Sergipe a família ocorre em todas as formações vegetacionais, com predominância em áreas campestres. Os principais períodos de floração ocorre entre janeiro a março e setembro a dezembro (MONTEIRO et al., 2012).

2.2. Subfamília Epidendroideae

A subfamília Epidendroideae compreende a mais ampla e diversificada de Orchidaceae com aproximadamente 18.000 espécies distribuídas em 650 gêneros (KULAK et al., 2006).

Definida por exibir os grãos de pólen aglutinados em políneas distintas assim como em Orchidoideae e diferente de Cyrtipedioideae, Apostasioideae e Vanilloideae que não formam políneas, os membros de Epidendroideae, em sua grande maioria, epífitas, apresentam antera terminal incumbente e de duas a oito polínias rígidas, com consistência ceróide ou cartilaginosa (SINGER, 2004).

Conforme o APG III (Angiosperm Phylogeny Group - Grupo de Filogenia das Angiospermas), Epidendroideae são divididas em 16 tribos: Arethuseae, Calypsoae, Collabieae, Cymbidieae, Dendrobieae, Epidendreae, Gastrodieae, Malaxideae, Neottieae, Nervilieae, Podochileae, Sobralieae, Triphoreae, Tropicdieae, Vandae e Xerorchideae, distribuindo-se por todo o globo, com exceção apenas das regiões polares.

Com 63 espécies de orquídeas identificadas em Sergipe, 65 % pertencem à subfamília Epidendroideae, representada no Estado por oito subtribos e 24 gêneros de um total de 41 espécies (MONTEIRO et al., 2012).

2.2.1 *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth.

O gênero *Catasetum* possui cerca de 130 espécies e apresenta distribuição neotropical, sendo o Brasil o seu centro de diversidade, com registros de 100 espécies. A espécie *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth. é amplamente distribuída pelo Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil nos domínios da Amazônia e Mata Atlântica (BARROS et al., 2013).

A grande importância econômica dessa espécie está ligada à exuberância das suas flores. Em Sergipe foi encontrada em ambiente de restinga, na região leste do estado. É uma epífita pseudobulbosa, diferenciada por apresentar flores masculinas verde-amarela com máculas castanhas, sobretudo, nas pétalas, além de labelo bilobado com margem inteira e calosidade central entre os lobos, com florações em épocas diferentes. (MONTEIRO et al., 2012). É provavelmente uma das espécies mais comuns encontradas em cultivo doméstico, com uma fragrância que lembra muito o cheiro de canela.

2.2.2 *Oeceoclades maculata* Lindl.

O gênero *Oeceoclades* possui cerca de 31 espécies, amplamente distribuída pela América do Sul, Central, sul da América do Norte e África, sendo que no Brasil há ocorrência apenas da *Oeceoclades maculata*. A espécie *Oeceoclades maculata* é uma orquídea encontrada em todos os estados brasileiros, com exceção do Amapá (BARROS et al., 2014).

Caracteriza-se como uma das orquídeas mais importantes na diagnose de fragmentos florestais por representar espécie invasora. É uma espécie terrestre, mais amplamente distribuída em Sergipe, ocorrendo no interior ou na borda de matas úmidas. Apresenta raízes curtas e pouco tuberculizadas, pseudobulbos de cinco a sete centímetros de altura, possuindo uma única folha paralelinérvea, longa e herbácea, de cor verde totalmente maculada de verde-escuro. Distingue-se pelas folhas coriáceas podendo atingir 22-32cm (MONTEIRO et al., 2012) e haste floral de 20-35cm de altura, com pétalas e sépalas branco-esverdeadas. O labelo apresenta bordas de cor branca e frutos tipo cápsulas tricarpelares, uniloculares de formato elíptico (MENINI-NETO et al., 2004).

2.2.3 *Polystachya estrellensis* Rchb.f.

O gênero *Polystachya* possui mais de 300 espécies catalogadas, com registro de 10 espécies encontradas no Brasil (BARROS et al., 2014). A espécie *Polystachya estrellensis* é endêmica do Brasil com distribuição ampla ocorrendo em quase todos os estados. Em Sergipe ocorre em áreas de Mata Atlântica, Caatinga e também em áreas de brejo (NUNES, 2013; MONTEIRO et al., 2012). É uma epífita pseudobulbosa de pequeno a médio porte, seus pseudobulbos lembram um cone estendido e emergem agrupados em uma fila de um rizoma fino. O sistema radicular é robusto e aderente, composto por inúmeras raízes brancas que emergem da base do caule. As folhas são ligeiramente encorreadas, profundas quilhadas, verde-escuras e linearmente lancioladas. As flores são suspensas em um cone apical ou às vezes em forma paniculada com sub-inflorescências menores, apresentando poucas flores e emergindo de nódulos na parte superior do caule, com coloração verde-amarelado. Sua reprodução apresenta pequenas cápsulas, dispersando infinidade de sementes férteis (MILLER, 2006).

2.3 Conservação de Recursos Genéticos

Devido à intensa atividade extrativista de espécies nativas, tornou-se importante a aplicação de tecnologias para as práticas de conservação. Por isso, as coleções de germoplasma passaram a ter papel fundamental para conservação de espécies ameaçadas de extinção (PESSOTTI, 2009).

Desta forma, as técnicas de conservação *in vitro* constituem-se em procedimentos para a conservação de recursos genéticos vegetais (HARDING et al., 1997). A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo em laboratório, a partir da técnica de cultura de tecidos.

Dessa maneira, a conservação *in vitro* pode ser feita a partir de mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir o crescimento de células, tecidos e órgãos. Com objetivo de diminuir o crescimento é aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, ou estendê-los indefinidamente, reduzindo assim o espaço necessário para a sua conservação, além de proporcionar acesso imediato a toda coleção (MARCO-MEDINA e CASAS, 2012).

A utilização dos métodos de conservação *in vitro* é chamativa tanto por motivos econômicos como práticos, sendo um elemento importante do tratamento de recursos genéticos e, principalmente, de espécies ameaçadas de extinção (WITHERS & WILLIAMS, 1998). Essa técnica tem sido aplicada com sucesso para o abacaxi, banana, coco, mangaba, morango, cará, inhame, batata-doce, mandioca, batata, bromélias, orquídeas dentre outras.

As técnicas de cultura *in vitro* apresenta grande interesse para a conservação de germoplasma de espécies que se propagam vegetativamente, como também de espécies em extinção, genótipos elite e material geneticamente modificado (ENGELMAN, 1998). Essas técnicas de cultura de tecidos permitem uma rápida multiplicação e armazenamento de plantas em ambiente asséptico, livres de patógenos, otimizando o espaço físico e facilitando a troca de germoplasma.

Assim, a aplicação de técnicas biotecnológicas de cultura de tecidos tem permitido que coleções de germoplasma de várias espécies de plantas sejam formadas e conservadas *ex situ* por longos períodos, possibilitando assim que o material vegetal de interesse se torne disponível para recuperação e possível utilização futura (SÁ et al., 2011).

2.4 Conservação *in vitro*

A conservação de plantas *in vitro* apresenta-se como uma alternativa complementar ao método convencional, pois possibilita a manutenção de um grande número de acessos em pequeno espaço físico, livre das intempéries e de riscos existentes no campo (FARIA et al., 2006).

Os protocolos de conservação *in vitro* objetivam alcançar a taxa máxima de sobrevivência e estabilidade genética com mínima frequência de subcultivo. Nesta técnica podem-se utilizar meristemas ou outros tecidos das plantas como material vegetal, proporcionando a disponibilidade imediata para intercâmbio de germoplasma de interesse e para utilização em outros ramos da biotecnologia (SANTOS, 2011).

A conservação *in vitro* pode ser realizada através de duas técnicas: via meio de cultura para crescimento lento e através da criopreservação. A escolha por determinado método de conservação dependerá do período de conservação desejável, das espécies a serem conservadas, da parte da planta a ser preservada, da disponibilidade de mão de obra e dos recursos financeiros disponíveis (CARVALHO et al., 2006).

O crescimento lento consiste em reduzir o metabolismo da planta sem afetar sua viabilidade, aumentando assim o intervalo entre os subcultivos ou estendendo-o

indefinidamente (MARCO-MEDINA e CASAS, 2012). O uso destas técnicas permite o armazenamento de germoplasma saudável, com intervalos de subcultura prorrogado, reduzindo tempo e custos de manutenção (SANTOS et al., 2012a).

Para retardar o crescimento de plantas na técnica de crescimento lento pode-se recorrer à redução da temperatura, da intensidade luminosa, das concentrações de sais do meio basal e à adição de agentes osmóticos, como manitol e sorbitol e inibidores de crescimento como o ácido abscísico (ABA) (MOOSIKAPALA e TE-CHATO, 2010).

A sacarose é universalmente a fonte de carbono mais utilizada na propagação *in vitro* de plantas. Os açúcares alcoois tais como manitol e sorbitol, geralmente, não são metabolizados pelas plantas e tem sido por esta razão, utilizados para mimetizar a condição de estresse osmótico. Quando adicionados ao meio de cultura, tais açúcares reduzem o potencial hídrico do sistema, limitando assim a absorção de água e nutrientes por parte do explante retardando o seu crescimento (MARINO et al., 2010; SILVA e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011).

A combinação de baixas temperaturas com a adição de agentes osmóticos no meio de cultura tem sido apontada como alternativa eficiente para a conservação de germoplasma *in vitro* (LIMA-BRITO et al., 2011). O decréscimo da temperatura é uma das estratégias utilizadas para manter as plantas em crescimento mínimo por reduzir o metabolismo da planta, incluindo alternando o conteúdo e ação das enzimas e na composição e funcionamento das membranas celulares (LEMOS et al., 2002; LÉDO et al., 2007), provocando a diminuição da velocidade de reações químicas vitais para estas, além de tornar as membranas mais rígidas, sendo necessária maior quantidade de energia para ativar processos bioquímicos (LARCHER, 2004). Dessa forma há uma redução do metabolismo geral das plantas (SANTOS et al., 2012a).

Essa técnica tem sido utilizada para a conservação de várias espécies vegetais, com respostas que variam em função da sensibilidade à baixa temperatura (NEGASH et al., 2001; LEMOS et al., 2002; FARIA et al., 2006).

Para *Agave* spp, o uso de 30 g.L⁻¹ de sacarose suplementado com 50 g.L⁻¹ de manitol e 50 g.L⁻¹ de sorbitol a 25°C permitiu a conservação por até 300 dias (BALCH et al., 2012). Já para plantas de *Vanilla*, contendo 10 g.L⁻¹ de sacarose e 15 g.L⁻¹ de manitol a 22°C permitiu a conservação por até 365 dias. Essa combinação também surtiu efeito positivo na conservação da bananeira-de-jardim (*Ensete ventricosum*), permitindo retomada do crescimento após período de baixo metabolismo (NEGASH et al., 2001).

No entanto, o sucesso da tecnologia de crescimento lento requer o desenvolvimento de protocolos específicos para cada tipo de espécie e explantes (WATT et al., 2004). Dessa forma, é necessário que se estude diferentes espécies para o estabelecimento de procedimentos eficazes para cada uma. Apesar de muitos resultados presentes na literatura, não existe um protocolo padrão de conservação que possa ser posto para todas as espécies, pois as respostas podem variar em função da espécie, cultivar, tipo de explante, dentre outros fatores (SÁ et al., 2011).

2.5 Aclimatização

A aclimatização é caracterizada como uma adaptação gradativa das plantas micropropagadas em casa de vegetação para então transferência ao campo, com propósito de minimizar os efeitos provenientes de uma mudança brusca de ambientes, já que estas eram mantidas em local totalmente controlado e asséptico (POSPÍSILOVÁ et al., 2007). Esta fase é constituída de duas etapas: o enraizamento (*in vitro* e *ex vitro*) e a transferência para condições não estéreis com temperatura e umidade controladas (SILVA et al., 2003a).

Esse processo não é uma tarefa simples, visto que as microplantas precisam alterar seu metabolismo da condição heterotrófica (*in vitro*) para a autotrófica (SILVA et al., 2003a). Esta condição é considerada delicada devido à influência de diversos fatores como: temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes que podem dificultar o desenvolvimento e sobrevivência das mudas durante esse processo (SOUZA et al., 2007; SHEHLOK, 2009).

Um grande problema do processo de transferência das mudas *in vitro* para *ex vitro* é o estresse hídrico, que provoca altas taxas de mortalidade das plantas micropropagadas devido à ocorrência de modificações morfofisiológicas nas plantas *in vitro*, onde há um menor desenvolvimento dos estômatos o que dificulta o controle da perda excessiva de água quando estas são submetidas às condições de campo onde por essa há uma maior taxa de evaporação (YOKOTA et al., 2007).

O crescimento e a adaptação da planta a diversos ambientes relacionam-se à sua eficiência reprodutiva, que está associada, entre outros fatores, aos teores de clorofila foliar (ALMEIDA et al., 2004). Os teores de clorofila nas folhas são utilizados para estimar o potencial fotossintético das plantas, pela sua ligação direta com a absorção e transferência de energia luminosa e ao desenvolvimento e à adaptação a diversos ambientes. Uma planta com maior teor de clorofila é capaz de alcançar taxas fotossintéticas mais altas, pelo seu valor potencial de captação de “quanta” na unidade de tempo (CHAPPELLE e KIM, 1992).

Entre os diferentes componentes do ambiente, a luz é importante para o crescimento das plantas, não só por fornecer energia para a fotossíntese, mas também por fornecer sinais que regulam seu desenvolvimento por meio de receptores de luz sensíveis a diferentes intensidades e estado de polarização. Assim, modificações nos níveis de luminosidade, podem controlar diferentes respostas fisiológicas em suas características de crescimento, bioquímicas e anatômicas (ATROCH et al., 2001).

Outro fator importante para a aclimatização é o tipo de substrato utilizado no plantio das mudas. Este deve possuir boas características físico-químicas que permita a manutenção do sistema radicular e as trocas gasosas entre as raízes e o meio ambiente, a estabilidade da planta e o suprimento adequado de água e nutrientes (FREITAS et al., 2011). Nas orquídeas, epífitas, torna-se essencial a utilização de substratos de textura relativamente grossa e de drenagem livre que proporcionam às raízes o livre acesso ao ar e à luz (SHEHLOK, 2009).

Para uma melhor eficiência do substrato, outros fatores como custo e disponibilidade devem ser levados em consideração. Nesta concepção a disponibilização de substratos alternativos encontrados em abundância nas diferentes regiões do país é de extrema importância, pois além de reduzir os custos da produção, é uma alternativa para minimizar os problemas econômicos e ambientais através da comercialização desses materiais que até então não eram reaproveitados para a produção (CARRIJO et al., 2002; SILVEIRA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010).

O substrato pó de coco é um resíduo orgânico de baixo valor comercial produzido em abundância pelas agroindústrias da região nordeste do Brasil (SILVEIRA et al., 2002). É considerado um substrato alternativo com boas características físicas, alta porosidade e retenção de umidade, longa durabilidade sem alteração de características físicas e praticamente inertes (CARRIJO et al., 2002). Como não possui os nutrientes essenciais para as plantas, é utilizado em combinação com adubos (CARRIJO et al., 2002) ou soluções nutritivas (CAÑIZARES et al., 2002).

Existem ainda outros substratos que podem ser usados para o cultivo de orquídeas, tais como cascas de diversas árvores, folhas secas de pinus, musgo, areia, casca de arroz carbonizada, pedra britada e fibra de piaçava (ARAUJO et al., 2007). Frequentemente são usadas misturas de vários substratos, pois apenas um único material conseguirá apresentar todas as características adequadas para compor um bom substrato (LUCENA, 2008).

Para a aclimatização o substrato fibra de coco e a mistura de casca de pínus e fibra de coco (1:1 v/v) são os mais indicados para o cultivo de *Cattleya intermedia* (LONE et al., 2008). O substrato pó de coco foi o mais indicado para a aclimatização da orquídea *Cattleya chocolate drop* x (*C. guttata* x *L.tenebrosa*) (COLOMBO et al., 2005).

Portanto, o substrato deve permitir o crescimento das raízes, reter água possibilitando paralelamente aeração e suporte do sistema radicular, e principalmente, não favorecer o crescimento de microorganismos e plantas daninhas. Sendo assim, o sucesso dos substratos vai depender da espécie, do tipo de ambiente e do local que se pretende cultivar a planta (LUCENA, 2008; SHEHLOK, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Botânico

Os indivíduos coletados foram mantidos em estufa agrícola no Departamento de Engenharia Agrônômica (DEA). Espécimes com frutos maduros tiveram suas sementes utilizadas para estabelecimento das culturas *in vitro*.

A identificação das espécies foi realizada a partir da chave taxonômica até o nível de espécie, no Herbário ASE pela Curadora Ana Paula do Nascimento Prata do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe.

Para os experimentos de conservação *in vitro*, as espécies utilizadas foram *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth., *Oeceoclades maculata* Lindl. e *Polystachya estrellensis* Rchb.f.

Para aclimatização das plântulas micropropagadas foram utilizadas as *C. macrocarpum*, *O. maculata*. Não foi possível realizar a aclimatização de *P. estrellensis* em virtude da falta de plântulas disponíveis para tal.

3.2. Local e condições dos experimentos

Os experimentos de conservação *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal e a aclimatização foi realizada na estufa agrícola localizados no Departamento de Engenharia Agrônômica (DEA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Em todos os experimentos o meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e submetido a autoclavagem ($121 \pm 1^\circ\text{C}$ e 1,05 atm) por 15 minutos.

3.3. Estabelecimento *in vitro*

O estabelecimento das espécies foi proveniente dos frutos coletados. As cápsulas de sementes foram então lavadas com água e detergente neutro e, em câmara de fluxo laminar, desinfestadas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto seguido de solução de hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos e tríplice lavagem com água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação as cápsulas foram abertas e as sementes isoladas em meio de cultura MS com metade dos sais e acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, 7 g.L^{-1} de ágar e 1 g.L^{-1} de carvão ativado.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ao alcançarem tamanho entre 1 e 2 cm, as plântulas foram utilizadas para os experimentos de conservação *in vitro* e posterior aclimatização.

3.4. Conservação *in vitro*

A conservação *in vitro* sob crescimento lento foi realizada em dois experimentos, sendo o primeiro avaliando variações na concentração de sais do meio MS e outro testando diferentes combinações de reguladores osmóticos e fontes de carbono.

Para ambos, as plantas foram inoculadas em tubos de ensaio e mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ou BOD à temperatura de 18°C .

3.4.1. Redução de sais do meio MS e temperatura de cultivo

O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial $4 \times 3 \times 2$, sendo quatro concentrações de sais do meio MS (100%, 75%, 50% e 25%), três espécies (*C. macrocarpum*, *O. maculata* e *P. estrellensis*) e duas temperaturas (18 e 25°C) com cinco repetições compostas por seis tubos com um broto cada.

3.4.2. Reguladores osmóticos e temperatura de cultivo

O experimento foi realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial $3 \times 3 \times 2$, sendo três combinações de fontes de carbono e reguladores osmóticos (20 g.L^{-1} de sacarose; 10 g.L^{-1} de sacarose + 5 g.L^{-1} de manitol; 10 g.L^{-1} de sacarose + 5 g.L^{-1} de sorbitol), três espécies (*C. macrocarpum*, *O. maculata* e *P. estrellensis*) e duas temperaturas (18 e 25°C) com cinco repetições compostas por seis tubos de ensaio com um broto cada.

3.5. Aclimatização das plântulas

As plântulas estabelecidas *in vitro* com aproximadamente 120 dias em meio MS básico foram retiradas dos frascos, procedendo-se a lavagem em água corrente para eliminação do meio de cultura aderida às raízes e transferida para bandejas de poliestireno expandido com 72 alvéolos, contendo os diferentes tratamentos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito substratos, sendo A:HM: Areia e Húmus de minhoca (4:1); A:PC:HM: Areia, Pó de coco e Húmus de minhoca (2:2:1); A:CPT:HM: Areia, Casca de pinus triturada e Húmus de minhoca (2:2:1); A:CPT:PC:HM: Areia, Casca de pinus triturada, Pó de coco e Húmus de minhoca (2:1:1:1); A: Areia; A:PC: Areia e Pó de coco (1:1); A:CPT: Areia e Casca de pinus triturada (1:1); A:CPT:PC: Areia, Casca de pinus triturada e Pó de coco (2:1:1) com cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída por seis mudas.

O experimento foi conduzido em ambiente protegido com tela sombrite de 50% e sistema de nebulização intermitente garantindo alta umidade relativa.

3.6. Variáveis analisadas

As plântulas permaneceram nos tratamentos citados durante 180 dias, posteriormente foram retiradas dos tratamentos e com o auxílio de um Medidor Eletrônico do Teor de Clorofila (Falker) foi medido o teor de clorofila nas folhas mais jovem. A medição do teor de clorofila foi feito só aos 180 dias devido as folhas serem muito pequenas.

Para a avaliação do peso de massa seca da parte aérea e da raiz, as plantas foram mantidas em estufa a 60°C por setenta e duas horas e, em seguida, pesadas em balança analítica.

Para os experimentos de conservação *in vitro* as avaliações foram realizadas com 270 dias e 450 dias. Foram avaliadas a sobrevivência (%), presença de raiz (%), coloração das folhas onde: 1= folhas e brotos totalmente verdes; 2= início de secamento das folhas; 3= entre 30 e 50% de folhas mortas; 4= mais de 50% de folhas mortas e 5= folhas e brotos totalmente mortos. A altura das plantas foi avaliada com a escala de notas: 1= igual ao tamanho inicial; 2= até o dobro do tamanho inicial; 3= até o triplo do tamanho inicial e 4= mais que o triplo do tamanho inicial, de acordo com a escala de notas adaptada de LEMOS et al. (2002).

Na aclimatização aos 180 dias foram avaliadas as variáveis: sobrevivência (%), número de folhas, número de raiz, comprimento de folhas (cm), comprimento de raiz (cm), altura (cm), massa seca de parte aérea (mg), massa seca de raiz (mg), clorofila A, clorofila B e total de clorofila.

3.7. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para concentrações de sais do meio MS, foi utilizado regressão polinomial (FERREIRA, 2011). As variáveis em porcentagem foram transformadas em arco seno da raiz quadrada de (X/100).

Nos experimentos de aclimatização as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Conservação *in vitro*

4.1.1. Redução de sais do meio MS e temperatura de cultivo

Aos 270 dias de conservação *in vitro* houve interação tripla entre concentrações de sais do MS, espécie e temperatura. Os resultados da variável sobrevivência em função das diferentes concentrações de sais sob a temperatura de 18°C para a espécie *C. macrocarpum*, podem ser explicados por uma equação quadrática, onde uma menor média (54,26%) é alcançada na concentração de (55,19%) dos sais do MS. Já para *O. maculata*, o resultado está representado por uma equação linear crescente a medida que aumentou-se a concentração dos sais. Já para a espécie *P. estrellensis* não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações dos sais do MS (Tabela 1). A 25°C, a concentração de sais não influi na sobrevivência das plantas.

Tabela 1. Sobrevivência de plântulas (%) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Sais MS (%)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
25	60,00 cB	92,00 bB	100,00 aA
50	55,00 cB	92,00 bB	100,00 aA
75	56,25 bB	100,00 aA	100,00 aA
100	67,50 bB	100,00 aA	100,00 aA
Equação (Y)=	$74,0625 - 0,7175x + 0,0065x^2$ R ² =99,26%	$88,00 + 0,128x$ R ² =80,00%	ns
-----Temperatura 25°C -----			
25	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
50	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
75	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
100	100,00 aA	88,00 bB	100,00 aA
Equação(Y)=	ns	ns	ns
CV(%)		5,26	

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas entre temperaturas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando as espécies dentro de cada concentração de sais, a 18°C, *C. macrocarpum* apresentou uma sobrevivência inferior às demais espécies com valores que variam de 55 (50% do MS) a 67,5 (100% do MS). A maior porcentagem de sobrevivência é apresentada por *P. estrellensis* em todos os níveis de MS, não diferindo de *O. maculata* com 75% e 100% dos sais MS (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre as espécies quando submetidas à temperatura de 25°C nas concentrações de 25, 50 e 75% dos sais MS, sendo que todas espécies apresentavam 100% das plantas vivas. Quando mantidas em meio contendo 100%

dos sais, *O. maculata* apresenta sobrevivência inferior as demais espécies estudadas. Resultado semelhante foi obtido por SANTOS et al. (2012b) que trabalhando com capim vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) obteve também 100% de sobrevivência com 25, 50 e 75% dos sais MS até os 90 dias de conservação, embora aos 270 dias, apenas na concentração de 25% pudesse ser observada sobrevivência superior a 70%.

Considerando as duas temperaturas estudadas, nota-se uma maior sobrevivência das plântulas de *C. macrocarpum* quando conservadas a 25°C (100% de sobrevivência) aos 270 dias. Para a *O. maculata*, as concentrações de 25% e 50% dos sais a 18°C e 100% a 25°C proporcionaram uma menor sobrevivência. As menores taxas de sobrevivência nesta condição (25°C com 100% dos sais) possivelmente foi decorrente das condições ideais de cultivo que levam ao crescimento natural e senescência da planta. *P. estrellensis* não apresentou diferença significativa entre as temperaturas (Tabela 1).

Em relação à coloração das folhas para a espécie *C. macrocarpum*, nas duas temperaturas (18°C e 25°C), os resultados são representados por equações lineares crescentes (aumento linear das notas) isto é, com o aumento nas concentrações de sais tem-se uma maior senescência das plântulas. Para *P. estrellensis*, nas duas temperaturas, os dados são representados por equações quadráticas, sendo a temperatura de 18°C proporcionando plântulas com folhas e brotos totalmente verdes (representados por notas abaixo de 2,0), enquanto que a temperatura de 25°C estes valores foram maiores (2,2 a 2,4) indicando o início de secamento das folhas (Tabela 2). Resultados similares foram encontrados em vetiver, conservadas *in vitro*, em que o aumento na concentração de sais no meio de cultivo acarretou uma aceleração da senescência das plantas, provavelmente porque teve seu metabolismo mais acelerado até os 270 dias de conservação sob temperatura de 25°C (SANTOS et al., 2012a). Já para *O. maculata*, a concentração de sais não foi determinante sobre a coloração das folhas. É preferível plantas com notas baixas para coloração, ou seja, mais verdes, mesmo que estas apresentem um tamanho maior que o desejado, visto que a senescência não é desejável para a conservação sob regime de crescimento lento e as plantas precisam estar viáveis para retomarem seu crescimento quando for necessário (SANTOS, 2011).

Comparando-se as espécies dentro de cada combinação de sais e temperatura, a *O. maculata* obteve os melhores resultados, apresentando folhas mais verdes (menor nota) em todas as concentrações de sais do MS em ambas as temperaturas. Analisando a influência da temperatura de conservação observa-se que, para a *C. macrocarpum*, os melhores resultados foram obtidos na temperatura de 25°C em todas as concentrações dos sais do MS. O inverso ocorre com *P. estrellensis* cujas menores notas são obtidas na temperatura de 18°C. Provavelmente isto é explicado pelo clima de cultivo destas duas espécies, já que *C. macrocarpum* é encontrado em área de restinga, com capacidade de suportar altas temperaturas e *P. estrellensis* nas áreas de mata atlântica com clima predominantemente úmido.

Analisando a presença de raízes, dentro da temperatura de 18°C, e as três espécies, nota-se que as médias de *C. macrocarpum* são representadas por uma equação quadrática, cujos valores variam de 55 a 67,5% de raízes (Tabela 3). Nesta mesma condição, *O. maculata* é representada por uma equação linear crescente a medida que aumenta as concentrações de sais do MS (92 a 100%), aumenta também a presença de raiz. Já para a espécie *P. estrellensis* não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de sais, com 100% de enraizamento em todos os tratamentos.

Tabela 2. Coloração das folhas (notas 1 a 5*) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Sais MS (%)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
25	4,20 cB	1,00 aA	1,52 bA
50	4,24 cB	1,04 aA	1,56 bA
75	4,79 cB	1,06 aA	1,40 bA
100	4,85 cB	1,20 aA	1,40 bA
Equação (Y)=	3,89+0,001x R ² =86,28%	ns	1,550000-0,00008x- 0,000016x ² R ² =68,24%
-----Temperatura 25°C -----			
25	2,08 bA	1,24 aA	2,44 bB
50	2,12 bA	1,28 aA	2,24 bB
75	2,15 bA	1,44 aA	2,20 bB
100	2,37 bA	1,68 aB	2,24 bB
Equação(Y)=	1,96+0,0036x R ² =78,81%	ns	2,740000- 0,014560x+0,000096x ² R ² =99,09%
CV(%)	10,99		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas entre temperaturas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Notas coloração: 1=folhas e brotos totalmente verdes; 2=início do secamento das folhas; 3=entre 30 e 50% de folhas mortas; 4= mais de 50% de folhas mortas e 5=folhas e brotos totalmente mortos.

Ainda na temperatura de 18°C, dentro de cada concentração de sais, observa-se valores superiores (100%) nas concentrações de 75 e 100% de sais para as espécies *O. maculata* e *P. estrellensis* em relação a *C. macrocarpum* (56-67%). Quando se analisa as concentrações de 25 e 50% de sais, *P. estrellensis* apresentou 100% de enraizamento, sendo estes valores significativamente superiores aos apresentados para *O. maculata* (92%) e *C. macrocarpum* (60-55%) (Tabela 3).

Quando a análise é feita a 25°C, observa-se que não houve diferenças significativas entre as três espécies, dentro de cada tratamento. Nesta temperatura, nota-se melhor enraizamento em relação a temperatura de 18°C, para *C. macrocarpum* em todas as concentrações de sais, enquanto que para *P. estrellensis* não houve diferenças significativas com 100% de enraizamento em todos os tratamentos e *O. maculata* diferindo apenas com 100% dos sais MS (Tabela 3).

Considerando os resultados de cada espécie entre as temperaturas, percebe-se que para a *C. macrocarpum*, as maiores porcentagens de enraizamento foram obtidas na temperatura de 25°C em todas as concentrações dos sais do MS (Tabela 3). Para a *O. maculata*, as concentrações de 25% e 50% dos sais a 18°C e 100% a 25°C proporcionou um menor enraizamento, em que o melhor resultado foi alcançado na temperatura de 25°C. *P. estrellensis* não apresentou diferença significativa entre as temperaturas. A presença de raízes pode indicar que as plantas estão bem ou que as condições de cultivo não estão causando limitação que possam prejudicar a retomada do crescimento. Um sistema radicular

desenvolvido é considerado de grande importância, uma vez que é um fator de extrema importância para a posterior aclimação das plantas (CANTO et al., 2004).

Tabela 3. Presença de raiz em plântulas (%) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Sais MS (%)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
25	60,00 cB	92,00 bB	100,00 aA
50	55,00 cB	92,00 bB	100,00 aA
75	56,25 cB	100,00 aA	100,00 aA
100	67,50 bB	100,00 aA	100,00 aA
Equação (Y)=	$74,0625+0,0715x-0,0065x^2$ R ² =99,26%	$88,00+0,128x$ R ² =80,00%	ns
-----Temperatura 25°C -----			
25	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
50	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
75	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
100	100,00 aA	88,00 bB	100,00 aA
Equação(Y)=	ns	ns	ns
CV(%)		5,26	

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas entre temperaturas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para variável altura de plântulas a 18°C as espécies *C. macrocarpum* e *O. maculata*, proporcionou pequeno aumento a medida que as concentrações de sais no meio de cultivo foram aumentadas (resultados representados por equações lineares), porém próximas a altura inicial, objetivo da conservação sob crescimento lento. Já para a espécie *P. estrellensis* a concentração de sais não foi significativa, com altura de plântulas próxima a do início da conservação. Nesta mesma temperatura dentro de cada concentração de sais, observa-se os melhores resultados para *C. macrocarpum* em relação às outras espécies, com plântulas apresentando menores notas (1,27-1,45), isto é, menos crescimento (Tabela 4).

Ao analisar a temperatura de 25°C, *C. macrocarpum* teve seus dados representados por uma equação quadrática, sendo as concentrações intermediárias responsáveis pelo maior crescimento, em que o ponto máximo (2,4) é alcançado na concentração de (63,56%) dos sais do MS. Já para *O. maculata* a altura de plântulas aumentou com o aumento da concentração salina e não houve diferenças significativas para *P. estrellensis* (Tabela 4).

Comparando as espécies dentro de cada concentração de sais, nota-se na temperatura de 25°C, que em todas as concentrações de sais *O. maculata* apresentou menor crescimento, seguida de *C. macrocarpum* e *P. estrellensis* de 25 a 75% e não diferindo de *C. macrocarpum* com 100% dos sais (Tabela 4). Analisando as duas temperaturas de conservação observa-se que a 18°C, proporcionou, em geral, um menor crescimento das plântulas como já era esperado, o que é benéfico para a conservação, cujo objetivo principal é manter a viabilidade da planta durante o período de crescimento lento. O uso de temperaturas abaixo daquelas consideradas as mais comuns no cultivo *in vitro*, reduz a ação de enzimas e o metabolismo geral das plantas, por esta razão tem sido o recurso mais usado para diminuir o crescimento de diversas culturas (LEMOS et al., 2002).

Tabela 4. Altura de plântulas (notas 1 a 4*) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Sais MS (%)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
25	1,27 aA	1,80 bA	1,96 bA
50	1,35 aA	1,80 bA	1,92 bA
75	1,42 aA	1,85 bA	2,00 bA
100	1,45 aA	1,88 bA	2,00 bA
Equação (Y)=	1,22+0,002x R ² =95,61%	1,76+0,001x R ² =89,29%	ns
-----Temperatura 25°C -----			
25	2,23 bB	1,88 aA	2,84 cB
50	2,33 bB	1,88 aA	2,88 cB
75	2,42 bB	2,20 aB	2,88 cB
100	2,23 aB	2,24 aB	2,88 bB
Equação(Y)=	1,960500+0,013348x- 0,000105x ² R ² =90,94%	1,7+0,005x R ² =84,19%	ns
CV(%)	5,88		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas entre temperaturas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Notas altura: 1= altura semelhante a inicial (1-2 cm); 2= até o dobro da altura inicial; 3= até o triplo da altura inicial e 4= mais que o triplo da altura inicial.

Aos 450 dias de conservação, a sobrevivência das plantas variou em função da interação entre concentração de sais, temperatura e espécies. Quando as plântulas foram mantidas a 18°C, a maior sobrevivência foi encontrada para *O. maculata* e *P. estrellensis*, representado por equações lineares crescente e decrescente conforme as concentrações de sais foram aumentando, ficando os valores entre 92 a 100% (*O. maculata*) e 88 a 100% (*P. estrellensis*). A menor sobrevivência encontrada em *C. macrocarpum* foi representada por uma equação quadrática, cujo ponto mínimo fica em 30%, com a utilização de 60% de sais do MS (Tabela 5).

Avaliando a sobrevivência das plântulas a 25°C, observa-se que a concentração de sais não foi significativa para nenhuma das espécies. Percebe-se claramente que esta temperatura foi muito benéfica para *C. macrocarpum* (96 a 100%) quando comparada com 18°C (abaixo de 35% de sobrevivência) (Tabela 5). A baixa sobrevivência observada em *C. macrocarpum* a 18°C é provavelmente devida ao fato dessas plantas serem encontradas em ambiente de restinga onde as temperaturas variam de 25 a 35°C, estando 18°C abaixo da faixa de tolerância da espécie (MONTEIRO et al., 2012). Em *Cochlospermum regium*, Camilo et al (2009) observaram que a redução da temperatura para menos de 20°C também reduziu a sobrevivência dos indivíduos. Temperaturas abaixo daquela ideal para o cultivo de uma espécie estão entre as estratégias mais empregadas para indução do crescimento lento, entretanto, as alterações fisiológicas provocadas pelo frio pode ser irreversível, inviabilizando a retomada de crescimento, sendo a faixa de tolerância a temperaturas mais baixas ou mais altas, variável entre espécies ou mesmo entre genótipos ou cultivares de uma mesma espécie.

Tabela 5. Sobrevivência de plântulas (%) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Sais MS (%)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
25	22,50 bB	92,00 aB	100,00 aA
50	25,00 bB	92,00 aB	100,00 aA
75	32,50 bB	100,00 aA	96,00 aA
100	16,25 cB	100,00 aA	88,00 bB
Equação (Y)=	$3,437500+0,892500x-0,007500x^2$ R ² =69,51%	$88,00+0,12x$ R ² =80,00%	$106,00-0,16x$ R ² =83,33%
-----Temperatura 25°C -----			
25	96,25 aA	100,00 aA	100,00 aA
50	96,25 aA	100,00 aA	100,00 aA
75	96,25 aA	100,00 aA	100,00 aA
100	100,00 aA	88,00 bB	100,00 aA
Equação(Y)=	ns	ns	ns
CV(%)		6,32	

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas entre temperaturas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à coloração das folhas aos 450 dias de conservação *in vitro*, a temperatura de 18°C foi favorável a *O. maculata* e *P. estrellensis*, uma vez que as folhas permaneceram totalmente verdes (nota 1), possivelmente o uso de temperaturas baixas aumentou a viabilidade das culturas uma vez que o processo de degradação do tecido é reduzido. A redução da temperatura mostra-se eficiente para redução do crescimento de varias espécies, auxiliando a manutenção das folhas mais verdes por maior período de tempo, como observado em *Aechmea blanchetiana* (ROSA, 2010) e capim vetiver (SANTOS et al., 2012a), contudo pode ser demasiadamente limitante para outras, como ocorre aqui com *C. macrocarpum*, que apresenta valores superiores a 4 na escala de notas, que significa mais de 50% de folhas mortas, mostrando-se não tolerante a essa temperatura (Tabela 6).

As plântulas mantidas a 25°C, apresentaram notas em torno de 2 para *O. maculata* e *P. estrellensis*, indicando o início de secamento das folhas. Esta temperatura só foi superior a de 18°C para *C. macrocarpum*, seguindo a mesma tendência de sobrevivência (Tabela 5 e 6).

Tabela 6. Coloração das folhas (notas 1 a 5*) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Sais MS (%)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
25	4,38 cB	1,00 aA	1,52 bA
50	4,96 cB	1,04 aA	1,56 bA
75	4,91 cB	1,12 aA	1,40 bA
100	4,97 cB	1,20 aA	1,40 bA
Equação (Y)=	$3,73700+0,032664x-0,000206x^2$ R ² =88,86%	ns	$1,55-0,00008x-0,000016x^2$ R ² =68,24%
-----Temperatura 25°C -----			
25	2,50 bA	2,00 aB	2,44 bB
50	2,25 aA	2,00 aB	2,24 aB
75	2,16 aA	2,00 aB	2,04 aB
100	2,47 bA	2,00 aB	2,20 abB
Equação(Y)=	$3,086000-0,028432x+0,000221x^2$ R ² =96,90%	ns	$2,910000-0,021680x+0,000144x^2$ R ² =92,02%
CV(%)	11,03		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas entre temperaturas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Notas coloração: 1=folhas e brotos totalmente verdes; 2=início do secamento das folhas; 3=entre 30 e 50% de folhas mortas; 4= mais de 50% de folhas mortas e 5=folhas e brotos totalmente mortos.

Aos 450 dias de conservação, verificou-se que houve 100% de enraizamento para todas as espécies tanto a 18°C quanto 25°C, exceto para *C. macrocarpum* a 18°C, cujos valores ficaram entre 16 a 32% de enraizamento, sendo representados por uma equação quadrática, segundo em que o ponto máximo (29,98) é alcançado na concentração de (59,5%) dos sais MS. (Tabela 7). A presença de raízes pode indicar que as plantas estão vegetando normalmente ou que as condições de cultivo não estão provocando restrições que possam prejudicar a retomada de crescimento. O enraizamento é fator de grande importância no caso de uma necessidade de aclimatização das plantas conservadas, uma vez que a sobrevivência de plantas já enraizadas neste processo é superior aos casos de enraizamento *ex vitro* (CAMOLESI et al., 2010).

Tabela 7. Presença de raiz em plântulas (%) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Sais MS (%)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
25	22,50 bB	100,00 aA	100,00 aA
50	25,00 bB	100,00 aA	100,00 aA
75	32,50 bB	100,00 aA	100,00 aA
100	16,25 bB	100,00 aA	100,00 aA
Equação (Y)=	$3,437500+0,892500x-0,007500x^2$ R ² =69,51%	ns	ns
-----Temperatura 25°C -----			
25	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
50	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
75	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
100	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
Equação(Y)=	ns	ns	ns
CV(%)		3,80	

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas entre temperaturas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando a altura das plântulas aos 450 dias de cultivo, observa-se que dentro da temperatura de 18°C, o crescimento foi mínimo para *C. macrocarpum* a qual obteve as menores notas quando comparando com as demais em todas as concentrações de sais do MS. Contudo, vale lembrar que nesta condição a espécie apresentava apenas 24% de plantas vivas (Tabela 5). Já quando mantida a 25°C, esta espécie apresentou maior crescimento (notas mais altas) que as demais (Tabela 8).

De um modo geral, a temperatura de 25°C proporcionou maior crescimento das plântulas, exceto para *O. maculata*, quando utilizado 25 e 50% dos sais, quando esta temperatura não diferiu de 18°C (Tabela 8). O mesmo comportamento foi observado em *A. blanchetiana*, para a qual a redução da temperatura manteve os menores índices de crescimento aos 360 dias (ROSA, 2010).

Quando se busca a conservação *in vitro*, a altura das plantas é uma variável importante para indicar a proximidade do subcultivo, já que chega um momento em que há o esgotamento do meio afetando o crescimento da planta por falta de nutrientes, portanto, a partir deste ponto há um aumento do número de folhas senescentes, sinalizando um estágio fisiológico mais avançado e a necessidade da troca de meio (MACIA, 2011).

Tabela 8. Altura de plântulas (notas 1 a 4*) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função da espécie, concentração dos sais MS e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Sais MS (%)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
25	1,23 aA	1,80 bA	1,96 bA
50	1,27 aA	1,80 bA	1,92 bA
75	1,42 aA	1,88 bA	1,96 bA
100	1,49 aA	1,80 bA	2,00 cA
Equação (Y)=	1,12+0,003x R ² =94,68%	ns	2,020000- 0,003360x+0,000032x ² R ² =90,00%
-----Temperatura 25°C -----			
25	3,31 cB	1,88 aA	2,84 bB
50	3,32 cB	1,88 aA	2,88 bB
75	3,33 cB	2,20 aB	2,88 bB
100	3,32 cB	2,24 aB	2,88 bB
Equação(Y)=	3,284000+0,001376x- 0,000010x ² R ² =82,47%	1,7+0,005x R ² =84,19%	2,84+0,004x R ² =60,00%
CV(%)	5,06		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma linha e maiúsculas entre temperaturas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Notas altura: 1= altura semelhante a inicial (1-2 cm); 2= até o dobro da altura inicial; 3= até o triplo da altura inicial e 4= mais que o triplo da altura inicial.

4.1.2. Reguladores osmóticos e temperatura de cultivo

A sobrevivência das plântulas em função da utilização de reguladores osmóticos aos 270 dias de cultivo, mantida a 18°C, apresentou média de 27,5% para *C. macrocarpum*, não havendo diferenças significativas entre os reguladores osmóticos, enquanto que para *O. maculata* e *P. estrellensis*, as médias variaram de 89,3 a 97,3% (Tabela 9).

Analisando esta mesma variável a 25°C, nota-se que não houve diferenças significativas entre os reguladores osmóticos e espécies, com valores médios de 95 a 100% (Tabela 9). Observa-se também uma maior sobrevivência das plântulas de *C. macrocarpum* nesta temperatura, quando comparada a 18°C (Tabela 9). Resultados similares foram encontrados em *Agave nizandensis*, conservadas *in vitro* por 300 dias utilizando sacarose : manitol : sorbitol (30:50:50 g.L⁻¹) mantido a 25°C (BALCH et al., 2012a).

Tabela 9. Sobrevivência de plântulas (%) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função de espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Reguladores Osmóticos (g.L ⁻¹)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
Sacarose (20)	30,00 aBB	100,00 aAα	100,00 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	23,75 aCB	84,00 bBβ	96,00 aAα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	28,75 aCB	84,00 bBβ	96,00 aAα
-----Temperatura 25°C -----			
Sacarose (20)	98,75 aAα	100,00 aAα	100,00 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	96,25 aAα	100,00 aAα	100,00 aAα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	93,75 aAα	100,00 aAα	100,00 aAα
CV(%)	8,92		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma coluna, maiúsculas na mesma linha e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para coloração das folhas, em plântulas mantidas a 18°C, as menores notas foram obtidas na *O. maculata* (média 1,52), indicando folhas e brotos totalmente verdes em todos os tratamentos, enquanto que para *C. macrocarpum* as notas foram as mais altas (em torno de 4), não diferindo entre os reguladores osmóticos utilizados, mas indicando morte de folhas acima de 50% (Tabela 10).

Para esta mesma variável a 25°C, não houve diferenças significativas dentro de cada espécie para os diferentes reguladores osmóticos. Entretanto, entre as espécies, *P. estrellensis* apresentou as notas mais elevadas (média de 2,8), denotando um aumento de folhas mortas (Tabela 10).

Comparando as duas temperaturas observa-se que 18°C permitiu plântulas com folhas mais verdes, devido ao metabolismo ser mais lento, exceto para *C. macrocarpum*, para a qual a temperatura de 25°C foi mais favorável assim como ocorre para *A. distichantha* e *A. fasciata*, que também apresentaram folhas mais verdes quando conservadas a 25°C por 360 dias (ROCHA, 2010 e MOREIRA, 2008).

Para a porcentagem de plântulas enraizadas, quando mantidas a 18°C por um período de 270 dias, os valores variam de 84 a 100% em *O. maculata*, 92 a 100% em *P. estrellensis* e 23 a 30% em *C. macrocarpum*, não diferindo entre as diferentes combinações de reguladores osmóticos dentro de cada espécie, exceto em *O. maculata* onde a sacarose foi superior as combinações com manitol e sorbitol (100%) (Tabela 11).

Analisando a presença de raiz em plântulas mantidas a 25°C, nota-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos e as três espécies, com valores que variam de 93,75% a 100%. Resultados semelhantes foram obtidos nesta temperatura para *Pfaffia glomerata* (100%) de enraizamento aos 180 dias, (ALVES et al., 2010). Vale ressaltar que ao comparar as duas temperaturas, 25°C foi superior a 18°C, exceto para *P. estrellensis* que não houve diferenças significativas entre as duas temperaturas (Tabela 11).

Tabela 10. Coloração das folhas (notas 1 a 5**) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função de espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Reguladores Osmóticos (g.L ⁻¹)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
Sacarose (20)	4,09 aCß	1,60 aAα	2,00 aBα
Sacarose + Manitol (10:5)	4,21 aCß	1,40 aAα	2,24 abBα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	4,11 aCß	1,56 aAα	2,36 bBα
-----Temperatura 25°C -----			
Sacarose (20)	2,00 aAα	2,04 aAß	2,60 aBß
Sacarose + Manitol (10:5)	2,02 aAα	2,12 aAß	2,84 aBß
Sacarose + Sorbitol (10:5)	2,04 aAα	2,12 aAß	2,88 aBß
CV(%)	8,32		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma coluna, maiúsculas na mesma linha e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Notas coloração: 1=folhas e brotos totalmente verdes; 2=início do secamento das folhas; 3=entre 30 e 50% de folhas mortas; 4= mais de 50% de folhas mortas e 5=folhas e brotos totalmente mortos.

Tabela 11. Presença de raiz em plântulas (%) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função de espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Reguladores Osmóticos (g.L ⁻¹)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
Sacarose (20)	30,00 aBß	100,00 aAα	100,00 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	23,75 aBß	84,00 bAß	96,00 aAα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	28,75 aBß	84,00 bAß	92,00 aAα
-----Temperatura 25°C -----			
Sacarose (20)	98,75 aAα	100,00 aAα	96,00 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	96,25 aAα	100,00 aAα	96,00 aAα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	93,75 aAα	100,00 aAα	100,00 aAα
CV(%)	9,82		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma coluna, maiúsculas na mesma linha e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para variável altura de plântulas aos 270 dias de cultivo, na temperatura 18°C, as combinações de sacarose com manitol e com sorbitol proporcionaram as menores notas para *C. macrocarpum* (1,3), indicando pouco crescimento durante este período. *P. estrellensis* e *O. maculata* apresentaram maior crescimento nestes tratamentos (Tabela 12).

Analisando as temperaturas, nota-se que 25°C foi favorável a um maior crescimento em altura das plântulas, em todas variações dos reguladores osmóticos (Tabela 12).

A sobrevivência de plântulas por um período de 450 dias de conservação sob crescimento lento manteve valores entre 80 a 100% de sobrevivência para todas as espécies independente da temperatura de cultivo com exceção de *C. macrocarpum* na temperatura de 18°C, que não favoreceu a sobrevivência ficando na média de 25% (Tabela 13), seguindo a mesma tendência com redução de sais do MS (Tabela 5), indicando que a temperatura de 18°C não deve ser utilizada na conservação sob crescimento lento para a espécie.

Tabela 12. Altura de plântulas (notas 1 a 4**) de Epidendroideae aos 270 dias de conservação em função de espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Reguladores Osmóticos (g.L ⁻¹)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
Sacarose (20)	1,95 bAα	2,16 bAα	2,12 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	1,32 aAα	1,76 bBα	2,08 aBα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	1,35 aAα	1,72 aBα	2,00 aBα
-----Temperatura 25°C -----			
Sacarose (20)	2,65 aAβ	2,72 bAβ	2,88 aAβ
Sacarose + Manitol (10:5)	3,16 bBβ	2,16 aAβ	2,88 aBβ
Sacarose + Sorbitol (10:5)	2,60 aBβ	2,20 aAβ	2,88 aBβ
CV(%)	10,17		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma coluna, maiúsculas na mesma linha e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Notas altura: 1= altura semelhante a inicial (1-2 cm); 2= até o dobro da altura inicial; 3= até o triplo da altura inicial e 4= mais que o triplo da altura inicial.

Tabela 13. Sobrevivência de plântulas (%) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função de espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Reguladores Osmóticos (g.L ⁻¹)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
Sacarose (20)	23,75 aBβ	100,00 aAα	92,00 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	21,25 aBβ	84,00 bBβ	92,00 aAα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	28,75 aBβ	84,00 bBβ	88,00 aAα
-----Temperatura 25°C -----			
Sacarose (20)	98,75 aAα	100,00 aAα	96,00 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	96,25 aAα	100,00 aAα	92,00 aAα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	93,75 aAα	100,00 aAα	88,00 aAα
CV(%)	11,33		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma coluna, maiúsculas na mesma linha e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a coloração das folhas, 18°C proporcionou as menores notas para *P. estrellensis* e *O. maculata*, sendo que a última apresenta a menor média (1,52) indicando folhas e brotos totalmente verdes, independente dos reguladores osmóticos utilizados. Esta mesma temperatura, não foi favorável a manutenção de cor de *C. macrocarpum*, apresentando aos 450 dias de conservação, cerca de 50% ou mais de folhas mortas (nota 4) (Tabela 14).

Quando a variável é analisada a 25°C, nota-se uma maior uniformidade das notas (2,02 - 2,88) para todas as espécies, sendo que *P. estrellensis* apresenta notas mais próximas a 3 (2,77), o que significa entre 30 e 50% de folhas mortas (Tabela 14).

Ao comparar as duas temperaturas de cultivo, observa-se que 18°C foi superior a de 25°C, exceto para *C. macrocarpum* em todos os reguladores osmóticos utilizados (Tabela 14), ratificando os resultados apresentados anteriormente. Resultados semelhantes foram observados por Moreira (2008) em *A. miniata*, que também apresentou folhas mais verdes quando conservadas a 25°C por 360 dias.

A porcentagem de plântulas enraizadas atingiu valores acima de 90% para todas as espécies, independente dos reguladores, tanto a 18°C como 25°C, exceto para *C.*

macrocarpum, com 24,6% de enraizamento quando mantida em 18°C (Tabela 15). Em *Vanilla planifolia*, aos 360 dias as maiores taxas de enraizamento (100%) foi alcançada com a redução da temperatura para 22°C (DIVAKARAN et al., 2006).

Tabela 14. Coloração das folhas (notas 1 a 5**) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função de espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Reguladores Osmóticos (g.L ⁻¹)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
Sacarose (20)	4,45 aCß	1,60 aAα	2,00 aBα
Sacarose + Manitol (10:5)	4,71 aCß	1,40 aAα	2,24 abBα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	4,51 aCß	1,56 aAα	2,36 bBα
-----Temperatura 25°C -----			
Sacarose (20)	2,04 aAα	2,04 aAß	2,60 aBß
Sacarose + Manitol (10:5)	2,02 aAα	2,12 aAß	2,84 aBß
Sacarose + Sorbitol (10:5)	2,04 aAα	2,12 aAß	2,88 aBß
CV(%)	9,13		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma coluna, maiúsculas na mesma linha e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Notas coloração: 1=folhas e brotos totalmente verdes; 2=início do secamento das folhas; 3=entre 30 e 50% de folhas mortas; 4= mais de 50% de folhas mortas e 5=folhas e brotos totalmente mortos.

Tabela 15. Presença de raiz em plântulas (%) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função de espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Reguladores Osmóticos (g.L ⁻¹)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
Sacarose (20)	23,75 aBß	100,00 aAα	100,00 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	21,25 aBß	100,00 aAα	96,00 aAα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	28,75 aBß	100,00 aAα	92,00 aAß
-----Temperatura 25°C -----			
Sacarose (20)	98,75 aAα	100,00 aAα	100,00 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	96,25 aAα	100,00 aAα	100,00 aAα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	93,75 aAα	100,00 aAα	100,00 aAα
CV(%)	7,34		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma coluna, maiúsculas na mesma linha e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 450 dias de conservação, as plântulas não apresentaram alteração em altura nas duas temperaturas, mantendo as mesmas notas obtidas aos 270 dias (Tabela 12 e 16). Esta desaceleração do crescimento aos 270 dias pode ser devida ao esgotamento dos nutrientes do meio de cultura. O mesmo fato foi observado em *Aechmea* ssp. por Rosa (2010), aos 270 dias de conservação.

A razão de mesmo com a privação de nutrientes estas plantas não virem a senescer, pode estar tanto no seu metabolismo CAM, que já previne a dessecação, quanto em sua morfologia. Estas espécies são capazes de absorver rapidamente e armazenar água e nutrientes em seus pseudobulbos e desta forma sobreviver a longos períodos sem precipitação na

natureza, utilizando suas reservas para suprir seu metabolismo de manutenção (SHIRAKI, 2000).

Supõe-se então que, mesmo na condição *in vitro*, com a diminuição de nutrientes, as plantas tenham criando uma reserva que as mantém vivas, porém sem crescimento aparente.

Após os 450 dias de conservação *in vitro* de *C. macrocarpum*, *O. maculata* e *P. estrellensis*, os explantes oriundos dos tratamentos com 25, 50, 75 e 100% dos sais MS e 20 g.L⁻¹ de sacarose; 10 g.L⁻¹ de sacarose + 5g.L⁻¹ de manitol; 10 g.L⁻¹ de sacarose + 5g.L⁻¹ de sorbitol e duas temperaturas (18 e 25°C) restabeleceram seu crescimento quando colocados em condições normais de cultivo *in vitro*. Esse comportamento é necessário visto que as plantas precisam estar com vigor suficiente para restabelecer seu crescimento.

Para a conservação *in vitro* é necessária a redução do crescimento da planta, para evitar sucessivos subcultivos, mas preservando a capacidade da planta de ser recuperada e multiplicada (MACIA, 2011). O teste de viabilidade é um indicador de sucesso mais confiável no desenvolvimento de um protocolo de conservação. Assim, as microplantas de orquídeas das três espécies foram colocadas em meio MS para que fosse observado o desenvolvimento das mesmas. Através do teste de viabilidade pôde-se constatar que as concentrações de sais MS e os reguladores osmóticos utilizadas na conservação não inviabilizaram a capacidade responsiva da cultura, assim, as plantas mantiveram um bom vigor e desenvolvimento, mesmo após permanecerem durante meses sem troca do meio de cultura.

Tabela 16. Altura de plântulas (notas 1 a 4**) de Epidendroideae aos 450 dias de conservação em função de espécie, reguladores osmóticos e temperatura. São Cristóvão, UFS, 2014.

Reguladores Osmóticos (g.L ⁻¹)	Espécies		
	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>	<i>Polystachya estrellensis</i>
-----Temperatura 18°C -----			
Sacarose (20)	1,95 bAα	2,16 aAα	2,12 aAα
Sacarose + Manitol (10:5)	1,32 aAα	1,76 aBα	2,08 aBα
Sacarose + Sorbitol (10:5)	1,35 aAα	1,72 aBα	2,00 aBα
-----Temperatura 25°C -----			
Sacarose (20)	2,72 aAß	2,72 bAß	2,96 aAß
Sacarose + Manitol (10:5)	3,16 bBß	2,16 aAα	2,88 aBß
Sacarose + Sorbitol (10:5)	2,60 aBß	2,20 aAα	2,88 aBß
CV(%)	9,94		

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma coluna, maiúsculas na mesma linha e gregas entre temperaturas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Notas altura: 1= altura semelhante a inicial (1-2 cm); 2= até o dobro da altura inicial; 3= até o triplo da altura inicial e 4= mais que o triplo da altura inicial.

4.2 Aclimatização das plântulas

A análise de variância evidenciou diferenças significativas para as misturas de substratos após 180 dias de aclimatização. Comparando os substratos dentro de cada espécie, observa-se que para *C. macrocarpum*, as médias de sobrevivência variaram de 50% a 100% (Tabela 17). Os melhores resultados foram obtidos nas misturas nas quais o húmus de minhoca estava presente (90-100% de sobrevivência) (Tabela 17). A presença do húmus possivelmente contribuiu para o desenvolvimento das plântulas por se tratar de um material orgânico, rico em nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e uma série de

micronutrientes), favorecendo dessa maneira, a sobrevivência das plântulas ao longo do cultivo (KNAPIK, 2005).

As diferentes misturas de substrato utilizadas na aclimatização de *O. maculata* não influenciou na sobrevivência das plântulas, apresentando uma sobrevivência de 83 a 100% (Tabela 17). Provavelmente isso se deve a adaptação da espécie aos mais variados ambientes, desde substratos arenosos até matas úmidas. Por isso é considerada uma orquídea bioindicadora de fragmentos florestais antrópicos pela sua facilidade de adaptação e colonização ambiental (DUBBERN et al., 2013).

Analisando a altura das plantas, observa-se que para *C. macrocarpum* a mistura de substrato que proporcionou plantas mais altas (5,8 cm) foi composto de areia:casca de pinus triturada:pó de coco:húmus de minhoca (2:1:1:1) (Tabela 17). Resultados semelhantes foram obtidos na aclimatização de *Cattleya guttata* x *Laelia tenebrosa*, utilizando misturas contendo pó e fibra de coco (COLOMBO et al., 2005). Para *O. maculata* a utilização de areia e húmus de minhoca (1:1) favoreceu o maior crescimento das plantas (6,51 cm) (Tabela 17).

O maior número de folhas por planta de *C. macrocarpum*, foi proporcionado pelas misturas contendo areia:húmus de minhoca e areia, casca de pinus e húmus, enquanto que para *O. maculata* areia e húmus e areia, pó de coco e húmus apresentaram o menor número de folhas (Tabela 17). A associação do húmus de minhoca com pó de coco favoreceu também o aumento do número de folhas na aclimatização de *Heliconia lingulata* (ROCHA et al., 2009).

Mudas com maior número de folhas têm maiores índices de sobrevivência no campo, pois são elas as estruturas responsáveis pela captação de energia solar e pela produção de matéria orgânica através da fotossíntese (ASSIS et al., 2009).

Para a variável número de raiz, *C. macrocarpum* apresentou os maiores valores (6,43) utilizando o substrato A:CPT:HM (2:2:1), não diferindo de A:HM (1:1); A:PC:HM (2:2:1); A:CPT:PC:HM (2:1:1:1). Para *O. maculata*, o maior número de raiz foi proporcionado pelos substratos A:CPT:PC:HM (7,46) e A (7,93) (Tabela 17). Resultados semelhantes foram obtidos na aclimatização de *Cattleya harrisoniana*, utilizando misturas contendo casca de pinus e pó de coco (DORNELES e TREVELIN, 2011).

Em relação ao comprimento de raízes os maiores valores foram registrados em *O. maculata* em todas as misturas de substrato, variando de (8,0 cm) A:CPT:PC (2:1:1) a 10,19 cm A:CPT:HM (2:2:1), enquanto que em *C. macrocarpum* o maior comprimento (6,6 cm) foi proporcionado pela mistura de A:CPT:HM (2:2:1) (Tabela 18). Resultados similares foram obtidos na aclimatização de *Cattleya intermedia* x *Hadrolaelia purpurata*, utilizando misturas contendo casca de pinus que proporciona uma boa aeração entre as raízes, o que permite o crescimento e maior longevidade das plantas (SORACE et al., 2009).

Para comprimento de folha os valores variaram de 2,2 cm (A:PC e A:CPT:PC) a 3,7 cm (A:CPT:HM) para *C. macrocarpum* e 2,3 (A:CPT:PC) a 3,30 cm (A:CPT:HM, A, A:PC) para *O. maculata*. Nota-se que, para *C. macrocarpum*, os menores comprimentos foram obtidos nas misturas sem o húmus de minhoca (Tabela 18). Uma possível explicação para este menor comprimento de folha se deve a baixa quantidade de matéria orgânica, como também a uma possível limitação de nutrientes.

Tabela 17. Sobrevivência (%), altura de plântulas (cm), número de folhas, número de raiz de *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth. e *Oeceoclades maculata* Lindl. em função de diferentes misturas de substratos aos 180 dias de cultivo. São Cristóvão, UFS, 2014.

Substratos	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>
----- Sobrevivência (%) -----		
A:HM (1:1)	90,0 aA	83,3 aA
A:PC:HM (2:2:1)	100,0 aA	96,7 aA
A:CPT:HM (2:2:1)	100,0 aA	96,7 aA
A:CPT:PC:HM(2:1:1:1)	90,0 aA	100,0 aA
A	76,7 bB	100,0 aA
A:PC (1:1)	80,0 bA	90,0 aA
A:CPT (1:1)	53,3 cB	100,0 aA
A:CPT:PC (2:1:1)	50,0 cB	100,0 aA
CV (%)	14,54	
----- Altura da planta (cm) -----		
A:HM (1:1)	4,0 cB	6,5 aA
A:PC:HM (2:2:1)	3,9 cB	5,9 bA
A:CPT:HM (2:2:1)	5,2 bA	5,2 cA
A:CPT:PC:HM(2:1:1:1)	5,8 aA	5,0 cB
A	3,6 dB	4,7 cA
A:PC (1:1)	3,3 dB	4,2 dA
A:CPT (1:1)	3,3 dA	2,8 eB
A:CPT:PC (2:1:1)	3,2 dA	2,6 eB
CV (%)	8,88	
----- Número de folhas -----		
A:HM (1:1)	6,8 aA	2,8 bB
A:PC:HM (2:2:1)	5,7 bA	3,3 bB
A:CPT:HM (2:2:1)	6,3 aA	4,3 aB
A:CPT:PC:HM(2:1:1:1)	5,5 bA	4,3 aB
A	4,2 cA	4,4 aA
A:PC (1:1)	4,1 cA	4,2 aA
A:CPT (1:1)	4,4 cA	3,7 aA
A:CPT:PC (2:1:1)	3,5 cA	3,9 aA
CV (%)	16,78	
----- Número de raiz -----		
A:HM (1:1)	6,3 aA	5,6 bA
A:PC:HM (2:2:1)	5,4 aA	6,2 bA
A:CPT:HM (2:2:1)	6,4 aA	6,7 bA
A:CPT:PC:HM(2:1:1:1)	5,7 aB	7,4 aA
A	5,3 aB	7,9 aA
A:PC (1:1)	4,8 bB	6,2 bA
A:CPT (1:1)	4,5 bA	5,7 bA
A:CPT:PC (2:1:1)	4,1 bB	6,2 bA
CV (%)	17,56	

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). **A:HM – Areia+ Húmus de minhoca (1:1 v/v); A:PC:HM – Areia + Pó de coco + Húmus de minhoca (2:2:1); A:CPT:HM: – Areia + Casca de pinus triturada + Húmus de minhoca (2:2:1); A:CPT:PC:HM – Areia + Casca de pinus triturada + Pó de coco + Húmus de minhoca (2:1:1:1); A – Areia; A:PC – Areia + Pó de coco (1:1); A:CPT – Areia + Casca de pinus triturada (1:1); A:CPT:PC – Areia + Casca de pinus triturada + Pó de coco (2:1:1).

Analisando a massa seca de parte aérea, de *C. macrocarpum* percebeu-se que os menores valores foram obtidos nos substratos onde o húmus de minhoca estava ausente (A, A:PC, A:CPT, A:CPT:PC), com valores entre 4,5 a 11,3 mg (Tabela 18). Enquanto que, a maior massa seca de parte aérea (43,4 mg) foi proporcionada pela mistura de areia, casca de pinus e húmus de minhoca (2:2:1) (Tabela 18). Provavelmente pela melhoria nos aspectos nutricionais do substrato fornecida pelo húmus de minhoca, além da presença de areia e casca de pinus, conferindo melhor propriedade física e suprimento adequado de água.

Quando a análise é feita em *O. maculata* nota-se, no geral, valores mais elevados, sendo os substratos A:CPT:HM, A:CPT:PC:HM, A, A:PC os que proporcionaram os maiores valores (médias de 35,2 mg) (Tabela 18). Resultados similares foram obtidos na aclimatização de *Phalaenopsis* ssp, utilizando misturas contendo casca de pinus, proporcionando maior acúmulo de massa seca, possivelmente por promover uma maior retenção de umidade (AMARAL et al., 2010).

Na variável massa seca de raiz, em *C. macrocarpum* um maior valor de massa seca foi proporcionado pelos substratos A:HM, A:CPT:HM, A:CPT:PC:HM e A:CPT com uma média de (33,58 mg) de biomassa. Enquanto que em *O. maculata*, o maior valor foi obtido com o substrato A (45,46 mg) de biomassa (Tabela 18). Geralmente, as misturas de pó, areia, fibra e casca de pinus favorecem a retenção de umidade e de aeração melhorando as condições físicas das plantas, possibilitando o desenvolvimento e crescimento radicular (AMARAL et al., 2010), corroborando com os resultados obtidos para *C. macrocarpum*. Entretanto para *O. maculata* o maior acúmulo se deu em areia, provavelmente por ser uma orquídea terrestre, comum em ambientes arenosos. *O. maculata* é ainda apontada como espécie invasora de ambientes que sofreram distúrbio, auxiliando na diagnose de interferências em fragmentos florestais (DUBBERN et al., 2013, UENO, 2013).

Em relação aos teores de clorofila A para as duas espécies, não houve diferenças significativas entre os substratos, exceto para *C. macrocarpum*, para o qual o substrato A:CPT:PC registrou o menor valor (6,36) (Tabela 19). Vale lembrar que para este substrato também foram encontrados os resultados mais negativos com relação à sobrevivência, altura de planta, número de folhas, número de raízes, comprimento de raiz e comprimento de folha. Os valores mais baixos com relação à massa seca de parte aérea e massa seca de raiz são compartilhados por A:CPT:PC e A, que aqui também apresenta-se com um dos menores teores de clorofila total.

Para as duas espécies foram obtidas os maiores teores de clorofila A, indicando que essas espécies são apropriadas para receber alta intensidade luminosa (Tabela 19). Esse resultado é semelhante ao observado por Galdiano Júnior (2013), em que encontrou as maiores quantidades de clorofila A em *Cattleya walkeriana*. Esse pigmento atua com maior eficácia na atividade fotossintética, diferente da clorofila A e carotenóides (denominados pigmentos acessórios), desempenhando o processamento da luz e apresentando maior eficiência fotossintética (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Tabela 18. Comprimento de raiz (cm), comprimento de folha (cm), massa seca de parte aérea (mg), massa seca de raiz (mg) de *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth. e *Oeceoclades maculata* Lindl. em função de diferentes misturas de substratos aos 180 dias de cultivo. São Cristóvão, UFS, 2014.

Substratos	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>
----- Comprimento de raiz (cm) -----		
A:HM (1:1)	5,6 bB	8,6 bA
A:PC:HM (2:2:1)	5,6 bB	9,3 aA
A:CPT:HM (2:2:1)	6,6 aB	10,1 aA
A:CPT:PC:HM (2:1:1:1)	4,8 bB	9,5 aA
A	5,2 bB	9,7 aA
A:PC (1:1)	3,8 cB	9,6 aA
A:CPT (1:1)	3,6 cB	9,4 aA
A:CPT:PC (2:1:1)	2,9 cB	8,0 bA
CV (%)	13,44	
----- Comprimento de folha (cm) -----		
A:HM (1:1)	3,3 bA	2,9 bB
A:PC:HM (2:2:1)	2,6 cA	2,7 bA
A:CPT:HM (2:2:1)	3,7 aA	3,3 aA
A:CPT:PC:HM(2:1:1:1)	3,2 bA	2,7 bB
A	2,9 cA	3,1 aA
A:PC (1:1)	2,2 dB	3,3 aA
A:CPT (1:1)	2,9 cA	2,4 cB
A:CPT:PC (2:1:1)	2,2 dA	2,3 cA
CV (%)	12,01	
----- Massa seca de parte aérea (mg) -----		
A:HM (1:1)	28,5 bA	16,6 bB
A:PC:HM (2:2:1)	20,8 bA	23,5 bA
A:CPT:HM (2:2:1)	43,4 aA	33,5 aB
A:CPT:PC:HM (2:1:1:1)	24,2 bB	34,7 aA
A	4,5 cB	33,8 aA
A:PC (1:1)	11,3 cB	38,6 aA
A:CPT (1:1)	10,5 cA	14,4 bA
A:CPT:PC (2:1:1)	9,2 cB	18,4 bA
CV (%)	34,38	
----- Massa seca de raiz (mg) -----		
A:HM (1:1)	34,7 aA	11,2 cB
A:PC:HM (2:2:1)	18,9 bA	16,6 cA
A:CPT:HM (2:2:1)	39,7 aA	24,0 bB
A:CPT:PC:HM (2:1:1:1)	32,2 aA	27,4 bA
A	9,0 bB	45,4 aA
A:PC (1:1)	14,4 bA	24,0 bA
A:CPT (1:1)	27,6 aA	13,1 cB
A:CPT:PC (2:1:1)	19,1 bA	14,9 cA
CV (%)	44,38	

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

**A:HM – Areia+ Húmus de minhoca (1:1 v/v); A:PC:HM – Areia + Pó de coco + Húmus de minhoca (2:2:1); A:CPT:HM: – Areia + Casca de pinus triturada + Húmus de minhoca (2:2:1); A:CPT:PC:HM – Areia + Casca de pinus triturada + Pó de coco + Húmus de minhoca (2:1:1:1); A – Areia; A:PC – Areia + Pó de coco (1:1); A:CPT – Areia + Casca de pinus triturada (1:1); A:CPT:PC – Areia + Casca de pinus triturada + Pó de coco (2:1:1).

Com relação à clorofila B, os valores variam de 2,37 a 3,57, sendo os maiores valores registrados nos substratos A:PC:HM, A:CPT:HM e A:CPT:PC:HM para *C. macrocarpum*, enquanto que *O. maculata* não houve diferenças significativas entre as diferentes misturas de substrato, com valores de 2,2 a 3,0 (Tabela 19). Para a aclimatização dessas espécies foram obtidos os menores teores de clorofila B, mostrando que essas espécies são adaptadas à condição de maior intensidade luminosa. Já que a clorofila B nas folhas submetidas a uma menor luminosidade é uma característica importante, porque a clorofila b recebe energia de outros comprimentos de onda e transporta para a clorofila A, que de fato age nas reações fotoquímicas da fotossíntese e desempenha um mecanismo de adaptação à condição de menor intensidade luminosa (SCALON et al., 2002).

Tabela 19. Clorofila A, clorofila B e total de clorofila de *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth. e *Oeceoclades maculata* Lindl. em função de diferentes misturas de substratos aos 180 dias de cultivo. São Cristóvão, UFS 2014.

Substratos	<i>Catasetum macrocarpum</i>	<i>Oeceoclades maculata</i>
----- Clorofila A -----		
A:HM (1:1)	28,8 aA	26,3 aA
A:PC:HM (2:2:1)	34,3 aA	24,5 aB
A:CPT:HM (2:2:1)	28,3 aA	28,3 aA
A:CPT:PC:HM (2:1:1:1)	33,6 aA	24,7 aB
A	25,7 aA	24,6 aA
A:PC (1:1)	29,4 aA	23,5 aA
A:CPT (1:1)	21,9 aA	18,1 aA
A:CPT:PC (2:1:1)	6,3 bB	27,1 aA
CV (%)	26,40	
----- Clorofila B -----		
A:HM (1:1)	2,3 bA	2,6 aA
A:PC:HM (2:2:1)	2,9 aA	2,3 aA
A:CPT:HM (2:2:1)	3,0 aA	2,9 aA
A:CPT:PC:HM (2:1:1:1)	3,5 aA	2,7 aB
A	2,4 bA	3,0 aA
A:PC (1:1)	2,7 bA	2,5 aA
A:CPT (1:1)	2,5 bA	2,2 aA
A:CPT:PC (2:1:1)	2,5 bA	2,5 aA
CV (%)	21,25	
----- Total de Clorofila -----		
A:HM (1:1)	31,1 aA	28,9 aA
A:PC:HM (2:2:1)	35,0 aA	26,7 aB
A:CPT:HM (2:2:1)	31,3 aA	28,8 aA
A:CPT:PC:HM(2:1:1:1)	37,2 aA	27,5 aB
A	24,1 bA	27,7 aA
A:PC (1:1)	32,5 aA	26,0 aA
A:CPT (1:1)	25,8 bA	20,3 aA
A:CPT:PC (2:1:1)	8,8 cB	29,6 aA
CV (%)	25,78	

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

**A:HM – Areia+ Húmus de minhoca (1:1 v/v); A:PC:HM – Areia + Pó de coco + Húmus de minhoca (2:2:1); A:CPT:HM: – Areia + Casca de pinus triturada + Húmus de minhoca (2:2:1); A:CPT:PC:HM – Areia + Casca de pinus triturada + Pó de coco + Húmus de minhoca (2:1:1:1); A – Areia; A:PC – Areia + Pó de coco (1:1); A:CPT – Areia + Casca de pinus triturada (1:1); A:CPT:PC – Areia + Casca de pinus triturada + Pó de coco (2:1:1).

A razão entre as clorofilas A e B é um indicador de adaptação a diferentes condições de disponibilidade luminosa utilizada na avaliação da quantidade de luz absorvida pelos complexos coletores. A maior quantidade de clorofila A, em ambientes luminosos, pode favorecer a absorção de fótons, uma vez que este pigmento absorve energia em comprimento de onda diferente em relação a clorofila B (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Analisando o teor total de clorofila, observa-se que o menor valor foi proporcionado pela mistura de areia:casca de pinus triturada:pó de coco (8,89) para *C. macrocarpum* e não havendo diferenças significativas entre os substratos para *O. maculata* (Tabela 19). Nestas duas espécies houve um aumento no teor de total de clorofila em relação com a clorofila A do que com a B. Como a degradação da clorofila B é mais difícil, há um aumento relativo da clorofila A.

5. CONCLUSÕES

Para conservação *in vitro* de *C. macrocarpum*, *O. maculata* e *P. estrellensis* por um período de 450 dias, deve-se utilizar 25% dos sais MS à temperatura de 25°C ou 20 g.L⁻¹ de sacarose e 25°C.

A aclimatização de plântulas de *C. macrocarpum* pode ser realizada utilizando areia : casca de pinus triturada:húmus de minhoca (2:2:1) como substrato e para *O. maculata* recomenda-se somente a utilização de areia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R. B. N.; BERTONI, B. W.; VIEIRA, R. F.; FRANÇA, S. C.; MING, L. C.; PEREIRA, A. M. S. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.510-515, 2010.
- AMARAL, T. L.; JASMIM, J. M.; ARAÚJO, J. S. P.; THIÉBAUT, J. T. L.; COELHO, F. C.; FREITAS, C. B. Adubação de orquídeas em substratos com fibra de coco. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.1, p.11-19, 2010.
- ALMEIDA, L. P. de, ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, E. M. de; ZANELA, S. M.; VIEIRA, C. V. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.83-88, 2004.
- ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CARVALHO, J. G.; SOARES, G. A.; Substratos alternativos ao xaxim e adubação de plantas de orquídea na fase de aclimatização. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.569-571, 2007.
- ASSIS, A.M.; FARIA, R.T.; UNEMATO, L.K.; COLOMBO, L.A.; LONE, A.B. Aclimatização de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) em substratos à base de coco. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.3, n.1, p.43-47, 2009.
- ATROCH, E. M. A. C; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, E. M, de. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forticata* LINK submetidas à diferentes condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.4, p.853-862, 2001.
- BALCH, E. P. M.; ARAIZA, M. J. E.; REYES, M. E. P.; Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. Bajo condiciones de crecimiento retardado. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 35, n.4, p. 279-287, 2012.
- BALCH, E. P. M.; ARAIZA, M. J. E.; REYES, M. E. P. *In vitro* Conservation of *agave* spp. germplasm under slow growth conditions. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v.35, n.4, p.279-287, 2012a.
- BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. *Orchidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11322>>. Acesso em: 10 Set. 2013
- BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. *Orchidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 10 Abr. 2014.

- CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrack) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.184-189, 2009.
- CAMOLESI, M. R.; MARTINS, A. N.; SOUZA, L. D. de; SACONI, C. G. Enraizamento *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* sp.) em diferentes meios de cultivo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1446-1451, 2010.
- CANIZARES, K.A.; COSTA, P. C.; GOTO; VIEIRA, A.R. M. Desenvolvimento de mudas de pepino em diferentes substratos com e sem uso de solução nutritiva. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 227-229, 2002.
- CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S.; Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.717-720, 2004.
- CARRIJO O. A.; LIZ R. S.; MAKISHIMA N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 533-535, 2002.
- CARVALHO, L. M.; CASALI, V. W. D; LISBOA, S.P; BARBOSA L. C. A; CECOM, P. R. Crescimento e metabolismo em artemísia em função do nível de irradiância. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.3, p. 289-294, 2006.
- CHAPPELLE, E. W.; KIM, M. S. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm for a remote estimation of the concentrations of chlorophyll A, chlorophyll B, and carotenoids in soybean leaves. **Remote Sensing of Environment**, v.39, p.239-247, 1992.
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.. FONSECA, I.C.B. Influencia do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, v.6, n. 2, p. 253-258, 2004.
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização 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.
- DIVAKARAN, M; BABU, K. N.; PETER , K.V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n.1, p. 175-180, 2006.
- DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **Revista Iheringia, Série Botânica**, v. 66, n.2, p.167-174, 2011.
- DUBBERN, C. A.; LEAL, T. S.; MORAES, C. P. Distribuição espacial de *Oeceoclades maculata* Lindl. (Orchidaceae) em fragmento florestal Estacional Semidecidual da fazenda Santa Tereza, Cordeirópolis, SP, Brasil. **Natureza on line**, v.1, n.11, p.29-32, 2013.

ENGELMANN, F.. *In vitro* germplasm conservation. In: DREW, R.A. [ed.]. Tropical & Subtropical Species. [s.l. : s.n.], p.41-47, 1998.

FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.C.; JUNGHANS, T.G.; LÉDO, C.A.S.; SOUZA, A.S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p. 267-270, 2006.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FREITAS, S. J.; CARVALHO, A. J. C.; BERILLI, S. S.; SANTOS, P. C.; MARINHO, C. S. Substratos e osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.672-679, 2011.

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

GALDIANO-JUNIOR, 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, 2013.

HARDING, K.; BENSON, E. E.; CLACHER, K. Plant conservation biotechnology: An overview. **Agro-Food-Industry Hi-Tech**, 1997.

KNAPIK, J. G. **Utilização do pó de basalto como alternativa à adubação convencional na produção de mudas de *Mimosa scabrella* BENTH e *Prunus sellowii* KOEHNE**. 2005. 163f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Paraná-PR, 2005.

KULAK, M.; GORNIK, M.; ROMOWICZ, A. Tribal and subtribal relationship of Epidendroideae Lindl.(Orchidaceae) with emphasis on Epidendreae Humb., Bonpl.&Kunth based on *matK* gene.**Biodiversity: Research and Conservation**, v. 3, n. 4, p. 205-209, 2006.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2004. 531p.

LÉDO, A. S. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento do coqueiro anão. **Magistra**, v.19, n.4 p.346-351, 2007.

LEMOS, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; RAMALHO NETO, C.E.; ALBUQUERQUE, M.M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M. S; ALVIM, B. F. M.; RESENDE, S. V.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, v.41, n.8, p.1354-1361, 2011.

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.

LUCENA, C. A. **Aclimatización y desarrollo en vivero de Dendrobium Lorrie Mortimer cultivado en seis substratos**. 2008. 53 p. Monografía. (Grado en Ingeniero Agrónomo), Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Cabudare.

MACIA, R. J. **Conservação *in vitro* de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2011. 67 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia-BA, 2011.

MARCO-MEDINA, A.; CASAS, J. L. Polyamine content during minimal growth storage of *Thymus moroderi* explants. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 3, p. 590-594, 2012.

MARINO, G.; NEGRI, P.; CELLINI, A.; MASIA, A. Effect of carbohydrates on *in vitro* low-temperature storage of shoot cultures of apricot. **Scientia Horticulturae**, v.126, n.4, p.434-440, 2010.

MENINI-NETTO, L. ALMEIDA, V.R, FORZZA, R.C. A família *Orchidaceae* em um fragmento de floresta estacional semidecidual, no município de Barroso. **Lundiana**, n.4, p.9-24, 2004.

MILLER, D.; WARREN, R.; MILLER, I. M.; SEEHAWER, H.; **Serra dos Órgãos: sua história e suas orquídeas**. Rio de Janeiro: Scart Editora, 2006. 574p.

MONTEIRO, S. H. N.; CARREGOSA, T.; SANTOS, L. A. S.; NASCIMENTO JUNIOR, J. E. do; PRATA, A. P. do N. Survey of orchidaceae from the State of Sergipe, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 12, n. 2, p. 167-174, 2012.

MONTEIRO, S. H. N. Orchidaceae. In: PRATA, A. P. N.; AMARAL, M. C. E.; FARIA, M. C. V.; ALVES, M. V. **Flora de Sergipe**, v.1, Aracaju: Grafia e Editora Triunfo, 2013. p. 431-490.

MOOSIKAPALA, L.; TE-CHATTO, S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, v.6, n.2, p.401-407, 2010.

MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. da C. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* lindl var *venosa* x *Cattleya warneri* t. moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 2, p. 16-21, 2007.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia-BA, 2008.

MOREIRA, M. A.; DANTAS, F. M.; BIANCHINI, F. G.; VIÉGAS, P. R. A. Produção de mudas de berinjela com uso de pó de coco. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 2, p.163-170, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologiae Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.

NEGASH, A.; KRENS, F.; SCHAART, J.; VISSER, B. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, n.2, p.107-111, 2001.

NUNES, J.; **Orquídeas e Bromélias**. ORQUÍDEA - *Polystachya estrellensis*. 2012. Disponível em <<http://orquideas-bromelias.blogspot.com.br/2012/06/14-orquidea-polystachya-estrellensis.html>> Acesso em 05 nov. 2013.

PESSOTTI, K. V. **Propagação e Conservação *in vitro* de Vriesea sucrei (L.B. Smith & R.W. Read): Bromeliaceae em perigo de extinção da Mata Atlântica**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2009.

POSPÍŠILOVÁ, J., SYNKOVÁ, H., HASEL, D., SEMORÁDOVÁ, S. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid. **Acta Horticulturae**, v. 748, p. 29-38, 2007.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; ROSA-JUNIOR, E. J. Levantamento e características ecológicas de Orchidaceae da mata ciliar do Rio Dourados, Dourados-MS. **Revista Árvore**, v.35, n.3, p.717-724, 2011.

ROCHA, E. L. J.; CARVALHO, A. C. P. P.; AZEVEDO, B. M.; MARINHO, A. B.; VIANA, T. V. A.; VASCONCELOS, D. V. Aclimatização de mudas micropropagadas de helicônia em ambiente protegido em função do tipo de substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.6, p.1457-1462, 2009.

ROCHA, M. A. C.; **Multiplicação e Conservação de Bromeliáceae Ornamentais**. 2010. 99 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia-BA, 2010.

ROSA, S. S.; **Propagação e conservação *in vitro* de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia-BA, 2010.

SÁ, A. J., LÉDO, A. S., LÉDO, C. A. S., Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v.41, n.2, p.57-62, 2011.

SANTOS, C. T. **Propagação e conservação *in vitro* de vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty]**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe-SE, 2011.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; Propagação e conservação *in vitro* de vetiver. **Horticultura Brasileira**, v.30, n.3, p.507-513, 2012a.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENEZES, M. M. L. A.; Conservação *in vitro* de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) ROBERTY (Poaceae). **Bioscience Journal**, v.28, n.6, p.963-970, 2012b.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; RIGONI, M. R.; VERALDO, F. Crescimento inicial de mudas de espécies florestais nativas sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, v.26, n.1, p.1-5, 2002.

SHERLOCK, E. M., **Propagação *in vitro* de *encyclia alboxanthina fowlie* (orchidaceae): espécie endêmica da chapada diamantina** - Bahia. 2009. 69f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Feira de Santana, Bahia-BA, 2009.

SHIRAKI, J. N. Adubação: Necessidade e cuidados nas orquídeas. 2000. Disponível em: <http://orquidarioterradaluz.blogspot.com.br/2008/09/adubao-necessidades-e-cuidados-nas.html>. Acesso em: 19 de jul. 2014.

SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; DUTRA, L.F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de glioxínia (*Sonningia speciosa* Lood. Hiern.) proveniente de cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.2, p.255-260, 2003a.

SILVA, E. F.; **Multiplicação e Crescimento *in vitro* de Orquídeas *Brassiocattleya Pastoral X Laeliocattleya Amber Glow***. 2003. 62f. Dissertação (Mestrado em fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais-MG, 2003b.

SILVA, T.L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.4, p.384-389, 2011.

SINGER, R. Orquídeas brasileiras e abelhas, 2004. Disponível em: <http://www.webbee.org.br/singer/01.htm>. Acesso em: 4 de out. 2014.

SILVEIRA, E. B.; RODRIGUES, V. J. L. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; MESQUITA, J. C. P. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 211-216, 2002.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; ARAUJO, A. G. de. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum, Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 503-507, 2011.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B.; YAMAMOTO, L. Y.; SORACE, M. A. F. Substratos alternativos ao xaxim no cultivo do híbrido *Cattleya intermedia X Hadrolaelia purpurata* (Orchidaceae). **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.4, p.771-778, 2009.

SOUZA, J. A. de; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; SOARES, G. C. Estabelecimento da Propagação *in vitro* de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.1, p.115-118, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed. 2006.

UENO, S.; **Diversidade e estrutura genética de população de *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl.** 2013. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2013.

YOKOTA, S.; KARIM, M. Z.; AZAD, M.A.K.; RAHMAN, M.M.; EIZAWA, J.; SAITO, Y.; ISHIGURI, F.; IIZUKA, K.; YAHARA, S.; YOSHIKAWA, N. Histological observation of changes in leaf structure during successive micropropagation stages in *Aralia elata* and *Phellodendron amurense*. **Plant Biotechnology**, v.24, p.221-226, 2007.

WATT, M. P.; THOKOANE, N. L., MYCOCK, D.; BLAKEWAY, F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.61, n.2, p.161-164, 2004.

WITHERS, L.A; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES et al. [ed.]. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília : EMBRAPA, v.1, p.297-330, 1998.

ANEXOS

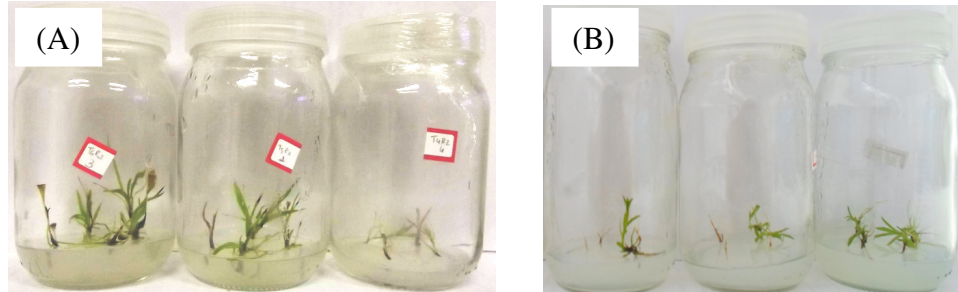


FIGURA 1A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e concentração dos sais MS de *Catasetum macrocarpum* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 270 dias.

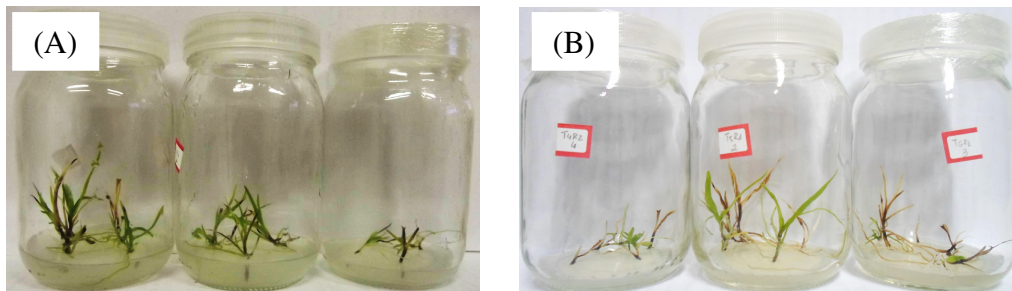


FIGURA 2A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e reguladores osmóticos de *Catasetum macrocarpum* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 270 dias.



FIGURA 3A. Teste de Viabilidade da conservação *in vitro* de *Catasetum macrocarpum* sob 25°C.

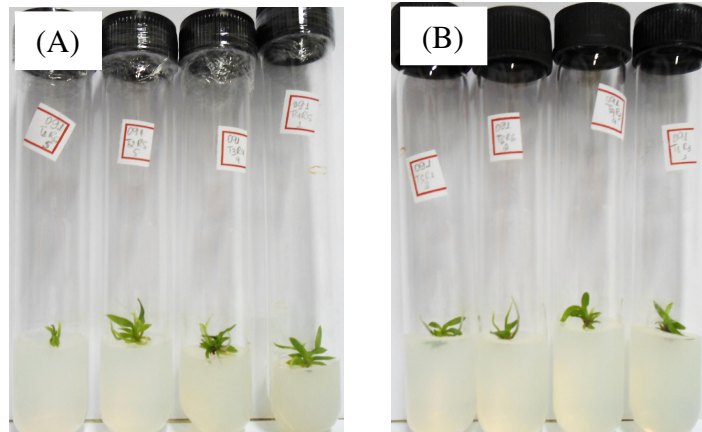


FIGURA 4A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e concentração dos sais MS de *Oeceoclades maculata* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 270 dias.

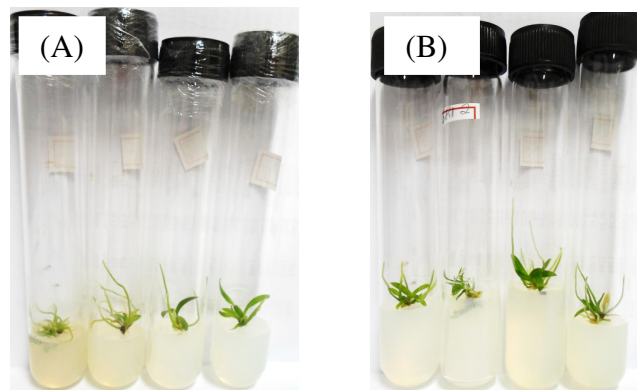


FIGURA 5A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e concentração dos sais MS de *Oeceoclades maculata* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 450 dias.

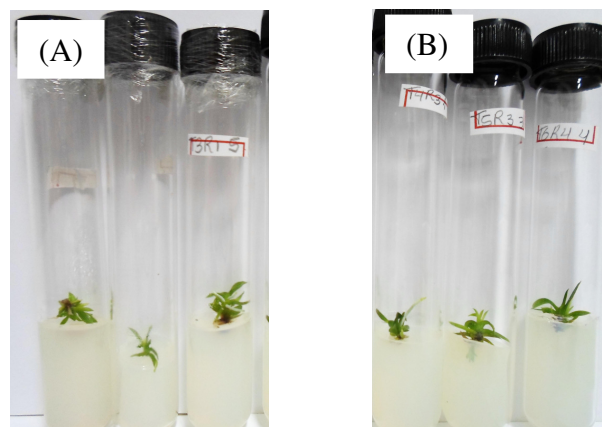


FIGURA 6A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e reguladores osmóticos de *Oeceoclades maculata* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 270 dias.

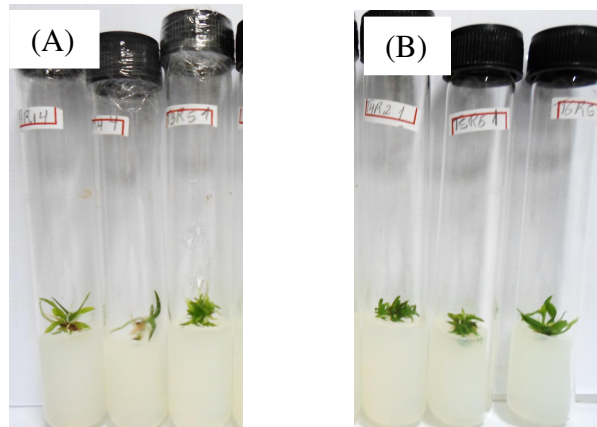


FIGURA 7A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e reguladores osmóticos de *Oeceoclades maculata* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 450 dias.



FIGURA 8A. Teste de Viabilidade da conservação *in vitro* de *Oeceoclades maculata* sob 25°C. Em função da temperatura e concentração dos sais MS (A) e em função da temperatura e reguladores osmóticos (B).

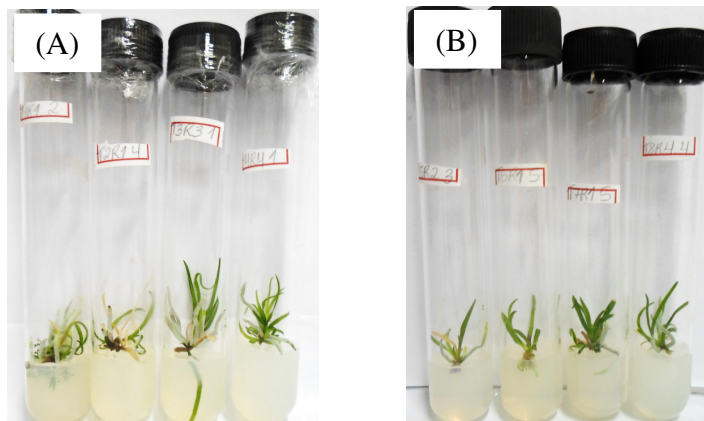


FIGURA 9A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e concentração dos sais MS de *Polystachya estrellensis* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 270 dias.

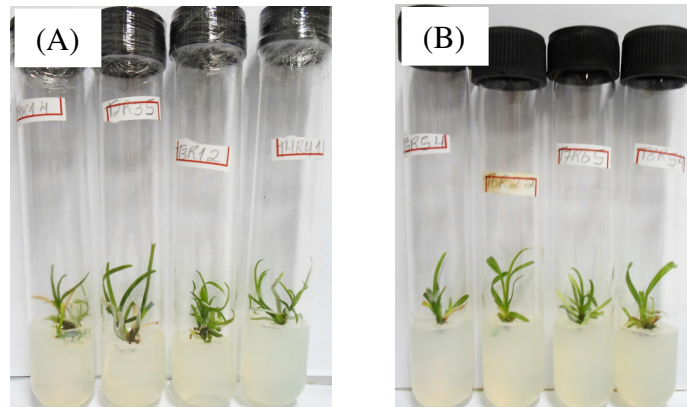


FIGURA 10A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e concentração dos sais MS de *Polystachya estrellensis* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 450 dias.

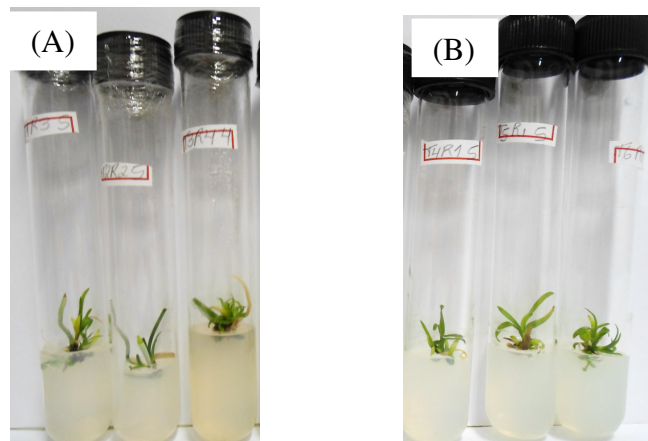


FIGURA 11A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e reguladores osmóticos de *Polystachya estrellensis* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 270 dias.

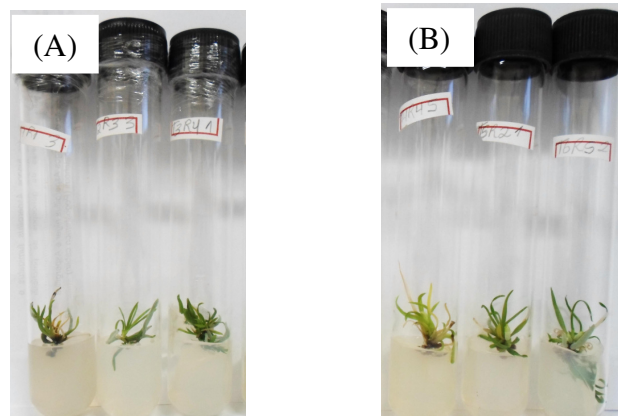


FIGURA 12A. Conservação *in vitro* em função da temperatura e reguladores osmóticos de *Polystachya estrellensis* sob 25°C (A) e 18°C (B) aos 450 dias.

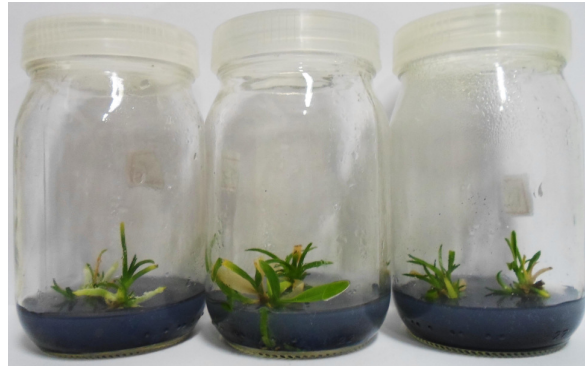


FIGURA 13A. Teste de viabilidade da conservação *in vitro* de *Polystachya estrellensis* sob 25°C. Em função da temperatura e concentração dos sais MS (A) e em função da temperatura e reguladores osmóticos (B).



FIGURA 14A. Plantas aclimatizadas de *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth., após 180 dias de aclimatização nos diferentes substratos. São Cristóvão, UFS, 2014.



FIGURA 15A. Plantas aclimatizadas de *Oeceoclades maculata* Lindl. após 180 dias de aclimatização nos diferentes substratos. São Cristóvão, UFS, 2014.