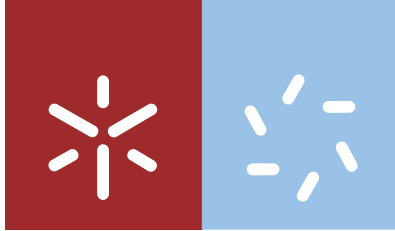


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Mauro Wanderley Braga Lemos

**Micropropagação clonal de orquídeas:
uma abordagem empreendedora**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Mauro Wanderley Braga Lemos

Micropropagação clonal de orquídeas: uma abordagem empreendedora

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho realizado sob a orientação da
Professora Doutora Ana Cunha
e da
Professora Doutora Beatriz Casais

abril de 2014

DECLARAÇÃO

Nome: Mauro Wanderley Braga Lemos

Endereço electrónico: mwlemos@gmail.com

Telefone: 914154778

Número do Bilhete de Identidade: 11234662

Título da dissertação: Micropropagação clonal de orquídeas: uma abordagem empreendedora

Orientadores: Prof. Doutora Ana Cunha e Prof. Doutora Beatriz Casais

Ano de conclusão: 2014

Designação do Mestrado: Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, 30 de Abril de 2014

Assinatura:

Agradecimentos

À Prof. Doutora Ana Cunha, pela sua infindável paciência, simpatia e dedicação que muito contribuíram para que pudesse assimilar o conhecimento por si transmitido.

À Prof. Doutora Beatriz Casais, pela sua orientação, dedicação e contributo para a realização desta tarefa.

Aos meus colegas e amigos, cuja ajuda por vezes discreta foi bastante importante.

À minha família pela paciência e apoio moral, especialmente nas horas mais conturbadas.

A todos eles, o meu mais sincero agradecimento.

Resumo

Apesar de em Portugal as orquídeas não se afirmarem (ainda?) como a classe de plantas mais comercializada, as suas cerca de 25.000 espécies e um sem número de híbridos possuem um valor difícil de ignorar, afinal, elas representam 10% de todas as espécies de angiospérmicas.

A produção *in vitro* de orquídeas tem assumido uma importância vital na economia de alguns países. Entre o risco de extinção, a propagação em massa ou a clonagem de híbridos valiosos, muitas são as razões para se utilizar as técnicas de micropropagação *in vitro* nestas plantas.

Numa primeira parte deste estudo foram seleccionadas quatro espécies de orquídeas pertencentes a alguns dos géneros mais popularizados entre os orquidófilos, nomeadamente: *Phalaenopsis tetraspis*, *Brassia caudata*, *Dendrobium farmeri* e *Cymbidium canaliculatum*. Os explantes usados neste ensaio foram obtidos através de sub-culturas de protocormos diferenciados a partir de plântulas germinadas *in vitro*. Neste projecto foram avaliados diferentes factores com vista à optimização dos protocolos de cultura *in vitro* a cada uma das espécies, de modo a potenciar a proliferação e/ou maturação de protocormos. O primeiro ensaio avaliou o efeito de diferentes meios na cultura nomeadamente o meio Phytamax com extracto de banana e carvão activado (PM), o meio Murashige and Skoog (MS) com carvão activado e o meio Knudson C modificado (KC). Apesar de algumas excepções, o meio PM revelou-se a melhor opção tanto para a proliferação como maturação dos protocormos das espécies em estudo. O efeito da suplementação de reguladores de crescimento, uma auxina (NAA) e uma citocinina (BAP), adicionados isoladamente ou em combinação em meio sólido PM, foi também avaliado. A resposta foi dependente da espécie mas em geral os meios com BAP foram mais proliferativos. Foi igualmente estudado o efeito da intensidade luminosa durante o crescimento das culturas, na competência fotossintética das plantas micropropagadas por fluorometria de pulso modulado (PAM). Verificou-se que as espécies têm capacidades fotossintéticas e susceptibilidades à fotoinibição muito distintas, havendo uma grande margem de melhoria das condições de crescimento das plantas. Por último, atendendo à modernização das técnicas de cultura foi avaliado o sistema de imersão temporária (TIBS), como método alternativo de micropropagação tendo-se usado o meio PM líquido, e dois regimes de imersão diários. Apesar de ter sido um ensaio muito preliminar revelou já algumas potencialidades deste sistema, designadamente na redução da hiperhidricidade e num aumento do potencial de diferenciação de novos protocormos.

Numa segunda parte deste estudo, delineou-se um Plano Estratégico de Marketing num contexto empreendedor de empresa inovadora, nomeadamente de uma futura empresa biotecnológica de gestão própria, identificando as opções estratégicas viáveis que traduzam vantagens competitivas, bem como os diferentes pontos-chave para um possível sucesso operacional.

Abstract

Although orchids in Portugal are not (yet?) the most commercialized class of plants, their 25,000 species and countless hybrids have a value that is hard to ignore, after all, they represent 10 % of all angiosperm species. *In vitro* production of orchids have been assuming an important place in the economy of some countries. The risk of extinction, mass propagation or the cloning of valuable hybrids are among the many reasons to use the techniques of *in vitro* micropropagation in these plants.

In the first part of this study four species of orchids belonging to some of the genus most popularized among orchid growers in particular have been selected: *Phalaenopsis tetraspis*, *Brassia caudata*, *Cymbidium canaliculatum* and *Dendrobium farmeri*. The explants used in this assay were obtained by subculturing protocorms differentiated from *in vitro* germinated seedlings. In this project different factors were evaluated in order to optimize *in vitro* culture protocols for each of the species and enhance the proliferation and/or maturation of protocorms. The first experiment have evaluated different culture media, namely, Phytamax with banana extract and activated carbon (PM), Murashige and Skoog (MS) with activated carbon and the modified Knudson C (KC) medium. Despite some exceptions, the PM medium proved to be the best option for both proliferation and maturation of protocorms. The effect of supplementation with growth regulators, auxin (NAA) and cytokinin (BAP), added alone or in combination to solid PM, was also assessed. The response was species dependent but in general media with BAP were more proliferative. It was also studied the effect of light intensity during growth of cultures, on photosynthetic competence of micropropagated plants, by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. It was found that species have very different photosynthetic capacities and susceptibilities to photoinhibition, existing a large margin for the improvement of micropropagation protocols. Finally, given the modernization of farming techniques, the temporary immersion system (TIBS) was evaluated as an alternative method of micropropagation using liquid PM medium and two regimes of daily immersion. Despite being a very preliminary study, results has shown some potential of this system, namely the reduction of hiperhydricity and an increased differentiation potential of new protocormos.

In the second part of this study, we conceived a Strategic Marketing Plan in the context of entrepreneurial innovation, namely a future biotech company, with self-management, identifying viable strategic options which reflect competitive advantages as well as the different key points for possible success operational.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Parte I – Micropropagação clonal de orquídeas	1
Introdução	2
1. Orquídeas: biologia, ecologia e economia	2
1.1. Principais géneros espontâneos e cultivados comercialmente	2
1.1.1. Género <i>Phalaenopsis</i>	2
1.1.2. Género <i>Cymbidium</i>	3
1.1.3. Género <i>Dendrobium</i>	4
1.1.4. Género <i>Brassia</i>	4
1.2. Particularidades morfo-fisiológicas das orquídeas	5
2. Cultura <i>in vitro</i> de plantas	6
2.1. Um pouco de história	6
2.2. Morfogénese e tipos de cultura <i>in vitro</i>	7
2.2.1. Organogénese	7
2.2.2. Embriogénese somática	8
2.3. Principais classes de reguladores de crescimento	9
2.3.1. Auxinas	9
2.3.2. Citocininas	10
3. Micropropagação de orquídeas	10
3.1. Principais aditivos e meios de cultura	10
3.1.1. Carvão activado	11
3.1.2. Meio Knudson C (KC)	11
3.1.3. Meio Murashige & Skoog (MS) com CA	12
3.1.4. Meio Phytamax (PM) com CA e extracto de banana	12
3.2. Condições e métodos de crescimento das culturas <i>in vitro</i>	12
3.2.1. Características das plantas <i>in vitro</i> e susceptibilidade às condições <i>ex vitro</i>	12
3.2.2. Métodos de cultura	13
4. Racional para selecção de espécies e objectivos do trabalho	13
4.1. Critérios de selecção das espécies	13
4.2. Objectivos do trabalho	14

Material e métodos.....	15
1. Material biológico.....	15
1.1. Espécies e material vegetal de arranque	15
1.2. Explantes.....	15
2. Meios e condições de cultura.....	16
2.1. Meios de cultura.....	16
2.2. Esterilização e condições de assepsia	17
2.3. Condições de crescimento de culturas	18
3. Estabelecimento das culturas e ensaios realizados	18
3.1. Pré-estabelecimento das culturas em meio sólido	18
3.2. Ensaio “diferentes meios”: avaliação da eficácia de 3 meios de cultura na proliferação e desenvolvimento de PLBs.....	18
3.2.1 Desenho experimental	18
3.2.2. Amostragem e variáveis resposta: proliferação e desenvolvimento	19
3.3. Ensaio “reguladores de crescimento”: avaliação do efeito da diferentes suplementações de citocinina (BAP) e/ou auxina (NAA) na proliferação e desenvolvimento de PLBs.....	19
3.3.1. Desenho experimental	19
3.3.2. Amostragem e variáveis resposta: proliferação e desenvolvimento	20
3.4. Ensaio “intensidade de luz”: avaliação do efeito de diferentes níveis de luz de crescimento no desenvolvimento e actividade fotossintética de PLBs	20
3.4.1. Desenho experimental	20
3.4.2. Fluorometria de pulso de luz modelada (PAM).....	20
3.4.3. Amostragem e variáveis resposta: fotossíntese.....	21
3.5. Ensaio “bio-reactores”: avaliação do sistema de imersão temporária (TIBS) na proliferação e desenvolvimento de PLBs.....	22
3.5.1. Desenho experimental	22
3.5.2. Amostragem e variáveis resposta: proliferação e desenvolvimento.	23
4. Aclimação	23
5. Análise estatística.....	24
6. Cronograma.....	24
Resultados	25
1. Ensaio “diferentes meios”: avaliação da eficácia de 3 meios de cultura na proliferação e desenvolvimento de PLBs.....	25
<i>Phal. tetraspsis</i>	25
<i>Bras. caudata</i>	26
<i>Dend. farmeri</i>	26

<i>Cymb. canaliculatum</i>	27
2. Ensaio “reguladores de crescimento”: avaliação do efeito da suplementação do meio de cultura com citocinina (BAP) e/ou auxina (NAA).....	28
<i>Phal. tetraspsis</i>	28
<i>Bras. caudata</i>	29
<i>Dend. farmeri</i>	30
<i>Cymb. canaliculatum</i>	32
Nesta espécie, a maturação foi o processo dominante nas várias variáveis de reguladores acompanhada de uma reduzida ou mesmo inexistente propagação (Fig. 18).....	32
3. Ensaio “intensidade de luz”: avaliação do efeito de diferentes níveis de luz de crescimento na actividade fotossintética de PLBs	32
<i>Phal. tetraspsis</i>	33
<i>Dend. farmeri</i>	34
<i>Cymb. canaliculatum</i>	35
4. Ensaio “bio-reactores”: avaliação do sistema de imersão temporária (TIBS) na proliferação e desenvolvimento de PLBs.....	36
<i>Phal. tetraspsis</i>	36
<i>Bras. caudata</i>	37
<i>Dend. farmeri</i>	38
<i>Cymbidium canaliculatum</i>	39
Discussão	40
1. Selecção do meio de cultura base para a micropropagação das diferentes espécies.....	40
• <i>Phalaenopsis tetraspsis</i>	40
• <i>Brassia caudata</i>	40
• <i>Dendrobium farmeri</i>	41
• <i>Cymbidium canaliculatum</i>	41
2. Optimização do meio de cultura com suplementação reguladores de crescimento para proliferação de protocormos	41
• <i>Phalaenopsis tetraspsis</i>	42
• <i>Brassia caudata</i>	42
• <i>Dendrobium farmeri</i>	42
• <i>Cymbidium canaliculatum</i>	43
3. Regime de luz de crescimento das culturas e competência fotossintética das plantas micropropagadas	43
• <i>Phalaenopsis tetraspsis</i>	44
• <i>Dendrobium farmeri</i>	44

• <i>Cymbidium canaliculatum</i>	45
4. Eficiência do sistema de imersão temporária.....	45
• <i>Phalaenopsis tetraspis</i>	46
• <i>Brassia caudata</i>	46
• <i>Dendrobium farmeri</i>	47
• <i>Cymbidium canaliculatum</i>	47
Conclusão.....	48
❖ <i>Phalaenopsis tetraspis</i>	48
❖ <i>Brassia caudata</i>	48
❖ <i>Dendrobium farmeri</i>	48
❖ <i>Cymbidium canaliculatum</i>	48
Referências bibliográficas.....	49
Parte II – Empreendedorismo em orquídeas	57
Introdução	58
1. Apresentação.....	58
2. Contextualização.....	58
2.1 A globalização	58
2.2. A orientação de mercado	59
2.3. A procura da diferença inovadora.....	59
2.4. Valorizar o auto-presente	60
3. Objetivo do projecto	60
Metodologia	61
1. Estrutura do plano	61
1.2. O questionário.....	61
Análise dos resultados:	63
1.3. Nuvem de referências	63
Planeamento Estratégico de Marketing	64
1. Diagnóstico do macroambiente de mercado	64
2. Diagnóstico do microambiente de mercado.....	66
3. Conhecer o cliente.....	68
3.1 <i>Feedback</i> das apresentações	68
3.2. Resultados dos inquéritos	69
4. Análise do Potencial estratégico	70

5. Segmentação de mercado.....	71
6. Diversidade da oferta – <i>targeting</i>	73
7. Posicionamento	74
8. Marketing Mix	76
8.1 Produto.....	76
8.1.2. Ciclo de vida	77
8.1.3. Qualidade	77
8.1.3. Marca	77
8.1.4. Preço	78
8.1.5. Comunicação.....	78
8.1.6. Distribuição.....	79
9. Plano de acções a implementar	80
10. Orçamento.....	81
Conclusão.....	83
Referências bibliográficas.....	84

Parte I – Micropropagação clonal de orquídeas

Introdução

1. Orquídeas: biologia, ecologia e economia

Orchidaceae é a maior família das plantas com flor, estimando-se que existam cerca de 800 géneros e, pelo menos, 24.000 espécies (World Checklist of the Monocotyledons, 2006) distribuídas por todos os continentes, com excepção da Antártida, ainda que presente em algumas das suas ilhas (Dressler, 1981). Com a sua maior expressão e diversidade em climas tropicais húmidos, as orquídeas compõem uma família bastante diversa que evoluiu e se adaptou a quase todos os habitats terrestres, desenvolvendo estratégias de fixação terrestre e epífita. As áreas geográficas mais ricas em orquídeas incluem: a parte norte dos Andes; Madagáscar; Sumatra e Bornéu, para as orquídeas epífitas; a Indochina, para as espécies tanto epífitas como terrestres; e o Oeste australiano, para as orquídeas terrestres (Cribb, 2003).

Apesar do elevado número de espécies, as orquídeas sofrem uma grande ameaça, dado que, actualmente, quase metade das espécies de plantas vasculares são endémicas de 25 pontos críticos em biodiversidade (Myers, 2000). Nenhuma dessas zonas possui hoje mais de um terço do seu habitat primitivo, sendo que os habitats endémicos que outrora cobriram 12% da superfície terrestre estão agora limitados a 1,4% (Brooks, 2002).

As plantas vasculares epífitas (onde se inserem 70% das espécies de orquídeas) compõem uma grande parte da diversidade vegetal e, muito provavelmente, esta será a forma de crescimento de maior risco de declínio populacional e mesmo de extinção, em consequência da desflorestação de populações suas hospedeiras, das alterações microclimáticas e da sua exploração excessiva pelo seu valor comercial (Sodhi, 2008).

1.1. Principais géneros espontâneos e cultivados comercialmente

1.1.1. Género *Phalaenopsis*

Phalaenopsis (Blume, 1825) é um género com aproximadamente 60 espécies. Estas são nativas do sudeste asiático, mas estendem-se desde as montanhas dos Himalaias até às ilhas Filipinas e norte australiano. Este género é composto por plantas epífitas e ocasionalmente litófilas em ambiente de sombra. Na natureza elas são encontradas debaixo das copas das árvores, protegidas da luz solar directa, crescendo a intensidades luminosas de 200-500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os seus habitats possuem temperaturas médias relativamente elevadas (20-35 °C) mas também se adaptam a temperaturas mais



Fig.1 – Iconografia de *Phalaenopsis amabilis* adaptado de *Lindenia Iconographie des Orchidées* (1890)

confortáveis para os humanos (15-30 °C). De modo semelhante, embora tenham preferência por humidades relativamente elevadas (60-70%) também se adaptam a humidades mais baixas.

As *Phalaenopsis* demonstram um crescimento monopodial, com o crescimento apical de uma a duas folhas anuais. As folhas são alternadas, espessas e de forma elíptica, sendo que quatro a cinco folhas se mantêm na planta, à medida que as folhas mais basais entram em senescência. A planta não possui pseudobolbos. As hastes florais surgem nos segmentos do caule, entre a inserção das folhas (Fig. 1). As *Phalaenopsis* são as orquídeas vendidas em vaso mais populares devido à facilidade de propagação e floração em condições artificiais. A sua popularidade deriva da fácil adaptabilidade ao

ambiente doméstico por parte dos seus híbridos tetraplóides, tornando-se um verdadeiro produto industrial.

1.1.2. Género *Cymbidium*

Cymbidium (Swartz 1799) é um género composto por 52 espécies epífitas, litófilas e terrestres, distribuídas por regiões tropicais e subtropicais da Ásia (norte da Índia, China, Japão, Malásia, Filipinas e Bornéu) e do norte da Austrália.



Fig.2. Iconografia de *Cymbidium giganteum* adaptado de *Lindenia Iconographie des Orchidées* (1890)

As orquídeas pertencentes a este género apresentam um crescimento simpodial e atingem os 60 cm de altura. As hastes florais atingem os 90 cm e surgem da base do pseudobolbo mais recente. As folhas, cerca de oito, são longas, estreitas e alternadas com origem no pseudobolbo (Fig. 2). Na natureza, estas plantas crescem sob uma intensidade luminosa de 300-900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a uma humidade relativa de 50-80%.

Os *Cymbidium*s tornaram-se populares na Europa devido à sua capacidade de sobreviver a baixas temperaturas (até 7 °C, podendo ser ainda inferior se por curtos períodos) e de florirem no Inverno em climas temperados, quando poucas orquídeas o fazem.

1.1.3. Género *Dendrobium*

Dendrobium (Swartz 1799) é um género bastante extenso, composto por aproximadamente 1200 espécies epífitas e ocasionalmente litófilas. A distribuição geográfica deste género compreende



Fig.3. Iconografia de *Dendrobium wardianum* adaptado de *Lindenia Iconographie des Orchidées* (1890)

habitats bastante heterogêneos, como as altas altitudes dos Himalaias, as florestas tropicais e até os climas secos dos desertos australianos, distribuindo-se pelo sul, este e sudeste da Ásia, Japão e Austrália. As orquídeas deste género apresentam desenvolvimento simpodial, desenvolvendo frequentemente pseudobolbos que se unem em forma de cana, com um comprimento superior a 30 cm (Fig. 3). As hastes florais surgem a partir dos pseudobolbos formados no ano anterior. Na natureza este género propaga-se muito frequentemente por reprodução assexuada, através da diferenciação de embriões somáticos (*keikis*, termo vulgarmente utilizado de origem havaiana e que significa “bebé”) ao longo da superfície do caule.

1.1.4. Género *Brassia*

O género *Brassia* (Brown, 1813) é bastante comum no cultivo de orquídeas, a sua notabilidade deriva do formato longo e estreito das tépalas, ou seja, do conjunto indistinto das sépalas e pétalas, podendo atingir os 50 cm, o que lhe valeu o nome de “orquídea aranha” (Fig. 4). Esta característica resulta da uma evolução adaptada ao polinizador, uma vespa predadora de aranhas, que se ilude com



Fig.4. Iconografia de *Brassia caudata* adaptado de *Lindenia Iconographie des Orchidées* (1890)

o mimetismo da flor e entra em contacto com o pólen desta. As orquídeas deste género são estritamente epífitas, ocorrendo desde a Flórida até aos Andes peruanos, cruzando a América tropical, podendo habitar regiões desde altitudes 0 até 1500 metros. As espécies do género *Brassia* são maioritariamente específicas de uma determinada região, no entanto, a *Brassia caudata* pode ser encontrada em toda a área geográfica atrás referida.

1.2. Particularidades morfo-fisiológicas das orquídeas

As sementes das orquídeas contêm um pequeno embrião, de aproximadamente 0,1 mm de diâmetro, desprovido de qualquer endosperma de reserva. Após a germinação, apenas possível na natureza após associação simbiótica com um fungo (geralmente do gênero *Rhizoctonia* sp.) (Bernard, 1909), o embrião dilata-se formando uma estrutura chamada protocormo (Fig. 5). Esta estrutura possui um meristema

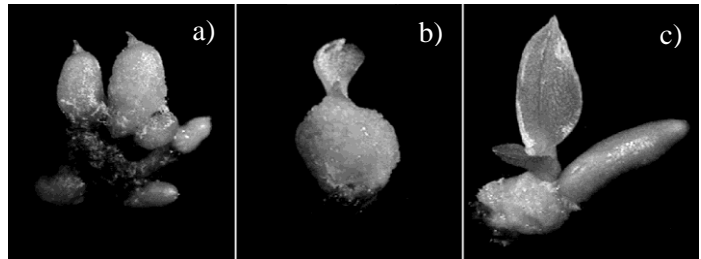


Fig.5. Desenvolvimento *in vitro* de protocormos. a) Fase 1 - Dilatação; b) Fase 2 - Desenvolvimento do meristema caulinar; c) Fase 3 -

caulinar e um meristema radicular quiescentes em pólos opostos. Na natureza, esta estrutura torna-se verde e fotossintética, acumulando deste modo reservas de hidratos de carbono (Veyret, 1974), no entanto, espécies micoheterotróficas (também designadas por saprófitas) poderão manter-se sempre aclorófilas (Leake, 1994). Somente quando as reservas forem suficientes, os meristemas apicais desenvolvem os ápices caulinar e radicular.

Em culturas *in vitro*, estas estruturas embrionárias formam-se diretamente a partir do desenvolvimento do embrião zigótico ou podem diferenciar-se a partir de células somáticas sendo, contudo, semelhantes entre si independentemente da origem celular (Andronova, 1986). Estas estruturas são comumente designadas de *protocorm-like bodies* (PLBs), abreviatura que se irá adoptar neste trabalho a par do termo protocormo.

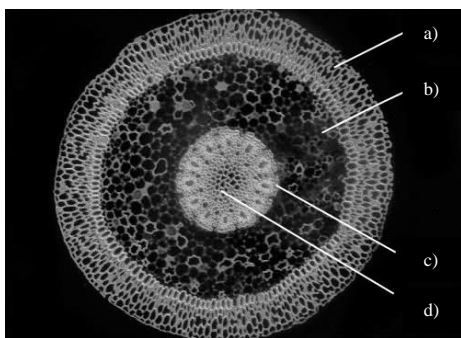


Fig.6. Corte transversal de uma raiz aérea. a) Velame; b) Exoderme; c) Endoderme; d) Cilindro central. (adaptado de Nikon SMZ1500 Fluorescence Image Gallery)

As raízes aéreas das orquídeas são uma característica de referência e distintiva destas plantas. O seu aspecto esbranquiçado provém do velame, uma estrutura multicamada, composta essencialmente por células mortas fortemente lenhificadas, que reveste as raízes aéreas (Fig. 6) e que desempenha várias funções, tais como absorção de água, protecção mecânica e redução da perda de água (Benzing, 1996; Pridgeon, 1987). Mais especificamente, Went (1940) propôs que a função primária do velame seria a captação e

imobilização das soluções que se produzem aquando das primeiras precipitações, cujo conteúdo em nutrientes é mais elevado, e assim permitir uma incorporação eficaz desses nutrientes pelos tecidos vivos subjacentes, hipótese essa que viria a ser comprovada muito recentemente por Zotz (2013).

Um grande número de espécies epífitas realizam fotossíntese tipo CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*) (Benzing, 1989; Luttge, 2004). Entre as várias espécies de orquídeas é provável que

pelo menos metade possa desempenhar este tipo de metabolismo fotossintético, havendo uma prevalência nas espécies epífitas e, em particular, da subfamília Epidendroideae. Pensa-se que esta subfamília se terá expandido no período terciário (Ramirez et al., 2007), um período marcado por importantes alterações climáticas conducentes a uma maior acidificação do solo e um decréscimo na concentração de CO₂ atmosférico (Pearson & Palmer, 2000). No entanto, o metabolismo CAM não parece relacionado com relações filogenéticas entre os *taxa*. Silvera *et al.* (2009) sugerem que, dentro da família Orchidaceae, o metabolismo CAM terá surgido independentemente em vários *taxa* a partir de ancestrais C3. De facto, a maquinaria enzimática necessária ao funcionamento daquela via fotossintética encontra-se presente em todas as plantas, mesmo naquelas exclusivamente C3, e que a diferença nas vias fotossintéticas das plantas reside somente na regulação desta maquinaria (Silvera, 2010).

2. Cultura *in vitro* de plantas

2.1. Um pouco de história

A cultura *in vitro* de plantas pode ser definida como uma cultura asséptica de células, tecidos, órgãos ou plantas em condições nutritivas e ambientais controladas (Thorpe, 2007). Os primeiros trabalhos em cultura de tecidos de plantas remontam ao início do século XX, quando Gottlieb Haberlandt desenvolveu experiências de manutenção de células de mesófilo em cultura, baseado no princípio da totipotência das células vegetais (Haberlandt, 1902). A partir de então, o desenvolvimento tem sido constante, sendo que, anualmente, centenas de artigos são publicados a respeito do desenvolvimento de técnicas e aplicações de cultura *in vitro* de tecidos, quer sejam no âmbito da micropropagação de plantas, da conservação genética da biodiversidade, da produção de compostos secundários, da isenção de vírus causadores de infecções sistémicas em plantas ou de transformações genéticas.

Durante este processo houve vários marcos importantes que foram revolucionando não só as áreas de aplicação das técnicas de cultura de tecidos, como o próprio conhecimento científico.

No início dos anos 20, Knudson descreveu um método eficaz de promover a germinação de sementes de orquídeas em meios de cultura estéreis, sem que estas estabelecessem uma relação de simbiose com qualquer fungo (Knudson, 1922).

Em meados dos anos 20, Went descobriu que uma auxina, mais tarde identificada como ácido-3-indol acético (IAA), promovia a proliferação de células vegetais (Went, 1926). Esta descoberta veio reverter irreversivelmente o que até então mostrava ser uma técnica com um êxito bastante limitado.

Passadas duas décadas, em 1941, Johannes van Overbeek fez outra descoberta que veio revolucionar a cultura *in vitro* de plantas, a evidência de que o leite de coco tinha a capacidade de estimular a divisão celular, à semelhança de outros compostos encontrados em diferentes espécies de plantas (Overbeek, 1941). A primeira citocinina viria a ser isolada em 1955, por Miller e os seus colaboradores, o composto foi baptizado de cinetina pela sua capacidade de promover a divisão celular ou citocinese (Miller, 1955).

Em 1952, um investigador francês, Morel, consegue propagar plantas a partir da cultura do meristema apical caulinar, primeiro em dalias (Morel & Martin, 1952) e depois em batateira (Morel & Martin, 1955). Uma particularidade fundamental destes explantes foi revelarem-se isentos de vírus, apesar de provirem de plantas infectadas. Alguns anos mais tarde, Morel viria a aplicar a sua técnica de cultura de meristemas apicais à multiplicação de *Cymbidium* (Morel, 1960) e de outras orquídeas (Morel, 1963).

2.2. Morfogénese e tipos de cultura *in vitro*

Quase todas as técnicas de cultura *in vitro*, em que o objectivo é propagar e/ou regenerar plantas, se baseiam em dois processos fundamentais de diferenciação e desenvolvimento, ou processos morfogénicos (do grego *morphé* e *genesis*, respectivamente, *forma* e *geração, criação*, literalmente, *iniciação de forma*): a organogénese e a embriogénese somática.

2.2.1. Organogénese

A organogénese refere-se à diferenciação *in vitro* de qualquer órgão vegetal (raízes, folhas, gemas ou rebentos caulinares, ou mesmo flores) a partir de um explante inicial (Thorpe, 1980). Geralmente, quando o que se pretende é a micropropagação, o objectivo principal é a produção de múltiplas gemas caulinares. Estas gemas são estruturas unipolares, estreitamente ligadas ao tecido mãe por conexões vasculares (Thorpe, 1993), sendo necessário, após o seu destacamento do explante, promover o enraizamento de forma a obter uma planta.

O processo organogénico compreende diferentes fases fundamentais, designadamente, a percepção de reguladores de crescimento ou fitohormonas, a desdiferenciação de células somáticas de modo a se tornarem competentes para encetar novas vias de desenvolvimento, a reactivação do ciclo celular de células quiescentes e organização de um meristema e, posteriormente, a divisão e diferenciação celulares de modo a se formar um primórdio de um órgão específico (Hicks, 1994).

É possível distinguir organogénese directa de organogénese indirecta. Nesta última forma-se primeiramente um *callus* (conjunto amorfo de células indiferenciadas) a partir do explante e são algumas destas novas células que posteriormente sofrem diferenciação desenvolvendo-se o órgão específico (Hicks, 1980). Devido ao facto da probabilidade de ocorrer variação cromossómica (ex. alterações de ploidia) durante a proliferação celular do *callus* ser elevada, o processo de organogénese indirecta pode resultar em alterações morfológicas e fisiológicas nos órgãos formados. A este tipo de variação denominou-se variação somaclonal (D'Amato, 1985). A indução de variabilidade e assim de uma maior diversidade de fenótipos de interesse tem tirado partido deste fenómeno.

2.2.2. Embriogénese somática

Nas plantas, o zigoto resultante da fusão dos gametas masculino e feminino é a célula que dá origem ao embrião, o embrião zigótico. No entanto, nas plantas superiores, o zigoto não é a única célula com a capacidade de se desenvolver em embrião. Em determinadas circunstâncias, células dos diferentes tecidos do corpo (do grego, *soma*) da planta, poderão diferenciar um embrião, estrutura bipolar em tudo semelhante ao embrião zigótico (Haccius, 1978), denominado de embrião somático. Certas espécies, como as do género *Kalanchoe*, apresentam embriogénese somática espontaneamente, sendo um modo de reprodução assexuada natural.

O fenómeno da embriogénese somática foi observado primeiramente em culturas *in vitro* em suspensões celulares e *callus* de *Daucus carota* (Reinert, 1959), revelando-se a partir daí um fenómeno generalizado em plantas superiores e estando actualmente descrito para inúmeras famílias de plantas.

À semelhança do acima descrito para a organogénese, a embriogénese somática resulta de duas possíveis vias de desenvolvimento (Ammirato, 1983):

- Directo – com a formação do embrião a partir da diferenciação embriogénica de células do explante;
- Indirecto – com prévia proliferação de um *callus* por mitoses sucessivas e posterior indução de embriogénese e desenvolvimento do embrião.

A embriogénese somática resulta de um conjunto de factores, uns associados às condições culturais, outros hereditários (Williams e Maheswaran, 1986). A resposta embriogénica parece ocorrer em fases sequenciais envolvendo também: percepção de sinais, desdiferenciação e aquisição de competência, indução e diferenciação, durante a qual a organização dos tecidos e órgãos se torna evidente. Consequentemente, a manipulação da composição dos meios de cultura (em particular no

que diz respeito aos reguladores de crescimento) e das condições de crescimento condicionam o processo embriogénico. O estado das plantas, das células e tecidos, do explante em cultura, demonstra igualmente influenciar a competência morfogénica (Carman, 1990).

2.3. Principais classes de reguladores de crescimento

2.3.1. Auxinas

A regulação da distribuição das auxinas ao nível das células e tecidos, mas também ao nível da planta inteira, desempenha um papel fundamental em processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas. Os mecanismos que regulam e promovem o transporte das auxinas durante o desenvolvimento são sensíveis a vários estímulos, nomeadamente luz e gravidade (Teale, 2006). As auxinas são necessárias para a geração e manutenção de meristemas primários, bem como para a formação de meristemas secundários, determinando, por exemplo, a especificação da célula inicial do meristema radicular (Dubrovsky, 2008). Este regulador de crescimento é considerado essencial desde a primeira divisão zigótica (Weijers, 2005). No processo embriogénico, é através da acção das auxinas que se processa a conectividade vascular dos órgãos e que, ao longo do desenvolvimento da planta, células são reactivadas para formarem novos tecidos vasculares e os órgãos laterais (Reinhardt, 2000).

Em cultura de tecidos, a adição de auxinas ao meio poderá desencadear diferentes respostas em função do tecido em cultura, da concentração da auxina e da presença de outros reguladores, por exemplo, um aumento na concentração de auxina poderá passar de uma estimulação de crescimento radicular para uma estimulação de *callus* (Gopitha, 2010). Para a produção de *callus* nos explantes é geralmente necessária a presença de auxina. A aplicação de auxinas parece reverter as células para um estado desdiferenciado e reiniciar a sua divisão. Esta reprogramação parece estar associada a uma metilação anormal do DNA (Lo Schiavo, 1989). A indução da rizogénese em *callus* ou outros explantes é geralmente conseguida pelo tratamento apenas com auxina, bem como o desenvolvimento de raízes adventícias em estacas (Silva, 2013). O processo embriogénico é normalmente iniciado com a presença de grandes concentrações de auxina no meio, no entanto, o desenvolvimento posterior dos embriões em plantas, também designado de conversão, depende da redução do teor em auxina (Sharp, 1980). Atualmente, o IAA e vários compostos análogos sintéticos, como ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D), o ácido 1-naftalenoacético (NAA) e o ácido indol-3-butírico (IBA), são indispensáveis para a investigação em cultura *in vitro* de tecidos vegetais e em micropropagação de orquídeas, em particular.

2.3.2. Citocininas

As citocininas são uma classe de reguladores de crescimento que devem o seu nome à sua capacidade de promover a citocinese, tal como referido anteriormente. O número de compostos considerados citocininas é vasto, nele incluindo-se compostos naturais e sintéticos, derivados da adenina (como é o caso da 6-benzil-aminopurina – BAP - ou benziladenina - BAP) (Shaw, 1994) e da fenilureia (Shudo, 1994). A caracterização química destes compostos tem vindo a ser revista. Dependendo do tipo de citocinina e da espécie em questão, foram já descritas várias respostas fisiológicas que elas podem induzir e identificados os mecanismos que regulam, tais como: abertura estomática (Jewer, 1980), activação de genes do cloroplasto (Zubo, 2008), divisão celular, crescimento das gemas axilares (pela quebra da dominância apical) e estimulação de rebentos caulinares (Werner, 2009).

Na cultura de tecidos, bem como na fisiologia das plantas, as citocininas parecem ser necessárias para a divisão de células vegetais, sendo necessárias à regulação da síntese das proteínas envolvidas no fuso mitótico. Para a proliferação de *callus*, geralmente é requerida a presença de citocinina e auxina no meio de cultura (Gopitha, 2010). As citocininas são bastante eficientes na indução a formação directa ou indirecta de rebentos caulinares, podendo promover inúmeros rebentos por explante (Hussain, 2012). Normalmente, as citocininas estão associadas à inibição da embriogénese, no entanto, baixas concentrações de citocininas poderão ser indutoras deste processo morfogénico (Raza, 2012). Podem também promover *callus* e suspensões mais clorofilinos, visto estarem também associadas à diferenciação de cloroplastos e síntese de clorofila.

3. Micropropagação de orquídeas

O primeiro grande avanço introduzido por Georges Morel na cultura de orquídeas foi a produção de PLBs que podiam ser repicados e propagados em cultura. Esta descoberta possibilitou a micropropagação clonal de uma forma rápida (Morel, 1963). Morel conseguiu este feito usando métodos e protocolos de cultura já existentes mas combinando-os numa aplicação inovadora e eficaz. No entanto, e apesar de ser considerado um pioneiro em micropropagação *in vitro* de orquídeas, foi outro investigador contemporâneo de Morel, Wimber, o primeiro a publicar um protocolo detalhado de propagação *in vitro* de *Cymbidium* baseado em cultura de meristemas (Wimber, 1963).

3.1. Principais aditivos e meios de cultura

3.1.1. Carvão activado

O carvão activado (CA) é um material de origem vegetal, constituído apenas por átomos de carbono dispostos numa estrutura microcristalina não gráfica. O CA tem a propriedade característica de ter um elevado poder de adsorção de sólidos coloidais, gases e vapores (Qadeer, 1994), podendo remover compostos a partir duma solução. O CA tem uma fina rede de poros que lhe proporciona uma extraordinária área superficial por unidade de volume (uma grama terá uma área superior a 500 m²), o que lhe confere uma capacidade única de adsorção (Qadeer, 1994).

Robert Ernst (1916) foi o primeiro investigador a adicionar CA a meio de cultura, descobrindo que plantas de *Paphiopedilum* e *Phalaenopsis* cresciam bem em substratos com CA. Esta descoberta resultou na formulação e difusão de vários meios de cultura contendo CA para germinação de sementes e micropropagação em orquídeas.

O CA é frequentemente usado em cultura *in vitro* de tecidos vegetais, quer em meios líquidos quer em sólidos, contudo, os seus efeitos podem ser benéficos ou prejudiciais, dependendo da espécie e do objectivo em estudo (Pan e Staden, 1998). A utilização de CA, por diferentes autores, ao longo dos anos, validou e documentou bem as suas propriedades benéficas, designadamente: a adsorção de substâncias inibidoras no meio de cultura (Fridborg, 1978); a prevenção do surgimento de plântulas anormais e a estimulação de embriogénese somática (Ziv e Gadasi 1986); a manutenção do pH do meio a um nível ideal para a morfogénese (Owen, 1991); o crescimento do rizoma (Kim e Lee, 1992); a criação de um ambiente escuro no meio e, portanto, simulação das condições do solo *in situ* (Dumas e Monteuis, 1995); a estimulação radicular (George e Ravishankar, 1997); e a diminuição drástica na oxidação de compostos fenólicos (Pan e Staden, 1998).

Encontram-se várias referências à utilização deste composto em cultura *in vitro* de orquídeas. Em 1987, já Waes (1985) usava CA para a cultura *in vitro* de 18 espécies de orquídeas nativas da Europa, em concentrações entre 0,02 % a 0,03 % (p/v), de modo a melhorar o seu desenvolvimento. Actualmente, é ainda realizada investigação acerca dos efeitos do CA, quer adicionado isoladamente quer em associação com reguladores de crescimento (Shin, 2011).

3.1.2. Meio Knudson C (KC)

O meio Knudson C (Knudson, 1946) tem sido amplamente utilizado ao longo dos anos para germinação assimbiótica de sementes e desenvolvimento de orquídeas de diferentes géneros. A sua história reporta à insatisfação de Knudson face ao meio que idealizou para a germinação assimbiótica (Knudson, 1922), isto porque, especialmente com sementes de *Paphiopedilum*, *Vanilla* e *Cypripedium*, os esforços não eram bem-sucedidos. Na altura concluiu que as dificuldades na germinação provinham da deficiência do meio em micronutrientes, tendo posteriormente adicionado

boro, cobre, manganésio e zinco à sua formulação anterior (meio B). Actualmente é frequente encontrar publicações que recorrem a este meio como teste comparativo na eficiência da germinação assimbiótica (Suzuki, 2012) e na avaliação da eficácia da germinação simbiótica em algumas espécies (Mahendran, 2013).

3.1.3. Meio Murashige & Skoog (MS) com CA

O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) é provavelmente o meio mais utilizado em cultura *in vitro* de plantas. Idealizado no início dos anos 60, este meio é bastante equilibrado e completo na sua composição em nutrientes inorgânicos, nele estão presentes todos os macronutrientes e micronutrientes que compõem as necessidades metabólicas dos tecidos vegetais, encontrando-se ainda vários compostos orgânicos, como vitaminas e aminoácidos. Este meio é largamente utilizado para diferentes métodos de micropropagação, quer por embriogénese somática, quer por organogénese, independentemente do explante inicial. Este meio é frequentemente suplementado com outros reguladores de crescimento e compostos que apótem benefícios específicos para a cultura em questão, como seja o carvão activado (Thomas, 2008).

3.1.4. Meio Phytamax (PM) com CA e extracto de banana

Mais recentemente, o meio PM (Sigma, USA) tem vindo a ganhar popularidade em culturas *in vitro* de orquídeas, com resultados interessantes na germinação de sementes (Hossain, 2010) e na proliferação de PLBs (Roy, 2011), em várias espécies de orquídeas. Na sua formulação, o meio PM inclui os mesmos macro e micronutrientes do meio MS mas em metade da concentração. Ao nível de nutrientes orgânicos, para além dos presentes no meio MS, o meio PM contém mais 3 componentes: extracto de banana (30 g/l) (geralmente ref. 1056, Sigma), carvão activado (2 g/l) e peptona (2 g/l).

3.2. Condições e métodos de crescimento das culturas *in vitro*

3.2.1. Características das plantas *in vitro* e susceptibilidade às condições *ex vitro*

As plantas micropropagadas são tendencialmente genética e fisiologicamente uniformes, apresentando-se mais frágeis e susceptíveis ao choque fisiológico da aclimação quando transplantadas para o substrato, quando comparadas com plantas obtidas por processos de macropropagação, tornando-se este passo um factor limitativo (Hazarika 2006). Dois importantes problemas relacionados com a micropropagação de plantas são a deficiência em clorofila dos tecidos regenerados e o fenómeno de vitrificação (Gaspar, 1987) renomeado para hiperhidricidade (Debergh,

1992). Este último, representa uma alteração da anatomia foliar que pode gerar constrangimentos no metabolismo celular e na circulação de gases. Paralelamente, anomalias anatomo-fisiológicas foliares foram observadas em plantas desenvolvidas *in vitro*, como o número de camadas de células do mesófilo, estomas irregulares e não funcionais, degeneração de cloroplastos e cutícula muito fina ou ausente (Chakrabarty, 2006). Estudos com diferentes densidades de fluxos de fótons fotossintéticos (PPFDs) em orquídeas na fase de aclimação revelaram diferenças nos parâmetros fisiológicos das folhas: aumento em assimilação de CO₂, condutância estomática e transpiração em plantas aclimatadas a PPFD mais elevados (450 μmol m⁻² s⁻¹), com diminuição da eficiência fotossintética, comprimento e áreas foliar (Jeon, 2005).

3.2.2. Métodos de cultura

Tradicionalmente, os métodos utilizados na micropropagação de orquídeas recorrem a meios líquidos ou sólidos agarizados. Mais recentemente, a aplicação de métodos de cultura baseados em bio-reactores tem sido vista como uma das melhores formas de reduzir custos de produção por planta, através da massificação de produção e de alguma automatização no processo. Nesta perspectiva, foram sendo desenvolvidos estudos para regeneração de plantas usando PLBs como explante, em bio-reactores (Park, 2000; Yang, 2010), que relatam métodos mais eficientes de micropropagação e uma melhor organogénese, quando comparados com micropropagação em meios sólidos e líquidos (Mehrotra, 2007).

4. Racional para selecção de espécies e objectivos do trabalho





4.1. Critérios de selecção das espécies

Os critérios que pautaram a selecção das espécies de orquídeas para este estudo foram:

- pertencerem a géneros diferentes;
- possuírem comprovado valor comercial;
- serem de difícil micropropagação, quer por dificuldades no surgimento de novos PLBs quer por deficiências no seu desenvolvimento (detectadas em ensaios anteriores).

A Tabela 1 pretende ilustrar as espécies seleccionadas e resumir os principais desafios colocados à sua micropropagação.

Tabela 1. Listagem das espécies em estudo e os desafios para a optimização das suas culturas *in vitro*.

Espécie	Planta em floração	Desafios
<i>Phalaenopsis tetraspis</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Acelerar o tempo de maturação dos PLBs
<i>Brassia caudata</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Potenciar a formação de <i>callus</i> a partir de PLBs • Acelerar o tempo de maturação dos mesmos.
<i>Dendrobium farmeri</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Potenciar a percentagem de maturação dos PLBs, (quebrando a tendência de seguirem unicamente a via da diferenciação e proliferação de novos PBLs).
<i>Cymbidium canaliculatum</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Promover a indução de <i>calli</i> embriogénicos (de modo a incrementar a capacidade reprodutiva)

4.2. Objectivos do trabalho

Este trabalho tem como objetivo principal o estabelecimento de protocolos de micropropagação *in vitro* de quatro espécies de orquídeas, pertencentes a géneros representativos da esfera comercial actual, tendo em conta algumas das suas especificidades e aspectos identificados como limitativos. Com estes protocolos pretende-se, assim, contribuir para uma optimização dos processos de micropropagação de orquídeas, de modo a maximizar a qualidade e uniformidade das plantas, a produtividade em larga escala e a rendabilidade comercial.

Assim, numa primeira parte do trabalho, foram avaliadas diferentes técnicas de micropropagação, bem como o efeito de diferentes factores do meio e ambientais na diferenciação, crescimento e fisiologia das espécies em estudo. Numa segunda parte, foram analisadas em pormenor as componentes de marketing e financeira, que complementam o conceito de empreendimento biotecnológico inovador.

Material e métodos

1. Material biológico

1.1. Espécies e material vegetal de arranque

As espécies utilizadas, pertencentes à classe *Orchidaceae*, foram as seguintes:

- *Brassia caudata* (L.) Lindl. 1824
- *Dendrobium farmeri* Paxton 1849
- *Cymbidium canaliculatum* R. Brown 1810
- *Phalaenopsis tetraspis* Rchb.f. 1868

No âmbito deste trabalho foram adquiridas 20 plântulas de cada uma das quatro espécies em estudo que derivaram da germinação *in vitro* de sementes em regime de autopolinização ou de cruzamento de linhas puras. Estas plantas advêm de uma partilha particular internacional de material de propagação de orquídeas.

1.2. Explantes

As estruturas biológicas utilizadas como explantes nos ensaios de micropropagação foram PLBs, ou simplesmente protocormos. Os explantes utilizados para os ensaios realizados foram obtidos a partir de culturas previamente estabelecidas em meio sólido (Phytamax, Sigma USA), a partir das plântulas adquiridas, e que foram multiplicadas por sucessivas repicagens de PLBs, durante 4 meses (ver detalhes em 3.1 desta secção).

As estruturas em cultura foram classificadas de acordo com o seu estado de desenvolvimento para cada uma das espécies. Estas escalas qualitativas empíricas permitem não só uma melhor uniformização e padronização dos processos de repicagem, como uma caracterização mais detalhada das respostas obtidas em cada ensaio. Os PLBs foram organizados em 3 classes de desenvolvimento, de T-1 (menos desenvolvidos) a T-3 (mais desenvolvidos), como é indicado na Tabela 2. Na Figura 7 é possível visualizar as estruturas nas diferentes fases e classes de desenvolvimento identificadas para as diferentes espécies em estudo.

Tabela 2: Caracterização do grau de desenvolvimento das espécies em cultura *in vitro* de acordo com o tamanho das estruturas. Valores médios expressos em mm.

Espécie	Plântula	PLB T-3	PLB T-2	PLB T-1
<i>P. tetraspis</i>	>20	9±2	6±2	2±1

<i>B. caudata</i>	>25	12±3	9±3	3±1
<i>D. farmeri</i>	>20	11±2	7±2	2±1
<i>C. canaliculatum</i>	>30	16±4	10±3	3±1



Figura 7: Estruturas representativas das diferentes classes de desenvolvimento. Da esquerda para a direita: plântula; PLB-T3; PLB-T2; PLB-T1. a) *Brassia caudata* b) *Dendrobium farmeri* c) *Phalaenopsis tetraspis* d) *Cymbidium canaliculatum*.

2. Meios e condições de cultura

2.1. Meios de cultura

Neste estudo foram utilizados os seguintes meios de cultura (Tabela 3):

- Meio PM ou Phytamax (PhytamaxTM, Sigma ref.^a 1056) (contendo 20 g/L de extracto de banana e 2 g/L de carvão activado);
- Meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 1 g/L de carvão activado (doravante designado por MS-c);

- Meio KC ou Knudson C modificado (Knudson, 1946) suplementado com compostos orgânicos.

Tabela 3 - Composição dos diferentes meios de cultura utilizados.

Componentes	KC (mg/L)	PM (mg/L)	MS-c (mg/L)
Inorgânicos			
NH ₄ NO ₃		825,0	1650,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	500,0		
H ₃ BO ₃	0,056	3,1	6,2
CaCl ₂		166,0	332,2
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	694,4		
CoCl ₂ · 6H ₂ O		0,0125	0,025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0624	0,0125	0,025
Na ₂ EDTA		37,24	37,26
FeSO ₄ · 7H ₂ O	25,0	27,85	27,8
MgSO ₄	122,125	90,35	180,7
MnSO ₄ · H ₂ O	5,682	8,45	16,9
MoO ₃	0,016		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O		0,125	0,25
KI		0,415	0,83
KNO ₃		950,0	1900,0
KH ₂ PO ₄	250,0	85,0	170,0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,331	5,3	8,6
Orgânicos			
Ácido nicotínico	1,0	1,0	1,0
Piridoxina · HCl	1,0	1,0	1,0
Tiamina · HCl	10,0	10,0	10,0
Sacarose	20,0	20,0	20,0
Mioinositol	100,0	100,0	100,0
Peptona		2000,0	
Extrato de banana (50% malto-dextrina)		30,0	
Outros aditivos			
Carvão activado		2000,0	1000,0
Tampão MES (C ₆ H ₁₃ NO ₄ S)		1000,0	

A preparação dos meios efectuou-se através da dissolução dos diferentes constituintes em água bidestilada (quer a partir de soluções *stock* – MS - quer a partir de mistura em pó adquirida comercialmente – Phytamax e Knudson C) e o pH ajustado para 5,7±0,1 com soluções 0,1 N de NaOH ou de HCl. Para os meios sólidos foi adicionado 3 g/L de agente gelificante Phytigel (Sigma). Após atingir ponto de ebulição sob constante agitação, os meios foram vertidos para os recipientes de cultura respectivos, de acordo com o tipo de ensaio (recipientes Magenta, frascos de cultura, bio-reactores).

2.2. Esterilização e condições de assepsia

Os recipientes utilizados para a cultura *in vitro* e os meios foram esterilizados por calor húmido, sendo autoclavados a 121 °C, à pressão de mais 1 atm, durante 20 minutos. Todo o restante material foi esterilizado por calor seco, em estufa a 180 °C, durante 4 h.

Todas as manipulações do material vegetal (desinfecção, iniciação e repicagem) decorreram sob condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar, após esterilização com radiação UV durante pelo menos 15 min e desinfecção da superfície de trabalho com etanol 70%.

2.3. Condições de crescimento de culturas

Em todos os ensaios, sempre que não forem referidas alterações, as culturas foram mantidas em sala de culturas de condições controladas, a 25 ± 2 °C, 55-60% de humidade relativa (HR), com um fotoperíodo de 16 h e uma intensidade luminosa de $25-50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (OSRAM L36W/77).

3. Estabelecimento das culturas e ensaios realizados

3.1. Pré-estabelecimento das culturas em meio sólido

Iniciou-se o estabelecimento das culturas *in vitro* inoculando 5 plântulas por recipiente em meio de cultura sólido Phytamax, como acima descrito, num total de 4 recipientes por espécie.

Durante o desenvolvimento das plântulas, após aproximadamente 4 meses, diferenciaram-se espontaneamente PLBs, com capacidade para diferenciar novos protocormos, à semelhança do processo de embriogénese secundária, ou, quando isolados, desenvolver-se dando origem a uma planta. Os PLBs foram sendo repicados a cada 8 semanas de modo a manter a proliferação de novos protocormos e, assim, obter número de explantes necessários para a realização dos ensaios.

3.2. Ensaio “diferentes meios”: avaliação da eficácia de 3 meios de cultura na proliferação e desenvolvimento de PLBs

3.2.1 Desenho experimental

Para este ensaio foram seleccionados 30 protocormos classe PLB T-2, de cada uma das quatro espécies em estudo. Os explantes de cada espécie foram repartidos pelos 3 meios em estudo (10 PBLs cada), inoculados em recipientes Magenta (Sigma) contendo 50 ml de meio de cultura sólido sem qualquer suplementação hormonal. Os meios de cultura testados foram:

- **Meio PM**
- **Meio MS-c**
- **Meio KC**

3.2.2. Amostragem e variáveis resposta: proliferação e desenvolvimento

De modo a avaliar a influência de diferentes meios de cultura na multiplicação e no desenvolvimento das estruturas vegetais das diferentes espécies, monitorizou-se por contagem directa não destrutiva o número de estruturas correspondentes a cada classe de desenvolvimento, a cada 4 semanas. Outros parâmetros foram igualmente monitorizadas embora possa não ter sido pertinente a sua apresentação em todos os ensaios, nomeadamente o nº de *callus* embriogénicos formados e necroses. A amostragem final realizou-se ao fim de 20 semanas.

3.3. Ensaio “reguladores de crescimento”: avaliação do efeito da diferentes suplementações de citocinina (BAP) e/ou auxina (NAA) na proliferação e desenvolvimento de PLBs

3.3.1. Desenho experimental

Paralelamente ao ensaio anterior iniciou-se um segundo onde se pretendeu analisar o efeito da adição de dois reguladores de crescimento, a auxina ácido 1-naftalenoacético (NAA) e a citocinina 6-benzilamino purina (BAP ou BA), no desenvolvimento e proliferação de PLBs. Para este ensaio utilizou-se apenas o meio de cultura sólido Phytamax (PM) (meio tradicionalmente utilizado na manutenção das culturas), tendo-se suplementado com diferentes concentrações de NAA e/ou BAP (Tabela 4). Tal como anteriormente, foram seleccionados 10 PLB T-2 por variante, num total de 8 variantes e 80 explantes por espécie.

Tabela 4 – Combinações hormonais de auxina e/ou citocinina e respectivas concentrações testadas em meio PM sólido.

Reguladores de crescimento (mg/L)	
#1	BAP 0,5
#2	NAA 0,5
#3	BAP 1,0
#4	NAA 1,0
#5	BAP 0,5 + NAA 0,5
#6	BAP 0,5 + NAA 1,0
#7	BAP 1,0 + NAA 0,5
#8	BAP 1,0 + NAA 1,0

3.3.2. Amostragem e variáveis resposta: proliferação e desenvolvimento

De modo a avaliar a influência de reguladores de crescimento na proliferação e no desenvolvimento das estruturas vegetais das diferentes espécies, monitorizou-se as culturas a cada 4 semanas, à semelhança do descrito para o ensaio anterior. A amostragem final realizou-se ao fim de 20 semanas.

3.4. Ensaio “intensidade de luz”: avaliação do efeito de diferentes níveis de luz de crescimento no desenvolvimento e actividade fotossintética de PLBs

Com este ensaio pretendeu-se avaliar o efeito de 3 densidades de fluxo de fotões (*Photosynthetic Photon Flux Density*, PPFs) durante o período de crescimento, na competência fotossintética de PLBs e eventual impacto na aclimação *ex vitro* das plantas micropropagadas.

3.4.1. Desenho experimental

Neste ensaio foram inoculados 6 PLB T-2 (2 por frasco de cultura), de cada uma das quatro espécies, em 30 ml de meio de cultura PM sólido. As culturas foram mantidas em sala de culturas, nas condições de temperatura, HR e fotoperíodo acima descritos, tendo-se testado as seguintes condições de luz de crescimento:

- Baixa Luz (**BL**) - $15-20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Média Luz (**ML**) - $40-50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Alta Luz (**AL**) - $100-125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

3.4.2. Fluorometria de pulso de luz modelada (PAM)

Para a determinação dos parâmetros fotossintéticos dos PLBs e plantas *in vitro*, utilizou-se a fluorometria de pulso de luz modelada (PAM-210, Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Esta é uma técnica de medição de fluorescência das clorofilas do fotossistema II (PSII) das membranas tilacoidais, caracterizada por ser não invasiva, rápida e de elevada sensibilidade e versatilidade, permitindo avaliar a competência fotoquímica e não fotoquímica de diferentes materiais vegetais fototróficos e mixotróficos, designadamente de culturas *in vitro*, materiais geralmente de dimensões diminutas e com baixo teor em clorofila. O controlo das operações, registo dos rendimentos em fluorescência e cálculo dos parâmetros foi efectuado pelo *software* PAM Win (Walz GmbH, 1997) instalado num PC acoplado ao aparelho.

Foi realizado um ensaio de análise de fluorescência de modo a determinarem-se sequencialmente vários parâmetros fotoquímicos e não-fotoquímicos, designadamente:

- **Eficiência quântica máxima do PSII:** $F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$
- **Eficiência quântica efectiva do PSII:** $\Phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_t}{F_m'}$
- **Taxa de Transferência de Electrões no PSII:** $ETR = (\Phi_{PSII} \times PAR \times 0,5 \times 0,84)$
- **Amortecimento não-fotoquímico da fluorescência (do inglês, *Non-Photochemical Quenching*, NPQ):** $NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$

A figura 8 ilustra uma sequência tipo revelando rendimentos em fluorescência registados e tipos de luzes operacionais (ML, AL e SP).

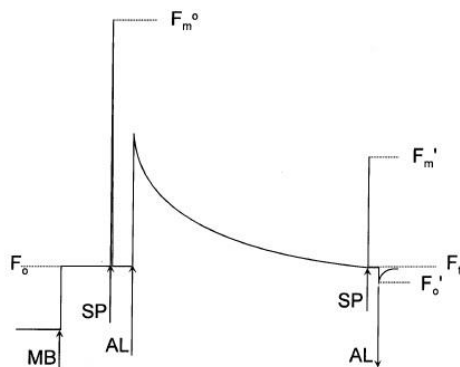


Fig. 8 - Sequência típica de um perfil de fluorescência: Liga-se a luz de medição (ML) e mede-se a fluorescência basal (F_0). Após um pulso saturante (SP) mede-se a fluorescência máxima (F_m). Liga-se a luz actínica (fotossinteticamente activa) durante um período de tempo, verificando-se no traçado que o aumento transiente de fluorescência é amortizado para níveis quase basais (F_t), que resultam de processos fotoquímicos e não-fotoquímicos. Após outro pulso

de luz saturante (SP) obtêm-se novo pico de fluorescência mas em condições de adaptação à luz (F_m'), inferior ao F_m . Ao desligar-se a luz actínica (AL) a fluorescência decai para níveis geralmente inferiores a F_0 (F_0'), pelo facto dos processos não fotoquímicos ainda não terem sido relaxados.

3.4.3. Amostragem e variáveis resposta: fotossíntese

Quando as culturas atingiram as 16 semanas, procedeu-se à amostragem final. Os frascos com as culturas foram colocados no escuro e estas deixadas a adaptar a estas condições durante pelo menos 30 min. Os PLBs eram posteriormente removidos do frasco, um de cada vez, e colocados com a página superior da folha mais longa em contacto sob suporte do fluorómetro, estabilizando o conjunto com disco magnético próprio. Após emissão de um pulso de luz saturante (SP; $>3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 800 ms) registou-se o rendimento em fluorescência basal (F_0 , medida imediatamente antes do SP) e fluorescência máxima (F_m) e determinou-se a eficiência quântica máxima (F_v/F_m). Seguidamente, acendeu-se a luz actínica durante 5 min., seleccionando uma intensidade cerca de 3x superior à PPFD de crescimento das culturas em questão (BL - 68, ML - 158; e AL - $318 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A eficiência quântica efectiva do PSII (Φ_{PSII}) foi determinada após emissão de novo SP, que induz agora um máximo em fluorescência do PSII para estas condições de luz (F_m'), e posteriormente calculada a taxa de transporte de electrões no PSII (ETR).

De modo a testar a resposta das plantas a uma PPF superior, alterou-se a luz actínica para uma intensidade aproximadamente 9x superior às condições de cultura (BL - 218, ML - 448; e AL - 858 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), novamente durante 5 min., e após outro SP foi registado novo F_m' e calculado o amortecimento não fotoquímico da fluorescência, ou NPQ, que será tanto maior quanto mais eficientes forem os processos não-fotoquímicos de dissipação de energia excitatória absorvida pelo PSII.

Por último, e sempre amostrando o mesmo local da folha, realizou-se uma curva rápida de resposta da fotossíntese à luz (RLC, do inglês *Rapid Light Curve*), com uma série crescente de luz actínica (68, 98, 128, 158, 218, 318, 448, 608, 858, 1258 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com 20 s de duração em cada incidência.

3.5. Ensaio “bio-reactores”: avaliação do sistema de imersão temporária (TIBS) na proliferação e desenvolvimento de PLBs

No sentido de avaliar o efeito do sistema de imersão temporária no desenvolvimento e maturação das culturas, foram utilizados bio-reactores tipo TIBS com dimensões 180x150x150mm e capacidade para 500 ml de meio de cultura líquido (Plant FormTM). Este equipamento possui a capacidade de submergir a plataforma das culturas durante o tempo desejado e de, paralelamente, promover o arejamento em circuito independente, permitindo assim estudar as variáveis imersão e ventilação. No ensaio realizado, contudo, apenas se testou diferentes tempos diários de imersão.

3.5.1. Desenho experimental

Neste ensaio foram utilizados 10 PLB-T2 de cada uma das quatro espécies e meio de cultura PM líquido. Com o auxílio de um separador organizaram-se 2 compartimentos dentro de cada um dos bio-reactores, tendo-se inoculado cada compartimento com os explantes de uma espécie distinta (Fig. 9). Deste modo foi possível testar duas durações diárias de imersão para as quatro espécies:

- Imersão de duração mais curta (**I₄₈**) - 4 imersões diárias de 10 min. cada (+ 2 min de descida do meio) num total de **48 min / dia**
- Imersão de duração mais longa (**I₉₆**) – 8 exposições diárias de 10 min. cada (+ 2 min de descida do meio) num total de **96 min / dia**,

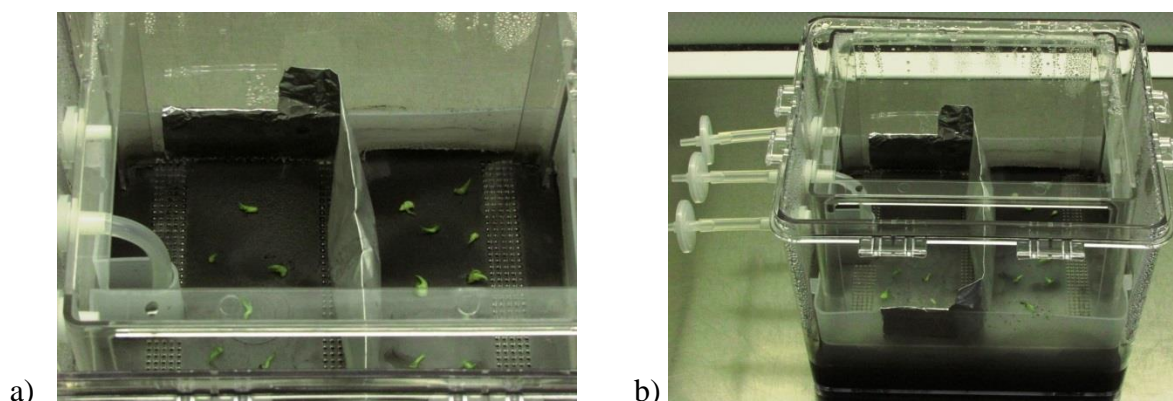


Fig 9. – Imagem de um bio-reactor com meio de cultura e inoculado com PLB T-2. Pode observar-se a disposição dos explantes (a), a disposição do separador (a, b) e o nível inicial do meio PM líquido (b).

3.5.2. Amostragem e variáveis resposta: proliferação e desenvolvimento.

No sentido de analisar a eficiência dos vários tratamentos para a definição de uma alternativa de protocolo de micropropagação, os diferentes ensaios foram mantidos durante 16 semanas e, no final, as culturas foram analisadas para avaliação do seu desenvolvimento, maturação e avaliação da sua competência fotossintética. No caso do desenvolvimento mediram-se/calcularam-se as seguintes variáveis e parâmetros:

- Peso fresco e peso seco
- Produtividade (Nº PLBs/explante)
- Maturação (Nº Plântulas/explante)

4. Aclimação

A aclimação é um processo bastante exigente para as novas plantas, ele requer condições físicas adequadas, normalmente associadas a estufas de grande precisão climática, especialmente a nível de humidade relativa e temperatura. Neste projecto pretendeu-se simular essas condições com alternativas de baixo custo que permitam que o processo decorra para além do local de produção, ou seja, numa perspectiva comercial, as plantas possam ser vendidas ainda em fase de aclimação, finalizando este fase na “nova casa”.

À data, o processo de aclimação ainda se encontra a decorrer, com as plantas submetidas a um processo de contacto com substrato mas sob luz artificial de intensidade 2x superior às condições de cultura ($80-100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Este processo consiste na incorporação da planta numa saqueta de

plástico semi-fechada, preenchida com raspas de madeira (mistura de madeiras macias, ex. pinho e faia) bastante humedecida de modo a criar uma pequena atmosfera com uma humidade relativa perto dos 100%.

5. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através de análise de variâncias (ANOVA 1-way e 2-way) seguidos de pós-testes Tukey (em 1-way) e Bonferroni (2-way) para as comparações múltiplas.. Esta análise foi efectuada no programa Prism vs.5 (GraphPad Software, Inc.). A significância encontrada é indicado com a notação de letras, em que médias com letras iguais não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

6. Cronograma

Na Figura 10 mostra-se um esquema resumo dos ensaios realizados.

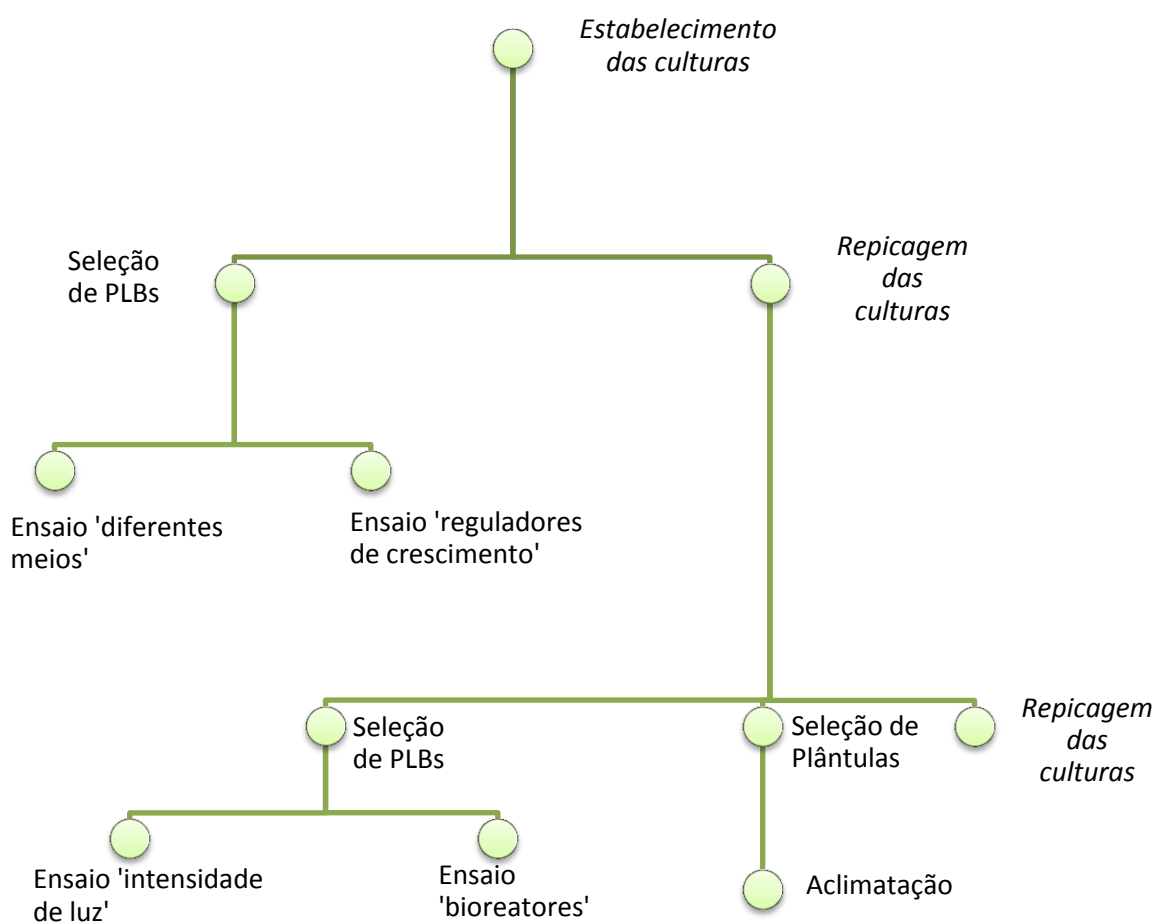


Fig 10- Cronograma geral dos ensaios realizados.

Resultados

1. Ensaio “diferentes meios”: avaliação da eficácia de 3 meios de cultura na proliferação e desenvolvimento de PLBs

A diferenciação e desenvolvimento de protocormos das espécies *Phal. tetraspsis* (Fig.11), *Brass. caudata* (Fig.12), *Dend. farmeri* (Fig.13) e *Cymb. canaliculatum* (Fig.14) a crescer nos meios PM, MS-C e KC foi monitorizada ao longo de 20 semanas, tendo sido feitas amostragens às 4, 12 e 20 semanas.

Phal. tetraspsis

Esta espécie apresentou diferentes respostas aos diferentes meios em estudo (Fig. 11).

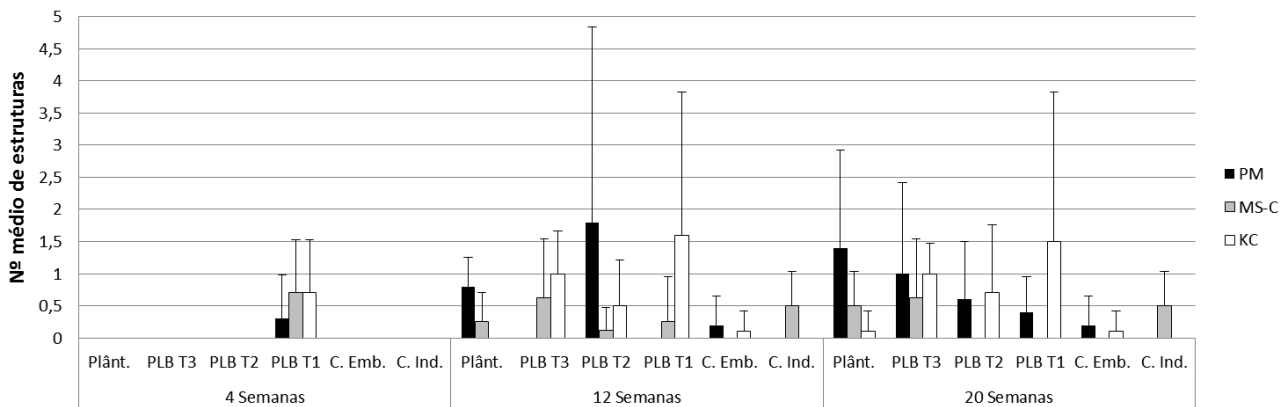


Fig. 11 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Phal. tetraspsis* crescidas em 3 meios diferentes (PM, MS-c e KC) ao longo de 20 semanas de cultura.

Apesar da variabilidade observada, é também evidente que as culturas desta espécie responderam diferentemente aos 3 meios de cultura testados. Ao fim de 4 semanas de cultura apenas se registaram protocormos PL T-1 nos 3 meios, parecendo, MS-C e KC, meios mais produtivos que PM nesta fase inicial de proliferação. Contudo, ao fim de 12 semanas é visível uma maior maturação em plântulas no meio PM, seguida do meio MS-C, não se registando este nível de desenvolvimento no meio KC. Nesta altura PBLs mantidos em meio PM apresentaram um maior número de PLB T-2, em meio KC maior número em estruturas PLB T-1, ambos com alguma produção de *calli* embriogénicos, enquanto que em meio MS-C os novos protocormos diferenciados se encontram distribuídos pelas diferentes fases de desenvolvimento.

Na amostragem final, manteve-se uma predominância de plântulas e de PLBs em fases mais desenvolvidas no meio PM tendo-se ainda verificado a manutenção de diferenciação de novos

protocormos. Já o meio MS-C, apenas com plântulas e PLB T-3, parece ter induzido uma proliferação de novos PLBs mais limitada, parecendo ocorrer apenas o desenvolvimento dos diferenciados numa fase inicial e a produção de *callus* indiferenciado. No meio KC não se verificou uma alteração significativa ao padrão observado às 12 semanas, com predominância de protocormos PLB T-1.

Bras. caudata

Ao longo do ensaio, foi notório um desenvolvimento pouco significativo dos protocormos (Fig. 12)

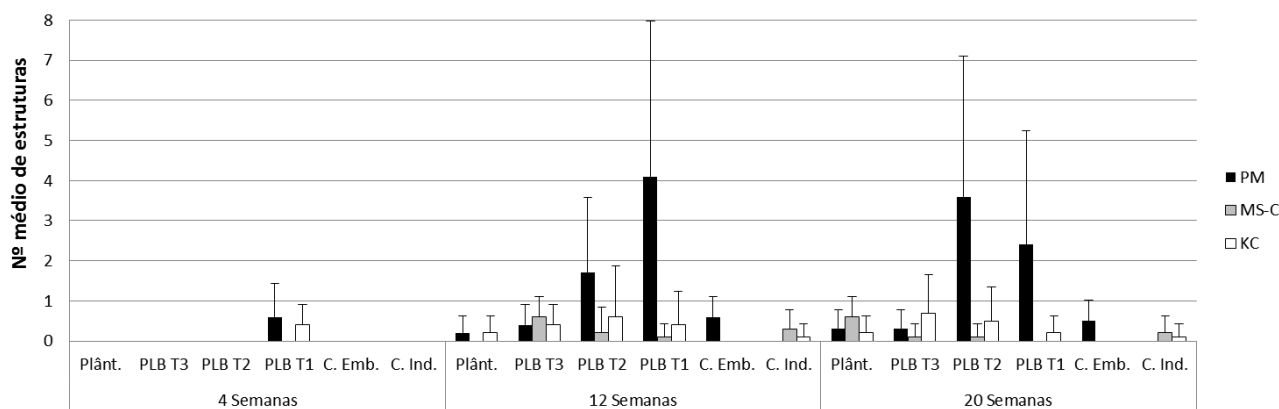


Fig. 12 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Bras. caudata* crescidas em 3 meios diferentes (PM, MS-c e KC) ao longo de 20 semanas de cultura.

Na primeira amostragem, com 4 semanas de cultura foi possível observar uma diferença na propagação, tendo os meios PM e KC um relevante desempenho na proliferação inicial. Nesta espécie, não houve nenhuma maturação significativa nos explantes até esta data.

A meio do ensaio, houve uma ligeira maturação em plântulas dos meios PM e KC, ficando o meio MS-C sem maturação a este nível. A nível da propagação, o meio PM revelou o melhor número em estruturas PLB-T2 e bastante melhor em estruturas PLB-T1, com produção de *calli* embriogénicos. A esta data, os meios MS-C e KC já desenvolviam *calli* indiferenciados.

Na passagem para a amostragem final, o meio PM perdeu a liderança na produção de plântulas para o meio MS-C. A nível da propagação, o meio PM evidenciou uma produção muito superior de estruturas T1 e T2, sendo o único onde se desenvolveram *calli* embriogénicos.

Dend. farmeri

Os explantes deste espécie do género *Dendrobium*, demonstraram um grande potencial de propagação em contraste com a sua capacidade de desenvolvimento (Fig. 13).

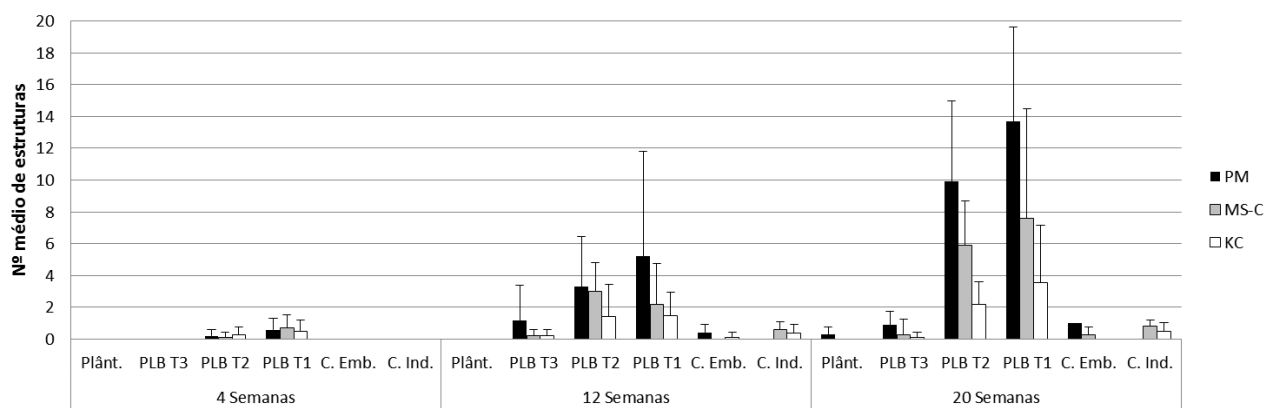


Fig. 13 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Dend. farmeri* crescidas em 3 meios diferentes (PM, MS-c e KC) ao longo de 20 semanas de cultura.

Nas 4 semanas iniciais de cultura foi possível observar uma propagação semelhante nos 3 meios. Nesta espécie, não houve nenhuma maturação significativa nos explantes até esta data.

Ao longo do sucessivo desenvolvimento, não se verificou uma maturação a nível de plântula em nenhum dos meios. No entanto, houve uma maturação em PLB-T3 mais eficaz por parte do meio PM, ficando os restantes meios com uma maturação residual a este nível. A nível da propagação, o meio PM revelou o melhor número em estruturas PLB-T2, e significativamente melhor em estruturas PLB-T1, seguido em bambos os casos pelo meio MS-C, ambos com uma presença residual de *callus* embriogénico. A esta data, os meios MS-C e KC já desenvolviam *calli* indiferenciados.

No final do ensaio, o meio PM foi o único a revelar maturação em plântulas, ainda que muito reduzida. A nível da propagação, os meios PM e MS-C revelaram uma produção bastante significativa de estruturas T1 e T2, com vantagem para o meio PM. O meio KC revelou a maturação e propagação menos satisfatória, tendo a esta data uma média de *callus* indiferenciado significativa, a par com o meio MS-C.

Cymb. canaliculatum

Esta espécie evidenciou-se pela sua capacidade em desenvolver quase todos os explantes iniciais até à fase de plântula dos 3 meios (Fig. 14).

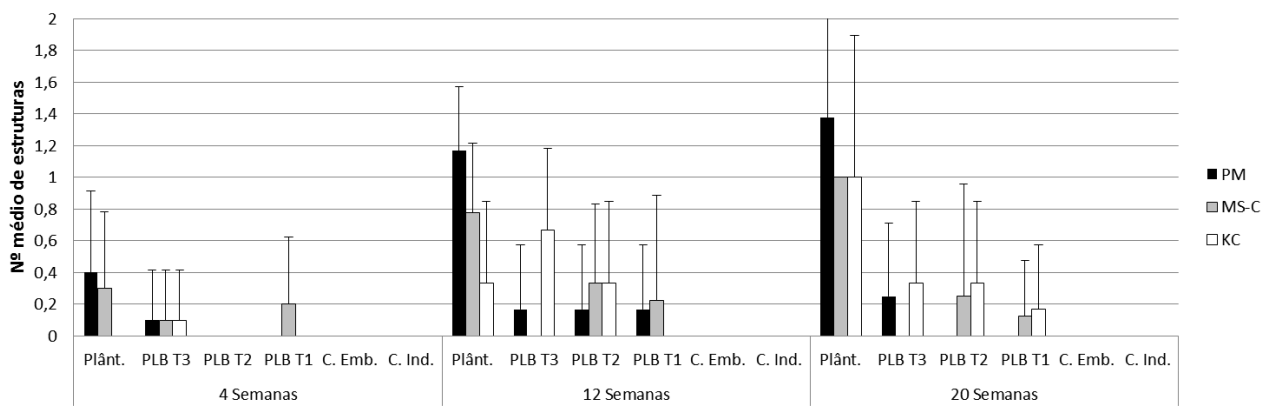


Fig. 14 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Cymb. canaliculatum* crescidas em 3 meios diferentes (PM, MS-c e KC) ao longo de 20 semanas de cultura.

Na amostragem inicial, às 4 semanas de cultura já foi possível observar uma diferenciação das estruturas em plântulas, tendo os meios PM e KC um relevante desempenho nesta diferenciação mais precoce. Nesta espécie, apenas o meio MS-C proliferou novas estruturas até esta data. Após 8 semanas, houve um aumento na maturação em plântulas dos meios PM e KC, ficando o meio MS-C com o valor médio mais baixo a este nível. A nível da propagação, o meio MS-C revelou o melhor número em estruturas PLB-T2 e PLB-T1, mas sem qualquer produção de *calli* embriogénicos. Na passagem para a amostragem final, o meio PM manteve a liderança na diferenciação de plântulas, seguido pelo meio MS-C. A nível da propagação de PLB-T1s, todos os meios revelaram valores sem diferenças significativas. Neste ensaio, não houve qualquer produção de *calli* embriogénicos.

2. Ensaio “reguladores de crescimento”: avaliação do efeito da suplementação do meio de cultura com citocinina (BAP) e/ou auxina (NAA)

A diferenciação e desenvolvimento de protocormos das espécies *Phal. tetraspsis* (Fig.15), *Brass. caudata* (Fig.16), *Dend. farmeri* (Fig.17) e *Cymb. canaliculatum* (Fig.18) a crescer nos meios suplementados com BAP e NAA em diferentes combinações foi monitorizada ao longo de 20 semanas, tendo sido feitas amostragens às 4, 12 e 20 semanas.

Phal. tetraspsis

Neste ensaio, a espécie apresentada revelou uma resposta bastante distinta em função dos reguladores utilizados (Fig. 15).

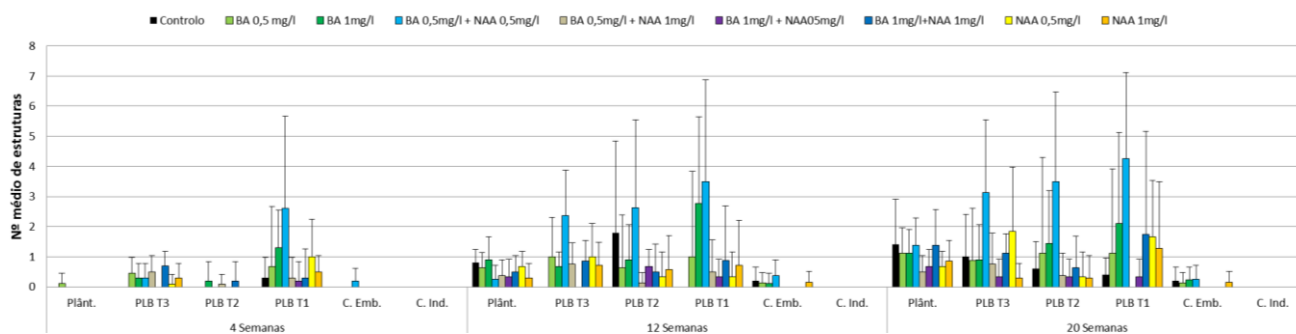


Fig. 15 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Phal. tetraspis* crescidas em meios PM acrescido de diferentes concentrações de auxina/citocinina (BAP 0,5 mg/L, BAP 1 mg/L, BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L, BAP 0,5 mg/L + NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L, BAP 1 mg/L + NAA 1 mg/L, NAA 0,5 mg/L e NAA 1 mg/L), e em PM sem reguladores (Controlo) ao longo de 20 semanas de cultura.

Logo às 4 semanas de cultura foi possível observar uma efeito da suplementação hormonal na diferenciação e desenvolvimento de protocormos. Apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas, devido essencialmente à assincronia do processo morfogénico, a combinação hormonal mais produtiva parece ser a BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L, seguida das BAP 1,0 mg/L e NAA 0,5 mg/L. Apenas a suplementação com BAP 0,5 mg/L gerou uma maturação até fase de plântula. A situação controlo, sem adição de reguladores de crescimento, foi a menos produtiva. Já às 12 semanas, e juntamente com o meio com BAP 1,0 mg/L, o meio não suplementado foi o que conduziu a uma maior maturação de PLBs a plântulas, induzindo também um número elevado de PLBs T-2, enquanto que BAP 1,0 mg/L induziu maior número de protocormos na fase T-1. Ao nível da capacidade proliferativa global, a suplementação BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L revelou ser aquela que induz um maior número de protocormos em valor absoluto mas também um maior diversidade de estruturas em cada momento, com maior número de PLBs nas fases T-3, T-2 e T-1.

A amostragem às 20 semanas veio essencialmente sublinhar a maior capacidade proliferativa mas também de maturação de PLBs do meio BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L aumentando o número de PLBs em todas as fases mas um aumento particularmente elevado de plântulas. Verificou-se igualmente que, de um modo geral, as suplementações apenas com BAP ou com baixas concentrações de BAP e NAA apresentaram melhor capacidade proliferativa. Já as combinações com auxina + citocinina, em concentrações desequilibradas (BAP 1,0 mg/L + NAA 0,5 mg/L e BAP 0,5 mg/L + NAA 1,0 mg/L) limitaram significativamente a diferenciação e desenvolvimento de PLBs nesta espécie.

Bras. caudata

O efeito dos reguladores de crescimento nesta espécie revelou-se indiferenciado entre as diferentes culturas (Fig. 16)

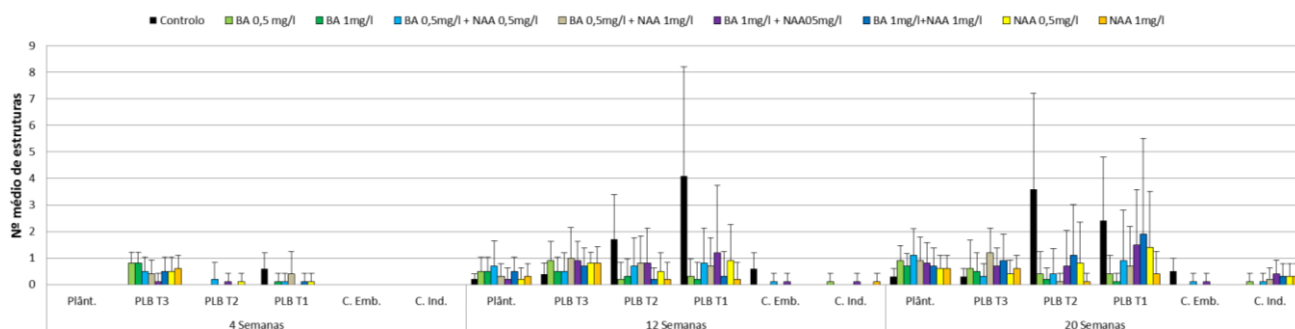


Fig. 16 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Bras. caudata* crescidas em meios PM acrescido de diferentes concentrações de auxina/citocinina (BAP 0,5 mg/L, BAP 1 mg/L, BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L, BAP 0,5 mg/L + NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L, BAP 1 mg/L + NAA 1 mg/L, NAA 0,5 mg/L e NAA 1 mg/L) e em PM sem reguladores (Controlo) ao longo de 20 semanas de cultura.

No primeiro momento de amostragem, a 4 semanas de cultura, foi possível observar uma maturação generalizada, em estruturas PLB-T3. A nível de propagação, os dados demonstram uma distribuição de novas estruturas pelos tratamentos de um modo não significativo.

Durante o ensaio, houve uma maturação em plântulas mais eficaz por parte do meio BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L, sem significado estatístico, seguida dos restantes meio de modo geral. A nível da propagação, todos os tratamentos revelaram um desempenho significativamente inferior aos valores registados pelo controlo. A esta data, registou-se uma presença vestigial de *calli* embriogénicos nos tratamentos BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L e BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L, e *calli* indiferenciado em 3 outros tratamentos sem relação racional entre si.

Na amostragem final, registou-se uma maturação, em plântula, generalizada nos diferentes tratamentos em ensaio. A nível da propagação, os dados demonstram uma distribuição de novas estruturas pelos tratamentos de um modo não significativo, com ligeira vantagem para o tratamento BAP 1 mg/L + NAA 1 mg/L. A nível de *calli* embriogénicos, apenas se mantiveram as estruturas geradas anteriormente. Na parte final do ensaio, registou-se uma proliferação generalizada de *calli* indiferenciados, contrariamente ao verificado no controlo ainda que não significativamente.

Dend. farmeri

À semelhança do ensaio “3 meios”, também neste ensaio esta espécie evidenciou-se pela sua capacidade em desenvolver um grande número de PLBs (Fig. 17).

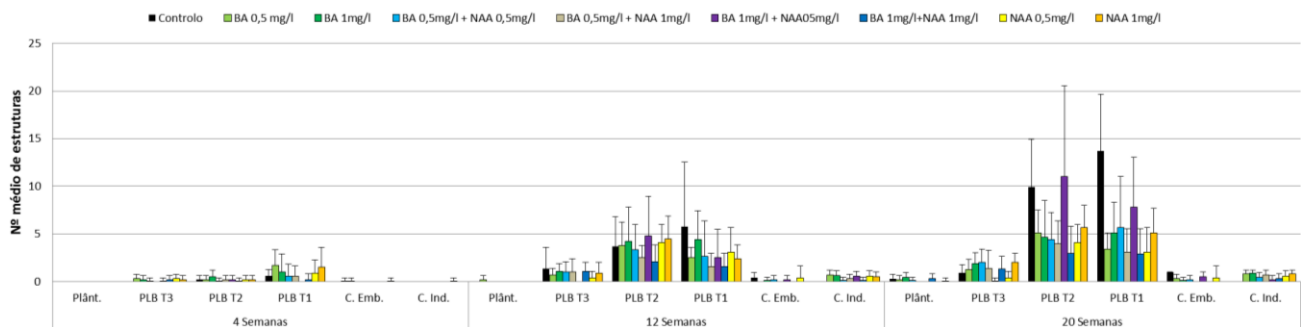


Fig. 17 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Dend. farneri* crescidas em meios PM acrescido de diferentes concentrações de auxina/citocinina (BAP 0,5 mg/L, BAP 1 mg/L, BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L, BAP 0,5 mg/L + NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L, BAP 1 mg/L + NAA 1 mg/L, NAA 0,5 mg/L e NAA 1 mg/L) e em PM sem reguladores (Controlo) ao longo de 20 semanas de cultura.

Observou-se uma maturação vestigial generalizada, e apenas em estruturas PLB-T3, com uma distribuição de novas estruturas pelos tratamentos de um modo não significativo.

Passadas 8 semanas, foram vários os meios a evidenciar uma produção de PLBs-T1 e T2 sem existir uma diferença significativa entre eles. A esta data, salvo um espécime, não se tinham desenvolvido mais nenhuma plântula. De salientar a proliferação generalizada de *calli* indiferenciado nos tratamentos ensaiados, contrariamente ao controlo, e de *calli* embriogénicos em 4 tratamentos sem relação racional entre si.

No final do ensaio registou-se uma maturação em plântula reduzida e distribuída pelos diferentes tratamentos de um modo não significativo, ainda que com uma ligeira vantagem para o tratamento BAP 1 mg/L. A nível da propagação, os dados demonstram uma distribuição de novas estruturas pelos tratamentos de um modo não significativo, com ligeira vantagem para o tratamento BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L. A nível de *calli* embriogénicos, apenas se produziram estruturas pontuais. Na parte final do ensaio, registou-se uma proliferação generalizada de *calli* indiferenciados, contrariamente ao verificado no controlo ainda que não significativamente.

Cymb. canaliculatum

Nesta espécie, a maturação foi o processo dominante nas várias variáveis de reguladores acompanhada de uma reduzida ou mesmo inexistente propagação (Fig. 18).

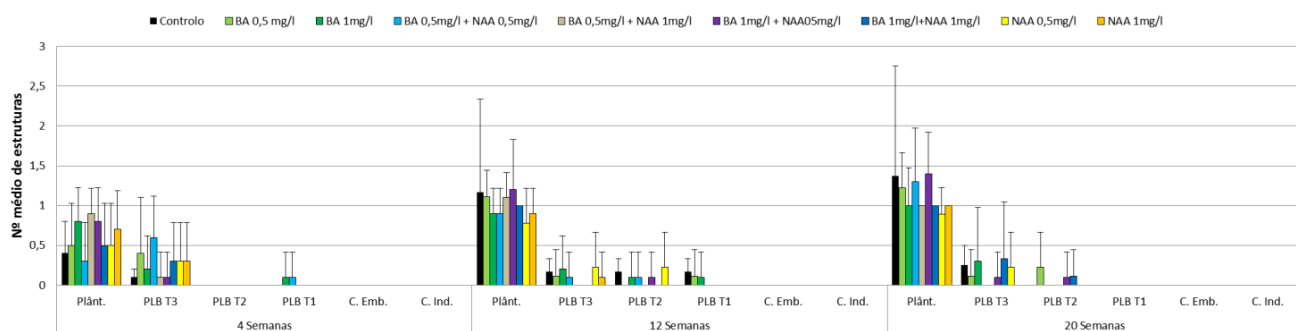


Fig. 18 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Cymb. canaliculatum* crescidas em meios PM acrescido de diferentes concentrações de auxina/citocinina (BAP 0,5 mg/L, BAP 1 mg/L, BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L, BAP 0,5 mg/L + NAA 1 mg/L, BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L, BAP 1 mg/L + NAA 1 mg/L, NAA 0,5 mg/L e NAA 1 mg/L) e em PM sem reguladores (Controlo) ao longo de 20 semanas de cultura.

Desde as primeiras semanas de cultura que foi possível identificar uma diferenciação das estruturas em plântulas de um modo geral em todos os tratamentos. Em contrapartida, apenas os meios BAP 1mg/L e BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L promoveram a proliferação de novas estruturas. Como resultado de um desenvolvimento linear das estruturas, o perfil das estruturas manteve-se constante ao longo do ensaio. A nível da propagação, os meios com tratamentos com recurso unicamente de citocininas (BAP 0,5 mg/L e BAP 1 mg/L) revelaram-se os únicos tratamentos, a par com o controlo a registar estruturas PLB-T1 nesta fase. No final, a maturação era praticamente total de todos os explantes iniciais em todos os tratamentos. A nível da propagação de PLB-T1s, todos os meios revelaram uma ausência destas estruturas nesta data. Neste ensaio, não houve qualquer produção de *calli* embriogénicos nem de *calli* indiferenciados.

3. Ensaio “intensidade de luz”: avaliação do efeito de diferentes níveis de luz de crescimento na actividade fotossintética de PLBs

Na análise dos parâmetros fotossintéticos, iniciou-se o ensaio com as 4 espécies mas perdeu-se as culturas de *Bras. caudata* por contaminação na sala de culturas ficando para análise as restantes. o efeito dos diferentes níveis de luz (BL, ML e AL) na cultura das espécies *Phal. tetraspis* (Fig.19), *Dend. farmeri* (Fig.21) e *Cymb. canaliculatum* (Fig.23) foi monitorizada fim de 16 semanas.

Phal. tetraspis

De modo a avaliar a eficiência fotossintética da espécie foram monitorizados os parâmetros: Potencial quântico máximo (Fig.19A), ETR (Fig.19B) e o NPQ (Fig. 19C).

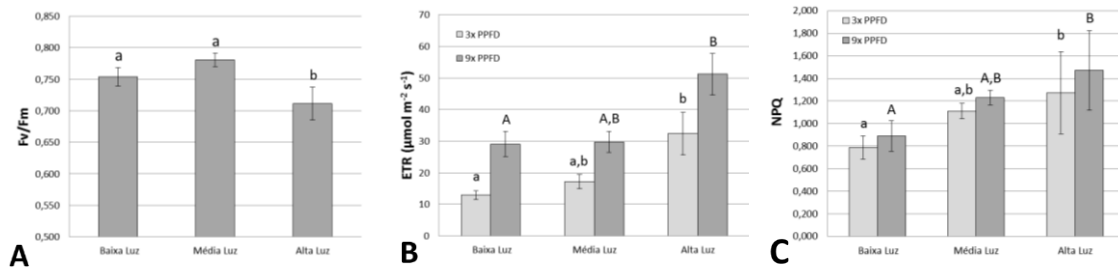


Fig. 19. Valores médios ($n=4-6$, \pm SD) para os parâmetros fotossintéticos medidos nas folhas maiores de plântulas provenientes de culturas mantidas diferentes condições de luz (Luz Baixa; Luz Média; Luz Alta) durante 16 semanas. A- Máxima eficiência quântica, B – Taxa de transporte de electrões e C – Relaxamento não fotoquímico, do PSII. Colunas com letras iguais não são significativamente diferentes.

Como se pode observar na figura 19A, não houve uma diferença significativa entre BL e ML na eficiência quântica máxima (F_v/F_m) das plantas desta espécie, mas quando as culturas são crescidas numa intensidade luminosa mais elevada (AL, $100-125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) este parâmetro foi significativamente afectado. Por outro lado, enquanto, a taxa de transporte de electrões no PSII (ETR) das plantas, medida quer a 3x quer a 9x a intensidade de crescimento, é semelhante para os regimes de luz mais baixas (BL e ML), a ETR de plantas mantidas em AL é significativamente mais elevada (Fig. 19B), revelando uma adaptação da maquinaria fotossintética das plantas a uma intensidade luminosa mais elevada. Relativamente ao parâmetro NPQ, que traduz a competência para dissipar energia excitatória da luz por processos não-fotoquímicos, verificou-se que as plantas micropropagadas *in vitro* desta espécie se adaptam ao regime de luz de crescimento, aumentando progressivamente os a eficiência dos processos não fotoquímicos (Fig. 19C).

Os resultados obtidos para as curvas rápidas de resposta da fotossíntese à luz são consistentes com os resultados anteriores, onde se pode verificar que a capacidade fotossintética (*plateau* de ETR atingido, ou seja, o ETR máximo) é significativamente mais elevada em plantas crescidas em alta luz, enquanto que aquelas crescidas em BL ou ML são semelhantes (Fig. 20).

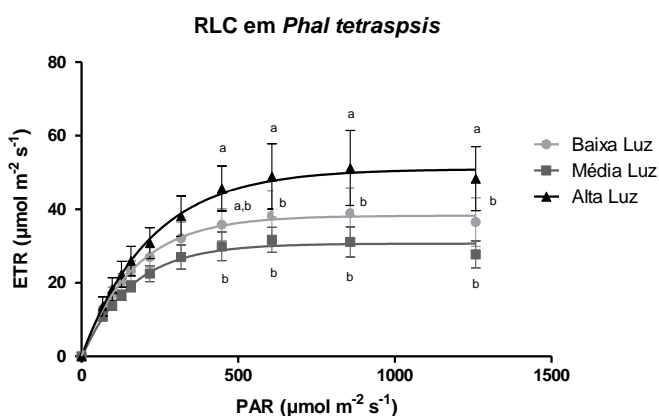


Fig. 20 - Curva de resposta fotossintética à luz, com taxa de transporte de electrões de PSII em função da incidência de luz fotossintética (PAR)

Dend. farmeri

A eficiência fotossintética da espécie foi avaliada segundo os resultados nos parâmetros: Potencial quântico máximo (Fig.21A), ETR (Fig.21B) e o NPQ (Fig. 21C).

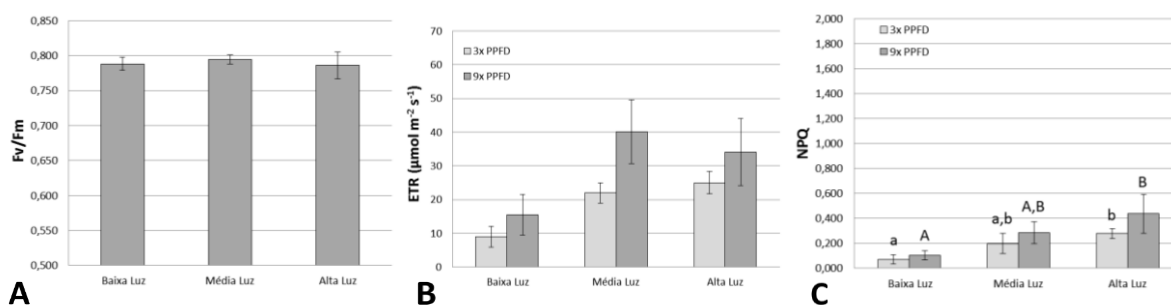


Fig. 21. Valores médios ($n=4-6$, $\pm SD$) para os parâmetros fotossintéticos medidos nas folhas maiores de plântulas provenientes de culturas mantidas diferentes condições de luz (Baixa Luz; Média Luz; Alta Luz) durante 16 semanas. A- Máxima eficiência quântica, B – Taxa de transporte de electrões e C – Relaxamento não fitoquímico, do PSII em *Dend. farmeri*. Colunas com letras iguais não são significativamente diferentes.

Os resultados demonstram uma diferença significativa, na ETR, entre a cultura em regime de luz baixa relativamente ao regime de luz média e alta, na resposta fotossintética à uma luz actínica de aproximadamente 3x superior à luz de cultura, e a 9x superior. Para as culturas de maior luz, média e alta, a resposta ETR foi semelhante. A resposta das culturas de luz inferior foi consistente na medição de RLC, onde a resposta da mesma obteve o menor desempenho, no entanto nesta parâmetro a luz Média ganhou vantagem relativamente à Alta Luz. A nível Fv/Fm, observou-se valores dentro da normalidade para as 3 variáveis de Luz. No parâmetro NPQ, registou-se uma diferença significativa entre a capacidade de relaxamento das plântulas cultivadas em Baixa Luz relativamente às de Alta Luz, revelando esta última uma capacidade superior, tanto na incidência a 3x como a 9x, ficando as de Média Luz sem diferença significativa com as restantes.

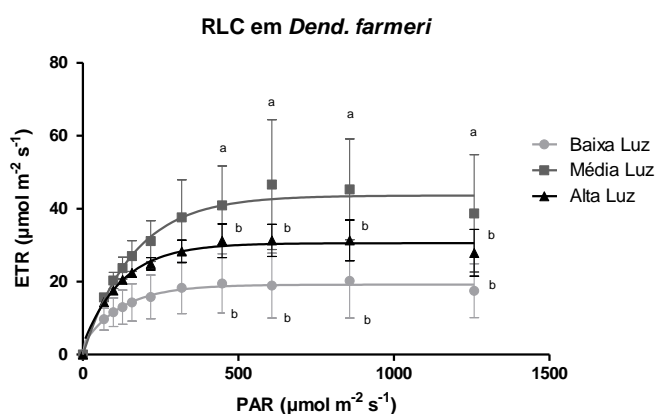


Fig. 22 - Curva de resposta fotossintética à luz, com taxa de transporte de electrões de PSII em função da incidência de luz fotossintética (PAR)

Cymb. canaliculatum

Foi feita a avaliação da eficiência fotossintética da espécie através da monitorização dos seguintes parâmetros: Potencial quântico máximo (Fig. 23A), ETR (Fig.23B) e o NPQ (Fig. 23C).

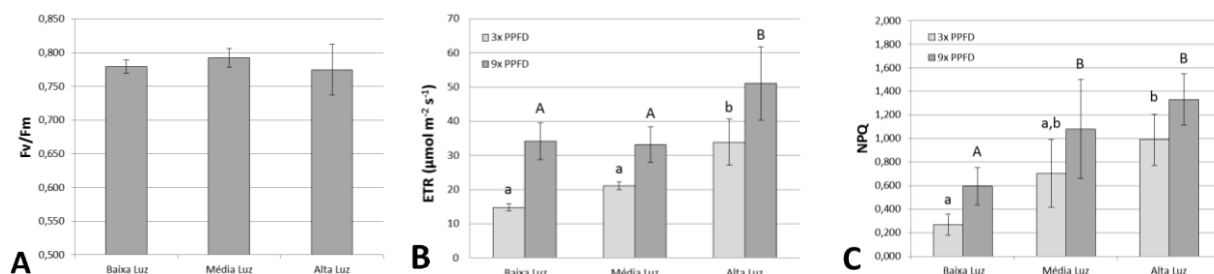


Fig. 23 - Valores médios ($n=4-6$, $\pm SD$) para os parâmetros fotossintéticos medidos nas folhas maiores de plântulas provenientes de culturas mantidas diferentes condições de luz (Baixa Luz; Média Luz; Alta Luz) durante 16 semanas. A- Máxima eficiência quântica, B – Taxa de transporte de electrões e C – Relaxamento não fotoquímico, do PSII em *Cymb. canaliculatum*. Colunas com letras iguais não são significativamente diferentes.

Os resultados demonstram uma diferença significativa, na ETR, entre a cultura em regimes de Baixa Luz e Média Luz relativamente ao regime de Alta Luz, na resposta fotossintética à uma luz actínica de aproximadamente 3x superior à luz de cultura, bem como a mesma diferença significativa foi evidenciada no ensaio a luz 9x superior. A resposta das culturas de Baixa Luz na medição de RLC (Fig. 24) foi atípica, revelando o melhor desempenho contrariamente evidenciado na medição de ETR, tanto a 3x como 9x. A nível Fv/Fm, observou-se valores dentro da normalidade para as 3 variáveis de Luz. No parâmetro NPQ, registou-se uma diferença significativa entre a capacidade de relaxamento das plântulas cultivadas em Baixa Luz relativamente às de Alta Luz, revelando esta última uma capacidade superior, tanto na incidência a 3x ficando as de Média Luz sem diferença significativa com restantes. No aumento da incidência para 9x, a diferença significativa variou, sendo agora a resposta das plântulas de Baixa Luz significativamente inferior às de ML e AL, ficando estas últimas com resultados semelhantes.

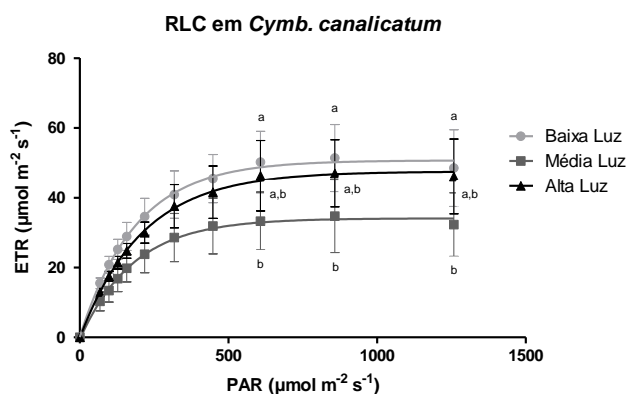


Fig. 24- Curva de resposta fotossintética à luz, com taxa de transporte de electrões de PSII em função da incidência de luz fotossintética (PAR)

4. Ensaio “bio-reactores”: avaliação do sistema de imersão temporária (TIBS) na proliferação e desenvolvimento de PLBs

Devido às suas características inovadoras, não se encontrou bibliografia disponível que guiasse a preparação deste ensaio, pelo que os resultados obtidos nas espécies ensaiadas, devem ser encarados como muito preliminares, com grande margem de optimização e com necessidade de estudos mais detalhados. A eficácia desta abordagem será comparada com o tratamento em meio PM sólido às 16 semanas, (dados retirados do ensaio “3 tipos de meio” e inseridos neste ensaio como referência). Contudo, e apesar das condições da sala de cultura serem idênticas, importa sublinhar aqui algumas diferenças encontradas entre os métodos de propagação que podem justificar eventuais diferenças nos resultados, assim:

- As plantas, numa fase inicial da cultura em bio-reactores, poderão estar sujeitas a algum stresse, uma vez que o regime a que estavam adaptadas, por repicagem, era o meio sólido;
- A fisionomia do bio-reactor, nomeadamente a menor transparência da sua tampa, terá reduzido a intensidade luminosa a que as plantas estiveram sujeitas durante o período de crescimento;
- A utilização de um meio com carvão activado fez com que o mesmo ficasse depositado na plataforma do reactor, originando uma superfície “lamacenta” de maior opacidade, principalmente no regime de 8 irrigações/dia.

A análise fotossintética efectuada em plântulas de ambos os regimes de irrigação revelou-se idêntica entre eles, em todas as espécies, para os diferentes parâmetros: eficiência quântica máxima (F_v/F_m), taxa de transporte de electrões (ETR) e amortecimento não fotoquímico (NPQ) (dados não incluídos). A diferenciação e desenvolvimento de protocormos das espécies *Phal. tetraspsis* (Fig.25), *Brass. caudata* (Fig.27), *Dend. farmeri* (Fig.29) e *Cymb. canaliculatum* (Fig.31) a crescer nos bio-reactores, sujeitos a dois regimes de irrigação foi monitorizada ao fim de 16 semanas.

Phal. tetraspsis

A proliferação desta espécie em sistema de reactor foi avaliada às 16 semanas (Fig. 25)

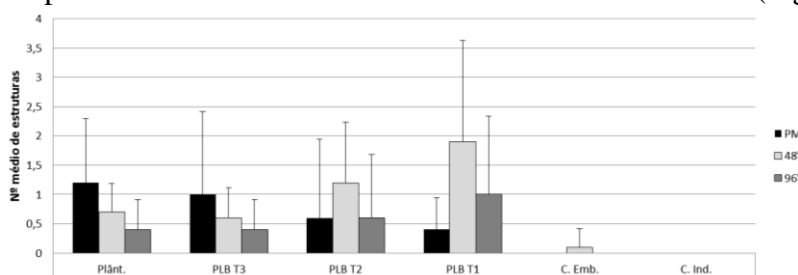


Fig.25 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Phal. tetraspsis* crescidas em diferentes regimes de irrigação em reactor (48'/dia e 96'/dia) e em meio sólido (PM ao fim de 16 semanas de cultura).

Ao fim de 16 semanas de cultura foi possível observar uma ligeira diferença no número de PLBs e de plântulas entre os diferentes regimes de irrigação, com vantagem para o regime 48'. Comparativamente à referência (meio PM sólido), este último apresentou um número mais elevado de plantas, apesar de estatisticamente não significativos, contudo, ao nível da capacidade proliferativa de protocormos, o regime 48' parece promissor. O regime 48' registou uma presença vestigial de *callus* embriogénico. Nenhuma das variáveis apresentou proliferação de *callus* indiferenciado.

Avaliando a proporção em peso seco dos PLBs (independentemente do estágio), registou-se uma redução para cerca de 70% do valor da referência PM sólido, em ambos os regimes de cultura dos bio-reactores, sugerindo um melhor estado hídrico das estruturas crescidas em regime de imersão temporária.

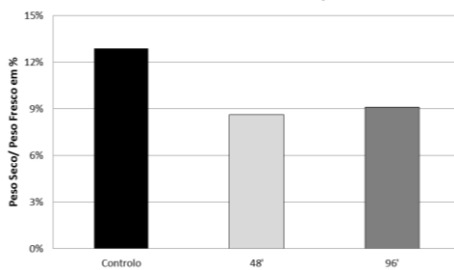


Fig. 26 – Proporção do peso seco total dos PLBs, comparação entre a produção em bio-reactor (48' e 96') e em meio sólido (PM), após as 16 semanas.

Bras. caudata

Os dados relativos à cultura desta espécie de *Brassia* estão descritos na Fig. 27.

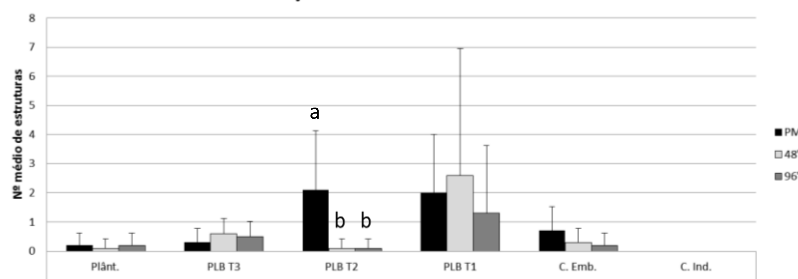


Fig. 27 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Bras. caudata* crescidas em diferentes regimes de irrigação em reactor (48'/dia e 96'/dia) e em meio sólido (PM ao fim de 16 semanas de cultura).

No final das 16 semanas de cultura não foi possível observar diferença significativa na maturação em plântulas entre os diferentes regimes de irrigação, nem perante a referência (meio PM sólido), tanto na produção de plântulas como de PLB-T3. A nível da proliferação de protocormos, na comparação entre os dois regimes de irrigação surge mais valorizado o regime 48', que apesar de registar uma média superior ao regime 96' não atinge significância estatística. Quando confrontados com os resultados de referência do meio sólido, a produção de PLB-T1 é estatisticamente semelhante nas 3 situações mas, para os valores de PLBs-T2, o meio de referência assume uma significância estatística, destacando-se de ambos os regimes de irrigação. Ambos os regimes registaram uma

presença vestigial de *callus* embriogénico a par da referência. Nenhuma das variáveis apresentou proliferação de *callus* indiferenciado.

Relativamente ao conteúdo em água e voláteis nos tecidos (Fig. 28), este revelou-se idêntico em ambos os regimes e similar ao controlo, registando valores médios de aproximadamente 8,5%.

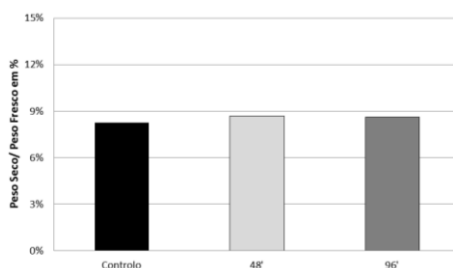


Fig. 28 – Proporção do peso seco total dos PLBs, comparação entre a produção em bio-reactor (48' e 96') e em meio sólido (PM), após as 16 semanas.

Dend. farneri

O desempenho desta espécie evidencia um interessante potencial proliferativo (Fig. 29).

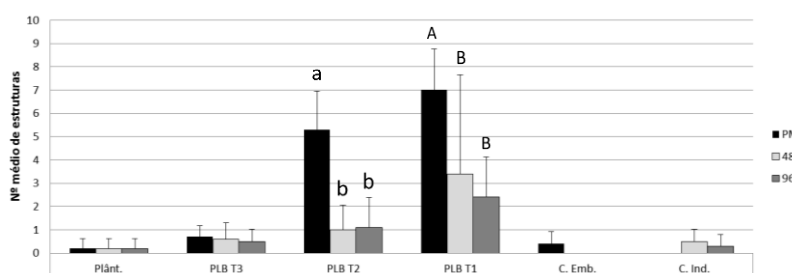


Fig. 29 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Dend. farneri* crescidas em diferentes regimes de irrigação em reactor (48'/dia e 96'/dia) e em meio sólido (PM ao fim de 16 semanas de cultura).

No final do ensaio, às 16 semanas, nenhuma diferença significativa na maturação em plântulas foi evidenciada entre os diferentes regimes de irrigação, nem perante a referência (meio PM sólido), tanto na produção de plântulas como de PLB-T3. A nível da proliferação de protocormos, na comparação entre os dois regimes de irrigação surge mais valorizado o regime 48', que apesar de registar uma média superior ao regime 96' não atinge significância estatística. Quando confrontados com os resultados de referência do meio sólido, a produção de PLB-T1 e de PLBs-T2, o meio de referência assume uma significância estatística, mais acentuada em PLB-T1s, destacando-se de ambos os regimes de irrigação. Ambos os regimes registaram uma presença de *callus* indiferenciado a par da referência. Nenhuma das variáveis apresentou proliferação de *callus* embriogénico, contrariamente à referência.

Avaliando a proporção em peso seco do total (Fig. 30) registou-se um valor de cerca de 12% na no regime 48', seguido pelo regime 96' (10%) que se revelou ligeiramente superior à referência PM sólido (9,5%).

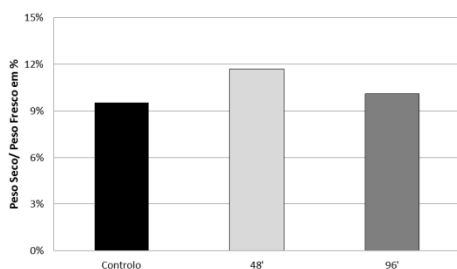


Fig. 30 – Proporção do peso seco total dos PLBs, comparação entre a produção em bio-reactor (48' e 96') e em meio sólido (PM), em *Dend. farmeri* após as 16 semanas.

Cymbidium canaliculatum

O desempenho desta espécie destacou-se pela sua capacidade de maturação dos PLBs (Fig. 31).

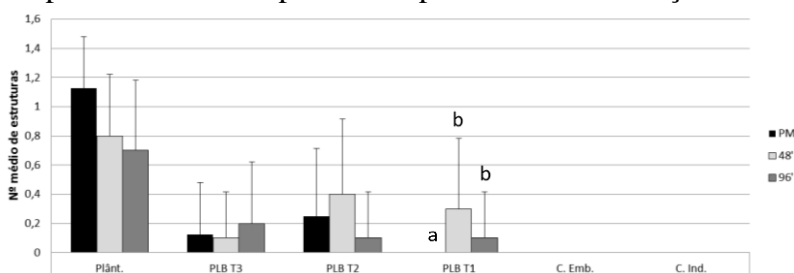


Fig. 31 – Número médio (n=10; +SD) de protocormos de cada classe de desenvolvimento (PL T-1, PL T-2, PL T-3, Plântulas) e de *calli* embriogénicos (C. Emb.) e *calli* indiferenciados (C. Ind.), em culturas de *Cymb. canaliculatum* crescidas em diferentes regimes de irrigação em reactor (48'/dia e 96'/dia) e em meio sólido (PM ao fim de 16 semanas de cultura).

Às 16 semanas de cultura foi possível observar uma ligeira diferença na maturação em plântulas entre os diferentes regimes de irrigação, com vantagem para o regime 48', e entre a referência (meio PM sólido), com este último a representar valores de maturação mais positivos, apesar de estatisticamente não significativos. A nível da proliferação de protocormos, na comparação entre os dois regimes de irrigação surge mais valorizado o regime 48', que apesar de registar uma média múltipla do regime 96', 0,1 e 0,3 estruturas por explante respectivamente, não atinge significância estatística. Nenhuma das variáveis apresentou proliferação de *callus*.

Relativamente à proporção de peso seco registou-se um valor de cerca de 13,5% na referência PM sólido que foi superior aos cerca de 11,5% obtidos em regime 48' e de cerca de 9,5% em regimes 96' (Fig. 32).

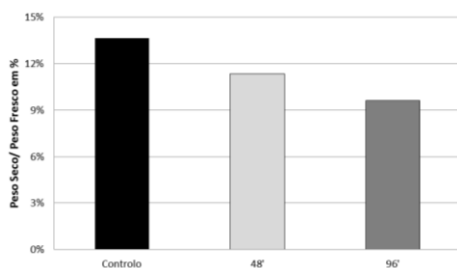


Fig. 32 – Proporção do peso seco total dos PLBs, comparação entre a produção em bio-reactor (48' e 96') e em meio sólido (PM), em *Cymb. canaliculatum* após as 16 semanas.

Discussão

1. Selecção do meio de cultura base para a micropropagação das diferentes espécies

Vários têm sido os meios de cultura utilizados para a propagação e regeneração de protocormos de orquídeas, mas, estando esta diversidade dispersa por diferentes espécies e híbridos, torna difícil retirar uma tendência ou fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos. Por exemplo, o meio Phytamax está descrito como promotor de de um crescimento mais vigoroso em plântulas de *Cymbidium giganteum* enquanto que o meio KC produziu maior número de protocormos (Hossain, 2010). Em *Vanda coerulea*, Roy (2011) associou o máximo potencial de germinação do meio PM ao facto de ser o único meio testado com peptona na sua constituição, cuja influência na germinação e estágios seguintes poderá ser determinante. Este efeito foi igualmente comprovado em *Cyrtopodium punctatum* (Dutra, 2009) e *Calopogon tuberosus* (Kauth, 2006). Silva (2012) descreve a necessidade da utilização do meio MS para a indução e proliferação de callus. O meio KC aparece recorrentemente em ensaios de micropropagação como referência sem se revelar mais competente na propagação ou na maturação (Houssain, 2010).

Seguidamente resumiremos os principais aspectos do trabalho desenvolvido para as diferentes espécies testadas.

- ***Phalaenopsis tetraspis***

O meio PM revelou ser o mais apropriado para a micropropagação deste espécie devido à maior capacidade proliferativa de PLBs (potenciar a diferenciação de novas estruturas), ao mesmo tempo que promove o seu desenvolvimento ao longo das sucessivas fases de maturação até ao estágio de planta, estando em linha dos resultados obtidos por Hossain (2010). Por outro lado, embora com menor expressão, a capacidade de gerar callus embriogénico também lhe confere um elevado potencial proliferativo.

- ***Brassia caudata***

Nenhum dos meios revelou ser muito adequado para potenciar a maturação das PLBs. No entanto, o meio PM demonstrou, também para esta espécie ser a melhor opção para a diferenciação de novas estruturas. Não tendo sido atingida uma significativa maturidade dos explantes iniciais com qualquer

dos meios testados, no intervalo de tempo do ensaio, parece ser necessário testar novos meios ou variações do meio PM.

- ***Dendrobium farmeri***

O meio PM parece revelar-se como meio base mais apropriado, no entanto, provavelmente necessitará ser aditivado com outra citocinina (ex. a cinetina), isoladamente ou a par de outro aditivo (maltose) como sugerido por Luo (2009), que além do tratamento químico sugere um tratamento por frio com o objectivo de garantir maior conversão dos PLBs. O meio MS-C revelou ser uma alternativa para potenciar a diferenciação de novas estruturas mas com claro prejuízo no processo de maturação de protocormos em plântulas. Está também associado a uma maior proliferação de *callus* não morfogénico indiferenciado, como também verificado por Silva (2012), o que lhe retira potencial proliferativo via embriogénese ou morfogénese indirecta.

- ***Cymbidium canaliculatum***

Nenhum dos meios revelou ser o mais apropriado para potenciar a maturação de PLBs, ainda que com o meio PM se tenha novamente obtido um valor médio superior. De salientar a ausência de calli embriogénicos nas culturas o que condiciona bastante a capacidade propagativa, sendo o factor limitante à propagação em massa desta espécie. Este meio base PM, sem adição de reguladores de crescimento, foi também experimentado por Houssain (2012) como controlo para a proliferação de PLBs tendo obtido valores igualmente reduzidos.

2. Optimização do meio de cultura com suplementação reguladores de crescimento para proliferação de protocormos

Nos ensaios de micropropagação de orquídeas, além do meio basal, diferentes reguladores de crescimento são geralmente testados em culturas de diferentes espécies e híbridos, mas principalmente no sentido de induzir a diferenciação de PLBs a partir de tecidos da planta adulta. Os poucos estudos encontrados relacionados com a indução de proliferação de PLBs, têm revelado resultados por vezes distintos dentro do mesmo género. Por exemplo, com *Cymbidium giganteum*, Houssain (2012) demonstrou que o maior número de PLBs produzidos era conseguido com BAP 2,0 mg/L + NAA 2,0 mg/L, de entre diferentes combinações de auxinas e citocininas testadas, enquanto

que Mahendran (2012) demonstrou que em *Cymbidium bicolor* essa resposta era obtida com as suplementações 1,0 mg/L BAP + 2,0 mg/L 2,4-D.

No sentido de estudar o efeito da suplementação hormonal do meio na micropropagação das espécies em estudo, quatro combinações de auxina e citocinina foram testadas, seguindo-se as principais conclusões.

- ***Phalaenopsis tetraspis***

A combinação BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L revelou ser a mais apropriada para potenciar a diferenciação de novas estruturas devido, em parte, à potencialidade de gerar callus embriogénico. Esta combinação está condizente com o trabalho de Hossain (2012) em *Cymbidium* sp., no entanto este investigador descreve a combinação de BAP 2 mg/L + NAA 2 mg/L como o melhor resultado no seu ensaio.

- ***Brassia caudata***

Nenhuma das combinações testadas revelou ser significativamente mais adequada para potenciar a propagação e maturação das estruturas. Para podermos entender melhor a produção e desenvolvimento dos PLBs desta espécie será necessária ensaiar outros protocolos experimentais, utilizando por exemplo, outros reguladores de crescimento ou mesmo, tratamento com estágio em frio cujos resultados encontrados (Luo, 2008) revelam-se prometedores.

- ***Dendrobium farmeri***

Nesta espécie a combinação BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L demonstrou ser a que induziu maior proliferação de PLBs apesar de a diferença não ser muito significativa, inclusivamente superior à situação controlo sem reguladores hormonais. Contudo, a maturação destes PLBs não foi favorecida em qualquer das combinações testadas. Este resultado está em linha com o que foi verificado por Luo (2008) para a espécie *Dendrobium densiflorum* onde mostra que uma maior concentração de BAP relativamente a NAA (nesse caso, BAP 5 mg/L + NAA 0,5 mg/L) induz ao maior número de PLB produzidos por explante. Nesse estudo (Luo, 2008) refere também uma taxa de conversão de PLBs em plantas de 100% com BAP 2 mg/L. No nosso caso, e ainda que muito baixa, a maturação foi superior foi em BAP 1 mg/L, pelo que se justificaria testar futuramente concentrações de citocinina mais elevadas.

De facto, esta espécie revelou-se bastante recalcitrante no que respeita a uma maturação eficiente dos protocormos, não se encontrando um efeito convincente em qualquer das combinações testadas. No

entanto, o número de PLBs diferenciados poder-se-á traduzir numa boa rentabilidade em futuros programas de micropropagação.

- ***Cymbidium canaliculatum***

Nesta espécie não foi conseguido uma boa proliferação de PLBs, nem de indução de calli embriogénicos nas culturas, apenas se verificando a via de desenvolvimento e conversão em plantas dos explantes, condicionando bastante a propagação desta espécie à larga escala. A razão deste insucesso poderá residir nas baixas concentrações de reguladores utilizados neste ensaio relativamente ao que foi descrito (Hossain, 2012), como sugere a observação do número de PLBs produzido nas diferentes combinações não ser muito diferente daquele obtida com o controlo. De modo semelhante, também se obteve que o comprimento dos rebentos caulinares era semelhante em várias combinações de reguladores utilizados (Houssain, 2012; Mahendran, 2012).

Embora haja respostas dependentes da espécie, genericamente pode concluir-se que uma suplementação com BAP, com BAP e NAA em concentrações equivalentes ou com a citocinina em concentração superior, parecem favorecer uma maior diferenciação e/ou maturação de PLBs na maioria das espécies aqui testadas, o que está de acordo com alguns resultados descritos na bibliografia. Contudo, também parece claro daqui que concentrações mais elevadas de BAP e eventualmente outras citocininas deveriam ser testadas.

3. Regime de luz de crescimento das culturas e competência fotossintética das plantas micropropagadas

A resposta a variabilidade das condições ambientais envolve modificações do aparelho fotossintético de modo a manter uma alta eficiência fotossintética em diferentes regimes de luz (Walters, 2003). Com um aumento da incidência luminosa, a necessidade dos complexos LHC (*Light Harvesting Complex*) é reduzida, em contrapartida aumenta a necessidade de componentes do transporte de electrões e assimilação de carbono de modo a suportar o alto teor fotossintético (Anderson, 1995).

A fotoinibição da fotossíntese e conseqüente redução do desenvolvimento da planta é uma conseqüência das mudanças fisiológicas e metabólicas nas plantas quando expostas ao um excesso de energia excitatória. Este fenómeno ocorre através da produção de ROS (espécies reactivas de oxigénio) que conduzem ao stress oxidativo e danos nas macromoléculas (Asada e Takahashi, 1987). A produção de ROS no cloroplasto durante stresse luminoso foi descrita por Mishra (1995). A

dissipação do excesso de energia excitatória absorvida pelos fotossistemas por processos não fotoquímicos, geralmente traduzidos pelo parâmetro NPQ (do inglês, non-photochemical quenching), ou amortecimento não fotoquímico, desempenha um papel muito importante na protecção do aparelho fotossintético contra os efeitos nocivos do excesso de luz, directamente relacionados com a produção de ROS (Mishra, 1995).

As culturas *in vitro* são estruturas especialmente susceptíveis à luz e ao défice hídrico. São geralmente estruturas muito frágeis, crescendo em meio e condições artificiais geralmente sob intensidades luminosas muito baixas ($20-50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ comparativamente aos 1500- 2000 típicos de dias soalheiros) e humidades perto da saturação. Estas condições de desenvolvimento fazem com que a sua maquinaria fotossintética seja incipiente ou muito pouco competente e os estomas, quando presentes, sejam pouco funcionais. Esta fragilidade anatómica e fisiológica é uma das principais causas do insucesso na aclimação das plantas micropropagadas a condições *ex vitro* (Hazarika, 2006)

No sentido de aumentar o sucesso de aclimação, bem como da sua capacidade fotossintética e assim desenvolvimento e maturação dos protocormos em cultura, testou-se o efeito de intensidades luminosas crescentes de crescimento nas várias espécies estudadas.

- ***Phalaenopsis tetraspis***

As plantas crescidas em condições de luz mais intensa ($100-125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) revelaram um significativo aumento da sua capacidade fotossintética relativamente às condições de luz menos intensas (Figs. do ETR e RLC). Este fenómeno parece claramente ter resultado de um processo de aclimação durante o período de crescimento, mas também se tornaram mais robustas a desafios de luz de curta duração, aumentando a taxa de transporte de electrões quando a luz actínica aumentou de 3x para 9x a luz de crescimento. O aumento, muito significativo, dos valores de NPQ (Fig. 19C) revelaram também uma melhor eficiência dos mecanismos não fotoquímicos e, portanto, uma menor susceptibilidade à fotoinibição. Juntos estes resultados sugerem que o condicionamento desta espécie a regimes de luz mais elevados parecem melhorar a sua competência fotoquímica e não fotoquímica e, provavelmente, promoverá um maior sucesso na aclimação a condições *ex vitro* mais agressivas.

- ***Dendrobium farmeri***

Esta espécie aumentou muito significativamente a sua competência fotoquímica e não fotoquímica quando crescida em luz de intensidade média ($40-50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e relativamente a uma intensidade baixa ($15-20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), contudo em luz elevada revelou indícios de fotoinibição da fotossíntese (Fig.s 21A, 21B, 21C e 22). Estes resultados sugerem que esta espécie apresenta um limitado

potencial de aclimação à luz, sendo mais susceptível à luz e ao stress foto-oxidativo. De facto, esta hipótese é suportada pela observação de que plantas crescidas no tratamento de alta luz (AL) evidenciavam um fraco desenvolvimento, apresentando folhas amareladas e necroses recorrentes.

Da pesquisa realizada, não se encontraram referências a estudos sobre a resposta ao stress luminoso de plântulas in vitro do género *Dendrobium*, sendo portanto este, um importante contributo para um melhor conhecimento da fisiologia deste género e espécie. Poderemos ainda supor que as plantas micropropagadas desta espécie, terão maiores dificuldades de adaptação a um ambiente luminoso intenso, pelo que deverão ter mais interesse como plantas ornamentais de espaços interiores.

- ***Cymbidium canaliculatum***

As plantas cultivadas com luz média (ML) não demonstraram capacidade fotossintética superior à BL. No entanto, essa adaptação surge sobre a forma de NPQ, ou seja, as plantas crescidas em ML, dissipam muito mais eficientemente o excesso de radiação do que as plantas de luz baixa (BL) (Fig. 23C). Em regime de intensidade luminosa elevada as plantas desta espécie, à semelhança de *Phal. tetraspsis*, aumentaram significativamente a taxa de transporte de electrões (ETR) e o NPQ, este já evidenciado pelas crescidas em ML. Estes resultados sugerem que a aclimação desta espécie à luz passa primeiramente por aumentar os mecanismos dissipativos e só depois aumentar a maquinaria fotossintética, o que poderá explicar a curva de luz obtida com as plantas crescidas em ML (Fig. 24) (note-se que esta medição é posterior aos ensaios de stress luminoso). Uma resposta semelhante foi notada por Heo (1996), onde plântulas do género *Cymbidium* apresentaram uma maior eficiência fotossintética quando cultivadas a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Globalmente estes resultados sugerem que algumas espécies de orquídeas micropropagadas poderão ser acondicionadas in vitro a regimes de luz mais elevados de modo a aumentar o sucesso de aclimação a condições ex vitro e eventualmente a produtividade, enquanto que com outras se deverá evitar exposições a luz intensa para evitar perdas por foto-oxidação.

4. Eficiência do sistema de imersão temporária

De modo a reduzir os custos de produção associados à micropropagação de plantas, é de enorme interesse o desenvolvimento de mecanismos de multiplicação automatizados.

O termo bio-reactor é geralmente utilizado para descrever um ambiente fechado e estéril com capacidade para entrada de ar e/ou líquido, podendo assumir dimensões industriais ou simplesmente

de um equipamento portátil. A utilização de meio líquido em bio-reactores é vantajosa e possibilita um sistema de propagação exponencial (Preil, 1991), a par de poder mitigar ou prevenir anomalias fisiológicas de hiperhidricidade no caule e folhas (Ziv, 1999).

Dada a tecnologia ser mais ou menos recente, apenas se encontram descritos ensaios para algumas espécies de plantas, raramente de orquídeas, e mesmo estes baseiam-se em equipamentos significativamente distintos entre si, o que mais uma vez impede sistematizar o conhecimento e transferi-lo para a melhoria de protocolos de micropropagação. Um dos poucos estudos encontrados, ensaiado para a espécie *Vanilla planifolia*, mostrou um incremento de 3 vezes no factor de multiplicação relativamente ao meio sólido, acompanhado de um maior crescimento do caule e do número de folhas (Ramos-Castellá, 2014).

No âmbito do trabalho aqui reportado, não houve possibilidade de explorar as várias possibilidades oferecidas por estudos em bio-reactores, contudo, foi possível testarem-se dois regimes de imersão nas quatro espécies, tendo-se verificado efeitos promissores.

- ***Phalaenopsis tetraspis***

Se os resultados obtidos com esta espécie demonstraram um desenvolvimento mais atrasado na cultura em bio-reactor face ao meio sólido, que como foi dito se poderá explicar por algum stresse de adaptação ao novo sistema de propagação, também é claro que em número absoluto se diferenciaram mais PLBs por explante no tratamento 48'. Quando comparados os dois regimes de irrigação, registou-se um menor número de PLBs em todas as fases de desenvolvimento quando se duplica o tempo diário de imersão. Importa contudo referir que o aspecto da plataforma coberta por “filme preto” poderá ter condicionado um maior desenvolvimento no regime 96', limitando a actividade fotossintética das culturas. Os regimes de irrigação conduziram à formação de estruturas com mais conteúdo em água, este fenómeno deverá estar associado à presença precoce de rizóides do desenvolvimento dos PLBs desta espécie que evidenciam, macroscopicamente, estruturas velâmicas, eficientes na retenção de líquidos. Desta forma o contacto temporário com fases líquidas conduziu a uma maior retenção de água.

- ***Brassia caudata***

Nesta espécie, o método de propagação em bio-reactor nas condições testadas, não parece trazer vantagens relativamente ao método referência (meio PM sólido). Apesar de haver diferenciação de novos protocormos, o seu desenvolvimento não progride para fases subsequentes (Fig.). De qualquer modo o desenvolvimento das culturas desta espécie é lento mesmo nas condições referência, demonstrando uma recalcitrância no que respeita a uma maturação eficiente dos seus protocormos.

Os efeitos dos tratamentos não foram muito expressivos, contudo, tendo em conta uma maior proliferação no tratamento 48' seria interessante testar outros regimes de imersão, talvez por períodos de tempo menores.

- ***Dendrobium farmeri***

O sistema TIBS não foi capaz de promover a maturação na cultura desta espécie, sendo que a sua introdução desta metodologia não trouxe qualquer benefício face à situação referência. Não houve também diferenças entre tratamentos, pelo que neste caso não foi possível identificar factores passíveis de optimização. No que respeita à hiperidricidade, a cultura em bio-reactores aponta para uma aumento do peso seco relativamente à cultura em meio sólido, ou seja, para uma diminuição deste fenómeno.

- ***Cymbidium canaliculatum***

Apesar de um desenvolvimento ligeiramente mais atrasado na cultura em bio-reactores face ao meio sólido, ressaltando problemas associados ao stresse inicial de arranque acima mencionados, este poderá ser um sistema vantajoso para esta espécie. À semelhança do observado com *Phal. tetraspsis* o número de protocormos formados por explante considerando a totalidade das fases de desenvolvimento é maior que na situação referência. Quando comparados os dois regimes de irrigação, a diferença não se revelou significativa, contudo, a tendência para 48' ser mais produtivo mantém-se. Os regimes de irrigação conduzem à formação de estruturas com mais conteúdo em água, este fenómeno deverá estar associado à presença funcionalidade das raízes desta espécie, que se assumem diferentes das outras espécies em estudo por assumirem um tropismo mais gravitacional, possuírem maior diâmetro e serem desprovidas de clorofila (totalmente brancas). Desta forma, e tal como verificado também para *Phal. tetraspsis*, o contacto com fases líquidas conduziu a uma maior retenção de água.

Estes resultados embora preliminares parecem mostrar que valerá a pena investir na optimização de vários parâmetros deste sistema TIBS. Por outro lado, conhecendo melhor a competência fotossintética das plantas destas espécies, aumentar o nível de luz e o arejamento, reduzindo o teor em carvão activado, poderão ser boas estratégias para melhorar crescimento e maturação daquelas com maior potencial fotossintético, e assim, o rendimento propagativo e qualidade das plantas micropropagadas.

Conclusão

Lembrando que tínhamos como ponto de partida, ou objectivo último, contribuir para a optimização de protocolos de micropropagação destas quatro espécies, findo este trabalho poderemos avançar nesse propósito dizendo que:

❖ *Phalaenopsis tetraspis*

O protocolo ideal para a propagação desta espécie passa pela utilização de meio base PM suplementado com BAP 0,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L, crescimento das culturas sob uma luz de intensidade relativamente elevada (superior a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em regime de bio-reactor TIBS, onde os PLBs de diferentes estádios poderão coexistir e desenvolver-se simultaneamente.

❖ *Brassia caudata*

Apesar de ser necessário ensaiar concentrações mais elevadas de citocininas, (isoladamente ou em combinação com auxina), o meio base indicado é o PM em cultura de bio-reactor de modo a garantir a proliferação, faltando somente uma melhor maturação.

❖ *Dendrobium farmeri*

O modo mais adequado para garantir a produção será a utilização de meio PM como base, suplementado com BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L, ou seja um desequilíbrio a favor da citocinina, devendo ser testadas concentrações mais altas deste regulador. A luz de cultura é limitante e não deverá passar dos $40\text{-}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O regime de bio-reactor é recomendável.

❖ *Cymbidium canaliculatum*

O protocolo encontrado para esta espécie passa pela utilização de meio base PM, sem aditivos. As culturas deverão ser mantidas a intensidades relativamente elevadas, tal como *Phal. tetraspis* para tirara mais partido da elevada competência fotossintética das plantas *in vitro* destas espécies. A opção de utilizar o bio-reactor representa a vantagem de melhorar o estado hídrico das culturas relativamente ao meio sólido.

Referências bibliográficas

- Ali, M. B., Hahn, E. J., & Paek, K. Y.** (2005). Effects of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micropropagated *Phalaenopsis* plantlet. *Environmental and experimental botany*, 54(2), 109-120.
- Ammirato, P.V.** (1983) Embryogenesis. *Handbook of Plant cell cultures*. Vol. 1, Techniques for propagation and breeding. 82-123
- Anderson, J. M., Chow, W. S., & Park, Y. I.** (1995). The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynthesis Research*, 46(1-2), 129-139.
- Andronova, E.** (1986) In vitro cultivation of seed and embryo of species of *Dactylorhiza*. *Ukrain. Bot. Zh.* 43: 79-81
- Arditti, J. & Krikorian, A.** (1996) Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Bot. J. Linn. Soc.* 122: 183–241
- Benzing, D.** (1996) Aerial roots and their environments. *Plant roots: the hidden half*. New York, pp. 875–894
- Benzing, D. H.** (1989). The evolution of epiphytism. In *Vascular plants as epiphytes* (pp. 15-41). Springer Berlin Heidelberg.
- Bernard, N.** (1909) Lévolution dans la symbiose: les orchidees et leurs champignons commensaux. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 9: 1-196
- Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Rylands, A. B., Konstant, W. R., ... & Hilton-Taylor, C.** (2002). Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation biology*, 16(4), 909-923.
- Carman, J. G.** (1990) Embryogenic cells in plant tissue culture: occurrence and behavior. *In vitro Cell Devel. Biol.*, 26: 746-753
- Chakrabarty, D., Park, S. Y., Ali, M. B., Shin, K. S., & Paek, K. Y.** (2006). Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree physiology*, 26(3), 377-388.
- Chapman, E. & Estelle, M.** (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Genet.* 34: 265–285
- Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W., & Barrett, R. L.** (2003). Orchid conservation: a global perspective. *Orchid conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, 1-24
- D'Amato, F. & Bayliss, M.** (1985) Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *Critical reviews in plant sciences* 3(1): 73-112

- Debergh, P., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R., & Ziv, M.** (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30(2), 135-140.
- Dressler, R.L.** (1981) *The Orchids: Natural History and Classification* (Harvard University Press: Cambridge, U.S.A.
- Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S. & Benková, E.** (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8790-8794.
- Dumas, E. & Monteuis, O.** (1995) In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants—influence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue Organ Cult*; 40: 231–5
- Dutra, D., Kane, M. E., & Richardson, L.** (2009). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 96(3), 235-243.
- Ernst, R.** (1974) The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 43: 35–38
- Faria, L. & Cuquel, F.** (2005) Activated Charcoal for In Vitro Propagation of Brazilian Orchids. *Proc. Vth IS on New Flor. Crops Acta Hort.* 683, ISHS
- Fridborg, G., Pedersen, M., Landstrom, L. E., & Eriksson, T.** (1978). The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiologia Plantarum*, 43(2), 104-106.
- Gan, S. & Amasino, R.** (1995) Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science*, December: Vol. 270 , no. 5244, pp. 1986-1988
- Gao, R., Wu, S. Q., Piao, X. C., Park, S. Y., & Lian, M. L.** (2014). Micropropagation of *Cymbidium sinense* using continuous and temporary airlift bioreactor systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(1), 117-124.
- Gaspar, T., Kevers, C., Debergh, P., Maene, L., Paques, M., & Boxus, P. H.** (1987). Vitrification: morphological, physiological, and ecological aspects. In *Cell and tissue culture in forestry* (pp. 152-166). Springer Netherlands.
- George, P. & Ravishankar, G.** (1997) In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillaries bud explants. *Plant Cell Reports*. 16: 490-494
- Gopitha, K., L. Bhavani, and J. Senthilmanickam.** "Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane." *Int. J. Pharma and Bio. Sci* 1.3 (2010): 1-7.

- Haberlandt, G.** (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl. Abt. J. 111: 69–92
- Haccius, B.** (1973) Les premiers stades des embryons végétaux zygotiques et somatiques sont-ils différents ou non? Soc. Bot. Fr., Mémoires, Coll." Morphologie, pp. 201-206
- Hazarika, B.** (2006) Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Sci Hort 108: 105–120
- Hazarika, B. N.** (2006). Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Scientia Horticulturae, 108(2), 105-120.
- Heo, J. W., Kubota, C., & Kozai, T.** (1996, August). Effects of CO₂ concentration, PPF and sucrose concentration on *Cymbidium* plantlet growth in vitro. In International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems 440 (pp. 560-565).
- Hicks, G.** (1980) Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. The Botanical Review 46(1): 1-23
- Hicks, G.** (1994) Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective In Vitro Cell Dev. Biol., 30, pp. 10–15
- Hossain, M. M., Sharma, M., Teixeira da Silva, J. A., & Pathak, P.** (2010). Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. Scientia horticulturae, 123(4), 479-487.
- Huang, C. & Chiachung, C.** (2005) Physical properties of culture vessels for plant tissue culture. Biosystems engineering 91(4):501-511
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I.** (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. LEVA, A.; RINALDI, LMR Recent Advances in Plant in vitro Culture. Editora: InTech, 1-28.
- Jeon, M.** (2005) Effects of photon flux density on the morphology, photosynthesis and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. Plant growth regulation, 45(2): 139-147
- Jeon, M. W., Ali, M. B., Hahn, E. J., & Paek, K. Y.** (2006). Photosynthetic pigments, morphology and leaf gas exchange during ex vitro acclimatization of micropropagated *Doritaenopsis* plantlets under relative humidity and air temperature. Environmental and experimental botany, 55(1), 183-194.
- Jewer P. & Incoll, L.** (1980) Promotion of Stomatal Opening in the Grass *Antheophora pubescens* Nees by a Range of Natural and Synthetic Cytokinins. Planta, 150: 218-221
- Jouanneau, J. P.** (1971). Contrôle par les cytokinines de la synchronisation des mitoses dans les cellules de tabac. Experimental cell research, 67(2), 329-337.

- Khosravi**, A. R., Kadir, M. A., Kazemin, S. B., Zaman, F. Q., & De Silva, A. E. (2008). Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium* cv. Serdang Beauty. *African Journal of Biotechnology*, 7(22).
- Kim**, J. & Lee, J. (1992) Effect of cultural conditions on rhizome growth and organogenesis of *Cymbidium lancifolium* native Korea in vitro. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*. 33: 471-476
- Knudson**, L. (1922) Non-symbiotic germination of Orchid seeds. *Bot. Gaz.* 73, pp. 1-25
- Knudson**, L. (1927) Symbiosis and asymbiosis relative to orchids. *New Phytologist* 26: 328–336
- Knudson**, L. (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *Am. Orchid Soc. Bull.*15: 214–217
- Kong-Sik Shin**, So-Young Park, Kee-Yoeup Paek. (2013) Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of in vitro plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 49:445–454
- Leake**, J.R. (1994) The biology of myco-heterotrophic (“saprophytic“) plants. *New Phytol* 127: 171–216
- Linden**, L. & Rodigas, E. (1890) *Lindenia* Iconographie des Orchidées, Imprimerie Eug. Vanderhaeghen, Gend
- Liu**, T. H., Kuo, S. S., & Wu, R. Y. (2001, April). Mass Micropropagation of Orchid Protocorm-Like Bodies Using Air-Driven Periodic Immersion Bioreactor. In *International Symposium on Design and Environmental Control of Tropical and Subtropical Greenhouses* 578 pp. 187-191
- LoSchiavo**, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., ... & Terzi, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77(3), 325-331.
- Luo**, J. P., Wang, Y., Zha, X. Q., & Huang, L. (2008). Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(3), 333-340.
- Lüttge**, U. (2004). Ecophysiology of Crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*, Vol.93, No.6, June, pp. 629-652
- Mahendran**, G., & Bai, V. N. (2012). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 135, 40-44.
- Mahendran**, G., Muniappan, V., Ashwini, M., Muthukumar, T., & Bai, V. N. (2013). Asymbiotic seed germination of *Cymbidium bicolor* Lindl.(Orchidaceae) and the influence of mycorrhizal fungus on seedling development. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3), 829-840.

- Mehrotra, S., Goel, M. K., Kukreja, A. K., & Mishra, B. N. (2007).** Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*, 6(13).
- Mok, M. (1994)** Cytokinins and plant development: an overview. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press, Boca Raton, FL: 155-166
- Mok, M. C., Mok, D. W. S., Turner, J. E., & Mujier, C. V. (1987).** Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*, 22.
- Morel G, & Martin, C. (1952).** Guérison de Dahlias atteints d'une maladie à virus. *C.R. Acad. Sci. Ser. D.* 235:1324-1325
- Morel, G. & Martin, C. (1955).** Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *CR Seances Acad. Agric. Fr.* 41: 472-475
- Morel, G. (1960)** Producing virus free cymbidiums. *Am. Orchid Soc. Bull.* 29: 495-497
- Morel, G. (1963)** La culture in vitro du meristème apical de certaines orchidées. *CR Hebd Seances Acad. Sci.* 256: 4955-4957
- Murashige, T & Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum.* 15: 473-497
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000).** Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Owen, H. R., Wengerd, D., & Miller, A. R. (1991).** Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. *Plant cell reports*, 10(11), 583-586.
- Pan, M. & Staden, J. (1998)** The use of charcoal in vitro culture – A review. *Plant Growth Regulation.* 26:155-163
- Park, S. (2003)** Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science* 164: 919-923
- Pearson, P.N. & Palmer, M.R. (2002).** Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years. *Nature*, Vol.406, No.6797, August, pp. 695–699
- Preil, W. (1991).** Application of bioreactors in plant propagation. In *Micropropagation* (pp. 425-445). Springer Netherlands.
- Pridgeon, A.M. (1987)** The velamen and exodermis of orchid roots. *Orchid biology. Reviews and perspectives IV.* Cornell University Press, Ithaca, pp. 139–192
- Qadeer, R., Hanif, J., Saleem, M., & Afzal, M. (1994).** Characterization of activated-charcoal. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 16(4), 229-235.

- Ramírez, S. R.,** Gravendeel, B., Singer, R. B., Marshall, C. R., & Pierce, N. E. (2007). Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*, 448(7157), 1042-1045.
- Ramos-Castellá, A.,** Iglesias-Andreu, L. G., Bello-Bello, J., & Lee-Espinosa, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-6.
- Raza, S.,** Qamarunisa, S., Hussain, M., Jamil, I., Anjum, S., Azhar, A., & Qureshi, J. A. (2012). Regeneration in sugarcane via somatic embryogenesis and genomic instability in regenerated plants. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 15(2), 131-136.
- Reinert, J.** (1959) Uber die kontrolle der morphogenese and die indoklion von advativa embryonen and geneted Ulturen aus karotten. *Planta*, 53: 318-333
- Reinhardt, D.,** Mandel, T., & Kuhlemeier, C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *The Plant Cell Online*, 12(4), 507-518.
- RongZhe, W.,** Chakrabarty, D., EunJoo, H., & KeeYoeup, P. (2007). Micropropagation of an endangered jewel orchid (*Anoectochilus formosanus*) using bioreactor system. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 48(6), 376-380.
- Roy, A. R.,** Patel, R. S., Patel, V. V., Sajeev, S., & Deka, B. C. (2011). Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl.(Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 325-331.
- Shaw, G.** (1994) Chemistry of adenine cytokinins. *Cytokinins: chemistry, activity and function*. CRC, Boca Raton, pp. 15–34
- Sheelavantmath, S. S.,** Murthy, H. N., Pyati, A. N., Kumar, H. A., & Ravishankar, B. V. (2000). In vitro propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. *Plant cell, tissue and organ culture*, 60(2), 151-154.
- Shin, Y.** (2011) Effects of activated charcoal, plant growth regulators and ultrasonic pre-treatments on in vitro germination and protocorm formation of *Calanthe* hybrids. *Austr. Journ. Crop Science* 5(5): 582-588
- Shudo, K.** (1994) Chemistry of diphenylurea cytokinins. *Cytokinins: chemistry, activity and function*. CRC, Boca Raton, pp. 35–42
- Silvera, K.,** Neubig, K. M., Whitten, W. M., Williams, N. H., Winter, K., & Cushman, J. C. (2010). Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. *Functional Plant Biology*, 37(11), 995-1010.
- Silvera, K.,** Santiago, L. S., Cushman, J. C., & Winter, K. (2009). Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. *Plant physiology*, 149(4), 1838-1847.

- Sodhi**, N. S., Koh, L. P., Peh, K. S. H., Tan, H. T., Chazdon, R. L., Corlett, R. T. & Bradshaw, C. J. (2008). Correlates of extinction proneness in tropical angiosperms. *Diversity and Distributions*, 14(1), 1-10.
- Suzuki**, R. M., Moreira, V. C., Pescador, R., & de Melo Ferreira, W. (2012). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5), 500-511.
- Teale**, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859.
- Teixeira da Silva**, J. A. (2012). New basal media for protocorm-like body and callus induction of hybrid *Cymbidium*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 20(2), 127-133.
- Teixeira da Silva**, J. A., Singh, N., & Tanaka, M. (2006). Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plantlets. *Plant cell, tissue and organ culture*, 84(2), 135-144.
- Teixeira da Silva**, J.A. (2013). In vitro rhizogenesis in Papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Plant Development* 20
- Thomas**, T. (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances*. 26(6): 618-631
- Thorpe**, T. (1980) Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects (Higher plants, root-shoot primordium formation). *International review of cytology*.
- Thorpe**, T. (1993) In vitro organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. *Morphogenesis in plants*. Springer US, pp. 19-38
- Thorpe**, T. (2007) History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180
- Thorpe**, T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.
- Tomáš** , W. & Schmülling, T. (2009) Cytokinin action in plant development, *Current Opinion in Plant Biology* Volume 12, Issue 5, 1 October, pp. 527–538
- Veyret**, Y. (1974) Development of the embryo and the young seedling stages of orchids. *The Orchid Scientific studies*, ed. C.L. Withner, Acad. Press. New York, USA. pp. 223-265
- Waes**, J. (1985) Effect of activated charcoal on in vitro propagation of western European orchids. *Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants*, pp. 212
- Waes**, J. (1987) Effect of activated charcoal on in vitro propagation of western european orchids. *Acta Hort.* 212(1): 131-138
- Walters**, R. G., Shephard, F., Rogers, J. J., Rolfe, S. A., & Horton, P. (2003). Identification of mutants of *Arabidopsis* defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. *Plant Physiology*, 131(2), 472-481.

- Weijers, D. & Jurgens, G. (2005)** Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 32–37
- Weng, J. Z., Lin, J. G., & Lin, J. B. (2006).** Influence of Different Activated Carbon Concentrations on Culture in Vitro of *Cymbidium sinense* [J]. *Subtropical Plant Science*, 3, 010.
- Williams, E. & Maheshwaran, G. (1986)** Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57: 443-462
- Wimber, D. (1963)** Clonal multiplication of cymbidiums through tissue culture of the shoot meristem. *Am. Orchid Soc. Bull.* 32, 105–107
- Yam, T. W., & Arditti, J. (2009).** History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*, 3(1), 1-56.
- Yang, J. F., Piao, X. C., Sun, D., & Lian, M. L. (2010).** Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of *Oncidium 'Sugar Sweet'*. *Scientia horticulturae*, 125(4), 712-717.
- Young, P. S., Murthy, H. N., & Yoeup, P. K. (2000).** Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 63(1), 67-72.
- Ziv, M. & Gadasi G. (1986)** Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus by activated charcoal in solid/liquid double-layer cultures. *Plant Sci*; 47: 115–22
- Ziv, M. (1999)** Organogenic plant regeneration in bioreactors. *Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century*. pp. 673-676
- Ziv, M. (1999).** Developmental and structural patterns of in vitro plants. In *Morphogenesis in plant tissue cultures* (pp. 235-253). Springer Netherlands.
- Zotz, G. & Winkler, U. (2013)** Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake, *Oecologia* 171: 733–741
- Zubo, Y. O., Yamburenko, M. V., Selivankina, S. Y., Shakirova, F. M., Avalbaev, A. M., Kudryakova, N. V. & Börner, T. (2008).** Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. *Plant physiology*, 148(2), 1082-1093.

Parte II – Empreendedorismo em orquídeas

Introdução

1. Apresentação

Nesta secção, e tendo por base a exploração teórica apresentada na primeira parte do trabalho sobre o processo laboratorial de produção de orquídeas *in vitro*, procede-se à formulação de um plano de negócio estratégico para o conceito de produção e comercialização de espécies exóticas de orquídeas em fase juvenil. O trabalho aqui apresentado é um projeto inovador a nível nacional, de um empreendimento biotecnológico. O projeto em estudo tem o nome de **Baby Orchids** e consiste em organizar uma oferta sob a forma de colecção de espécies naturais de orquídeas exóticas, disponíveis em diferentes tipos de embalagem, consoante o seu propósito e mercado alvo. O conceito passa por proporcionar ao mercado uma experiência cativante de acompanhar o crescimento da planta, tendo um papel ativo nesse processo, o que proporcionará momentos de lazer ao cliente, atingindo o seu momento apoteótico aquando da primeira floração da orquídea.

Assim, este projeto compõe-se como uma construção de ideias e acções de modo a identificar o seu lugar como fornecedor de um produto inovador para uma sociedade de consumo instável, caracterizada pela exigência, impaciência e volatilidade.

2. Contextualização

2.1 A globalização

Kotler definiu marketing como um conjunto de tarefas desenvolvidas por uma organização com vista a determinar e ir ao encontro das necessidades dos grupos de consumidores, com objetivo de equilibrar os lucros da organização com o interesse dos mesmos (Kotler, 1999).

Desde o início dos anos 80 que o mundo entrou por uma fase caracterizada pela enorme oferta diversificada de bens e serviços a nível mundial potencializada pela globalização e, em consequência disso, a competição acentuada é hoje uma das principais características do ambiente de marketing. A procura pelo lucro máximo e imediato tem-se mostrado uma prática parte do passado e ineficiente para a manutenção da atividade das empresas a longo prazo (Levitt, 1983). Isto significa que, actualmente, existe a capacidade de produzir e vender produtos em mercados planetários em competição aberta com todos os concorrentes. Os mercados globais aumentam largamente a competição internacional. No entanto, enquanto seguem uma estratégia de globalização, as empresas

terão que superar desafios como a organização de recursos humanos, tecnológicos, e físicos em mercados internacionais (Knight, 2000).

2.2. A orientação de mercado

A orientação de mercado é a geração e disseminação de informação e conhecimento por parte da organização acerca das soluções apropriadas, relacionadas com as necessidades e preferências dos clientes, bem como, do conhecimento sobre os concorrentes (Kohli, 1990). Ao longo da literatura, é sugerido que o principal objectivo da orientação de mercado consiste em oferecer um valor superior ao consumidor. Uma melhor compreensão das necessidades dos consumidores permite que uma empresa com forte orientação de mercado identifique e desenvolva capacidades necessárias para um sucesso duradouro (Day, 1994).

2.3. A procura da diferença inovadora

Ao longo dos tempos, alguns investigadores foram levantando reservas a respeito de uma focagem inquestionável que as empresas aplicam nos seus mercados. O principal motivo desta reserva é que, uma exagerada ênfase no consumidor poderá direccionar a empresa para inovações triviais e à miopia em investigação e desenvolvimento (I&D) do produto. Esta consequência, por seu turno, levaria à diminuição da competência inovadora. Devido a uma visão curta dos consumidores, as empresas com forte orientação de mercado poderão pôr em risco a sua visão de criação inovadora (Frosch, 1996).

Nas empresas a adopção de uma postura estratégica voltada à tecnologia produz um ganho em inovação relativamente às figuras concorrentes. Esta inovação tecnológica pode ser diferenciada em dois tipos de soluções: (i) avanços em tecnologia existente e (ii) êxodo de um segmento de mercado existente (Benner & Tushman 2003). O primeiro tipo, chamado de “inovações baseadas em tecnologia”, adopta novas e mais avançadas tecnologias para melhorar os benefícios de produtos existentes para os consumidores em mercados existentes. O segundo tipo, chamado de “inovações baseadas no mercado”, diverge de um historial em servir um mercado existente e generalista. Estas inovações envolvem novas e diferenciadas tecnologias para criar um conjunto de valores marginais para mercados emergentes (Benner & Tushman, 2003). É nesta perspectiva que o projecto apresentado se insere, ou seja, através de uma inovação tecnológica, ainda que com uma complexidade tecnológica reduzida, este projecto permite divergir do mercado tradicional de orquídeas, apresentando uma oferta com os seus valores particulares.

2.4. Valorizar o auto-presente

Em contexto de sociedade, a prática de presentear oferendas é extremamente comum e uma componente essencial das relações humanas. Provavelmente a função mais relevante de presentear é o simbólico acto interpessoal de comunicação, cujos propósitos implícitos e explícitos passam por felicitação, agradecimento, amor, ressentimento, obrigação e dominância. Outros propósitos, como intercâmbios sociais e económicos, e sociabilização. Desde a argumentação de Belk (1979) sobre este tema, vários artigos de pesquisa do consumidor foram editados sob a ideia conceptual do acto de presentear (Scammon, 1982; Sherry, 1983; Belk, 1984, 1988; Sherry and McGrath, 1989).

Em ciências sociais, o estudo sobre comportamento de compra de presentes, tem subjacente uma tendência de desenhar uma dicotomia entre produtos comprados para oferecer e produtos comprados para uso pessoal. Investigadores como Ryans (1977) e Levy (1982) usaram esta distinção de modo a examinar as diferenças no comportamento de compra. Por exemplo, na década de 70, Ryans argumentava que quando os consumidores que adquiriam produtos para uso pessoal não tinham, à partida, um preço alvo em mente, contrariamente aos consumidores que compravam presentes a terceiros Ryans (1977). No entanto, Levy parece ter sido o primeiro investigador em pesquisa do consumidor que particularizou o acto de comprar um auto-presente, como um prémio pessoal (Levy, 1982).

3. Objetivo do projecto

É objetivo deste estudo a implementação de um Plano Estratégico de Marketing num contexto empreendedor de empresa inovadora, nomeadamente de uma futura empresa biotecnológica de gestão própria, identificando as opções estratégicas viáveis que traduzam vantagens competitivas, bem como os diferentes pontos-chave para um possível sucesso operacional. Paralelamente, pretende-se demonstrar uma análise financeira preliminar que sustente um futuro Plano de Negócios inserido numa componente operacional do plano inicial.

Em suma, a hipótese que se coloca com este trabalho é: Poderá este projeto ter viabilidade de mercado a médio e longo prazo?

Metodologia

1. Estrutura do plano

O plano estratégico em estudo consiste nos seguintes pontos:

- **Diagnóstico:** análise do ambiente da futura empresa, ao nível das transações com outros agentes e do contexto em que se insere (microambiente de marketing e macroambiente de marketing)
- **Segmentação e Targeting:** Seleccionar o nosso segmento de mercado alvo através de critérios que se apresentem mais razoáveis e adequar o nosso produto às características desse ou desses segmentos alvo.
- **Posicionamento e proposta de valor:** Construir a imagem da empresa/marca no pensamento do mercado.
- **Marketing Mix:** Operacionalizar a proposta de valor diferenciada para que a marca seja consolidada e associada ao nosso propósito de posicionamento.
- **Plano de acção de Marketing:** Definir opções práticas para a implementação da estratégia planeada.

As conclusões que resultarão deste estudo provêm das considerações dos próprios consumidores através de palavras ou reações aquando da apresentação dos produtos. Esta forma básica de pesquisa foi experienciada igualmente em pesquisa de comportamento de compra, nomeadamente em posse especial (compras com forte conotação emocional) (Myers, 1985) e compra por impulso (Rook, 1987). A abordagem aos consumidores foi realizada em contexto de venda de bancada em diferentes feiras urbanas, ex. Flea Market. Neste formato foi apresentado o produto em várias cidades como Braga, Porto, Leiria e Maia.

1.2. O questionário

Paralelamente, foi desenvolvido um questionário para consumidores mais dispostos a colaborar, onde se pretende a percepção do produto aos seus comportamentos de compra mais habituais e conscientes.

O questionário é composto por 4 campos identificativos, 10 questões relativas a comportamento de compra e 6 questões relativas ao produto apresentado. As respostas estavam limitadas à opção considerada mais adequada.

Os campos identificativos foram: Género, Idade, Estado civil e Habilitação Profissional. Para além da importância de perceber se o produto é preferido por homens e mulheres, e respectivas idades,

também se considerou importante relacionar a preferência do produto com o estado civil, dado que este dado pode ser indicativo do tipo de habitação e respectiva decoração (familiar, social ou minimalista). Relativamente à questão sobre Habilitação Profissional, foi importante dividir o questionário de acordo com as actividades primária, secundária e terciária, para as quais os inquiridos estão habilitados, independentemente da situação actual ser empregado, desempregado ou reformado. Assim poderá ser associado o sector de experiência profissional à receptividade do produto.

As questões relativas ao comportamento de compra foram:

O número de vezes que o entrevistado compra, por mês, presentes para o próprio (1) e para familiares/ amigos (6) - o objectivo destas questões é averiguar a frequência com que o público-alvo tem a atitude activa de procurar um presente tanto para ele próprio como para terceiros;

A categoria dos presentes comprados para o próprio (2) e para familiares/ amigos (7) - o objectivo destas questões é averiguar a categoria de produtos que o público-alvo tem como preferência ou hábito de procurar para presente;

Quanto costuma gastar em presentes para o próprio (3) e para familiares/ amigos (8) - o objectivo destas questões é averiguar o intervalo do custo que o público-alvo tem como preferência ou hábito suportar para presentes;

O modo como o presente é decidido para o próprio (3) e para familiares/ amigos (10) - o objectivo destas questões é averiguar o modo de escolha habitual do público-alvo para presentes;

O que considera mais importante a nível de grau de satisfação em detrimento da durabilidade da mesma (4) - o objectivo desta questão é comparar a importância do grau de satisfação com a durabilidade desta satisfação, de modo a averiguar a preferência por produtos de consumo imediato *versus* de longa duração;

O que considera a característica mais importante em presentes para familiares/ amigos (9) - o objectivo desta questão é averiguar a prioridade intencional com que o entrevistado espera que o seu presente seja percebido;

As questões relativas à percepção do produto foram:

Se já conhecia o produto antes deste questionário (11);

Se considera o produto um presente apetecível próprio (12) e para familiares/ amigos (13);

Se gostaria de receber o produto como prenda de familiares/ amigos (14);

Quanto estaria disposto a pagar pelo produto (15);

Quanto tempo de longevidade estima para o produto (16).

Análise dos resultados:

A análise dos resultados foi efectuada segundo uma perspectiva qualitativa, desta forma não se pretende avaliar estatisticamente opções de resposta mas sim avaliar o impacto imediato que a tomada de consciência do produto produzia em termos do posicionamento na mente do público, nomeadamente se o percebiam como apetecível, atractivo, valioso ou perecível. As respostas foram registadas, analisadas e organizadas por categorias de resposta de acordo com as recomendações da literatura (Miles e Huberman, 1994). A primeira parte do questionário que não é relativa às orquídeas bebés tem como finalidade uma abertura e empatia para apurar melhor as respostas específicas ao produto.

1.3. Nuvem de referências

Ao longo das apresentações do produto em exposições ao vivo, registou-se os termos espontâneos do público que percepcionava o produto e que os demonstrava quer por conversa directa com o promotor da exposição quer em conversa com amigos e familiares de forma audível para o promotor. Em função da repetibilidade dos termos proferidos, elaborou-se uma classificação qualitativa, onde se evidenciou os termos mais utilizados (Miles e Huberman, 1994).

Planeamento Estratégico de Marketing

1. Diagnóstico do macroambiente de mercado

As mudanças no ambiente de mercado influenciam a eficiência das empresas. Uma técnica popular, a análise PESTEL foi utilizada para explorar o macroambiente. O acrónimo PESTEL refere-se aos factores Político, Económico, Social, Tecnológico, Ecológico e Legal que influenciam o macroambiente onde a empresa exerce a sua actividade. Alterações nestes factores podem criar incerteza, ameaças ou oportunidades. De modo a antecipar os possíveis cenários, os factores externos deverão ser avaliados. A nível político-legal, novas leis poderão aumentar ou encurtar a dimensão de mercado, bem como, certas decisões políticas poderão beneficiar, através de subsídios, ideias inovadoras ou em áreas preferenciais. A nível económico, o poder de compra, o receio ou a confiança económica traduzem factores preponderantes para as empresas. A nível sócio-cultural, as modas, as tendências, a dinâmica dos grupos de consumidores reflecte-se numa variação na procura dos produtos e na resposta a estímulos de consumo. A nível tecnológico, a rápida evolução nesta área condiciona a actualidade dos produtos face às inovações, ao mesmo tempo que potencia novos segmentos de mercado divergentes. A nível ecológico, a consciência global nesta temática tem assumido um papel decisivo, potenciando empresas que assumam esta responsabilidade ambiental. (Mayer-Wittman, 1989; Sanchez, 1997).

Sendo uma empresa biotecnológica, o ambiente tecnológico terá uma grande preponderância. De modo a que a tecnologia da empresa se mantenha o mais actualizada possível, será necessário uma interacção permanente com, pelo menos, um pólo universitário, neste caso particular com a Escola de Ciências da Universidade do Minho. Desta forma, os avanços científicos e tecnológicos, como foi o caso da utilização de biorreatores para produção em massa, serão divulgados e adaptados no seio da empresa.

A nível político, o QREN (Quadro de Referência Estratégico Nacional), aponta a “utilização dos fundos comunitários, no período de 2014-2020, para a promoção da competitividade e internacionalização da economia portuguesa, num contexto de orientação para a produção de bens e serviços transaccionáveis, terá como prioridades: o incentivo ao investimento empresarial em inovação, criatividade, internacionalização e formação; o reforço das capacidades de investigação e inovação; o desenvolvimento das ligações e sinergias entre empresas, centros de I&D e o ensino superior; a melhoria da conectividade internacional da economia portuguesa e a modernização da administração pública, visando a redução dos custos de contexto” (G.P.P., 2012). Assim, uma

possível candidatura ao QREN poderá ser sustentada pela perspetividade inovadora de um produto em constante desenvolvimento, com grande potencial exportador para países com mercados emergentes e inclusivamente, para países com mercados saturados com orquídeas adultas, que reconheçam neste produto uma alternativa diferenciada e apetecível.

A nível económico, observa-se que na capacidade produtiva do país existe um défice de produção interna, segundo os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE) relativo ao mercado de plantas ornamentais em 2012: *“O saldo da balança comercial das plantas ornamentais registou uma acentuada diminuição, passando dos -24,8 milhões de euros em 2002 para os -6,8 milhões de euros em 2011, em consequência do aumento das exportações (+146%). A taxa de cobertura das importações pelas exportações relativamente à Holanda, principal parceiro comercial de Portugal neste tipo de produtos, passou dos 19% em 2002 para os 68% em 2011”*.(INE, 2012). Apesar de a nível macroeconómico, esta ser uma notícia favorável à economia nacional, este dado significa que existe espaço de mercado para produzir mais plantas ornamentais em território português dirigido ao consumo nacional. No entanto, o aumento produtivo verificado nos últimos anos parece ter como objetivo a exportação, dado o elevado aumento desta e, tendo em conta a continuada importação de produtos florícolas, este aumento produtivo não parece estar a satisfazer a procura interna: *“A produção de flores, folhagens e plantas ornamentais nacionais continua a ser insuficiente para satisfazer a procura interna. As importações de plantas ornamentais são dominadas pela Holanda (54% em 2011), merecendo destaque a Espanha que apresenta uma quota de mercado de 30%.”*. (INE, 2012)

Assim, mais do que identificar o fluxo de plantas é necessário saber que plantas são importadas e quais são exportadas, em particular as orquídeas, mas nos dados do INE, estas surgem constantemente englobadas em “outras plantas” o que condiciona a informação.

A nível social, é importante ressaltar a estrutura de empregabilidade associada à exploração de produtos florícolas, que claramente contrasta com a vertente familiar dos produtos hortícolas, característica de uma economia de sobrevivência: *“Em Portugal existiam 1.010 explorações em 2012 a produzir culturas florícolas numa área base 1.365 ha, 1/3 dos quais em estufa. As plantas ornamentais têm maior expressão nas regiões do Centro (30%) e do Algarve (20%)*.

Para podermos ter uma ideia da dimensão do mercado de plantas ornamentais, em 2012 registou-se cerca de 60 milhões de plantas ornamentais comercializadas, pertencentes a mais de 360 espécies diferentes, com múltiplas valorizações comerciais (INE, 2012). Na falta de dados específicos do comércio de orquídeas em Portugal, iremos recorrer a dados bibliográficos acerca do exemplo Norte-Americano. Assim, nos E.U.A., as orquídeas são a segundo grupo de plantas em termos de vendas nacionais, o valor negociado em orquídeas envasadas aumentou 80% em dez anos, partindo de 70

milhões de dólares em 1997 e atingindo 126 milhões de dólares em 2007. Em termos de produção, de acordo com o Departamento de Agricultura dos EUA, o número de orquídeas produzidas em território norte-americano aumentou 61%, de 9,58 milhões em 1997 para 15,4 milhões em 2007 (USDA, 2007). Um estudo americano efectuado com o intuito de analisar as preferências dos consumidores acerca dos atributos das orquídeas concluiu que a maioria dos entrevistados foram capazes de identificar a espécie correcta que estavam a comprar (57,8%), sendo que a restante parcela (42,2%) não era capaz de identificar especificamente qualquer espécie de orquídea. Paralelamente, o mesmo estudo revelou que o factor mais influenciador, apontado pelos consumidores, foi o preço (30,90%), seguido por tamanho (26,28%), a espécie (25,58%) e por último a cor (17,23%) como o atributo menos importante (Palma, 2010).

Por último, analisando o panorama ecológico que, de alguma forma poderá influenciar esta iniciativa, observamos que existem inúmeras espécies vegetais ameaçadas de extinção, inclusivamente várias orquídeas já foram declaradas extintas na natureza, havendo alguns laboratórios a divulgar alguns espécimes *in vitro* como únicos sobreviventes da espécie. Contrariamente aos inúmeros cruzamentos artificiais entre orquídeas que produzem todo o tipo de híbridos, a grande maioria incapaz de se reproduzir naturalmente (devido a aberrações cromossómicas), a empresa em estudo apresenta-se como defensora das espécies nativas, ou seja, das espécies que foram evoluindo ao longo dos tempos pelas regras da selecção natural. Desta forma, a colecção de espécies da empresa poderá, a qualquer momento suprimir uma necessidade de reinserção de uma espécie em perigo na natureza, mantendo o seu património genético.

2. Diagnóstico do microambiente de mercado

Uma empresa não se define só por um empreendimento isolado, pelo contrário, esta constituiu um organismo dinâmico que se estabelece em rede simbiótica com os seus fornecedores, os seus intermediários, os seus clientes e até mesmo com os seus concorrentes. A empresa, nos dias de hoje, está constantemente a ser avaliada pela opinião pública, sendo facilmente conotado com alguns dos muitos atributos próprios do sector, sejam eles positivos ou negativos, como por exemplo: empresa verde, solidária, comércio justo, ou por outro lado, de industrial, enganadora ou de lucro fácil. (Mayer-Wittman, 1989).

Assim é importante a empresa cimentar as ligações com parceiros credíveis que inspirem confiança no consumidor, este factor é tanto mais importante quanto mais for a inovação nos seus produtos.

Na empresa em estudo, os fornecedores gerais assumem um papel muito pequeno, a empresa somente “consome” embalagens, material de laboratório, substratos, etc., sendo que todos estes

produtos são inertes, estão tabelados e possuem variações muito baixas no preço. No entanto, existe um fornecedor com um papel bastante importante, o fornecedor dos propágulos das orquídeas iniciadores da cultura, possuindo este uma colecção catalogada à qual a empresa recorre em exclusividade.

A interacção com o cliente não será feita diretamente pelos funcionários da empresa mas sim pelos intermediários, ou seja, nos postos de venda, podendo ou não, estes pontos de venda, proporcionarem ao cliente um serviço personalizado. Assim é importante identificar as características dos diferentes tipos de postos de venda:

- Floristas ou hortos: Estes são pontos de venda com boas características humanas, ou seja, nestes espaços, normalmente, os clientes podem facilmente conversar com os responsáveis e satisfazer todas as curiosidades e dúvidas a respeito dos produtos. Cada vez mais, estes entrepostos comerciais assumem um papel dominante do comércio de flores e plantas. Dados de 2012 revelam que os *garden centers* constituem a principal forma de escoamento das plantas ornamentais, comercializando 39% da produção total em 2012, seguindo-se o mercado externo (25%) (I.N.E., 2012);

- Grandes superfícies: Estes espaços possuem uma exposição alargada, a capacidade de venda é aumentada, no entanto, o produto terá que falar por si, pois o apoio personalizado é praticamente inexistente. (Para que tal fosse possível, todos os funcionários da secção do produto teriam que ter formação no produto e disponibilidade para explicar aos clientes);

- On-line: A venda através da internet apresenta-se como o modo mais informativo, dado que a toda a informação acerca dos produtos (ex. condições de cultura, características das espécies, fotos em estado adulto, etc.) está disponível na página oficial. As encomendas poderão ser efectuadas a qualquer hora ou dia da semana, no entanto, de modo a justificar o custo de envio, que deverá equivaler à percentagem cedida aos outros intermediários, os utilizadores deverão ter um número mínimo de encomenda.

Face à inovação dos produtos comercializados, será difícil nesta fase, identificar com exactidão os concorrentes directos e indirectos. Poder-se-á supor que um produto como uma orquídea adulta envasada seria um concorrente directo, mas na verdade, nem o preço nem a utilidade imediata, estão relacionados com a nossa oferta, de modo que curiosamente, o comercializador de orquídeas, deverá ser mais um concorrente indirecto ou até mesmo um potenciador, dada a divulgação que faz das orquídeas adultas. A lista de potenciais concorrentes indirectos, ou seja, empresas com produtos diferentes para os mesmos clientes, é extensa, podendo ser denominados concorrentes todos os produtos decorativos, ou presentes, de igual valor, quer sejam igualmente florícolas ou não. Desta forma, de momento só os produtores tradicionais de mudas de orquídeas deverão assumir o papel de

concorrente directo, no entanto, estes operam de um modo pouco transparente relativamente à verdadeira proveniência das plantas e não estão acessíveis ao público geral.

3. Conhecer o cliente

O comportamento de compra assume um papel fundamental no sucesso da implementação de um produto inovador no mercado (Anderson, 2006). O conhecimento sobre a motivação para um consumidor aceitar ou rejeitar um tipo de produto, até então desconhecido, revela-se decisivo para desenvolver tarefas de adaptação da oferta e da percepção dessa mesma oferta.

De modo a recolher dados relativos ao comportamento de compra e relativos à percepção do produto, foi elaborado um pequeno inquérito e distribuído por uma amostra heterógena de pessoas em idade adulta. Os entrevistados foram informados do propósito do inquérito e foi-lhes apresentado o produto Baby Orchids sob a forma de Globo Decorativo.

3.1 *Feedback* das apresentações

Com base nos comentários voluntários do público que percepcionava a apresentação dos produtos, elaborou-se uma hierarquização dos termos mais utilizados (Fig. 1)



Fig. 1 – Nuvem de referências espontâneas do público, representando os termos mais utilizados evidenciados pelo tamanho de letra na figura.

No contexto de apresentação sob a forma de venda urbana, registou-se os comentários do público que se aproximavam para satisfazer a curiosidade após perceberem o produto (fig. II.1). As dúvidas mais recorrentes eram:

- 1 – Isto (planta em saqueta) cresce ou fica deste tamanho?
- 2 – Daqui a quando tempo vai dar flor?
- 3 – São produzidas cá (Portugal)?
- 4 – O que é preciso para fazê-la crescer?
- 5 – Quanto tempo dura?

Nas exposições efectuadas, das pessoas que circulavam pela feira e viam a banca das “Orquídeas Bebés”, em cerca de metade dos grupos pessoas (amigos, casais, famílias, etc.) uma dessas pessoas chamava a atenção dos restantes com algo do tipo “- Olha que engraçado, são orquídeas bebés!”

3.2. Resultados dos inquéritos

Na monitorização dos resultados dos questionários, procedeu-se a distribuição percentual das repostas em cada alínea, relevando a resposta mais votada e a menos votada (Tabela 1).

Tabela 1 – Listagem das questões com apresentação resposta mais votada *versus* a menos votada (n=50):

#	Questão:	Resposta mais votada	%	Resposta menos votada	%
1	Quantas vezes, por mês, costuma comprar um auto-presente?	b) Uma ou duas;	55	e) Muitas (+ de 12)	3
2	Que categoria de auto-presentes prefere?	b) Moda e Vestuário;	55	a) Comida e bebida;	3
3	Quanto costuma gastar em auto-presentes?	c) De 10 a 20 €;	38	a) Menos de 5 €;	8
4	O que considera mais importante num auto-presente?	c) Satisfação boa por um médio prazo;	50	e) Elimine um problema;	3
5	Como decide o seu auto-presente?	a) Visita as lojas;	60	c) Por sugestão de amigos/familiares;	0
6	Quantas vezes por mês costuma comprar um presente a familiares e amigos(as)?	b) Muito poucas (1 a 2 vezes);	63	e) Muitas (+ de 12 vezes);	0
7	Que categoria de presentes prefere para familiares e amigos(as)?	c) Lazer e Recreação;	38	d) Tecnologia e Equipamentos;	5
8	Quanto costuma gastar em presentes a familiares e amigos(as)?	c) De 10 a 20 €;	45	a) Menos de 5 €;	0
9	O que considera mais importante num presente para familiares e amigos(as)? Como decide o presente para familiares e amigos(as)?	a) Ser útil	43	c) Ser duradouro	5
10	Como decide o presente para familiares e amigos(as)?	a) Visita as lojas;	58	e) Pesquisa nos folhetos;	3
11	Conhecia o produto “orquídea bebé”?	a) Não;	83	b) Pesquisa na internet;	0
12	Considera o produto “orquídea bebé” um auto-presente apetecível?	b) Sim;	70	e) Não;	0
13	Considera o produto “orquídea bebé”	b) Sim;	70	d) Dificilmente;	0

	um presente apetecível a familiares e amigos(as)?				
14	Gostaria de receber o produto “orquídea bebé” como prenda de familiares e amigos(as)?	b) Sim;	75	e) Não;	3
15	Quanto estaria disposto a pagar pelo produto “orquídea bebé”?	b) Entre 3€ e 5,99€;	63	e) Mais de 12€;	0
16	Quanto tempo de longevidade estima para produto “orquídea bebé”?	b) Alguns meses;	38	a) Menos de um mês;	3

Relações coincidentes entre respostas:

Na questão “*Considera o produto “orquídea bebé” um auto-presente apetecível?*” as respostas negativas (d) *difícilmente* ou e) *não*) foram dadas por pessoas Solteiro(a) e Homens (2 respostas);

Na questão “*Considera o produto “orquídea bebé” um presente apetecível a familiares e amigos(as)?*” as respostas negativas (d) *difícilmente* ou e) *não*) foram dadas por pessoas Solteiro(a) e Homens (1 resposta);

Na questão “*Gostaria de receber o produto “orquídea bebé” como prenda de familiares e amigos(as)?*” as respostas negativas (d) *difícilmente* ou e) *não*) foram dadas por pessoas Solteiro(a) e Homens (3 respostas);

Na questão “*Quanto estaria disposto a pagar pelo produto “orquídea bebé”?*” as respostas com o valor igual ou superior a 6€ foram dadas por pessoas com Habilitação Profissional para Serviços e Solteiro(a) ou Viúvo(a);

4. Análise do Potencial estratégico

A análise SWOT consiste numa ferramenta importante de avaliação de desempenho de um negócio, que consiste em responder a questões simples tais como: O que há de bom e mau neste projeto? E o que há de bom e mau na realidade actual e na realidade futura? (Humphrey, 2005).

Ao realizar este exercício de auto-análise, pretende-se evidenciar os pontos-chave que se identificam com as Forças e Fraquezas do projeto, bem como as Oportunidades e Ameaças a que este projeto estará exposto.

Tabela 2 – Matriz SWOT

	FORÇAS	FRAQUEZAS
AMBIENTE INTERNO	<ul style="list-style-type: none"> • Novidade • Atractividade • Rápida disponibilidade • Organograma simples 	<ul style="list-style-type: none"> • Pouca experiência em <i>ex vitro</i> • Produção limitada • Elevado custo de expansão
	OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
AMBIENTE EXTERNO	<ul style="list-style-type: none"> • Vivência “em casa” • Socialização “em casa” • Produção nacional • Coleccionismo de plantas nobres 	<ul style="list-style-type: none"> • Posicionamento das orquídeas como planta já florida • Sector bem estruturado e difícil • Crise económica

5. Segmentação de mercado

Smith (1956) foi o primeiro investigador a definir os conceitos importantes e práticos da segmentação de mercado e *targeting* do produto que actualmente ainda são considerados fundamentais nas estratégias de gestão. Segmentação é o processo de divisão de um mercado em grupos de consumidores, consumidores estimados, ou situações de compra, de modo a que os membros desse grupo terão sejam homogéneos entre si e suficientemente distintos de outros segmentos (Smith, 1956). Desta forma, dentro de cada segmento, o comportamento de compra será semelhante e reagirá aos mesmos incentivos com motivação semelhante (Bonoma and Shapiro, 1983).

No entanto, uma segmentação de mercado pode conduzir a partições extremamente restritas que não traduzem as particularidades da heterogeneidade do mercado. A distribuição de produtos variados pode-se revelar mais indicadora dos parâmetros individuais dos consumidores e poderá suportar uma abordagem mais particular de um para um (Wedel, 2002).

Moore conceptualizou um modelo de procura de produtos tecnológicos baseado em segmentos generalistas (Moore, 1991). Este modelo, descreve a adopção de produtos pelos diferentes segmentos como um processo temporal que se traduz num ciclo de vida do produto. Numa breve descrição, as categorias organizam-se sequencialmente desta forma:

1º - Os tecnólogos que adoram novidades, principalmente por ser novidade e intrigante (*early concept adopters*);

2º - Os visionários que percebem a vantagem de adopção inicial como uma vantagem competitiva;

3º - Os pragmáticos que gostam de se manter conhecedores e competitivos mas sem arriscar uma adopção radical;

4º - Os conservadores que apenas adoptam o produto de uma forma calculada após uma clara demonstração das vantagens;

5º - Os cépticos que não lhes resta alternativa senão adoptar o produto, mantendo sempre que o antigo era preferível.

Numa empresa nova, será importante a focalização na segmentação que, em perspectiva, lhe trará a maior retorno em vendas, isto porque, os recursos e a capacidade exploratória de uma pequena empresa recém-criada são muito limitados. Assim, a análise dos critérios lógicos da divisão do mercado foram apoiados por considerações teóricas e incursões práticas, nomeadamente pelo acima mencionado, feedback da apresentação do produto.

Critérios relevantes para a segmentação de mercado:

- Pessoas que possam ter plantas em casa, preferencialmente que gostem de acompanhar o crescimento das mesmas;
- Pessoas que possuam capacidade económica para comprar uma novidade, com o risco de perda do investimento (*early concept adopters*);
- Pessoas que possuam capacidade motivacional para comprar algo sem a total garantia de satisfação;
- Pessoas que reconheçam uma orquídea como uma planta nobre e desejável;
- Pessoas que tenham confiança na sua competência de cuidar de plantas exigentes.

Confrontando o já apresentado feedback da apresentação do produto com os critérios teorizados, podemos encontrar tendências e vícios que atestam a racionalidade dos critérios apresentados, assim:

- Várias pessoas salientaram o facto de gostarem de ter plantas em casa, independentemente do tipo de planta, validando o critério (1) mas tornando-o abrangente;

- Muitas pessoas elogiaram o facto de apresentar, de forma original, uma orquídea, que segundo as mesmas, seria a sua planta preferida, o que me leva a crer que o critério (4) é importante e de alguma forma intrínseco da cultura nacional;

- Mais pessoas afirmaram gostar de orquídeas do que aquelas que afirmaram gostar de plantas em casa, o que me leva a crer que a empatia pelas orquídeas não é por si só motivo para adoptarem uma.

O critério (1) revelou-se ligeiramente mais específico;

- Muitas pessoas relataram a sua má experiência com orquídeas, acabando na morte das mesmas, sendo que, este facto confere bastante especificidade ao critério (5);
 - Apenas algumas pessoas, de facto, aceitaram pagar pelo produto, no entanto, salvo uma ou outra excepção, apenas compraram uma unidade e, regra geral, deixando um comentário de dúvida acerca da longevidade do produto, esta atitude revela a fragilidade da sua capacidade económica para suportar o risco ainda que o desejem, validando o critério (2)
 - A capacidade de lidar com a novidade, seja a nível de preço ou a nível de expectativa, é o critério mais selectivo dos apresentados, a capacidade para a motivação de compra sem ter garantia da expectativa releva uma mente aberta e curiosa dos consumidores, traduzindo-se numa baixa percentagem de adopção, como descrito no modelo de Moore (1991).
 - Pelo que pude experienciar, todas as pessoas que se enquadravam na especificidade de quatro dos cinco critérios propostos, compraram um ou mais produtos na mesma compra.
- Considerando os critérios anteriores é possível definir 3 segmentos de mercado com bases nos critérios (Tabela 3).

Tabela 3 – Matriz para segmento em função dos critérios de selecção

Premissas	Segmento		
	Base	Decorativo	Brinde
Gosta e estimam as plantas;	Sim	Sim	Sim
Possui capacidade económica;	Não	Sim	Sim
Possui capacidade motivacional;	Sim	Sim	Sim
Reconhece a nobreza da orquídea;	Sim	Sim	Sim
Possui confiança/ competência;	Sim	Sim	Não

6. Diversidade da oferta - *targeting*

Com o objetivo de satisfazer as necessidades de cada segmento identificado, idealizei um produto adaptado a cada um dos três segmentos (Tabela 4):

- Para o segmento base, foi necessário idealizar um produto que prescindisse de um dos critérios-chave, nomeadamente a capacidade económica. Este produto distingue-se dos outros pelo baixo custo, fruto de uma embalagem temporária, económica mas ainda assim, atractiva. O resultado foi o **Formato Saqueta**;

- Para o segmento “pronto a usar”, a oferta apresenta-se o mais completa possível, de modo a disponibilizar um produto ornamental pronto a ser colocado e admirado – **Formato Globo;**

- Para o segmento brinde, o produto apresentado não dependerá da confiança/ competência para criar o produto pelo consumidor, dado tratar-se de uma oferta impessoal (para um grande número de pessoas), podendo mesmo ser institucional. O factor mais importante será uma embalagem tipo prenda - **Formato Frasco Rolhado.**

Tabela 4 — Matriz para formato em função das características do produto

Características	Formato		
	Saqueta	Vaso	Frasco
Pronto a usar;	Não	Sim	Sim
Manutenção a curto prazo;	Sim	Não	Sim
Manutenção a longo prazo;	Sim	Sim	Sim
Requer envasamento urgente;	Sim	Não	Não
Requer envasamento futuro;	Sim	Sim	Não

7. Posicionamento

De modo a que a futura empresa possa ser percebida pelos consumidores como uma proposta de valor, ela terá que responder a 3 questões: (i) Que tipo de empresa é?; (ii) O que é que a empresa produz?; e (iii) Qual a vantagem desse produto?. Só desta forma o consumidor ficará com uma ideia mental completa e interiorizada sobre o projecto. E em que é que se diferencia? (Brooksbank, 1994)

(i) Que tipo de empresa é?

O projeto Baby Orchids pretende criar uma empresa de micropropagação vegetal de orquídeas;

(ii) O que é que a empresa produz?

A futura empresa irá produzir uma variedade de espécies de orquídeas, em estado juvenil, podendo fornecer substratos, recipientes, equipamentos e formação para o seu cultivo;

(iii) Qual a vantagem desse produto?

A Baby Orchids diferencia-se pela oferta de uma experiência de adopção de orquídeas exóticas em estado juvenil, sempre de espécies botânicas, com identificação da espécie, promovendo o coleccionismo a um preço reduzido.

O modo como se processará a comunicação desta proposta de valor aos consumidores irá ser determinante no sucesso da iniciativa. Segundo alguns investigadores, é possível identificar três tipos

de proposta de valor: a) Todos os benefícios, b) Pontos favoráveis de diferenciação, c) Focagem ressonante (Anderson, 2006).

Todos os benefícios – Numa construção de proposta de valor deste tipo, a estratégia seria apresentar todos os benefícios que, na perspectiva da empresa, poderiam proporcionar valor à proposta, sem no entanto possuir a assertividade necessária, ou seja, uma ou mais vantagens anunciadas podiam não representar qualquer valor para o cliente. Como exemplo, uma proposta de valor deste tipo poderá ser: As Baby Orchids proporcionam ao consumidor uma satisfação: da estima, pela propriedade de um adorno com a invejável beleza de espécies exóticas; de pertença, pela possibilidade de se inserir numa comunidade de orquidófilos com actividades permanentes; de realização pessoal, pela superação dos desafios aliados à cultura da planta até à sua maturidade e floração. No entanto, nem todas estas vantagens são valorizadas por todos os consumidores ou mesmo são únicas deste produto.

Pontos favoráveis de diferenciação – A apresentação de uma proposta de valor deste tipo já implica um maior conhecimento sobre os consumidores e sobre a concorrência, propondo uma alternativa. Neste caso, a proposta deverá responder à pergunta: Porque deverei comprar uma Baby Orchid e não outro produto? Assim, a proposta de valor será uma explicação dos pontos de diferenciação relativamente aos produtos concorrentes. Como exemplo, uma proposta de valor deste tipo poderá ser: As Baby Orchids distinguem-se, das orquídeas mais vendidas no país, pelo seu preço reduzido, pela sua identificação taxonómica (espécie), pela oferta de formatos (saqueta, brinde e decorativo), pela raridade das espécies em catálogo, pelo suporte informativo de cultura e pela novidade. No entanto, todos estes parâmetros de diferenciação possuem um valor diferente, no caso de um produto inovador, como este, é normal que sejam muitos os pontos de diferenciação, o que poderá conduzir a alguma confusão ao consumidor quando avalia as alternativas, sendo que um produto confuso pode ser facilmente preterido.

Focagem ressonante - Uma proposta de valor deste tipo, será construída em torno de um ou dois pontos de diferenciação. Esta proposta diferencia-se da anterior pelo conceito de que ter mais vantagens não implica ser melhor, e que a focagem no ponto de maior valor trará mais vantagem competitiva, assim, este ponto deverá ser o ponto-chave da empresa e ser potenciado e enfatizado de modo a ser incomparável a nível perceptivo. Como exemplo, uma proposta de valor deste tipo poderá ser: As Baby Orchids distinguem-se pela melhor oferta nacional de espécies de orquídeas em catálogo, contando com produtos de alta raridade e inacessíveis de outra forma. Uma vantagem clara desta construção de proposta de valor é a possibilidade de correcção da estratégia, caso o ponto-chave não tenha sido o melhor dos possíveis, a orientação poderá ser corrigida para outro ponto sem que a proposta de valor corra a risco de ser repetitiva. Estou convicto que esta construção de proposta de valor será a ideal para representar a oferta da Baby Orchids.

8. Marketing Mix

8.1 Produto

8.1.1. Gama

A oferta do produto pretende-se dividida em 3 gamas:

Gama baixa: Formato Saqueta - planta em saqueta (Fig. 2), ideal para o conceito de “plante você mesmo” ou para viveiristas;



Características: Planta inserida em substrato dentro de uma saqueta fechada de plástico, identificada com uma etiqueta autocolante.
Dimensões: 100mm x 70mm x 8 mm. Peso aprox.: 50g.

Fig. 2 – Imagem de saqueta com orquídeas bebé

Gama média: Formato globo de vidro (Fig. 3), para o público em geral;



Características: Planta inserida em substrato dentro de um globo de vidro, identificada com uma tira de cartão.
Dimensões: 100mm x 100mm x 100 mm. Peso aprox.: 150g.

Fig. 3 – Imagem de globo com orquídeas bebé

Gama especial: Formato brinde - planta em frasco de vidro rolhado (Fig. 4), ideal para promotores de eventos ou público de ocasião (ex. casamentos) com um significativo número mínimo de venda;



Características: Planta inserida em substrato dentro de um frasco de vidro com rolha de cortiça, identificada com uma etiqueta de cartão.
Dimensões: 70mm x 50mm x 50 mm. Peso aprox: 100g.

Fig. 4 – Imagem de frasco com orquídeas bebé

8.1.2. Ciclo de vida

Apesar de todo o tipo de produtos estarem sempre disponíveis sob encomenda, de modo a manter pelo menos um produto em fase de crescimento, a promoção dos diferentes tipos de gama será faseada, de forma a manter o interesse dos consumidores satisfeitos e a conquista de novos consumidores. Assim, numa primeira fase pretende-se promover o formato saqueta, estima-se que na sua fase de crescimento consiga cativar os consumidores para experimentar uma ou mais espécies (*early adopters*). Seguidamente, quando se estabelecer alguma confiança no produto, pretende-se cativar visionários com interesses comerciais (*garden centres*) e sugerir o Formato Globo (ou similar), de modo a que os consumidores reticentes do formato saqueta, possam ter uma opção mais rápida de início de cultura (pronto a usar). Dado que se trata de um produto vivo de crescimento contínuo, os consumidores mais pragmáticos e cépticos ficarão sempre atrás dos adeptos primários no que respeita ao desenvolvimento da planta, isto poderá condicioná-los a adquirir várias espécies em simultâneo “para compensar o tempo perdido”.

O formato brinde deverá ser promovido num circuito paralelo (não disponível nos postos de venda) de modo que poderá ser lançado e recolhido por sazonalidades, beneficiando indirectamente pela fase de vida dos outros segmentos.

8.1.3. Qualidade

O produto apresentado é um produto de alta qualidade devido ao modo através do qual é obtido (micropropagação *in vitro*). A obtenção de plantas através desta tecnologia permite ao produto ser isento de pragas e doenças, incluindo infecções por vírus que estão presentes em muitas plantas comercializadas de um modo silencioso (sem sintomas). O processo de produção garante igualmente que a orquídea bebé possua o património genético da planta mãe (uniformidade clonal).

8.1.3. Marca

Na construção do nome e do logótipo, pretendeu-se criar uma marca “verde” e exótica que traduzisse o acesso a uma variedade de espécies de orquídeas em estado juvenil. Para consolidar esta perspectiva, será necessário associar esta marca a revendedores confiáveis e solícitos às questões dos seus clientes, permitindo criar a imagem de uma vivência viciante de coleccionismo e lazer.



Fig. 5 – Logotipo ma marca Baby Orchids

8.1.4. Preço

Condicionante (CUSTO): Salvar o preço de produção, distribuição e desenvolvimento como revendedores – Esta componente do preço será a opção a aplicar no Formato Saqueta, onde o preço mínimo será a aposta de apresentação e massificação aos consumidores, ficando este estabelecido nos 2€ para revenda;

Estratégia (CONCORRÊNCIA): Preço inferior à planta adulta, de modo a atrair tanto consumidores de plantas como consumidores de produtos decorativos em geral – No Formato Globo, o preço terá que ser equacionado tendo em conta a concorrência directa e indirecta, assim a variação do preço poderá ser recorrente consoante o comportamento do preço da concorrência, no entanto existirá um preço concorrenciais de referência, os 5€;

Determinante (PROCURA): Preço máximo pelo qual um determinado número de pessoas está disposta a pagar e esse número garanta um crescimento sustentável – No Formato Brinde, o produto está fortemente ligado à sazonalidade, à novidade e às tendências, desta forma o preço será equacionado pela procura do produto, podendo variar entre o preço mínimo e quase o dobro desse preço, ou seja entre 2,9€ e 4,5€.

8.1.5. Comunicação

A promoção e comunicação da oferta deverá apostar nas redes sociais, tem em consideração o seu efeito viral em marketing (Kaplan, 2010) em particular no Facebook (Fig. 6), com redireccionamento para a próprio site (Fig. 7), bem como num ou mais sites dedicados a casamentos (Fig. 8) de modo a promover o Formato Brinde adaptado a esta festividade. A dinamização na rede social Facebook e no

site Casamentos.pt passará pela contratação de publicidade paga.



Fig. 6 – Imagem de rosto da página Baby Orchids no Facebook: <http://www.facebook.com/BabyOrchids>



Fig. 7 - Imagem de rosto da página Baby Orchids no seu site: <http://www.babyorchids.pt>

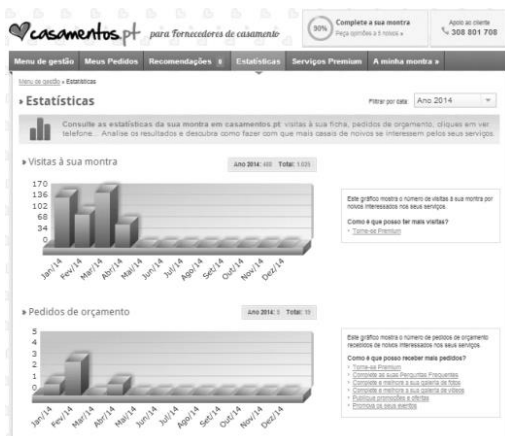


Fig. 8 – Imagem retirado do site Casamentos.pt onde se observa o número de visitas ao projecto Baby Orchids: <http://www.casamentos.pt/lembrancas-de-casamento/baby-orchids--e107601>

Além destas iniciativas, a comunicação do projecto será feita através de:

- Contacto directo com os distribuidores nos próprios estabelecimentos, para prestar todas as informações relativas às práticas necessárias para o sucesso da planta e informações relativas a novas espécies comercializadas;
- Presença em feiras de plantas e da especialidade de orquidofilia, de modo a promover o produto junto de potenciais intermediários e algum público mais específico, como coleccionadores e formadores de opinião;
- Presença em feiras urbanas, com vista a sensibilizar o público geral, por intermédio de contacto directo, para um produto até então desconhecido, onde as dúvidas serão muitas e serão respondidas pelo responsável do projeto (ex. Flea Market).

8.1.6. Distribuição

Selectiva – De modo a evitar a sobreposição dos distribuidores e a consequente competição de preços, os distribuidores serão seleccionados atendendo ao interesse demonstrado e capacidade de venda, sendo-lhes garantindo exclusividade no seu raio de acção. Este tipo de distribuição permitirá definir um Preço de Venda ao Público recomendado que se espera ser seguido pelos revendedores. O perfil de negócio de um revendedor será o de um horto (*garden center*), de uma loja de flores ou mesmo uma grande superfície de artigos de decoração e jardim.

Própria – Através de encomendas efectuadas directamente no site do projecto.

9. Plano de acções a implementar

Após identificar os factores chave que condicionam o sucesso da implementação das *Baby Orchids* no mercado, construiu-se uma tabela de dupla entrada (Tabela 5) onde se cruzaram os factores internos (Forças e Fraquezas), com os factores externos à empresa (Oportunidades e ameaças). Desta forma, foram identificadas as acções chave que resultam destes cruzamentos.

Tabela 5 – Matriz SWOT com referência às acções a desenvolver

		Ambiente Externo	
		Oportunidades	Ameaças
Ambiente Interno	Forças	<ul style="list-style-type: none"> Reforçar o posicionamento das orquídeas como plantas exóticas Aumentar a colecção de espécies Potenciar a rápida disponibilidade para todas as espécies <p>CAPITALIZAR</p>	<ul style="list-style-type: none"> Optimizar os custos de produção Criar uma rede de distribuição Apostar na inserção de mercado por via inovadora Criar novos formatos <p>INOVAR</p>
	Fraquezas	<ul style="list-style-type: none"> Procurar parceiros com experiência orquídeas <i>ex vitro</i> Procurar parceiros com experiência de mercado Procurar opções de investimento <p>EVOLUIR</p>	<ul style="list-style-type: none"> Investigar factores que aumentem a longevidade das plantas Pesquisar novas tendências Sobreviver à crise económica <p>INVESTIGAR</p>

Capitalizar: Perante uma situação de Oportunidade, dever-se-á investir na promoção das Forças de modo a potenciar o retorno, ou seja, apostar no que o projecto tem de melhor;

Evoluir: Num contexto de Oportunidades, as Fraquezas poderão ser extremamente condicionantes, em particular, devido à especificidade da oferta. Neste contexto o nosso plano de acção será desenvolver parcerias que acrescentem valor à oferta, baseado no seu conhecimento e experiência das mesmas;

Inovar: Apesar das potencialidades do nosso produto, o mercado poderá revelar-se ameaçador, devido ao crescimento da concorrência, neste caso a estratégia será recriar a nossa oferta, inovando;

Investigar: Numa perspectiva mais desfavorável, quando as nossas Fraquezas assumem se aliam a um contexto de Ameaça, será necessário reformular aspectos estruturantes da estratégia. Assim uma investigação exhaustiva do mercado e de potencialidades de valorização será vital, nesta situação o produto sofrerá forçosamente uma transformação radical.

Como objectivos a curto prazo (1 ano) foram definidos os seguintes:

- Desenvolver a componente científico-técnica, através da investigação científica de protocolos optimizadores de propagação das espécies existentes, estabelecer novas espécies e potenciar as suas características de modo melhorar o seu desempenho pós-venda;
- Posicionamento da marca através do testemunho de profissionais do sector, por aconselhamento/sugestão diretos, de modo a reforçar o posicionamento das orquídeas bebés como plantas exóticas e nobres;
- Procurar parcerias construtivas, baseadas em contributos financeiros ou de conhecimento que acrescentem valor à oferta;
- Representação física nas três cidades portuguesas mais desenvolvidas (Lisboa, Porto, Braga), iniciando uma rede de distribuição nacional;

Relativamente aos objectivos a cumprir no longo prazo (5 anos), estes são:

- Avaliar e renovar os objetivos de curto prazo de modo contínuo e sustentável;
- Contratualização para venda com grandes distribuidores de modo a cobrir todo o território nacional;
- Expansão das instalações e contratação de novos funcionários de modo a aumentar a produção e o número de espécies em catálogo;
- Contratualização experimental com distribuidores no espaço europeu.

10. Orçamento

De modo a representar os custos aproximados do projecto, elaborou-se um orçamento parcial de actividade, com base em custos efectivos e em receitas potenciais para o exercício a 3 anos (Tabela 6)

Tabela 1 - Simulação de actividade prevista para os primeiros três anos, baseada em custos efectivos e em objectivos programados de receita. Atendendo a uma inflação de referência de 2% ao ano e um aumento salarial de 10% para os dois anos seguintes ao de início de actividade.

ORÇAMENTO PARCIAL DE ATIVIDADE	2015			2016			2017		
	Nº de representantes		5	Nº de representantes		10	Nº de representantes		20
	Quantid.	Preço/unid.	Valor	Quantid.	Preço/unid.	Valor	Quantid.	Preço/unid.	Valor
1. Proveitos (1=1.1+1.2+1.3)			38.200,00 €			42.860,40 €			48.089,37 €
1.1 Vendas			38.200,00 €			42.860,40 €			48.089,37 €
Formato Saqueta (venda direta)	2500	2,50 €	6.250,00 €	2750	2,55 €	7.012,50 €	3025	2,60 €	7.868,03 €
Formato Saqueta (revenda)	6000	2,00 €	12.000,00 €	6600	2,04 €	13.464,00 €	7260	2,08 €	15.106,61 €
Formato Berço	500	6,50 €	3.250,00 €	550	6,63 €	3.646,50 €	605	6,76 €	4.091,37 €
Formato Brinde (venda direta)	2500	2,50 €	6.250,00 €	2750	2,55 €	7.012,50 €	3025	2,60 €	7.868,03 €
Formato Brinde (revenda)	2500	3,50 €	8.750,00 €	2750	3,57 €	9.817,50 €	3025	3,64 €	11.015,24 €
Substratos (venda direta)	1000	1,00 €	1.000,00 €	1100	1,02 €	1.122,00 €	1210	1,04 €	1.258,88 €
Substratos (revenda)	1000	0,70 €	700,00 €	1100	0,71 €	785,40 €	1210	0,73 €	881,22 €
1.2 Prestação de serviços			- €			- €			- €
1.3 Subsídios			- €			- €			- €
2. Custos variáveis (2=2.1+2.2+2.3)			7.458,13 €			6.883,78 €			7.021,45 €
2.1 Compra de materiais			3.880,00 €			3.243,60 €			3.308,47 €
Luz	12	100,00 €	1.200,00 €	12	102,00 €	1.224,00 €	12	104,04 €	1.248,48 €
Água	12	40,00 €	480,00 €	12	40,80 €	489,60 €	12	41,62 €	499,39 €
Gasóleo	1000	1,40 €	1.400,00 €	500	1,43 €	714,00 €	500	1,46 €	728,28 €
Substratos	100	4,00 €	400,00 €	100	4,08 €	408,00 €	100	4,16 €	416,16 €
Reagentes	10	40,00 €	400,00 €	10	40,80 €	408,00 €	10	41,62 €	416,16 €
2.2 Aquisição de serviços			3.480,00 €			3.549,60 €			3.620,59 €
Serviço Limpeza	12	100,00 €	1.200,00 €	12	102,00 €	1.224,00 €	12	104,04 €	1.248,48 €
Serviços Postais	12	100,00 €	1.200,00 €	12	102,00 €	1.224,00 €	12	104,04 €	1.248,48 €
Telecomunicações	12	90,00 €	1.080,00 €	12	91,80 €	1.101,60 €	12	93,64 €	1.123,63 €
2.3 Juros sobre o capital circulante		7.360,00 €	98,13 €		6.793,20 €	90,58 €		6.929,06 €	92,39 €
3 - Margem Bruta total (3=1-2)			30.741,87 €			35.976,62 €			41.067,92 €
4 - Margem bruta unitária (4=3/Nº de representantes)			6.148,37 €			3.597,66 €			2.053,40 €
5 - Custos fixos (5=5.1+5.2+5.3+5.4..)			31.408,09 €			33.608,22 €			35.944,15 €
5.1 Rendas / Quotas			6.600,00 €			6.783,00 €			6.918,66 €
Renda Laboratório	12	500,00 €	6.000,00 €	12	510,00 €	6.120,00 €	12	520,20 €	6.242,40 €
Quotas	12	50,00 €	600,00 €	13	51,00 €	663,00 €	13	52,02 €	676,26 €
5.2 Salários			23.883,75 €			25.900,88 €			28.101,15 €
Salário Diretor/ Técnico Superior	14	950,00 €	16.458,75 €	14	1.045,00 €	18.104,63 €	14	1.149,50 €	19.915,09 €
Salário Comercial	12	500,00 €	7.425,00 €	12	525,00 €	7.796,25 €	12	551,25 €	8.186,06 €
5.3 Amortizações			890,00 €			890,00 €			890,00 €
Câmara de fluxo laminar	1	- €	- €	1	- €	- €	1	- €	- €
Autoclave	1	- €	- €	1	- €	- €	1	- €	- €
Água Ultra-Pura (Recarga)	1	600,00 €	50,00 €	1	600,00 €	50,00 €	1	600,00 €	50,00 €
Estufa secagem	1	- €	- €	1	- €	- €	1	- €	- €
Medidor pH	1	400,00 €	100,00 €	1	400,00 €	100,00 €	1	400,00 €	100,00 €
Balança	1	400,00 €	100,00 €	1	400,00 €	100,00 €	1	400,00 €	100,00 €
Placas magnéticas	3	200,00 €	150,00 €	3	200,00 €	150,00 €	3	200,00 €	150,00 €
Prateleiras	20	60,00 €	100,00 €	20	60,00 €	100,00 €	20	60,00 €	100,00 €
Iluminação	80	7,00 €	140,00 €	80	7,00 €	140,00 €	80	7,00 €	140,00 €
Bioreatores	20	50,00 €	250,00 €	20	50,00 €	250,00 €	20	50,00 €	250,00 €
5.4 Juros capital fixo		1.717,00 €	34,34 €		1.717,00 €	34,34 €		1.717,00 €	34,34 €
6 - Margem de contribuição (6=3-5)			- 666,22 €			2.368,41 €			5.123,77 €
7 - Margem de contribuição unitária (7=6/Nº de representantes)			- 133,24 €			236,84 €			256,19 €

Conclusão

Em formato de conclusão, este trabalho realçou os pontos fulcrais na conceptualização, estruturação e implementação de um projecto empreendedor. Aqui ficaram evidenciados as estratégias conceptuais de modo a criar uma empresa de natureza biotecnológica, com uma marca, nomeadamente, Baby Orchids, intimamente ligada ao conceito Bio/Eco. O carácter inovador do conceito acarreta uma dificuldade de prever, com relativa exactidão, as potencialidades e dimensão do mercado para esta ideia de negócio, o que demonstra que o projecto terá que avaliar e adaptar-se ao seu “microclima” regularmente.

Passo a passo, construiu-se uma estratégia conceptual, potencialmente adaptativa, de modo a promover o sucesso e sustentabilidade deste projecto a médio e longo prazo. Através de contactos reais e vendas piloto foi possível recolher os comentários de consumidores e de parceiros de modo a orientar a oferta. A metodologia de inquérito revelou o impacto da ideia no consumidor através de uma análise qualitativa do conteúdo das respostas que permitiu a criação de uma listagem de palavras ou pequenos comentários que definem o produto na sua mente, assim conclui-se que o público percebe os produtos apresentados como significativamente interessantes mas sem garantia de durabilidade.

A proposta de negócio resultante deste projecto consiste em comercializar uma gama de 3 produtos, variando na embalagem e no seu propósito (saqueta, globo ou frasco de brinde), de produção própria, que consistem fundamentalmente numa orquídea bebé de espécie botânica que é colecionável entre as várias espécies disponíveis.

Para projecto futuro, pretende-se para satisfazer necessidades conscientes dos consumidores através da credibilização da viabilidade das plantas, através da apresentação de exemplos de plantas adultas, sem mimetizar as ofertas concorrentes existentes, mantendo a identidade inovadora e apostando essencialmente em satisfazer necessidades ainda “inconscientes” dos consumidores.

Referências bibliográficas

- Anderson, J. C., Narus, J. A., & Van Rossum, W. (2006).** Customer value propositions in business markets. *Harvard business review*, 84(3), 90.
- Belk, R. (1979)** Gift-Giving Behavior. *Research in Marketing*, (2), 95-126.
- Belk, R. (1988)** Possessions and the Extended Self. *Journal of Consumer Research*, 15 (2), 139-168.
- Belk, R. W. (1984).** Cultural and historical differences in concepts of self and their effects on attitudes toward having and giving. *Advances in consumer research*, 11(1), 754-763
- Benner, M. & Tushman, M. (2003)** Exploitation, Exploration, and Process Management: The Productivity Dilemma Revisited. *Academy of Management Review*, 28 (2), 238–56.
- Bonoma, T. V., & Shapiro, B. P. (1983).** Segmenting the industrial market. Lexington, MA: Lexington Books.
- Brooksbank, R. (1994).** The anatomy of marketing positioning strategy. *Marketing Intelligence & Planning*, 12(4), 10-14.
- Day, G. S. (1994).** The capabilities of market-driven organizations. *Journal of marketing*, 58(4).
- Diário da República (2013) Resolução do Conselho de Ministros n.º 33/2013 -, 1.ª série — N.º 96 — 20 de maio
- Frosch, R. (1996)** The customer for R&D is always wrong. *Research Technology Management*, 39 (November/December), 22–27.
- Gabinete de Planeamento e Políticas (2012)** Programa de desenvolvimento rural 2014-2020 – Documento de orientação. Min. da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Orden. do Território.
- Humphrey, A. (2005)** SWOT Analysis for Management Consulting, SRI Alumni Association Newsletter, December, 7-8
- I.N.E. (2012)** Floricultura e Plantas Ornamentais, Lisboa
- Kaplan, A. M., & Haenlein, M. (2010).** Users of the world, unite! The challenges and opportunities of Social Media. *Business horizons*, 53(1), 59-68.
- Knight, G. (2000).** Entrepreneurship and marketing strategy: The SME under globalization. *Journal of International Marketing*, 8(2), 12-32.
- Kohli, A. & Jaworski, B. (1990)** Market orientation: the construct, research propositions, and managerial implications. *The Journal of Marketing*, 1-18.
- Kotler, P. (1999)** *Kotler on Marketing*. New York: The Free Press
- Levitt, T. (1983)** The globalization of markets. *Harvard Business Review*, May– June, 61, 92– 102.
- Levy, S. J. (1982)** Symbols, selves, and others. *Advances in consumer research*, 9(1), 542-543.

- Mick, D.** (1986) Consumer Research and Semiotics: Exploring the Morphology of Signs, Symbols, and Significance. *Journal of Consumer Research*, 13 (2), 196-213.
- U.S. Department of Agriculture** (2007) Floriculture and nursery crops yearbook. Econ. Res. Serv., U.S. Dept. Agr., Washington, DC.
- Miles, M.B. & Huberman, A.M.** (1994) *Qualitative Data Analysis: An Expanded Sourcebook* (2nd Edition)
- Mayer-Wittman, K.** (1989) Economic analysis and corporate strategic planning. *Business Economics*, April, 27-31.
- Mick, D. G., & DeMoss, M.** (1990). To Me From Me: A Descriptive Phenomenology of Self-Gifts. *Advances in consumer research*, 17(1), 677-682.
- Mooij, M., & Hofstede, G.** (2011). Cross-cultural consumer behavior: A review of research findings. *Journal of International Consumer Marketing*, 23(3-4), 181-192.
- Moore, G. A.** (1999). *Crossing the Chasm: Marketing and Selling High-Tech Products to*. NY: Harper Collins.
- Myers, E.** (1985). Phenomenological analysis of the importance of special possessions: an exploratory study. *Advances in consumer research*, 12(1), 560-565.
- Narver, J. C., & Slater, S. F.** (1990). The effect of a market orientation on business profitability. *Journal of marketing*, 54(4), 20-35.
- Palma, M. A., Chen, Y. J., Hall, C., Bessler, D., & Leatham, D.** (2010). Consumer preferences for potted orchids in the Hawaiian market. *HortTechnology*, 20(1), 239-244.
- Sanchez, R., & Heene, A.** (1997). Managing for an uncertain future. *International Studies of Management & Organization*, 27(2), 21-42.
- Porter, M.** (1980) *Competitive Strategy*. New York: The Free Press
- Rook, D.** (1987) The Buying Impulse. *Journal of Consumer Research*, 14 (2), 189-199.
- Ryans, A. B.** (1977). Consumer gift buying behavior: an exploratory analysis. *Contemporary marketing thought*, 44, 99-104.
- Scammon, D. L., Shaw, R. T., & Bamossy, G.** (1982). Is a gift always a gift? An investigation of flower purchasing behavior across situations. *Advances in Consumer Research*, 9(1), 531-536.
- Sherry, J.** (1983) Gift Giving in Anthropological Perspective. *Journal of Consumer Research*, 10 (2), 157-168.
- Smith, W.** (1956) Product differentiation and market segmentation as alternative marketing strategies. *Journal of Marketing*, 21, 3-8.
- Wedel, M. & Kamakura, W.** (2002) Introduction to the special issue on market segmentation. *International Journal of Research in Marketing* 19.3 181-183.