

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado



Trabalho de Conclusão de Curso

Reprodução *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham em diferentes meios de cultura

Andréia Macedo Barboza

Pelotas, 2017

Andréia Macedo Barboza

Reprodução *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham em diferentes meios de cultura

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a Iara Valquide Gomes de Oliveira

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B238r Barboza, Andréia Macedo

Reprodução in vitro de *Cattleya intermedia* Graham em diferentes meios de cultura / Andréia Macedo Barboza ; Iara

Valquide Gomes de Oliveira, orientadora. — Pelotas, 2017.
35 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Orchidaceae. 2. Reprodução assimiótica. 3. Orquídea nativa. I. Oliveira, Iara Valquide Gomes de, orient.

II. Título.

CDD : 584.72

Andréia Macedo Barboza

Reprodução *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham em diferentes meios de culturas.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 13/02/2017

Banca Examinadora:

.....
Bióloga Dra. Iara Valquide Gomes de Oliveira (Orientador)
Doutora em Fitotecnia- Fitossanidade pela Universidade Federal de do Rio Grande do Sul.

.....
Prof. Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha
Doutora em Ciências. Ciências Biológicas I pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Prof. Dra. Vera Lucia Bobrowski
Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho à
minha orientadora Dra. Iara
V. Gomes de Oliveira pelo
quanto aprendi a amar as
plantas.

Agradecimentos

A Deus, por tudo e a cada passo de realização de um sonho.

Agradeço a minha mãe M^a Cristina M. Barbosa pelo incentivo, paciência, carinho e por me ajudar sempre que preciso.

Agradeço a minha orientadora, Iara Valquide Gomes de Oliveira, pela confiança, paciência, motivação e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus familiares pelo incentivo, paciência e carinho prestados neste caminho percorrido.

Agradeço as professoras Dr^a Beatriz Helena Gomes Rocha, Dr^a Luciana Bicca Dode e Dr^a Vera Lucia Bobrowski, integrantes da Banca, pelas sugestões.

A professora Giselda M. Pereira pela forma gentil e sempre solícita com que orientou as análises estatísticas dos dados.

Ao Álvaro Martins, pelo tempo e trabalho dedicado ao meu aprendizado e pela motivação em alguns momentos de indecisão.

Aos meus professores pelo privilégio de termos compartilhado esse período de aprendizagem.

Às minhas colegas, mais do que colegas amigas, companheiras de trabalhos, angústias e realizações, Greice e Mayara que fizeram com que o fardo do caminho se tornasse mais leve e compartilhado.

Aos meus colegas e amigos, pelo apoio e pelas lembranças alegres que levarei deste tempo.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para que este momento se concretizasse, meus mais sinceros agradecimentos.

Obrigada.

Resumo

BARBOZA, Andréia Macedo. **Reprodução *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham em diferentes meios de cultura**. 2017, 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso- Ciências Biológicas- Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A *Cattleya intermedia* Graham é uma epífita nativa da região sul do Brasil e vem sofrendo uma grande pressão devido à ação antrópica, tornando-se vulnerável a extinção. As sementes das orquídeas não possuem endosperma funcional por isso elas necessitam de uma associação com fungos micorrízicos para a germinação do embrião. O cultivo assimbiótico de orquídeas viabiliza o processo de multiplicação e contribui para garantir a manutenção das populações naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da água de coco e fertilizantes comerciais na germinação e desenvolvimento *in vitro* de *C. intermedia*. Os tratamentos consistiram em meios de cultura com água de coco (CAC) (200 mL.L⁻¹ de água de coco), e sem água de coco (SAC): T₁ (Meio MS ½ da concentração CAC); T₂ (Meio MS ½ da concentração SAC); T₃ (Meio de Tomate CAC); T₄ (Meio de Tomate SAC); T₅ (NPK (05-08-08) CAC); T₆ (NPK (05-08-08) SAC); T₇ (NPK (09-07-07) CAC); T₈ (NPK (09-07-07) SAC); T₉ (NPK (15-09-06) CAC); T₁₀ (NPK (15-09-06) SAC); T₁₁ (NPK (08-06-04) CAC); T₁₂ (NPK (08-06-04) SAC); T₁₃ (NPK (06-08-06) CAC); T₁₄ (NPK (06-08-06) SAC). Todos os meios foram suplementados com 20 g de sacarose, 14 g agar e 2 g de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,0 ± 0,2. Após 56 dias do início do experimento foi avaliado o resultado da variável Germinação de Sementes (GS), sendo observado no tratamento T₃ maior taxa de germinação (10- 100%) do que no meio T₄. Os outros tratamentos não apresentaram nenhuma germinação. As plântulas desenvolvidas nos meios T₃ (Meio de Tomate CAC) e T₄ (Meio de Tomate SAC) foram repicadas após 196 dias de cultivo, para os mesmos meios e colocadas cinco plântulas em cada frasco, com cinco repetições, onde foram avaliadas as variáveis: Altura da Parte Aérea (APA); Número de Raízes (NR) e Número de Folhas (NF). O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado com os tratamentos arranjados em um esquema fatorial 2x7 em que os fatores foram com e sem adição de água de coco (2) e diferentes meio de cultura (7), com cinco réplicas cada. Portanto, é viável o cultivo *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham nos meios de cultivo testados neste estudo. Os meios de cultura T₃ e T₄ suportam todo o desenvolvimento de *C. intermedia* desde a germinação. Todos os outros tratamentos com e sem adição de água de coco foram eficientes no desenvolvimento de *C. intermedia* a partir do repique.

Palavras chave: Orchidaceae; reprodução assimbiótica; orquídea nativa.

Abstract

BARBOZA, Andréia Macedo. **In vitro reproduction of *Cattleya intermedia* Graham in different cultivation media.** 2017, 35 p. Term paper of bachelor degree in Biology, Biology Institute, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

Cattleya intermedia Graham is an epiphyte native of the Southern region of Brazil and has been under great pressure due to its anthropic action, making it vulnerable to extinction. The seeds of the orchids do not have a functional endosperm, so they require an association with mycorrhizal fungi for the germination of the embryo. The asymbiotic cultivation of orchids enables the multiplication process and contributes to ensure the maintenance of the natural population. This study aims to assess the influence of coconut water and commercial fertilizers on the germination and *in vitro* development of *C. intermedia*. The treatments were culture media with coconut water (CAC) (200 mL.L⁻¹ of coconut water), and without coconut water (SAC): T₁ (MS media ½ of the CAC concentration); T₂ (MS Media ½ of the SAC concentration); T₃ (Tomato Medium CAC); T₄ (Tomato Medium SAC); T₅ (NPK (05-08-08) CAC); T₆ (NPK (05-08-08) SAC); T₇ (NPK (09-07-07) CAC); T₈ (NPK (09-07-07) SAC); T₉ (NPK (15-09-06) CAC); T₁₀ (NPK (15-09-06) SAC); T₁₁ (NPK (08-06-04) CAC); T₁₂ (NPK (08-06-04) SAC); T₁₃ (NPK (06-08-06) CAC); T₁₄ (NPK (06-08-06) SAC). All media were supplemented with 20 g of sucrose, 14 g of agar and 2 g of activated carbon. The pH was adjusted to 5.0 ± 0.2. After 56 days from the beginning of the experiment, the result of the Germination of Seeds (GS) variable, and we observed that in the T₃ treatment there was a higher germination rate (10-100%) than in the T₄ medium. The other treatments did not present any germination. The seedlings grown in media T₃ (Tomato Medium CAC) and T₄ (Tomato Medium SAC) were picked after 196 days of cultivation for the same media and five seedlings were placed in each bottle, with five repetitions, in which were assessed the variables: Height of the aerial part (APA); Number of Roots (NR) and Number of Leaves (NF). The statistical design applied was entirely randomized with the treatments arranged in a 2x7 factorial scheme in which the factors were with and without coconut water (2) and different culture media (7), with five replicated each. Therefore, the *in vitro* cultivation of *Cattleya intermedia* Graham is feasible in the cultivation media tested in this study. The T₃ and T₄ culture media support all the development of *C. intermedia* since the germination. All other treatments with and without coconut water were efficient in the development of *C. intermedia* from the peal.

Keywords: Orchidaceae, Asymbiotic reproduction; Native orchid.

Lista de figuras

Figura 1	<i>Cattleya intermedia</i> em seu hospedeiro preferencial, <i>Erythrina crista galli</i> L., em mata de restinga no Campus Capão do Leão.....	12
Figura 2	Germinação de sementes <i>in vitro</i> de <i>Cattleya intermedia</i>	13
Figura 3	Cápsula coletada em remanescente de Mata de Restinga no entorno da UFPel, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, Rio Grande do Sul.....	22
Figura 4	Mostra o passo a passo da metodologia em: A, B, C, D, E, F, G e H.....	23
Figura 5	Refere-se a materiais utilizados previamente esterilizados (A), em ambiente asséptico (B) e frascos em sala de crescimento (C).....	24
Figura 6	Gráfico de porcentagem de germinação de sementes de <i>Cattleya intermedia</i>	26
Figura 7	Destaca as plântulas desenvolvidas em meios de cultura testados.....	30

Lista de Tabelas

Tabela 1	Meios de cultura utilizados nos tratamentos testados com a respectiva descrição, com ou sem adição de 200 mL. L ⁻¹ de água de coco.....	18
Tabela 2	Médias da Análise de Variância (ANOVA) de interação com e sem água de coco, e os meios.....	27
Tabela 3	Médias de Número de Folhas (NF), Número de Raízes (NR) e Altura da Parte Aérea (APA) de plântulas de <i>Cattleya intermedia</i> Graham subcultivadas em diferentes meios de cultura.....	28

Lista de Abreviaturas

AC	Água de Coco
ADE	Água Destilada Esterilizada
AF	Área Foliar
AP	Altura da Planta
APA	Altura da Parte Aérea
CAC	Com Água de Coco
Cm	Centímetro
CP	Comprimento de Pseudobulbos
CR	Comprimento maior Raiz
DEZG	Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética
DP	Diâmetro de Pseudobulbos
FeEDTA	Ferro Etileno Diamino Tetra-Acético
GA ₃	Ácido Giberélico
GS	Germinação de Sementes
K	Potássio
MF	Massa Fresca
MSF	Matéria Seca de Folhas
MSR	Matéria Seca de Raízes
MST	Massa Seca Total
MS	MURASHIGE e SKOOG
N	Nitrogênio
NP	Número de Pseudobulbos
NR	Número de Raízes

NF	Número de Folhas
P	Fósforo
pH	potencial Hidrogeniônico
SAC	Sem Água de Coco
T ₁ e T ₂	MS ½ (MURASHIGE e SKOOG metade da concentração)
T ₃ e T ₄	Meio de Tomate
T ₅ e T ₆	NPK (05-08-08)
T ₇ e T ₈	NPK (09-07-07)
T ₉ e T ₁₀	NPK (15-09-06)
T ₁₁ e T ₁₂	NPK (08-06-04)
T ₁₃ e T ₁₄	NPK (06-08-06)

Sumário

1	Introdução.....	12
1.1	Objetivo Geral.....	15
1.2	Objetivos Específicos.....	15
2	Revisão da literatura.....	16
3	Metodologia.....	18
4	Resultados e Discussão.....	26
5	Conclusão.....	31
	Referências.....	32

1 Introdução

O gênero *Cattleya* engloba cerca de 70 espécies e inúmeras variedades de híbridos. A *Cattleya intermedia* (Figura 1) é uma epífita nativa da região sul do Brasil e vem sofrendo uma grande pressão devido à ação antrópica, tornando-se vulnerável a extinção. Em relação ao modo de reprodução, as orquídeas produzem elevado número de sementes, embora menos de 5% germinem em condições naturais, pois as sementes são demasiadamente pequenas, quase que desprovidas de endosperma, apresentando embrião reduzido, cotilédone não diferenciado e requerendo associação micorrízica para germinar (CORRIE; TANDON, 1993; RAPOSO, 1993).



Figura 1- *Cattleya intermedia* em seu hospedeiro preferencial, *Erythrina crista-galli* L, em mata de restinga no Campus Capão do Leão, UFPel.

Fonte: GOMES-OLIVEIRA, 2014.

A cultura assimbiótica ou sementeira *in vitro* de orquídeas constitui técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e ecológico, seja aumentando o índice de germinação *in vitro* (98 a 100%) para a grande maioria dessas espécies, ou acelerando o processo de crescimento e desenvolvimento, fornecendo plantas muito mais vigorosas e adaptáveis para o cultivo *ex vitro*. Portanto, o cultivo assimbiótico de orquídeas (Figura 2) viabiliza o processo de multiplicação, que visa à produção em grande escala de plantas para comercialização, o que contribui para minimizar a ação antrópica e perpetuar no baixo número de espécies em extinção, garantindo assim a manutenção das populações naturais (MARTINI et al., 2001; NAYAK et al., 2002).

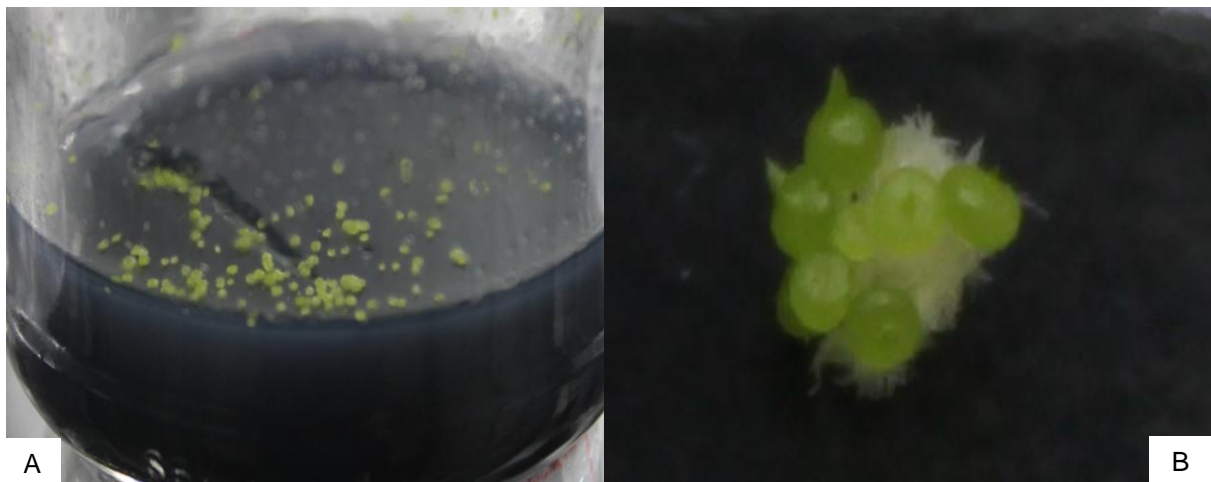


Figura 2- Germinação de sementes *in vitro* de *Cattleya intermedia*. (A) Protocormos no meio de cultura; (B) Primeiros folíolos e protocormos.
 Fonte: BARBOZA. A. M., 2015.

A germinação *in vitro* é utilizada desde 1946, quando o pesquisador Lewis Knudson obteve com seus trabalhos a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas. A técnica consiste na inoculação das sementes *in vitro* para germinar em condições assépticas, mantidas em sala de crescimento, na qual fatores ambientais como luz e temperatura são controlados (CALDAS; TORRES; BUSO, 1998; KNUDSON, 1946).

O cultivo *in vitro* de orquídeas demanda, entre as distintas espécies que essa família apresenta, meios de cultura específicos muitas vezes elaborados com aditivos complexos, a fim de proporcionar as condições mais favoráveis de crescimento (CAMPOS, 2010). Dentre os meios de cultura mais utilizados para a propagação *in vitro*, destacam-se os meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), Knudson C (KNUDSON, 1946) e Vacin e Went (VACIN; WENT, 1949). O meio de

cultura padrão mais utilizado é o MS composto de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, FeEDTA, sacarose, ágar e acrescido de carvão ativado. Embora seja o meio mais utilizado pela maioria dos produtores, apresenta um custo significativamente alto que incide no aumento do custo de produção (SU; SCHNITZER; FARIA, 2012).

Os componentes do meio de cultura podem ser substituídos, em muitos casos, por frutas, legumes, açúcar de uso doméstico (CAMPOS, 2002) e fertilizantes comerciais que são acrescentados aos meios de cultura como fonte de macro e micronutrientes em substituição aos sais usualmente empregados.

Vários elementos aditivos complexos como coco (endosperma, água, leite), peptona de carne e polpa de banana (verde ou madura) foram utilizados nos meios de cultura de tecidos ou de germinação de orquídeas (GEORGE, 1993). Há relatos da utilização da polpa de banana na germinação de *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilum* e *Phalaenopsis* (ARDITTI; ERNST, 1993) e também água de coco adicionado a meios de crescimento *in vitro* de *C. intermedia* (FREITAS, 2014). De acordo com Caldas, Torres e Buso (1998) o aditivo mais usado para um grande número de espécies *in vitro* é a água de coco, cuja ação pode estimular o crescimento de calos, formação de embriões somáticos, indução da divisão de grãos de pólen e do desenvolvimento de embriões imaturos.

Trabalhos de cultivo *in vitro* sobre a espécie *C. intermedia* são escassos, assim, este estudo pretende ampliar o conhecimento sobre a reprodução assimbiótica desta orquídea nativa (Gomes-Oliveira, 2014, informação pessoal).

1.1 Objetivo geral:

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da água de coco e fertilizantes comerciais na germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham.

1.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a germinação das sementes de *C. intermedia* nos meios de cultura com e sem água de coco e fertilizantes comerciais;
- Avaliar o crescimento *in vitro* de *C. intermedia* nos meios de cultivo testados;
- Verificar, dentre estes, o meio de cultura mais adequado para esta orquídea;
- Contribuir para ampliar o conhecimento do cultivo assimbiótico da *C. intermedia*.

2 Revisão de Literatura

Apesar da formulação salina do meio MS ser a mais usada em cultura de tecidos, para o desenvolvimento *in vitro* de orquídeas, sua redução à metade da concentração tem sido comum e eficaz para a grande maioria dos testes realizados. Dezan e colaboradores (2012) observaram que o meio de cultura MS com metade da concentração é o mais adequado para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Schomburgkia gloriosa*. *Dendrobium nobile* teve seu crescimento *in vitro* otimizado em meio MS com metade da concentração e sem carvão ativado (JÚNIOR et al. 2011). Mas, foi observado por Muller e colaboradores (2007) que a redução da concentração do meio MS acarretou na diminuição do desenvolvimento *in vitro* de *Miltonia flavescens*.

Segundo Caldas, Torres e Buso (1998) a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo que esse açúcar suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. Dignart et al. (2009) demonstraram que é possível cultivar *Cattleya walkeriana* em luz natural, diminuindo a concentração de sacarose. Já Sorace et al. (2008) constataram que 40gL^{-1} de sacarose em MS com metade da concentração dos sais foi mais eficiente para o desenvolvimento *in vitro* de *Oncidium baueri*. Já, outros pesquisadores verificaram que o dobro da concentração do meio Knudson C promoveu o crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* e *Hadrolaelia lobatta* X *Hadrolaelia purpurata* Aço, e também, constataram que a adição de $2,5\text{mg L}^{-1}$ de ácido giberélico (GA_3) no meio Knudson C incrementou o desenvolvimento da *C. loddigesii* (SOARES et al., 2009)

Diversos trabalhos têm usado diferentes meios de cultivo no desenvolvimento *in vitro* de vários gêneros de Orchidaceae. Alguns macro e micronutrientes usualmente utilizados em cultura de tecidos foram substituídos por ureia em vez de sulfato de amônio, glicina, mio-inositol e diferentes formulações de NPK (Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K)), contidos em adubos comerciais. Também foram usados produtos orgânicos tais como tomates, polpa de banana, mamão verde e mamão maduro (COLOMBO et al., 2012; CUNHA et al., 2011; FERREIRA et al.,

2012; FIGUEIREDO et al., 2007; HERMANN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012; STANCATO et al., 2008; SU; SCHNITZER; FARIA, 2012; TOMBOLATO; COSTA , 1998; UNEMOTO et al., 2007; VIEIRA et al., 2007; VIEIRA et al., 2009).

O desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* foi estudado por Moraes e colaboradores (2009a) utilizando três diferentes meios de cultivo: MS com metade da concentração de sais, e com os fertilizantes comerciais Hyponex (NPK 6,5-9-19) e Kristalon laranja (NPK 06-12-36). Estes pesquisadores constataram que o meio mais eficiente para o desenvolvimento da orquídea estudada foi aquele com Kristalon laranja. Moraes e outros colaboradores (2009b) testaram os mesmos meios de cultivo no desenvolvimento *in vitro* de *C. loddigesii* constatando que o meio com Kristalon laranja foi significativamente mais adequado ao desenvolvimento desta orquídea.

Vários pesquisadores obtiveram plantas mais vigorosas de diferentes orquídeas crescidas no meio de cultura Knudson C combinado a aditivos como água de coco e polpa de banana para *C. loddigesii*, mamão verde e maduro para híbrido de *Cattleya warneri* x *Laelia purpurata*, água de coco para *D. nobile* e polpa de banana nanica para *C. intermedia* (ARAUJO et al. 2006; ASSAKAWA et al. 2009; FIGUEIREDO et al. 2008; FREITAS et al. 2014; SOARES et al. 2013).

Segundo Hermann et al. (2011) houve um aumento no desenvolvimento *in vitro* de *Brassavola tuberculata* com utilização do meio de cultivo composto por NPK (07-09-05), tomate, banana, açúcar e carvão ativado além do ágar. Schneiders e colaboradores (2012) também destacaram que a utilização de carvão ativado ao meio de cultivo é significativamente favorável ao desenvolvimento *in vitro* de *C. forbesii* e *C. harrisoniana*. Gomes-Oliveira e colaboradores (2010) recomendam o meio de tomate composto por: nitrato de cálcio, sulfatos de amônia e magnésio, fosfato de potássio, sacarose, ágar, carvão ativado e suco de tomate para o cultivo *in vitro* de várias orquídeas, inclusive *C. intermedia*, pois este meio suporta o desenvolvimento de plântulas até sua retirada do frasco para aclimação.

3 Metodologia

O trabalho foi conduzido no período de setembro de 2015 a setembro de 2016 no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética (DEZG), Instituto de Biologia, UFPel, Campus Capão do Leão.

Tabela 1 mostra a respectiva descrição dos meios de cultura utilizados nos tratamentos testados.

Tabela 1: Meios de cultura utilizados nos tratamentos testados com a respectiva descrição, com e sem adição de 200 mL.L⁻¹ de água de coco.

Meio MS (MURASHIGE & SKOOG)			Meio de Tomate		NPKs	
Soluções	Componentes	Concentração (.L ⁻¹)	Componentes	Concentração (g. L ⁻¹)	Componentes	(. L ⁻¹)
A	NH ₄ NO ₃	1,65g	Nitrato de Cálcio	01	NPK (05-08-08)	7 mL
			Sulfato de Amônia	01		
B	KNO ₃	1,9g	Fosfato de Potássio	0,25	NPK (09-07-07)	8 mL
			Sulfato de Magnésio	0,25		
C	MgSO ₄ 7H ₂ O	370mg	1 Tomate maduro		NPK (15-09-06)	7 mL
	MnSO ₄ H ₂ O	16,9mg	Sacarose	20		
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6mg	Agar	14	NPK (08-06-04)	5 mL
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025mg	Carvão ativado	2		
D	CaCl ₂	333mg			NPK (06-08-06)	10 mL

E	H ₃ BO ₃	6,2mg		Sacarose	20 g
	KH ₂ PO ₄	170mg		Agar	14 g
	KI	0,83mg		Carvão ativado	2 g
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25mg			
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025mg			
F	Na ₂ EDTA	37,25mg			
	FeSO ₄ 7H ₂ O	27,85mg			
G	Tiamina HCl	0,5mg			
	Ácido nicotínico	0,5mg			
	Piridoxina	0,5mg			
	Glicina	02mg			
	Mio Inositol	100mg			
	Sacarose	20g			
	Agar	14g			
	Carvão ativado	2g			

Meio MS:

Colocar em uma panela de inox uma quantidade de água destilada, cerca de metade do volume final de meio a ser preparado. Adicionar os componentes do meio, um a um, exceto o carvão ativado, e levar ao fogo brando até a completa dissolução do agar. Adicionar água destilada até completar 1000 mL. Verificar o pH ($\text{pH } 5 \pm 0,2$) com auxílio de fitas indicadoras e, se necessário, utilizar vinagre ou bicarbonato de sódio para o controle deste, adicionar o carvão ativado e homogeneizar. Depois distribuir 25 mL de meio por frasco, fechar com papel alumínio, etiquetar e fechar com filme de PVC. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atm.), durante 20 min. Colocar os frascos sobre uma mesa e deixar esfriar, agitando-os frequentemente para que o carvão ativado fique bem distribuído.

Meio de Tomate:

No liquidificador colocar o tomate (com aproximadamente 70 g), sem casca e sem sementes, com aproximadamente 100 mL de água destilada e deixar bater bem e peneirar. Colocar o suco numa panela de inox, levar ao fogo brando, adicionar o restante dos componentes do meio e água destilada aos poucos até completar 1000 mL, exceto o carvão ativado, sempre em fogo brando até a completa dissolução do ágar. Em seguida verificar o pH ($\text{pH } 5 \pm 0,2$) com auxílio de fitas indicadoras e, se necessário, utilizar vinagre ou bicarbonato de sódio para o controle deste, adicionar o carvão ativado e homogeneizar. Depois distribuir 25 mL de meio por frasco, fechar com papel alumínio, etiquetar e fechar com filme de PVC. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atm), durante 20min. Colocar os frascos sobre uma mesa e deixar esfriar, agitando-os frequentemente para que o carvão ativado fique bem distribuído.

Meios com NPKs:

NPK 05-08-08 (GARDO[®] flores): colocar 7 mL do NPK em 100 mL de água destilada, adicionar o restante dos componentes do meio e água destilada aos poucos até completar 1000 mL, exceto o carvão ativado, sempre em fogo brando até a completa dissolução do ágar. Em seguida verificar o pH ($\text{pH } 5 \pm 0,2$) com auxílio de fitas indicadoras e, se necessário, utilizar vinagre ou bicarbonato de sódio para o controle deste, adicionar o carvão ativado e homogeneizar. Depois distribuir 25 mL de meio por frasco, fechar com papel alumínio, etiquetar e fechar com filme de PVC. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atm), durante 20min. Colocar os frascos sobre

uma mesa e deixar esfriar, agitando-os frequentemente para que o carvão ativado fique bem distribuído.

NPK 09-07-07 (GARDO® Multi- jardim): colocar 8 mL do NPK em 100 mL de água destilada, adicionar o restante dos componentes do meio e água destilada aos poucos até completar 1000 mL, exceto o carvão ativado, sempre em fogo brando até a completa dissolução do ágar. Em seguida verificar o pH ($\text{pH } 5 \pm 0,2$) com auxílio de fitas indicadoras e, se necessário, utilizar vinagre ou bicarbonato de sódio para o controle deste, adicionar o carvão ativado e homogeneizar. Depois distribuir 25 mL de meio por frasco, fechar com papel alumínio, etiquetar e fechar com filme de PVC. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atm), durante 20min. Colocar os frascos sobre uma mesa e deixar esfriar, agitando-os frequentemente para que o carvão ativado fique bem distribuído.

NPK 15-09-06 (GARDO® Plantas Jovens): colocar 7 mL do NPK em 100 mL de água destilada, adicionar o restante dos componentes do meio e água destilada aos poucos até completar 1000 mL, exceto o carvão ativado, sempre em fogo brando até a completa dissolução do ágar. Em seguida verificar o pH ($\text{pH } 5 \pm 0,2$) com auxílio de fitas indicadoras e, se necessário, utilizar vinagre ou bicarbonato de sódio para o controle deste, adicionar o carvão ativado e homogeneizar. Depois distribuir 25 mL de meio por frasco, fechar com papel alumínio, etiquetar e fechar com filme de PVC. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atm), durante 20min. Colocar os frascos sobre uma mesa e deixar esfriar, agitando-os frequentemente para que o carvão ativado fique bem distribuído.

NPK 08-06-04 (Vida Verde® Raiz): colocar 5 mL do NPK em 100 mL de água destilada, adicionar o restante dos componentes do meio e água destilada aos poucos até completar 1000 mL, exceto o carvão ativado, sempre em fogo brando até a completa dissolução do ágar. Em seguida verificar o pH ($\text{pH } 5 \pm 0,2$) com auxílio de fitas indicadoras e, se necessário, utilizar vinagre ou bicarbonato de sódio para o controle deste, adicionar o carvão ativado e homogeneizar. Depois distribuir 25 mL de meio por frasco, fechar com papel alumínio, etiquetar e fechar com filme de PVC. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atm), durante 20min. Colocar os frascos sobre uma mesa e deixar esfriar, agitando-os frequentemente para que o carvão ativado fique bem distribuído.

NPK 06-08-08 (Biofert[®]): colocar 10 mL do NPK em 100 mL de água destilada, adicionar o restante dos componentes do meio e água destilada aos poucos até completar 1000 mL, exceto o carvão ativado, sempre em fogo brando até a completa dissolução do ágar. Em seguida verificar o pH ($\text{pH } 5 \pm 0,2$) com auxílio de fitas indicadoras e, se necessário, utilizar vinagre ou bicarbonato de sódio para o controle deste, adicionar o carvão ativado e homogeneizar. Depois distribuir 25 mL de meio por frasco, fechar com papel alumínio, etiquetar e fechar com filme de PVC. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atm), durante 20min. Colocar os frascos sobre uma mesa e deixar esfriar, agitando-os frequentemente para que o carvão ativado fique bem distribuído.

Para avaliação de germinação *in vitro*, coletamos a cápsula (Figura 3) contendo as sementes de *Cattleya intermedia* Graham que foi obtida de planta nativa coletada em remanescente de Mata de Restinga no entorno da UFPel, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, Rio Grande do Sul.

A cápsula fechada foi colocada em um becker contendo um chumaço de algodão embebido em formaldeído 37%, por 60min (Figura 4. A) e, logo após foi transferida, com o auxílio de uma pinça, para a placa de petri e aberta com um bisturi (Figura 4. B).



Figura 3: Cápsula coletada em remanescente de Mata de Restinga no entorno da UFPel, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, Rio Grande do Sul. Fonte: BARBOZA. A. M., 2015.



Figura 4: A: Cápsula em presença de algodão embebido em formaldeído a 37%; B: Cápsula sendo aberta com auxílio de pinça e bisturi; C: Sementes sendo retiradas com auxílio de um mexedor de café; D: Sementes em suspensão no tubo de ensaio; E: Inoculação de 1 mL de sementes em suspensão com auxílio de micropipeta automática; F: Sementes em suspensão G: Frascos fechados com papel alumínio e etiquetados; H: Frascos fechados com filme de PVC. Fonte: BARBOZA. A. M., 2015.

As sementes foram retiradas da cápsula com um mexedor de café (EMBALE BEM- mexedor de café) (Figura 4. C) e colocadas em um tubo de ensaio contendo 30 mL de água destilada esterilizada (ADE) para a suspensão das sementes, durante 60 min (Figura 4. D). Cada frasco recebeu, com a utilização de uma micropipeta automática (Figura 4. E), 1 mL de suspensão de sementes (Figura 4. F). Foram utilizados cinco frascos por tratamento. Após a semeadura, os frascos foram fechados com papel alumínio, etiquetados (Figura 4. G) e filme de PVC (Figura 4. H), e incubados em sala de crescimento a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 0,2$ e iluminação de 16h (Figura 5: C). Este procedimento foi realizado em ambiente asséptico e todo o material utilizado foi previamente esterilizado (Figura 5: A e B).



Figura 5: A e B- Materiais utilizados previamente esterilizados em ambiente asséptico. C- Frascos em sala de crescimento.

Fonte: BARBOZA. A. M., 2015.

Os tratamentos consistiram em meios de cultura adicionados Com Água de Coco (CAC) e Sem Água de Coco (SAC) ($200 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de água de coco): T_1 = Meio MS $\frac{1}{2}$ da concentração CAC; T_2 = Meio MS $\frac{1}{2}$ da concentração SAC; T_3 = Meio de Tomate CAC; T_4 = Meio de Tomate SAC; T_5 = NPK (05-08-08) CAC; T_6 = NPK (05-08-08) SAC; T_7 = NPK (09-07-07) CAC; T_8 = NPK (09-07-07) SAC; T_9 = NPK (15-09-06) CAC; T_{10} = NPK (15-09-06) SAC; T_{11} = NPK (08-06-04) CAC; T_{12} = NPK (08-06-04) SAC; T_{13} = NPK (06-08-06) CAC; T_{14} = NPK (06-08-06) SAC. Em todos os meios de cultura foram acrescidos de: 20g de sacarose, 14g de ágar e 2g de carvão ativado. O pH foi ajustado para $5,0 \pm 0,2$ com vinagre ou bicarbonato de sódio, antes da adição do ágar. Aproximadamente 25 mL de meio de cultura foi distribuído em frascos com capacidade para 250 mL, e esterilizados em autoclave a 121°C por 20min.

O material incubado foi observado diariamente nos primeiros 15 dias de cultivo a fim de monitorar o eventual desenvolvimento de microrganismos.

Para análise do crescimento das plântulas obtidas nos meios T₃, Meio de Tomate CAC, e T₄, Meio de Tomate SAC, essas foram repicadas para os mesmos meios de cultivo usados na semeadura, colocando-se cinco plântulas em cada frasco, com cinco repetições. Os frascos foram fechados com papel alumínio e filme de PVC, etiquetados e incubados em sala de crescimento a uma temperatura de 25°C ± 0,2 e iluminação de 16 horas. O delineamento estatístico empregado nos dois experimentos foi um esquema fatorial 2x7 em que os fatores foram com e sem adição de água de coco (2) e diferentes meios de cultura (7) com cinco réplicas cada e avaliadas as variáveis Altura da Parte Aérea (APA); Número de Raízes (NR) e Número de Folhas (NF), as médias foram pela Análise de Variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade pelo programa Statistix 9.0.

4 Resultados e Discussão

Os resultados deste trabalho mostram que meio de cultura T₃, Meio de Tomate CAC, e T₄, Meio de Tomate SAC, obtiveram maior taxa de Germinação de Sementes (GS), (Figura 3). Os tratamentos: T₁, Meio MS ½ da concentração CAC, (T₂) Meio MS ½ da concentração SAC, T₅ Meio NPK (05-08-08) CAC, T₆ Meio NPK (05-08-08) SAC, T₇ Meio NPK (09-07-07) CAC, T₈ Meio NPK (09-07-07) SAC, T₉ Meio NPK (15-09-06) CAC, T₁₀ Meio NPK (15-09-06) SAC, T₁₁ Meio NPK (08-06-04) CAC, T₁₂ Meio NPK (08-06-04) SAC, T₁₃ Meio NPK (06-08-06) CAC e T₁₄ Meio NPK (06-08-06) SAC não apresentaram germinação *in vitro*.

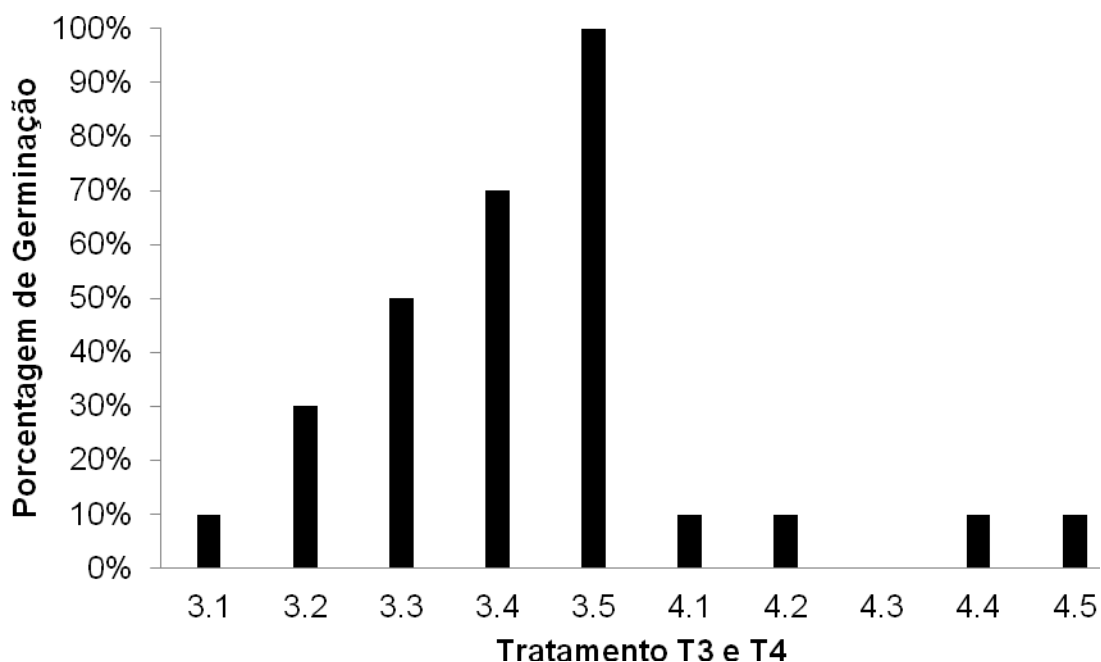


Figura 6- Taxa de Germinação de Sementes (GS). Os tratamentos: T₃ (3.1- 3.5 com adição de água de coco) e T₄ (4.1 a 4.5 sem adição de água de coco).

Schneiders et al. (2012) relataram que *Cattleya forbesii* se desenvolveu mais rapidamente *in vitro* em meio básico de Murashige e Skoog (MS) com adição de 2,5g. L⁻¹ de carvão ativado, obtendo um ótimo resultado de taxa de germinação entre 45 e 90%. Ao contrário do que ocorreu neste trabalho, com *Cattleya intermedia*, onde em T₁, Meio MS ½ da concentração CAC, e T₂, Meio MS ½ da concentração

SAC, a taxa de germinação foi de 0%. Já em T₃, Meio Tomate CAC, e T₄, Meio de Tomate SAC, foi observada taxa de germinação em torno de 30 a 100%.

Hermann et al. (2011) obtiveram germinação de *Brassavola tuberculata* em vários tratamentos, inclusive em meio de cultura alternativo, proposto por Campos (2002), com adição de 200 mL. L⁻¹ de água de coco. Mas Soares e colaboradores (2013) constataram que não houve germinação de *D. nobile* neste mesmo meio de cultura. Embora em alguns tratamentos T₁ (Meio MS ½ da concentração CAC), e T₂ (Meio MS ½ da concentração SAC), T₅ (Meio NPK (05-08-08) CAC), e T₆ (Meio NPK (05-08-08) SAC), ao T₁₃ (Meio NPK (06-08-06) CAC), e T₁₄ (Meio NPK (06-08-06) SAC), usados neste trabalho, não tenham sido observadas germinação, este fato provavelmente não seja devido à presença de água de coco nos meios porque houve germinação nos meios de tomate CAC e SAC.

A tabela 2 apresenta a média de interação nos meios com e sem água de coco.

Tabela 2: Médias das Análise de Variância (ANOVA) sobre a interação dos meios com e sem água de coco.

Coco X Meios			
Variável	CV	F	P
NF	12,81	5,75	0,0001*
NR	16,95	5,18	0.0003*
APA	14,85	3,60	0,0044*

*Significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

A interação entre os fatores água de coco e meios foram significativas para todas as variáveis.

No tratamento T₄, Meio de Tomate SAC, quanto a variável NF observou-se 13,44 folhas por plântula diferindo estatisticamente dos outros tratamentos (Tabela 3).

A Tabela 3 apresenta as variáveis analisadas e os respectivos tratamentos.

Tabela 3: Médias de número de folhas (NF), número de raiz (NR) e altura da parte aérea (APA) de plântulas de *Cattleya intermedia* Graham subcultivadas em diferentes meios de cultura.

Meios de Culttura	N F	N R	APA (cm)
T ₁	8,79 BCD	2, 57 D	0,83 E
T ₂	9,48 BC	3,01 CD	0,94 E
T ₃	9,72 B	5,8 A	1,38 ABC
T ₄	13,44 A	5,04 AB	1,2 ABCDE
T ₅	6,4 E	4,6 AB	1,32 ABCD
T ₆	6,12 E	4,24 BC	1,45 AB
T ₇	5,6 E	3,2 CD	1,18 ABCDE
T ₈	5,83 E	2,17 D	0,98 DE
T ₉	5,45 E	2,65 D	1,12 BCDE
T ₁₀	5,43 E	2,99 CD	1,04 CDE
T ₁₁	7,32 DE	2,52 D	0,86 E
T ₁₂	7,38 CDE	4,17 BC	0,93 E
T ₁₃	6,72 DE	4,16 BC	1,49 A
T ₁₄	6,24 E	4,24 BC	1,07 CDE

T₁= Meio MS ½ da concentração com coco; T₂= Meio MS ½ da concentração sem coco; T₃= Meio de Tomate com coco; T₄= Meio de Tomate sem coco; T₅= NPK (05-08-08) com coco; T₆= NPK (05-08-08) sem coco; T₇= NPK (09-07-07) com coco; T₈= NPK (09-07-07) sem coco; T₉= NPK (15-09-06) com coco; T₁₀= NPK (15-09-06) sem coco; T₁₁= NPK (08-06-04) com coco; T₁₂= NPK (08-06-04) sem coco; T₁₃= NPK (06-08-06) com coco; T₁₄= NPK (06-08-06) sem coco.

Médias de combinações seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Quanto ao Número de Raízes (NR), o tratamento T₃, Meio de Tomate SAC, apresentou o melhor resultado com uma média de 5,8 raízes por explante (Tabela 2), diferindo estatisticamente apenas dos tratamentos T₁ (Meio MS ½ da

concentração CAC), T₈ (Meio NPK 09-07-07 SAC), T₉ (Meio NPK 15-09-06 CAC) e T₁₁ (Meio NPK 08-06-04 CAC).

Em relação a Altura da Parte Aérea (APA) das plântulas, o tratamento T₁₃, NPK (06-08-06) CAC, apresentou altura média de 1,49 cm (Tabela 2), sendo superior à da maioria dos tratamentos diferindo apenas dos tratamentos T₁ (Meio MS ½ da concentração CAC), T₂ (Meio MS ½ da concentração SAC), T₁₁ (Meio NPK (08-06-04) CAC) e T₁₂ (Meio NPK (08-06-04) SAC).

Araújo et al. (2006), estudando meio de cultura Knudson C para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de um híbrido de *Cattleya*, observaram maior NR (6,5) formadas quando os meios foram suplementados com 50 e 200 mL. L⁻¹ de água de coco combinada com 100 g. L⁻¹ de polpa de banana nanica.

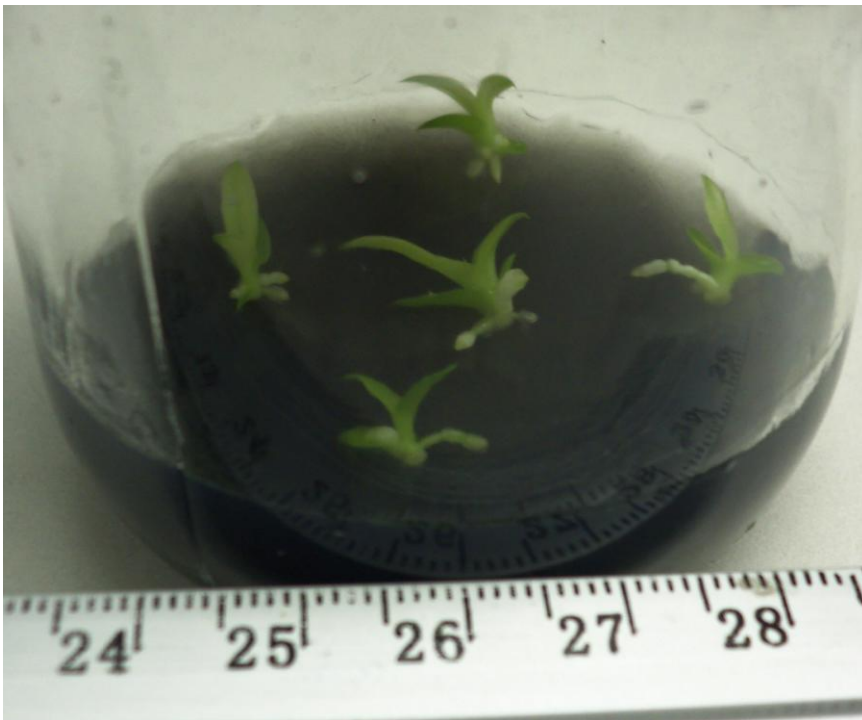
Soares (2010) observou nos seus resultados que a água de coco não promoveu alteração no número de plântulas e porcentagem de germinação de *D. nobile*, mas a adição de 200 mL. L⁻¹ de água de coco ao meio de cultura propiciou os melhores resultados para Altura da Planta (AP), Número de Raiz (NR), Número de Pseudobulbos (NP) e Massa Fresca (MF) de plantas, sendo este volume recomendado para a germinação assimbiótica de *D. nobile*. Por outro lado, neste trabalho foi observado o efeito benéfico da água de coco em todos os tratamentos usados.

Ao trabalharem com um híbrido de *Phalaenopsis* (*P. amabilis* x *P. equestris*) Colombo, Favetta e Faria (2012), constataram que o tratamento composto por Biofert® (NPK (08-09-09)) acrescido de polpa de banana apresentou os melhores resultados de Área Foliar (AF), NF e NR, Comprimento de Maior Raiz (CR), Massa Seca Foliar (MSF) e Massa Seca de Raiz (MSR) no desenvolvimento *in vitro* do híbrido. Resultados semelhantes foram relatados por Su, Schnitzer e Faria (2012) com o mesmo fertilizante no cultivo *in vitro* de *D. nobile*. Porém, a utilização do NPK (06-08-06) apresentou resultados satisfatórios em relação às variáveis NF, NR e APA.

Soares et al. (2013), adicionaram 200 mL. L⁻¹ de água de coco ao meio de cultura composto por Campos (2002) modificado, que proporcionou os melhores resultados para Comprimento de Pseudobulbos (CP), Diâmetro de Pseudobulbos (DP) e Número de Pseudobulbos (NP), NF, NR, CR e MF de *D. nobile*, não influenciando apenas na porcentagem de germinação e o número de plântulas produzidas. Ao contrário, neste trabalho a água de coco proporcionou melhores

resultados nas variáveis: NF, NR e APA, aumentando a porcentagem de germinação de plântulas.

Resultados semelhantes foram relatados por Freitas e colaboradores (2014), mas sem adição de água de coco quando estudaram o desenvolvimento *in vitro* de *C. intermedia* em meio de cultura Knudson C. Já, neste trabalho a presença de água de coco favoreceu o desenvolvimento de plântulas em todos os meios aqui testados, conforme mostra a Figura 7.



A figura 7 mostra plântulas desenvolvidas em meio de cultura.

Fonte: BARBOZA. A. M., 2015

5 Conclusão

É viável o cultivo *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham nos meios de cultivo testados neste estudo.

Os meios de cultura T₃, Meio de Tomate com água de coco, e T₄, Meio de Tomate sem água de coco, suportam todo o desenvolvimento de *C. intermedia* desde a germinação.

Todos os outros tratamentos, com e sem adição de água de coco foram eficientes no desenvolvimento de *C. intermedia* a partir do repique.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. G. et al. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Revista Ceres**. v. 53, n.310, p. 608-613, 2006.

ARDITTI, J; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley; Son, 1993. 682 p.

ASSAKAWA, R. H. et al. Cultivo *in vitro* do híbrido *Cattleya warneri* T. Moore Alba X *Laelia purpurata* Lindl. var. venosa em meio nutritivo suplementado com a polpa de mamão verde e madura na germinação de sementes e no desenvolvimento de orquídeas. **IV Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**- Centro Universitário de Maringá, Paraná, Brasil. 2009. p. 1-5.

CALDAS, L. S.; TORRES, A. C.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa- SPI/EMBRAPA-CNPH. v. 1, 1998. 509 p.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas: Micropropagação e quimioterapia de meristemas**. 1 Ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura. 2002. 112 p.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas: reprodução por sementes em laboratório caseiro**. 1 Ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura. v. 6, 2010. 100p.

COLOMBO, R. C.; FAVETTA, V.; FARIA, R. T de. Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo *in vitro* de um híbrido de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Revista Ceres**. v. 59, n. 6, p. 873-876, 2012.

CORRIE, S.; TANDON, P. Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. through high frequency conversion of encapsulated protocorms under *in vivo* and *in vitro* conditions. Indian J. **Experiment Biologia**. v. 31, p. 61-64, 1993.

CUNHA, T. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, v. 7, n.8, p. 1-5, 2011.

DEZAN, L. F. et al. Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. Em meio de cultivo simplificados. **IDESIA**. v. 30, n. 2, p. 53-58, 2012.

DIGNART, S. L. et al. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência Agrotécnica**. v. 33, n. 3, p. 780- 787, 2009.

- FERREIRA, J. P. et al. Crescimento *in vitro* de orquídea em diferentes concentrações de ureia em substituição ao nitrato de amônio. **Nucleus**. v. 9, n. 1, p. 137-142, 2012.
- FIGUEIREDO, M. A. de. et al. Variações no Meio de Cultura sobre o Crescimento *in vitro* em Híbridos de Orquídea. Nota científica. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 294-296, 2007.
- FIGUEIREDO, M. A. de. et al. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**. v. 38, n. 1, p. 255-257, 2008.
- FREITAS, E. M. de. et al. Propagação *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) em diferentes meios de cultura. **Caderno pedagógico**. v. 11, n. 1, p. 30-41. 2014.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, part 1- the technology**. 2. ed. Exegetics Ltd., England. 1993, 786 p.
- GOMES-OLIVEIRA, I. V. et al. **Orquídeas: Reprodução Assimbiótica**. Pelotas, Ed. Universitária/UFPel, 2010, 152 p.
- HERMANN, M. H.; FREITAS, E. M. de; PÉRICO, E. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas. v. 17. n. 1- 4. p. 162- 166, 2011.
- JUNIOR, R. F. G.; NETO, P. C.; MANTOVANI, C. Crescimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindley com adição de carvão ativado. 2011. Disponível em: <www.unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/.../30032011212607.pdf > Acesso em: 17 novembro 2014.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**. v. 14. p. 214- 217. 1946.
- MARTINI, P. C. et al. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 36, n. 10, p. 1319-1324. 2001.

MORAES, C. P. de. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. v. 13, n. 2, p. 57- 65, 2009 (a).

MORAES, C. P.de. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**. v.7, n. 1, p 67-69, 2009 (b).

MULLER, T. S. et al. Crescimento *in vitro* e aclimatação de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, n. 2. p. 252-254, 2007.

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

NAYAK, N. R. et al. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium alaifolium* (L.) Sw and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Scientia Horticultura** v. 94. p. 107-116. 2002.

RAPOSO, J. G. C. M. **A etimologia a serviço dos orquidófilos**. v. 1. São Paulo: Ave Maria, 1993, 168 p.

RODRIGUES, D. T. et al. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. **Revista Ceres**. v. 59, n. 1, p. 9-15, 2012.

SCHNEIDERS, D. et al. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**. v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.

SOARES, J. D. R. et al. Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Ciência Rural**. v. 39, n. 3, p. 772-777, 2009.

SOARES, Jaqueline Schultz. **Germinação Assimbiótica e Desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores hormonais e água de coco**. 2010. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2010.

SOARES, J. S. et al. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**. v. 31, n. 1, p. 63-67, 2013.

SORACE, M. et al. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 29, n. 4, p. 775-782, 2008.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, Â. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**. v.67, n.1, p.51-57, 2008.

SU, M. J.; SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. de; Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Revista Científica**, Jaboticabal, v.40, n.1, p.28–34, 2012.

TOMBOLATO, A. F. C., COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998, 72 p.

UNEMOTO, L. K. et al. Propagação *in vitro* de Orquídeas Brasileiras em Meio de Cultura Simplificado. **Revista Brasileira Agrociência**. v. 13, n.2, p. 267-269, 2007.

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

VIEIRA, J. G. Z. et al. Influência da caseína hidrolisada no cultivo *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**. v. 28, n. 2, p. 207-212, 2007.

VIEIRA, J. G. Z. et al. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**. v. 37, n. 1, p. 48-52, 2009.