

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Epidendrum secundum* Jacq. EM MEIOS DE CULTIVO SIMPLIFICADOS

Raquel Massaro*

Germana Marcelino Cordeiro**

Thiago de Souza-Leal***

Cristiano Pedroso-de-Moraes****

RESUMO: A semeadura *in vitro* constitui ferramenta indispensável para propagação das principais espécies de orquídeas comerciais, como, por exemplo, *Epidendrum secundum*, espécie de grande importância na obtenção de híbridos. O presente trabalho teve por objetivo estudar aspectos do desenvolvimento *in vitro* desta espécie mediante a avaliação do efeito do meio de cultura MS com metade da concentração de macronutrientes e de dois meios à base de fertilizantes, Hyponex e Kristalon laranja. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão durante 20 minutos. As sementes foram desinfetadas por meio da agitação em tubos eppendorf®, contendo hipoclorito de sódio 5%, durante cinco minutos; posteriormente foram lavadas e inoculadas nos frascos juntamente com 1 mL de água destilada. Foram semeados quatro frascos por tratamento contendo 1 g de sementes cada. Após 180 dias de cultivo, inferiu-se que o meio de cultura mais eficiente para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas foi o meio MS com metade da concentração de macronutrientes, que apresentou as maiores médias para todas as variáveis biométricas avaliadas, podendo, dessa forma, ser utilizado comercialmente por pequenos produtores por apresentar menor custo de produção.

PALAVRAS-CHAVE: Orquídea; Propagação *in vitro*; Meio de cultivo; Produção vegetal.

* Discente de Iniciação Científica - Lab. de Botânica e Meio Ambiente - Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS. E-mail: raquelmassaro@hotmail.com

** Discente de Iniciação Científica - Lab. de Botânica e Meio Ambiente - Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS. E-mail: germanacordeiro@hotmail.com

*** Discente de Iniciação Científica - Lab. de Botânica e Meio Ambiente - Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS. E-mail: thiagosouzaleal@hotmail.com

**** Docente e Membro do Núcleo de Ciências Ambientais Centro Universitário Hermínio Ometto - UNIARARAS; Doutorando Depto de Botânica, IBUNES. E-mail: pedroso@uniararas.br

IN VITRO DEVELOPMENT OF *Epidendrum secundum* Jacq. IN SIMPLIFIED GROWTH MEDIA

ABSTRACT: The *in vitro* seeding is an indispensable tool to propagate the main commercial species of orchids, such as *Epidendrum secundum*, a species of great importance in obtaining hybrids. The present work aimed to study aspects of the *in vitro* development of this species by assessing the effect of MS medium with half of its concentration of macronutrients and two media based on fertilizers, Hyponex and Kristalon Laranja. The culture media were autoclaved at 121 ° C and 1 atm pressure for 20 minutes. The seeds were disinfected by being stirred in Eppendorf® tubes, containing 5% sodium hypochlorite, for five minutes. Subsequently, they were washed and inoculated in flasks with 1 ml of distilled water. Four flasks were seeded per treatment with 1 g of seeds each. After 180 days of cultivation, the most efficient medium for the development of *in vitro* plantlets was inferred to be the MS medium with half of its concentration of macronutrients, which had the highest means for all the biometric variables assessed. Therefore, it can be commercially used by small producers since it presents a lower production cost.

KEYWORDS: Orchid, *In vitro* propagation; Growth medium, Crop production.

INTRODUÇÃO

Orchidaceae abrange uma das maiores famílias de plantas floríferas e representa o grupo mais derivado da superordem Liliiflorae (DRESSLER, 1993). A maioria de seus representantes ocorre em ambientes tropicais, sendo o Brasil um dos maiores detentores de biodiversidade de espécies epífitas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). No entanto, muitas espécies apresentam-se ameaçadas de extinção devido à destruição de *habitats* e às coletas predatórias (BIOTA, 2005), principalmente orquídeas de elevado interesse comercial.

O gênero *Epidendrum* caracteriza-se ecológica e horticulturalmente como um dos mais importantes da família, sendo possuidor de 1.000 espécies, distribuídas pelas Américas Central e do Sul (CHEN, L.; CHEN, J.; CHANG, 2002). Apresenta-se muito variável morfológicamente e mal resolvido taxonomicamente, devido a sua delimitação genérica e à posição sistemática de

muitas de suas espécies, as quais têm sido alvo de controvérsias (DRESSLER, 1967; BRIEGER, 1977; DRESSLER, 1984; HÁGASTER, 1993; WITHNER; HARDING, 2004). Infelizmente, apesar de toda a importância ornamental do gênero, produtores de *Epidendrum* encontram problemas, como custos elevados e lenta taxa de propagação sexual e vegetativa para a produção em larga escala (CHEN, L.; CHEN, J.; CHANG, 2002).

Epidendrum secundum Jacq. representa uma das mais populares espécies do gênero, impulsionando o agronegócio florícola nacional, pois é amplamente comercializada como flor de corte e de vaso, além de ser utilizada na produção de híbridos multifloros. Tal orquídea foi recentemente considerada apenas uma espécie altamente polimórfica, apresentando alta variação morfológica contínua entre suas populações (PINHEIRO; BARROS, 2007).

A espécie caracteriza-se morfológicamente por apresentar caule cilíndrico pendente, rizoma curto, folhas dísticas, coriáceas, ovadas a lanceoladas e planas de ápice arredondado a agudo. As inflorescências apresentam de 16 a 57 cm de comprimento e são do tipo corimbo ou racemo, possuindo de 12 a 80 flores. As flores apresentam pétalas e sépalas de coloração variável entre lilás e rosa. O labelo, também lilás ou róseo, apresenta-se delgado, plano, trilobado, possuidor de lobos laterais suborbiculares a deltoide de margem recortada com lobo mediano retangular a deltoide de margem denticulada e ápice levemente mucronulado, apresentando coloração alva e/ou amarela (STANCIK; GOLDENBERG; BARROS, 2009).

Um das ferramentas indispensáveis à propagação de espécies de orquídeas é a semeadura *in vitro*, uma vez que as metodologias empregadas proporcionam a produção de plantas uniformes, sadias, velocidade superior de crescimento em relação aos métodos convencionais de propagação, maior produção em menor tempo e espaço físico e a obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos (SANTOS et al., 2006). Além disso, o cultivo *in vitro* tem sido utilizado para aumentar a produção de mudas de alta qualidade genética e para redução de custo de produção, pela simplificação de meios de cultura (STANCATO, 2001; PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a).

As plantas cultivadas *in vitro* possuem alto vigor fisiológico devido à nutrição balanceada nas fases iniciais de desenvolvimento. Isto se traduz em rápido crescimento e maior tolerância às condições adversas do meio ambiente, bem como ao ataque de doenças e pragas. Assim sendo, a composição do meio de cultura é importante para a germinação das sementes e o crescimento da planta (KERBAUY, 1997).

O uso de fertilizantes comerciais tem se intensificado como forma de facilitação para a preparação de meios de cultura e redução de custos de produção em várias espécies de orquídeas (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a; 2009b). Tal constatação ocorreu no trabalho realizado por Oliveira e Faria (2005), em estudo comparativo entre os meios MS, Knudson C, Vacin & Went e meios à base de adubos NPK (10-5-5) e NPK (10-30-20) na concentração de 3,0 g L⁻¹, no qual obtiveram as melhores médias para comprimento da maior raiz nas espécies *Catasetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaensis* quando utilizaram o meio à base do adubo NPK (10-5-5). O meio à base do fertilizante NPK (10-30-20) apresentou a melhor média em número de raízes para *Catasetum fimbriatum*. Em relação à massa da matéria seca da raiz e massa da matéria seca da parte aérea, os dois meios à base de fertilizantes se destacaram para a espécie *Cyrtopodium paranaensis*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de meios de cultura simplificados à base de fertilizantes comerciais Hyponex e Krislalon laranja em comparação ao meio MS com metade da concentração de macronutrientes, no desenvolvimento de plântulas de *Epidendrum secundum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, cinco flores de diferentes indivíduos de hábito terrestre de *Epidendrum secundum* foram autopolinizadas artificialmente em setembro de 2008. Seis meses após a autopolinização, foram coletadas sementes dos frutos maduros, as quais foram levadas ao Laboratório de Botânica e Análises Ambientais do Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS.

Foram preparados três tipos de meios de cultura, sendo o primeiro composto por metade da concentração de macronutrientes e totalidade de micronutrientes do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o qual foi usado como controle, e os outros dois pelos meios Hyponex (NPK 6,5-6-19) e Kristalon laranja (NPK 6-12-36) a 2 g.L^{-1} , acrescidos de 1 g.L^{-1} de carvão ativado, 30 g.L^{-1} de sacarose com pH ajustado para pH 5,8 antes da adição de 7 g.L^{-1} de agar-banana. Em seguida, 50 mL de cada meio de cultura foram vertidos em quatro frascos de 250 mL e esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão durante 20 minutos (ARDITTI; ERNEST, 1992).

As sementes foram desinfetadas mediante a agitação em tubos *ependorf*® para centrífuga em solução de hipoclorito de sódio a 5% durante cinco minutos. Posteriormente, os tubos contendo as sementes foram mergulhados em álcool 70% por cinco minutos e levados à câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram lavadas quatro vezes em água destilada com o auxílio de seringa de 1 mL. Com o auxílio de seringa as sementes, juntamente com 1 mL de água destilada, foram depositadas nos frascos contendo os meios de cultura (ARDITTI; ERNEST, 1992). Foram semeados quatro frascos por tratamentos sendo inoculadas, por recipiente, 1g de sementes. Os frascos semeados foram fechados com tampa plástica transparente e mantidos durante 180 dias em câmara climática (B.O.D. MA 403), à temperatura constante de 25°C , sob fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de aproximadamente $116 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Após 180 dias de cultivo foram avaliados os seguintes parâmetros de crescimento: comprimento total da plântula (CTP), comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca da plântula inteira (MFP), massa seca da plântula inteira (MSP), comprimento da maior raiz (CMR) e comprimento da maior folha (CMF) utilizando paquímetro digital (Digimes 100A) e balança analítica (Gehaka BG 400). Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste de Lilliefors para normalidade dos resíduos da ANOVA. Como essa pressuposição foi atendida para todas as medidas analisadas, a análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) pela utilização do aplicativo BioEstat 5.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise de variância foi possível verificar que as plântulas de *Epidendrum secundum*, cultivadas em meio de cultura MS com metade da concentração de macronutrientes, apresentaram as maiores médias para todas as variáveis biométricas analisadas quando comparado aos meios de cultivo preparados com os fertilizantes Kristalon laranja e Hyponex. O meio de cultura à base de Kristalon laranja proporcionou valores intermediários de crescimento das plântulas em relação ao meio MS com metade da concentração de macronutrientes e ao Hyponex, com este último apresentando os menores valores médios para as variáveis analisadas (Tabela 1).

Tabela 1 Valores médios para comprimento total da plântula (CTP), comprimento da parte aérea (CPA) comprimento da maior raiz (CMR), comprimento da maior folha (CMF), massa fresca da plântula inteira (MFP), massa seca da plântula inteira (MSP) de *Epidendrum secundum*, após 180 dias cultivo em três meios de cultura: MS = MS com metade da concentração de macronutrientes; HY = Hyponex; KR = Kristalon. CV = Coeficiente de Variação; DMS = Desvio Padrão Médio.

Variáveis Biométricas Avaliadas						
Meios de Cultura	CTPM	CPA (cm)	CMR (cm)	CMF (cm)	MFP (g)	MSP (g)
MS	2.33 A ¹	1.58 A	2.49 A	1.33 A	0.51 A	0.24 A
HY	1.23 C	1.07 C	0.74 C	0.71 C	0.17 C	0.04 C
KR	2.14 B	1.13 B	1.44 B	0.87 B	0.40 B	0.13 B
DMS	0.53	0.11	0.05	0.002	0.08	0.19
CV(%)	13.1	9.8	18.8	12.9	16.9	20

¹Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os resultados encontrados para o presente trabalho discordam dos descritos por Pedroso-de-Moraes et al. (2009a) para a orquídea epífita *Cattleya loddigesii*, nos quais o meio de cultura à base de fertilizante Kristalon laranja apresentou as maiores médias para as variáveis altura das plântulas (AP), matéria

fresca (MF) e matéria seca (MS), comprimento da maior raiz (CMR) e maior folha (CMF), quando comparados aos meios de cultivo Hyponex e MS com metade da concentração de macronutrientes.

Os resultados demonstram as diferenças adaptativas e nutricionais existentes entre orquídeas de hábito estritamente epifítico, como *C. loddigesii*, e orquídeas que apresentam diferentes genótipos em relação ao seu hábito, como é o caso de *E. secundum*, que frequentemente é descrita como espécie terrícola, mas que também é encontrada apresentando-se rupícola e raramente epifítica (HOENE, 1938; PINHEIRO; BARROS, 2007). Exemplo da influência do genótipo no gênero *Epidendrum* foi encontrado por Vidoz et al. (2008) em sementes oriundas de duas formas fenotípicas de *Epidendrum ibaguense*, amarelo e laranja, hibridizadas com *Brassavola perrinii*, que apresentaram comportamento germinativo diferenciado, quando cultivadas em meio Hyponex e MS com metade da concentração de macronutrientes. Sementes de *Brassavola perrinii* X *Epidendrum ibaguense* amarelo apresentaram 100% de germinação nos dois meios de cultura utilizados; entretanto, sementes de *Brassavola perrinii* X *Epidendrum ibaguense* laranja apresentaram 67% de germinação no meio MS com metade da concentração de macronutrientes e 88% no meio Hyponex.

Tal constatação está de acordo com as verificações de Singh (1992) e McKendrick (2000), de que preferências de certas espécies de orquídeas por um meio de cultivo determinado variam amplamente de um genótipo para outro quanto às exigências nutricionais, sendo este o motivo pelo qual a mesma espécie, por vezes, é capaz de proliferar muito bem em meios simples de cultura enquanto outras necessitam de meios mais complexos para a germinação.

O nitrogênio é um dos principais nutrientes essenciais e ativos, sendo absorvido, principalmente, na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (SAKUTA; TAKAGI; KOMAMINE, 1987). O efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas é marcante: o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo, também, a melhor forma de nitrogênio para algumas culturas, como orquídea (REINERT; MOHR, 1967). Contudo, George (1996)

observou que espécies de orquídeas terrestres não germinam bem em meios de cultura utilizados normalmente para orquídeas epífitas e que, em certas ocasiões, não toleram altas concentrações de sais e, em outras, apenas germinam na presença de nitrogênio orgânico ou inorgânico.

Para bromélias e orquídeas aumentos na concentração de Nitrogênio nítrico propiciam melhor desenvolvimento do sistema radicular enquanto que maiores concentrações de nitrogênio amoniacal incrementam a parte aérea (RUSSOWSKI; NICOLOSO, 2003; KANASHIRO et al., 2007; PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a). Para os meios analisados, de acordo com Pedroso-de-Moraes e colaboradores (2009a), aquele acrescido do fertilizante Hyponex apresenta maior concentração de nitrogênio nítrico em relação aos meios Krystalon laranja e MS com metade da concentração de macronutrientes, que, por sua vez, contém maiores concentrações de nitrogênio amoniacal. Mercier e Kerbauy (1991) verificaram o efeito da fonte de nitrogênio sobre o desenvolvimento de *Epidendrum fulgens* Brongn. Neste caso, a forma e a concentração do nitrogênio tiveram uma influência significativa na síntese de citocininas endógenas, resultando em diferentes padrões de crescimento vegetativo da espécie estudada.

Mesmo o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) tendo sido desenvolvido inicialmente para o uso em cultivo de tecido de tabaco, o mesmo demonstra-se muito efetivo como substrato nutritivo para muitas espécies de orquídeas. Este apresenta altos níveis de nitrogênio e potássio em concentrações superiores a de outros meios utilizados, além de ser o único a possuir nitrogênio em forma de nitrato de amônio (RODRÍGUEZ et al., 2005).

Reddy, Nanjan e Shanmugavelu (1992) avaliaram os meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), KC (KNUDSON, 1946), RL (ROSA; LANERI, 1977) e VW (VACIN; WENT, 1949), para germinação e desenvolvimento de plântulas de *Cymbidium aloifolius*, *Dendrobium cripidatum* e *Epidendrum radicans*, sendo que, assim como para todas as variáveis deste trabalho, os meios nutritivos MS e RL, respectivamente, apresentaram os melhores resultados para desenvolvimento vegetativo das três espécies analisadas.

Para a orquídea rupestre *Laelia cinnabarina*, Stancato e Faria (1996),

em trabalho desenvolvido com diferentes composições de meio de cultura, obtiveram resultados satisfatórios no cultivo *in vitro* em meio MS com metade da concentração dos macronutrientes. Da mesma forma, Rego-Oliveira e Faria (2005) verificaram maiores índices de massa fresca, massa seca e comprimento de plântulas pela utilização de meio de cultura contendo MS com metade da concentração de macronutrientes em comparação aos meios à base de fertilizantes NPK, para a orquídea epífita *Catasetum fimbriatum*, o que vem de encontro com os resultados encontrados para as mesmas variáveis analisadas neste trabalho (Tabela 1).

Sorace e colaboradores (2008) constataram que, para *Oncidium baueri*, as análises biométricas relativas à altura da parte aérea indicaram melhores resultados com a utilização do meio de cultura MS com metade da concentração de macronutrientes, com adição de 40 g.L⁻¹ de sacarose, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho para a variável comprimento da parte aérea (CPA) e conseqüentemente para a variável comprimento da maior folha (CMF), implícita na análise da variável anterior.

Para orquídea epífita *Cattleya nobilior* (ARAUJO et al., 2005) e para as bromélias *Pitcairnia flammea* e *Vriesia philippocoburgii* (MERCIER; KERBAUY, 1991) foi verificado que concentrações crescentes de amônio favoreceram o desenvolvimento do sistema radicular, o que corrobora com os resultados referentes à variável analisada comprimento da maior raiz (CMR), obtida neste trabalho (Tabela 1).

Ainda, em relação aos demais macronutrientes que compõem os meios de cultura, deve-se ressaltar que a absorção de um dado nutriente pode ser influenciada por outro (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Tal observação foi comprovada por Kanashiro et al. (2007), ao verificar correlação linear entre o aumento nas concentrações de potássio e o consumo de nitrato por células vegetativas, promovendo um maior incremento nas características fitotécnicas em bromélias. Também a combinação de KCl com K₂SO₄, ambos na concentração de 500 mg.L⁻¹ promoveu maior crescimento *in vitro* em plântulas de *Cattleya loddigesii*, exceto para a variável comprimento da raiz, que

apresentou melhores resultados com 500 mg.L⁻¹ de KCl na ausência de K₂SO₄ (FIGUEIREDO et al., 2008). Ainda, em relação ao potássio, propõe-se uma correlação com o fósforo, sendo que sua deficiência no meio de cultura conduz a hiperidricidade e ao decréscimo na taxa de absorção de fosfato.

Altas concentrações de fosfato de sódio diminuem o crescimento de explantes de diferentes espécies vegetais, conforme já citado por Pasqual (2001), possivelmente porque o sódio e alguns microelementos são precipitados na solução ou sua absorção é reduzida. Em várias espécies de orquídeas a taxa de incorporação de íons fosfato depende do genótipo e da concentração de sais de potássio presentes no meio de cultura, que é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura. Por exemplo, em estudos com a orquídea *Phalaenopsis nebula* verificou-se melhor desempenho na regeneração de plantas, em cultura de calos, em baixa concentração de fosfato de sódio presente no meio MS (170 mg.L⁻¹) (CHEN; CHANG, C.; CHANG, W., 2000).

Dessa forma, assim como exposto acima, em conjunto e da mesma forma que para o nitrogênio amoniacal, a maior concentração de sais fosfatados e sais contendo potássio no meio MS com metade da concentração de macronutrientes, propiciaram incrementos nas variáveis biométricas analisadas, principalmente em relação ao sistema radicular. O resultado obtido ressalta que meios de cultura deveriam ser determinados para cada espécie e que o uso de fórmulas nutritivas mais apropriadas podem otimizar a qualidade da planta produzida *in vitro* (REGO-OLIVEIRA; FARIA, 2005).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio de cultura MS com metade da concentração de macronutrientes foi mais apropriado para desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Epidendrum secundum* quando comparado aos meios contendo os fertilizantes Kristalon laranja e Hyponex. Tal resultado foi provavelmente encontrado devido ao meio de cultura ½MS apresentar maior riqueza em macro e micronutrientes, enquanto os fertilizantes comerciais usados possuem apenas NPK.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, A. G. et al. Meios de cultura e GA₃ no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Horticultura Brasileira**, Fortaleza, v. 2, p. 612-615, 2005.

ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 682p.

BIOTA. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo. Workshop de áreas prioritárias para conservação da biodiversidade do estado de São Paulo – 2005. **Lista oficial de espécies de plantas ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo**. 2005. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/info/wap/lista1c.html>>. Acesso em: 3 set. 2009.

BRIEGER, F. G. Gattungsreihe Epidendra. In: BRIEGER, F. G.; MAATSCH, R.; SENGHAS, K. (Eds.). **Schlechter Die Orchideen**, v. 3, p. 509-549, 1977.

CHEN, L. R.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 38, p. 441–445, 2002.

CHEN, Y.; CHANG, C.; CHANG, W. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 36, p. 420-423, 2000.

DRESSLER, R. L. The genera *Amblostoma*, *Lanium* and *Stenoglossum*. **Brittonia**, v. 19, p. 237-243, 1967.

_____. La delimitación de géneros em El complejo *Epidendrum*. **Orquídea**, v. 9, p. 277-298, 1984.

_____. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Discorides Press, 1993. 314 p.

FIQUEIREDO, A. M. et al. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 255-257, fev. 2008.

GEORGE, E. F. **Propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics

Ltd., 1996. 1574p.

HÁGSATER, E. *Epidendrum anceps* or *Epidendrum secundum*? **Orquídea**, México, v. 13, p. 153-158, 1993.

HOEHNE, F. C. As plantas ornamentais da flora brasileira. **Boletim de Agricultura**, v. 1, p. 247-273, 1938.

KANASHIRO, S. et al. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, v. 34, p. 59-66, 2007.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, p. 30-33, 1997.

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

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. Piracicaba, SP: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.

McKENDRICK, S. **Manual para la germinación in vitro de Orquídeas**. Quito: Ceiba Fundación para la Conservación Tropical, 2000. 143p.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, v. 138, p. 195-199, 1991.

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

OLIVEIRA, R. L.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum**, v. 27, p. 1- 5, 2005.

PASQUAL, M. Introdução: fundamentos básicos. In: CURSO de especialização à distância cultura de tecidos vegetais (CTV). Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p.

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

_____. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard. (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciência**, v. 13, p. 57-65, 2009b.

PINHEIRO, F.; BARROS, F. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. **Nordic Journal of Botany**, v. 25, p. 129-136, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2007. 830p.

REDDY, P. V.; NANJAN, K.; SHANMUGAVELU, K. G. *In vitro* studies in tropical orchids: seed germination and seedling growth. **Coimbatore**, v. 6, p. 75-78, 1992.

REGO-OLIVEIRA, L. V.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, p. 1-5, 2005.

REINERT, R. A.; MOHR, H. C. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v. 91, p. 664-671, 1967.

RODRÍGUEZ, L. et al. **Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas**. 2005. Disponível em: <http://www.secretariadeambiente.gov.co/sda/libreria/pdf/ecosistemas/restauracion/1_ar26.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2011.

ROSA, M. D.; LANERI, U. Modification of nutrient solutions for germination and growth *in vitro* of some cultivated orchids and the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. **American Orchid Society Bulletin**, v. 46, p. 813-820, 1977.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F. T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 57-63, 2003.

SAKUTA, M.; TAKAGI, T.; KOMAMINE, A. Effects of sucrose source

on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiologia Plantarum**, v. 71, p. 459-463, p. 1987.

SANTOS, A. F. et al. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta**, v. 46, p. 8-12, 2006.

SINGH, F. Micropropagation of orchids *Scaphiglotis plicata* and *Epidendrum radicans*. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry, hig-tech and micropropagation IV**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 1992. p. 223-245.

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

STANCATO, G. C. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 7, p. 25-33, 2001.

STANCATO, G. C.; FARIA, R. T. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae): effects of macro and microelements. **Lindleyana**, v. 11, p. 41-43, 1996.

STANCIK, J. F.; GOLDENBERG, R.; BARROS, F. O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 864-880, 2009.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 604-613, 1949.

VIDOZ, M. L. et al. Comportamiento *ex vitro* de plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de tres híbridos intergenéricos. **Ciencia y Técnica**, v. 1, p. 12-15, 2008.

WITHNER, C. L.; HARDING, P. A. **The Cattleyas and their relatives: The debatable Epidendrums**. Portland: Timber Press, 2004. 146p.

Recebido em: 21 dezembro 2010.

Aceito em: 03 maio 2011.