

CRESCIMENTO DE *ARUNDINA GRAMINIFOLIA* (D. DON.) HOCHR. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO E NÍVEIS DE pH

Cristiano Pedroso-de-Moraes*

Thiago Souza-Leal**

José Alberto Diogo***

Rosângela Isete Canabrava****

Natália Pierobon Pedro****

Marco Aurélio Marteline****

RESUMO: *Arundina graminifolia* é uma orquídea apreciada mundialmente pelo seu valor ornamental, possuindo também uso medicinal. Entretanto, os baixos investimentos relacionados a melhorias das atuais técnicas de cultivo *in vitro*, ferramenta importante para propagação de diversas espécies de orquídeas, impedem a diminuição dos custos de propagação. O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do meio de cultura ½MS e de dois meios a base dos fertilizantes comerciais Hyponex® (NPK 6,5-6-19) e Kristalon laranja® (NPK 6-12-36), submetidos a três níveis de pH (5,3, 5,8 e 6,3), sobre o crescimento *in vitro* de *A. graminifolia*. Para tanto, sementes foram distribuídas em quatro frascos de cada meio e, após 180 dias de cultivo, foram retiradas aleatoriamente vinte plântulas de cada frasco para análise estatística. O meio de cultura mais eficiente foi o meio ½MS com nível de pH de 5,8, que apresentou as maiores médias para todas as variáveis analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Arundina bambusifolia*; Orchidaceae; Orquídea bambu; Propagação *in vitro*.

GROWTH OF *ARUNDINA GRAMINIFOLIA* (D. DON.) HOCHR. IN DIFFERENT CULTURE MEDIA WITH DIFFERENT pH LEVELS

ABSTRACT: *Arundina graminifolia* is an orchid, widely appreciated for its beauty,

* Doutor em Biologia Vegetal; Docente no Centro Universitário Herminio Ometto (UNIARARAS), Araras (SP), Brasil; E-mail: pedroso@uniararas.b

** Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) Rio Claro (SP), Brasil

*** Mestre em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) Brasil

**** Alunos de Iniciação Científica do Lab. de Botânica e Análises Ambientais do Centro Universitário Herminio Ometto (UNIARARAS), Araras (SP), Brasil.

***** Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP); Docente no Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), Brasil.

also used as medicine. Low investments in the improvement of current *in vitro* culture techniques, an important tool for the propagation of species of orchids, impairs decrease in costs. Current analysis assesses the effects of culture medium $\frac{1}{2}$ MS and two media based on commercial fertilizers Hyponex[®] (NPK 6.5-6-19) and Kristalon orange[®] (NPK 6-12-36), at three pH levels (5.3, 5.8 and 6.3), on the *in vitro* growth of *A. graminifolia*. Seeds were placed in four flasks with each medium and 20 seedlings were removed randomly after 180 days of culture from each flask, for statistical analysis. The most efficient culture medium was $\frac{1}{2}$ MS at pH level 5.8, with the greatest media for all variables analyzed.

KEY WORDS: *Arundina bambusifolia*; Orchidaceae; Bamboo orchid; *In vitro* propagation.

INTRODUÇÃO

Entre as espécies ornamentais e medicinais comercializadas, as orquídeas se destacam, principalmente, no oriente. Contudo, tais plantas apresentam alto custo de produção (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2011), principalmente devido aos baixos investimentos relacionados a melhorias das atuais técnicas de cultivo *in vitro* e *ex vitro*, que propiciem aumento de velocidade e redução de custos de propagação (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a).

Arundina graminifolia (D. Don) Hochr constitui uma das espécies de orquídeas terrestres utilizada na medicina tradicional oriental (SIGH; DUGGAL, 2009) e, ornamentalmente, apresenta destaque no agronegócio florícola nacional e mundial como planta de jardim, devido a características intrínsecas à espécie, tais como beleza, resistência a altas intensidades luminosas e tamanho de flores e partes vegetativas (LORENZI; SOUZA, 1999).

Conhecida popularmente como orquídea-bambu, *A. graminifolia* é originária da Ásia Tropical desde a Índia, Nepal, Tailândia, Malásia, Singapura, China Setentrional, Indonésia às Ilhas do Pacífico, onde é utilizada como bactericida e cicatrizante tópico e estomacal (SIGH; DUGGAL, 2009; MEDHI; CHAKRABARTI, 2009; ACHARYA; ROKAYA, 2010). Nos neotrópicos, foi primeiramente introduzida em Porto Rico, Costa Rica e Panamá, de onde se irradiou para os demais países

latinos. Devido à coleta indiscriminada, esta orquídea se apresenta ameaçada de extinção em Bangladesh, um de seus países de origem (BADRHA; BHOWMIK, 2005).

Em mercados internacionais, principalmente nos Estados Unidos, mudas dessa espécie são vendidas entre US\$ 7,00 a US\$ 15,00 (BARRIENTOS; ALFARO, 2002). No Brasil, o valor de mercado da planta florida varia de R\$ 10,00, quando adquiridas diretamente do produtor, a R\$ 55,00 quando compradas em floriculturas (TOMAZELA, 2006). Portanto, nacionalmente, tal planta também apresenta alto potencial mercantil, sendo apenas a melhoria das taxas de propagação da espécie uma das barreiras para o aumento de seu uso como ornamental, medicinal e sua ampla comercialização.

A semeadura *in vitro* é ferramenta para a propagação massal de espécies de orquídeas ameaçadas de extinção (SANTOS et al., 2006; PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a; b). Entretanto, orquidicultores, por falta de conhecimento e indisponibilidade de informações em relação à nutrição destas plantas, empregam meios de cultivo complexos, com diversos nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento (VENTURA, 2002), elevando os custos desta forma de propagação (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a; b).

Estudos *in vitro* realizados por Stancato et al. (2001) demonstram que a diminuição de custos é possível, somente pela simplificação dos meios de cultura atuais, onde as condições de cultivo são específicas para algumas espécies. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento de plântulas pós-germinação de *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr. em meio de cultura experimental MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de macronutrientes e em outros dois meios compostos pelos fertilizantes Hyponex® e Kristalon Laranja®, em três diferentes níveis de pH, durante um período de 180 dias de cultura *in vitro*, a fim de otimizar a produção de mudas dessa espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do trabalho, cinco flores de plantas de genótipos diferentes da espécie *Arundina graminifolia*, cultivadas a céu aberto nos jardins do Centro Universitário Hermínio Ometto - UNIARARAS, Araras, São Paulo, foram

autopolinizadas. Seis meses após a autopolinização, foram coletadas sementes dos frutos maduros, as quais foram homogeneizadas e levadas ao Laboratório de Botânica e Análises Ambientais da instituição, para o início do cultivo *in vitro*.

Foram preparados três tipos de meios de cultura, sendo o primeiro o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), modificado para conter metade da concentração de macronutrientes, o qual foi usado como controle, e os outros dois, por meios compostos pelos fertilizantes Hyponex[®] (NPK 6,5-6-19) e Kristalon Laranja[®] (NPK 6-12-36) a 2 g.L⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Formulação dos fertilizantes utilizados para o cultivo *in vitro* de *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr.

Hyponex		Kristalon Laranja	
Sais	%	Sais	%
Nitrato de potássio	2	Nitrato de potássio	4,5
Nitrato de amônio	4,5	Nitrato de amônio	1,5
Pentóxido de fósforo	6	Pentóxido de fósforo	12
Óxido de potássio	19	Óxido de potássio	36
Sulfato de magnésio	2,5	Sulfato de magnésio	8
Sulfato de zinco	0,5	Sulfato de zinco	1,8
Sulfato de cobre	0,025	Sulfato de cobre	0,01
Sulfato ferroso	-	Sulfato ferroso	0,07
Sulfato de manganês	0,03	Sulfato de manganês	0,04
Ácido bórico	0,05	Ácido bórico	0,025
Molibdato de sódio	0,025	Molibdato de sódio	0,004

Todos os meios de cultivo foram acrescidos de 1 g L⁻¹ de carvão ativado, 30 g L⁻¹ de sacarose e tiveram seus pH ajustados para 5,3, 5,8 e 6,3 após a adição de 7 g L⁻¹ de ágar-banana. Logo após, 50 mL de cada meio, com cada um dos níveis de pH 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 desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio a 0,5%, sendo submetidas à agitação na solução durante cinco minutos em tubos *Eppendorf*[®] (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a; b). Posteriormente, os tubos foram mergulhados em álcool 70% e levados à câmara de fluxo laminar, onde as

sementes foram lavadas quatro vezes em água destilada autoclavada com o auxílio de seringa de 1 mL, também autoclavada. Ainda utilizando-se de seringa estéril, as sementes, juntamente com 1 mL de água destilada autoclavada, foram depositadas nos frascos contendo os meios de cultura (ARDITTI; ERNEST, 1992). Foram semeados quatro frascos por tratamento, sendo inoculadas, por recipiente, 1 mg 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 de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas com intensidade luminosa de aproximadamente $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para análise estatística, foram utilizados vinte indivíduos de cada frasco, retirados aleatoriamente dos meios de cultura (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009b; CUNHA et al., 2011). Foram auferidos os dados referentes à altura das plântulas (AP), comprimento da maior raiz (CMR), comprimento da maior folha (CMF), número de raízes (NR), massa da matéria fresca (PMF) e massa da matéria seca (PMS). Para a análise estatística dos dados foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, constituído em um esquema fatorial 3×3 (três meios de cultura x três níveis de pH, em triplicata). A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as avaliações, os dados foram transformados em Log visando à estabilização da variância e favorecimento da homogeneidade das amostras (SANTANA; RANAL, 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que as plântulas de *Arundina graminifolia*, cultivadas em meio de cultura MS composto por metade da concentração de macro nutrientes e pH 5,8, apresentaram as maiores médias para todas as variáveis analisadas quando comparadas aos outros meios de cultivo associados aos demais níveis de pH (Tabela 2). Estes são corroborados pelos encontrados para a orquídea *Epidendrum secundum*, cultivada nos mesmos meios de cultura e potencial hidrogeniônico (MASSARO et al., 2012), e vão de encontro à afirmação de Rodríguez et al. (2005), de que mesmo o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) tendo sido desenvolvido inicialmente para o uso em cultivo de tecido de tabaco, demonstra-se muito efetivo como substrato nutritivo para muitas espécies de orquídeas.

Tabela 2. Médias obtidas para as variáveis: Número de raízes (NR), Altura das plântulas (AP), Comprimento da maior raiz (CMR), Comprimento da maior folha (CMF), Massa da matéria fresca (PMF) e Massa da matéria seca (PMS), de plântulas de *Arundina graminifolia* (D. Don.) Hochr., cultivadas em três diferentes meios de cultura e níveis de pH. CV (%) = Coeficiente de variação

Meio de cultivo	pH					
	5,3	5,8	6,3	5,3	5,8	6,3
	NR			AP (cm)		
½MS	1,23 Ac	1,84 Aa	1,43 Ab	1,32 Ac	2,54 Aa	1,82 Ab
Hyponex	1,21 Ac	1,50 Ba	1,33 Bb	1,19 Bc	1,90 Ba	1,54 Bb
Kristalon	0,96 Bb	1,19 Ca	1,01 Cb	0,99 Cc	1,56 Ca	1,23 Cb
F - Mc		16,4*			13,6*	
F - Ph		10,2**			9,2**	
F - Mc x pH		10,5**			9,9**	
CV (%)		4,8			3,1	
	CMR (cm)			CMF (cm)		
½MS	0,83 Ac	1,42 Aa	1,03 Ab	1,13 Ab	1,65 Aa	1,12 Ab
Hyponex	0,33 Ab	0,87 Ba	0,85 Ba	1,01 Bb	1,20 Ba	1,04 Bb
Kristalon	0,68 Ba	0,72 Ca	0,69 Ca	0,64 Cb	0,74 Ca	0,62 Cb
F - Mc		2,5**			7,8**	
F - pH		3,5*			5,9**	
F - Mc x pH		1,5*			14,6*	
CV (%)		2,26			9,35	
	PMF (g)			PMS (g)		
½MS	0,09 Ac	0,56 Aa	0,23 Ab	0,4 Ac	0,09 Aa	0,7 Ab
Hyponex	0,06 Bb	0,25 Ba	0,24 Aa	0,3 Ab	0,07 Ba	0,4 Bb
Kristalon	0,06 Bc	0,18 Ca	0,15 Bb	0,1 Bc	0,06 Ba	0,4 Bb
F - Mc		5,2**			13,3*	
F - pH		2,8**			12,4*	
F - Mc x pH		1,2**			14,2*	
CV (%)		10,85			19,85	

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas representam análise nas colunas e minúsculas nas linhas. *significativo a $p < 0,05$; **significativo a $p < 0,01$.

Reddy et al. (1992) avaliaram os meios de cultura MS, KC (KNUDSON, 1958), RL (ROSA; LANERI, 1977) e VW (VACIN; WENT, 1949), para germinação e

desenvolvimento de plântulas de *Cymbidium aloifolius*, *Dendrobium crispdatum* e *Epidendrum radicans*, sendo que, assim como para todas as variáveis deste trabalho, o meio nutritivo MS apresentou os melhores resultados para desenvolvimento vegetativo das espécies analisadas. Também, para a orquídea rupestre *Laelia cinnabarina*, em trabalho desenvolvido com diferentes composições de meio de cultura, foram obtidos resultados satisfatórios no cultivo *in vitro* em meio MS com metade da concentração dos macronutrientes (STANCATO; FARIA, 1996).

Tais resultados em relação aos meios de cultura podem ser explicados pela presença de uma relação quadrática entre variáveis analisadas em plântulas submetidas a doses balanceadas de nitrogênio nítrico e amoniacal, em que se obtém principalmente o aumento de matéria seca e da altura de plântulas, como observado tanto para orquídeas terrestres do gênero *Cymbidium* quanto epífitas do gênero *Cattleya* (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a; b). Da mesma forma, os resultados encontrados para os meios à base de fertilizantes para todas as variáveis estão de acordo com os encontrados para a bromélia *Aechmea blanchetiana* (KANASHIRO et al., 2007) e para a orquídea *Cattleya loddigesii* (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a), nas quais o número de raízes decresceu linearmente com o aumento da concentração de nitrogênio nos meios de cultivo modificados.

A mesma tendência para a variável NR foi encontrada para *Arundina graminifolia* cultivada em meio de cultura MS suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose (BHADRA; BHOWMIK, 2005), em que foi constatado maior número de raízes na concentração 50% de nitrato de amônio contido no meio MS e tendendo ao decréscimo nas maiores concentrações. Tal resultado leva à constatação de que as maiores percentagens de nitrogênio amoniacal encontradas nos fertilizantes Hyponex® e Kristalon Laranja®, em comparação à do meio MS com metade da concentração de macronutrientes, podem ter sido as responsáveis pela melhor média apresentada para a variável, fato este corroborado pelos resultados obtidos em experimento com as orquídeas *Cattleya loddigesii* e *C. tigrina*, onde meios de cultivo à base dos mesmos fertilizantes foram analisados (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a; b).

Para a orquídea epífita *Oncidium baueri* e para a terrestre *Epidendrum secundum*, 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 (SORACE et al., 2008; MASSARO et al., 2012), corroborando com os resultados encontrados neste trabalho para a variável altura das plântulas (AP) e para comprimento da maior folha (CMF). Além disso, para a orquídea *Cattleya nobilior* e para as bromélias *Pitcairnia flammaea* e *Vriesia philippocoburgii* (MERCIER; KERBAUY, 1991; ARAÚJO et al., 2005) foi verificado que concentrações crescentes de amônio favoreceram o desenvolvimento do sistema radicular, o que concorda com os resultados referentes à variável analisada comprimento da maior raiz (CMR) obtida neste trabalho (Tabela 2).

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, sendo tal absorção altamente influenciada pelo pH. Tal observação foi comprovada em bromélias, pela correlação linear existente entre o aumento nas concentrações de potássio e o consumo de nitrato por células vegetativas, promovendo um maior incremento nas características fitotécnicas (KANASHIRO et al., 2007). A combinação de KCl com K_2SO_4 , ambos na concentração de 500 mg L^{-1} , também 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 K_2SO_4 (FIGUEIREDO et al., 2008).

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 cultivo, que é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura (CHEN et al., 2000). Dessa maneira, 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.

Nesse íterim, os maiores índices de massa da matéria fresca e 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* e para a terrestre *Epidendrum secundum* (REGO-OLIVEIRA; FARIA, 2005; MASSARO et al., 2012), vem

de encontro com os resultados encontrados para as mesmas variáveis analisadas neste trabalho (Tabela 2).

O efeito do pH nos meios nutritivos *in vitro* tem merecido atenção especial de pesquisadores por sua atuação direta sobre a disponibilidade de nutrientes neles contidos (CHAPLA et al., 2009). Orquídeas cultivadas assimbioticamente são extremamente sensíveis a mudanças em seus níveis normais de pH, apresentando, em alguns casos, intolerância a variações da ordem de 0,05, como no caso de representantes do gênero *Encyclia*, e tolerância em relação a maiores variações, até 1,5, como em plantas do gênero *Cattleya* (PEDROSO-DE-MORAES, 2000).

Segundo Arditti e Ernst (1984) a maior parte das espécies de orquídeas germina bem em pHs entre 4,8 e 5,2, com amplitude entre os pHs 3,6 e 7,6. Entretanto, Kämpf (2000) sugere que para um crescimento adequado da maioria das espécies de orquídeas, a faixa que revela o melhor ajuste é a de 5,0 a 6,5.

O processo de autoclavagem e a estocagem são fatores que acidificam os meios de cultura. Dessa forma, uma das maneiras de se impedir tal acidificação é a adição de carvão ativado, que estabiliza o pH do meio, serve de fonte alternativa de carbono para a cultura (PEDROSO-DE-MORAES, 2000) e pode ser benéfico em concentrações de 0,1 a 2%, pois, fisicamente, simula a condição de escuro, na qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor, tendo, devido a estes fatores, sido usado neste ensaio. Vários são os relatos na literatura que comprovam os benefícios do uso do carvão ativado para a cultura *in vitro* de orquídeas, principalmente levando-se em consideração dados biométricos (MORALES et al., 2006; MURDAD et al., 2006; CHAPLA et al., 2009). Entretanto, mesmo com o uso do carvão ativado, os meios de cultura ainda se alteram em relação à acidez devido ao crescimento celular (MURDAD et al., 2006). O pH de meios de cultura se modifica à medida que diferentes íons são absorvidos e os produtos metabólicos são excretados para o meio, fato este principalmente causado pela absorção diferencial do amônio e do nitrato (MURDAD et al., 2006).

Neste trabalho, os meios com pH ajustados para 6,3 assumiram valores intermediários para as variáveis analisadas, o que corrobora com os resultados obtidos para a orquídea epífita *Baptistonia pubes* cultivada em meio MS modificado e em meio à base de banana nanica acrescido de fertilizante NPK 20-20-20 Plant

Prood® (BAN), com pH ajustado para 6,2 (FERREIRA et al., 2010). Já o nível de pH 5,3 pode ser considerado o pior para todos os meios de cultura usados, mesmo existindo uma tendência das orquídeas terrestres germinarem em faixa de pHs mais baixos que as epífitas (DIEZ, 2007), afirmação esta discordante dos resultados obtidos para *Baptistonia pubes*, em que os maiores valores para as variáveis analisadas foram obtidos para os meios ajustados para 5,2 (FERREIRA et al., 2010).

O ajuste de pH dos meios de cultivos usados para 5,8 obteve os melhores resultados para todas as variáveis quantitativas e biométricas analisadas, o que corrobora com trabalhos recentes enfocando germinação e regeneração *in vitro* de representantes da família, sejam eles terrestres, litófitos ou epífitos, os quais apresentam meios de cultivo ajustados para este nível de pH (ARAÚJO et al., 2009; CHAPLA et al., 2009; PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a; b; SUZUKI et al., 2009; BESSON et al., 2010; GALES et al., 2010; SCHEIDT et al., 2010; SOARES et al., 2010; SOUTO et al., 2010; CHIU et al., 2011; CUNHA et al., 2011; KEEL et al., 2011; LIAU et al., 2011; ROY et al., 2011), com exceção dos geralmente utilizados para cultivo de orquídeas do gênero *Phalaenopsis* e *Dendrodium*, para os quais são encontrados, em geral, os níveis de 5,4 e 6,0 respectivamente (CHEN et al., 2000; MURDAD et al., 2006; PEDROSO-DE-MORAES et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

O meio de cultivo MS com metade da concentração de macronutrientes ajustado para pH 5,8 demonstrou ser o mais eficaz no crescimento *in vitro* de plântulas de *Arundina graminifolia* como demonstrado para todas as variáveis analisadas, em detrimento dos meios de cultivo à base dos fertilizantes Hyponex® e Kristalon Laranja®. A obtenção de tais resultados aponta para a necessidade de mais investigações em relação ao uso de fertilizantes como base de meios de cultura para propagação *in vitro* da espécie, uma vez que para outras orquídeas, o uso de fertilizantes constitui eficiente forma de redução de custos de produção.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K. P.; ROKAYA, M. B. Medicinal Orchids of Nepal: Are They Well Protected? **Our Nature**, v. 8, n. 1, p. 82-91, 2010.
- ARAÚJO, A. G. et al. Meios de cultura e GA₃ no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Horticultura Brasileira**, Suplemento, p. 612-615, 2005.
- ARAÚJO, A. G. et al. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti, J. (ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives III**. New York: Cornell University Press, 1984. p. 177-222.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 682p.
- BARRIENTOS, J. M.; ALFARO, L. M. Efecto del efluente de excretas de bovinos sobre el crecimiento inicial de la orquídea *Arundina graminifolia* (D. Don.) Hochr. **InterSedes**, v. 3, n. 4, p. 45-51, 2002.
- BESSON, J. C. F. et al. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 9-13, 2010.
- BHADRA, S. K. et al. Micropropagation of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) G. E. C. Fisher. Bangladesh J. **Genetics and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 47-50, 2002.
- BHADRA, S. K.; BHOWMIK, T. K. Axenic germination of seeds and rhizome-based micropropagation of an orchid *Arundina graminifolia* (D. Don.) Hochr. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 34, n. 2, p. 59-64, 2005.
- CHAPLA, P. I. et al. pH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.

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, n. 3, p. 420-423, 2000.

CHIU, Y-T.; LIN, C-S.; CHANG, C. *In vitro* fruiting and seed production in *Erycina pusilla* (L.) N. H. Williams & M. W. Chase. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 11, n. 3, p. 131-136, 2011.

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.

DIEZ, J. M. Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. **Journal of Ecology**, v. 95, n. 1, p. 159-170, 2007.

FERREIRA, A. W. C. et al. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V. P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 636-639, 2010.

FIGUEIREDO, A. M. et al. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, v. 4, n. 1, p. 255-257, 2008.

GALE, S. W. et al. Constraints on establishment in an endangered terrestrial orchid: a comparative study of *in vitro* and *in situ* seed germinability and seedling development in *Nervilia nipponica*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 163, n. 2, p. 166-180, 2010.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Porto Alegre: Ed. Guaíba, 2000. 254p.

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, n. 2, p. 59-66, 2007.

KEEL, B. G.; ZETTLER, L. W.; KAPLIN, B. A. Seed Germination of *Habenaria repens* (Orchidaceae) in situ Beyond its Range, and its Potential for Assisted Migration Imposed by Climate Change. **Castanea**, v. 76, n. 1, p. 43-54, 2011.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, n. 2, p. 214-217, 1946.

LIAO, Y-J. et al. *In vitro* shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. **In Vitro Celular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 6, p. 702-709, 2011.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1999. 1120p.

MASSARO, R. et al. Avaliação do desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. em meios de cultivo simplificados. **Rama: Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2, p. 337-351, 2012.

MEDHI, R. P.; CHAKRABARTI, S. Traditional Knowledge of NE people on conservation of wild orchids. **Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK)**, v. 8, n. 1, p. 11-16, 2009.

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, n. 2, p. 195-199, 1991.

MORALES, S.; MILANEZE, M. A. G.; MACHADO, M. F. P. S. Effect of activated charcoal for seedlings development of *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). **Journal of Plant Sciences**, v. 1, n. 4, p. 388-391, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 2, p. 473-497, 1962.

MURDAD, R. et al. High multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique. **Scientia Horticulturae**, v. 111, n. 3, p. 73-79, 2006.

PEDROSO-DE-MORAES, C. **Cultivo de Orquídeas**. Araras: Biblioteca Duse Rüeegger Ometto, 2000. 145p.

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

PEDROSO-DE-MORAES, C. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciência**, v. 13, n. 3, p. 57-65, 2009b.

PEDROSO-DE-MORAES, C. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lind. (Orchidaceae) em recipientes de diferentes volumes. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 2, p. 255-258, 2010.

PEDROSO-DE-MORAES, C. et al. Response of *Cattleya* hybrids for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae* Foster. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 2, p. 267-271, 2011.

REDDY, P. V.; NANJAN, K.; SHANMUGAVELU, K. G. *In vitro* studies in tropical orchids: seed germination and seedling growth. **Coimbatore**, v. 6, n. 1-2, 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, n. 1, p. 1-5, 2005.

RODRÍGUEZ, L. et al. **Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas**. v. 1, p. 4-9, 2005. Disponível em: <http://www.secretariadeambientegov.co/sda/libreria/pdf/ecosistemas/restauracion/1_ar26.pdf> Acesso em: 22 dez. 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, n. 9, p. 813-820, 1977.

ROY, A. R. et al. 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**, v. 128, n. 3, p. 325-331, 2011.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da Germinação**: um enfoque estatístico. Brasília: Universidade de Brasília, 2004. 248p.

SANTOS, A. F. et al. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta**, v. 46, n. 3, p. 8-12, 2006.

SCHEIDT, G. N. et al. Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucobillum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. **Biociências**, v. 17, n. 1, p. 82-85, 2010.

SIGH, A.; DUGGAL, S. Medicinal Orchids: An Overview. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 13, n. 1, p. 399-412, 2009.

SOARES, J. D. R. et al. Estiolamento e luz artificial no cultivo *in vitro* de orquídeas nativa e híbrida. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1941-1947, 2010.

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.

SOUTO, J. S. et al. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 2, p. 179-185, 2010.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. 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, n. 1, 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, n. 1, p. 41-43, 1996.

SUZUKI, R. M. et al. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V. P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 657-666, 2009.

TOMAZELA, J. M. Orquídeas em Meio a Bananais. **Suplemento Agrícola. O Estado de São Paulo**, n. 2665, p. 6-7, 2006.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, n. 4, p. 604-613, 1949.

VENTURA, G. M. et al. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, v. 47, n. 286, p. 613-628, 2002.

Recebido em: 23 de maio de 2014

Aceito em: 21 de maio de 2015