

Fertilizantes comerciais e reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de *Schomburgkia crisper Lindl*

Daniela Antonietti¹; Sabrina Buttini¹; Suzana Stefanello²

Resumo: O mercado de floricultura e plantas ornamentais tem se expandindo devido ao alto potencial que algumas plantas apresentam, dentre as quais se encontram as orquídeas. Juntamente, os protocolos para otimização do cultivo *in vitro* de orquídeas vêm se especificando conforme as exigências de cada espécie. Portanto, objetivou-se nesse trabalho verificar a influência de diferentes concentrações de fertilizantes comerciais (Biofert® e Nutrigarden®) no cultivo *in vitro* de plantas de *Schomburgkia crisper*, além do efeito da suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de auxina e citocinina na regeneração *in vitro* de plantas a partir de ápices foliares e segmentos radiculares. O experimento com fertilizantes constou de 10 tratamentos e após 120 dias, avaliou-se a sobrevivência, número de folhas, raízes e brotos e altura da parte aérea. O melhor resultado foi observado para tratamentos contendo Biofert®, em relação à altura da parte aérea, número de folhas e raízes, enquanto tratamentos contendo Nutrigarden® apresentaram-se melhores para o número de brotos. O segundo experimento constou de oito tratamentos contendo combinações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg L⁻¹) e BAP (0 e 0,1 mg L⁻¹) onde foram inoculados segmentos foliares e ápices radiculares de *S. crisper*. Avaliações semanais foram realizadas a fim de verificar mudanças morfológicas e sobrevivência dos explantes. A suplementação do meio de cultura com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D na ausência de BAP e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg L⁻¹ de BAP promoveu a regeneração de plantas de *S. crisper* a partir de segmentos foliares.

Palavras-chave: Meio de cultura simplificado; propagação *in vitro*; orchidaceae.

Commercial fertilizers and plant growth regulators for *in vitro* regeneration of *Schomburgkia crisper Lindl*.

Abstract: The market for floriculture and ornamental plants has been expanding due to the high potential that some plants present, among which are the orchids. At the same time, the optimization of protocols for *in vitro* cultivation of orchids has been specifying according to the requirements of each species. Therefore, this study aimed to: investigate the influence of different concentrations of commercial fertilizers (Biofert® and Nutrigarden®) *in vitro* cultivation of *Schomburgkia crisper* and the effect of culture medium supplementation with different concentrations of auxin and cytokinin for *in vitro* regeneration of plants from leaf tips and root segments. The first experiment consisted of 10 fertilizer treatments and after 120 days, survival, number of leaves, roots and shoots and shoot height were evaluated. For shoot height, number of leaves and roots, the higher results were observed for treatments containing Biofert®, whereas treatments containing Nutrigarden® presented the higher number of shoots. The second experiment consisted of eight treatments containing combinations of 2,4-D (0, 1, 2 and 4 mg.L⁻¹) and BAP (0 and 0.1 mg.L⁻¹) where leaf tips and root segments of *S. crisper* were inoculated. Weekly evaluations were conducted to verify morphological changes and survival of explants. The supplementation of culture medium with 1 mg.L⁻¹ 2,4-D in the absence of BAP and 2 mg.L⁻¹ 2,4-D and 0.1 mg.L⁻¹ BAP promoted regeneration plants of *S. crisper* from leaf tips.

Key words: simplified culture medium, *in vitro* propagation, Orchidaceae

Introdução

O mercado de flores e plantas ornamentais vem se expandindo e contribui de forma significativa para a economia do Brasil, devido ao alto valor agregado e pelo retorno do capital investido em pouco tempo (STUMPF *et al.*, 2005). As orquídeas são plantas herbáceas que apresentam grande potencial de comercialização e, por esse motivo, também estão inseridas nesse mercado. Apresentam flores exuberantes de distintas formas e cores.

Muitas espécies de orquídeas, no entanto, vêm sofrendo grande extrativismo do seu habitat natural para exploração comercial. Dessa forma, estudos que tenham como finalidade estabelecer protocolos de propagação de orquídeas são importantes para a conservação destas plantas (FERREIRA, SUZUKI, 2008). Técnicas de cultura de tecidos são empregadas para acelerar o processo de germinação, multiplicação e desenvolvimento, permitindo a propagação em larga escala (ARAÚJO, LÉDO, 2012; JORGE, JURAS, SUZUKI, 2015).

Schomburgkia crispa Lindl. é uma orquídea epífita (WATANABE *et al.*, 2002) que aparece na lista de espécies em extinção na flora de Minas Gerais (FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 2007).

A utilização de meio de cultura simplificado baseado em formulações de fertilizantes comerciais em substituição aos meios geralmente utilizados como o MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) ou ainda como complemento, pode ser uma alternativa para se obter protocolo simplificado com baixo custo de produção (SU *et al.*, 2012). A utilização de fertilizantes comerciais torna-se uma importante estratégia para a obtenção de plantas, em especial, para orquídeas, com boa qualidade e redução de custos para propósitos de conservação e/ou comercialização (HERRMANN, FREITAS, PÉRICO, 2011; GALDIANO JUNIOR, MANTOVANI, LEMOS., 2012).

Uma forma de promover o desenvolvimento do material vegetal é, juntamente ao meio de cultura, adicionar substâncias reguladoras de crescimento, as quais têm a função de promover o desenvolvimento das partes aérea e radicular. A micropropagação em larga escala de plantas de diferentes espécies de orquídea tem sido obtida utilizando regiões meristemáticas (STEFANELLO *et al.*, 2009; FLACHSLAND *et al.*, 2011; BELLAVAR *et al.*, 2015).

Dessa forma, objetivou-se estimar a influência de diferentes concentrações de fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de plantas de *Schomburgkia crispa*, bem como o efeito da suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de auxina e

citocinina na regeneração *in vitro* de plantas a partir de ápices foliares e segmentos radiculares.

Material e Métodos

Para dar início aos cultivos *in vitro* foram coletadas cápsulas maduras de *S. crispera*. Realizou-se a assepsia das cápsulas com álcool 70% durante 1 minuto e solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo por 15 minutos. Posteriormente foram lavadas três vezes com água destilada. Em seguida, as cápsulas foram abertas e as sementes foram inoculadas em frascos de vidro com 50 mL de meio de cultura MS. Os frascos foram mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

O aparecimento dos protocormos no meio de cultura ocorreu 15 dias após a inoculação das sementes e plantas completas foram observadas após 90 dias de cultivo *in vitro*. A cada 60 dias realizou-se o subcultivo das plantas no mesmo meio de cultura utilizado para germinação (MS).

Efeito de fertilizantes comerciais

Plantas com tamanho aproximado de 0,8 cm, contendo 2 folhas, com aproximadamente seis meses de cultivo, obtidas por meio da germinação *in vitro* foram utilizadas como explantes na instalação de experimento a fim de avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com fertilizantes comerciais no crescimento de plantas de *S. crispera*.

Foram testadas diferentes combinações dos fertilizantes Biofert[®] (NPK 3-2-2 em g.L⁻¹: N 34,5; P₂O₅ 23; K₂O 23; Ca 11,5; Mg 5,75; S 11,5; B 0,23; Cl 2,3; Co 0,115; Cu 0,575; Fe 1,15; Mn 0,575; Mo 0,0575; Zn 1,15; Cl 0,115 e Ni 0,0575) e Nutrigarden[®] (NPK 4-12-8 em g.L⁻¹: N4; P₂O₂ 12; K₂O 8; Mg 1; B 0,06; Cu 0,05; Fe 0,3; Mn 0,07; Mo 0,005 e Zn 0,15) sendo que todas as combinações foram complementadas com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6,5 g.L⁻¹ de ágar.

Foram testadas as seguintes combinações: MS completo + vitaminas do MS (MS), MS com metade da concentração dos macronutrientes + vitaminas do MS (MS/2), 5mL.L⁻¹ de Biofert[®] (B5), 10 mL.L⁻¹ de Biofert[®] (B10), 10 mL.L⁻¹ de Biofert[®] + vitaminas do MS (B10+vit), 15 mL.L⁻¹ de Biofert[®] (B15), 2,5 mL.L⁻¹ de Nutrigarden[®] (N2,5), 5 mL.L⁻¹ de Nutrigarden[®] (N5), 5 mL.L⁻¹ de Nutrigarden[®] + vitaminas do MS (N5+vit) e 10 mL.L⁻¹ de Nutrigarden[®] (N10). O pH dos meios de cultura foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem a 121° C e 1 atm de pressão por 15 minutos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, o qual constou com dez tratamentos, cada um contendo 4 repetições, tendo como unidade experimental um frasco com 5 plantas, totalizando 20 plantas por tratamento.

Os frascos com as plantas permaneceram em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 120 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis: taxa de sobrevivência (%), altura da parte aérea (cm), número de folhas, número de brotos e número de raízes.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste LSD – Fisher ($p < 0,05$).

Efeito de reguladores de crescimento na regeneração de plantas a partir de ápices radiculares e segmentos foliares

Um segundo experimento foi conduzido utilizando como explantes segmentos foliares e ápices radiculares (com 0,5 cm) seccionados de plantas ($3 \pm 0,5$ cm) cultivadas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS/2 (50% dos macronutrientes) suplementado com diferentes combinações de 2,4-D (0; 1; 2; e 4 mg.L^{-1}) e BAP (0 e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose, vitaminas do MS, solidificado com $6,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar e com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

O experimento foi inteiramente casualizado, contendo oito tratamentos, tendo como unidade experimental um frasco contendo 5 explantes foliares e 5 radiculares, com três repetições cada, totalizando 15 explantes por tratamento.

Os frascos com as culturas permaneceram em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As avaliações foram realizadas semanalmente para acompanhar as mudanças morfológicas, a taxa de sobrevivência e a regeneração de protocormos. Após 210 dias de cultivo avaliou-se o número de plantas regeneradas.

Resultados e Discussão

Efeito de fertilizantes comerciais

As variáveis analisadas foram afetadas pelos diferentes meios de cultura (Tabela 1). A taxa de sobrevivência foi maior e não diferiu quando as plantas foram cultivadas em meio de cultura MS, MS/2 e nas diferentes concentrações de Biofert[®], assim como quando se utilizou 5 mL.L^{-1} de Nutrigarden[®] que corresponde a concentração recomendada pelo fabricante.

Maior número de folhas por planta foi obtido quando as plantas foram cultivadas no meio de cultura MS/2 e quando foi utilizado o fertilizante Biofert[®]. Contudo, com o passar do

tempo as folhas das plantas cultivadas na presença de ambos os fertilizantes (exceto na concentração 10 mL.L⁻¹) ficaram cloróticas, o que não ocorreu com as folhas das plantas cultivadas em meio de cultura MS e MS/2 após 120 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 1 - Taxa de sobrevivência (%), altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), número de raízes (NR) e número de brotos (NB) de plantas de *S. crisper* após 120 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Sobrevivência (%)	APA (cm)	NF	NR	NB
MS	80a	0,64b	10,67a	2,49b	3,08a
MS/2	85a	0,73a	9,28a	2,82b	4,05a
B5	100a	0,92a	9,60a	6,70a	1,80b
B10	90a	0,92a	11,21a	6,52a	3,31a
B10 +vit.	85a	0,73a	10,98a	6,26a	1,85b
B15	85a	0,92a	14,29a	5,94a	4,66a
N2,5	55b	0,43b	6,79b	7,04a	2,27b
N5	85a	0,49b	6,57b	5,18a	3,50a
N5 +vit.	95a	0,58b	10,54a	6,34a	4,34a
N10	70b	0,46b	6,54b	0,33b	4,72a

*Médias seguidas de letras distintas nas colunas, diferem entre si pelo Teste LSD- Fisher a 5% de significância. MS (MS completo + vitaminas do MS); MS/2 (MS com metade da concentração de macronutrientes + vitaminas do MS); B5 (5mL.L⁻¹ de Biofert[®]); B10 (10mL.L⁻¹ de Biofert[®]); B10 + vit. (10mL.L⁻¹ de Biofert[®] + vitaminas do MS); B15 (15mL.L⁻¹ de Biofert[®]); N2,5 (2,5mL.L⁻¹ de Nutrigarden[®]); N5 (5mL.L⁻¹ de Nutrigarden[®]); N5 + vit. (5mL.L⁻¹ de Nutrigarden[®] + vitaminas do MS) e N10 (10mL.L⁻¹ de Nutrigarden[®]).

A clorose observada nas folhas pode ter ocorrido devido a baixa concentração do nitrogênio encontrada nos fertilizantes Biofert[®] e Nutrigarden[®] (3 e 4%, respectivamente). O nitrogênio é um nutriente essencial e possui importante papel no crescimento das plantas, na sua deficiência é comum a clorose geralmente em folhas mais velhas, pois o nitrogênio é mobilizado das folhas mais velhas para as áreas de novo crescimento ocasionando a clorose das folhas (TAIZ, ZEIGER, 2010).

Quando se analisou a altura da parte aérea melhores resultados foram obtidos quando as plantas foram cultivadas em meio de cultura MS/2 e na presença do fertilizante Biofert[®] independente da concentração empregada, diferindo dos tratamentos onde o fertilizante foi o Nutrigarden[®] e no meio de cultura MS completo.

Por outro lado, as plantas cultivadas com Nutrigarden[®] apresentaram bons resultados para número de raízes e brotos, o que pode ser explicado devido à eficiente concentração de fósforo (12%), o qual é responsável pelo desenvolvimento da raiz, além de atuar na divisão e crescimento celular da planta (TAIZ, ZEIGER, 2010). Maior número de raízes por planta foi obtido quando as plantas foram cultivadas com ambos os fertilizantes comerciais, exceto na concentração de 10 mL.L⁻¹ de Nutrigarden[®] (NPK 4:12:8) corroborando com os resultados

obtidos por Rodrigues *et al.* (2012) que utilizaram o fertilizante Peter's (NPK 10:30:20) para *Cattleya walkeriana* e obtiveram resultados similares, demonstrando a sensibilidade à salinidade quando as raízes foram expostas a maiores concentrações, ou seja, altas concentrações de sais podem ser limitantes para o desenvolvimento da raiz.

Resultados similares foram encontrados também para *Cattleya trianaei* por Galdiano Júnior, Mantovani e Lemos (2012) também utilizando o fertilizante Peter's e comparado com o meio de cultura MS, demonstrando que houve pouca diferença entre as concentrações do meio MS com a dos fertilizantes, porém o número de raízes ainda foi maior para os meios com fertilizantes, fortalecendo a ideia de que o crescimento das raízes é favorecido em plantas cultivadas com fertilizantes comerciais. A presença de maior número de raízes se torna importante quando se trata da aclimatização, fazendo com que as plantas tenham maiores condições de sobrevivência no ambiente *ex vitro*.

Favetta, Colombo e Faria (2014) em trabalho realizado com *Vanda tricolor* Lindl., também encontraram bons resultados para as variáveis área foliar, número de folhas e raízes com a utilização de Biofert® (NPK: 8:9:9) porém na concentração de 3 mL.L⁻¹ com e sem a suplementação com banana o que permitiu a produção de plantas de elevada qualidade e com baixo custo. De modo similar, Colombo, Favetta e Faria (2012) relataram a viabilidade de utilização de Biofert® na propagação de *Phalaenopsis*.

Unemoto *et al.* (2007) também obtiveram bons resultados na propagação *in vitro* de *Oncidium nanun* e *Cattleya forbesii* em meio de cultura com formulação simplificada acrescido de 3 mL. L⁻¹ do adubo comercial de formulação NPK (6:6:8) após 8 meses de cultivo. Segundo os autores, todas as variáveis analisadas apresentaram melhor desempenho em meio contendo fertilizante quando comparado com os meios MS e MS/2.

Os meios simplificados, geralmente utilizam uma quantidade reduzida de elementos e são de fácil acessibilidade. Além da facilidade do preparo e baixo custo dos componentes utilizados, outro fator favorável é a não utilização dos compostos, nitrato de amônia e nitrato de potássio, utilizados no meio de cultura MS e cuja obtenção é controlada pelo Ministério de Defesa.

Efeito de reguladores de crescimento na regeneração de plantas a partir de ápices radiculares e segmentos foliares

Nos primeiros dias após a instalação do experimento praticamente todos os explantes permaneceram verdes quando cultivados no meio de cultura basal MS/2 na presença ou ausência de 2,4-D e BAP.

As primeiras modificações nos segmentos foliares cultivados *in vitro* foram observadas por volta dos 40 dias de cultivo. Na extremidade seccionada de explantes cultivados em meio de cultura basal suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0 mg.L⁻¹ de BAP (T3) e 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ de BAP (T6) observou-se a formação de massas nodulares branco-amareladas, sobre as quais posteriormente observou-se a formação de protocormos. O mesmo não ocorreu com os ápices radiculares.

Após 90 dias de cultivo apenas os explantes foliares cultivados nos tratamentos mencionados acima sobreviveram e o percentual de sobrevivência, ou seja, o percentual de explantes que formaram protocormos foi de 6,66% para ambos as combinações de reguladores de crescimento.

Quando as plantas regeneradas a partir dos protocormos apresentavam aproximadamente 0,3 cm, após 90 dias de cultivo, foram transferidas para um novo meio de cultura MS/2 isento de reguladores. O subcultivo das plantas no meio de cultura sem reguladores permitiu o crescimento das mesmas. O número médio de plantas regeneradas por explante foi similar em ambos os tratamentos (Tabela 2).

A adição da auxina sintética 2,4-D ao meio de cultura parece ter sido importante para a regeneração dos protocormos a partir de segmentos foliares. Os resultados obtidos foram similares aos relatados por Chen, Chang e Chang (1999) com *Oncidium Gower Ramsey*“. Segmentos foliares produziram aglomerados de massas nodulares quando cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 2,4-D e TDZ. Essas massas produziram embriões, inicialmente pequenos e brancos, os quais germinaram e passaram por sucessivos estágios de desenvolvimento.

Tabela 2 - Efeito do 2,4-D e do BAP na regeneração de plantas a partir segmentos foliares de *S. crista* após 210 dias de cultivo *in vitro*.

2,4-D (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)	Nº médio de plantas regeneradas por explante	Tamanho médio (cm)
1	0	35	0,5
2	0,1	36	0,9

Stefanello *et al.* (2009) também regeneraram plantas da orquídea *Miltonia flavescens* a partir de regiões meristemáticas. Inicialmente, massas nodulares originaram-se sobre segmentos foliares e ápices radiculares seccionados e cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 3 mg L⁻¹ de 2,4-D associado com BAP (1 ou 3 mg L⁻¹). Posteriormente, estas massas originaram protocormos que quando subcultivados em meio de cultura MS/2 na ausência de reguladores de crescimento originaram plantas completas.

Nasiruddin, Begun e Yasmin (2003), ao avaliarem o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D (0; 0,05; 0,1; 0,50 e 1 mg.L⁻¹) sobre a formação de calos e protocormos para a regeneração de plantas de *Dendrobium formosum* a partir de explantes foliares, relataram que a formação de calos ocorreu rapidamente (aproximadamente 10 dias) com a maior concentração de 2,4-D, enquanto que a formação de protocormos foi observada com maior tempo de cultivo na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ (aproximadamente 30 dias). Além disso, explantes cultivados em meio isento de regulador não apresentaram formação de calo e protocormos. Portanto, a formação de calos e protocormos parece estar relacionada à concentração do regulador, ou seja, em concentrações mais elevadas pode haver a formação de calos, enquanto que em menor concentração pode haver a formação de protocormos, levando em consideração a espécie utilizada, sendo que cada espécie apresenta necessidades diferentes.

Estudos indicam que as auxinas influenciam o desenvolvimento dos protocormos. A aplicação de auxinas exógenas aumenta o conteúdo de DNA, o diâmetro, influencia a morfologia e o número de protocormos durante a germinação bem como regulam a formação de estruturas vegetativas (NOVAK, WHITEHOUSE, 2013; NOVAK, LUNA, GAMAGE, 2014).

Conclusão

O crescimento da parte aérea e o incremento no número de folhas das plantas de *S. crispera* é favorecido pelo cultivo em meio de cultura MS ou com Biofert[®] comparativamente ao Nutrigarden[®]. O incremento no número de raízes é maior quando o meio de cultura é suplementado com os fertilizantes comerciais em comparação aos sais do MS.

Segmentos foliares cultivados em meio de cultura MS acrescido de 2,4-D e BAP regeneram protocormos e permitem a propagação *in vitro* de *S. crispera*.

Referências

ARAÚJO, A. G.; LÉDO, A. S. III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas. Brasília: Embrapa, 2012. 156p.

BELLAVER, L.A.; KATO, K.M.M.; BUTTINI, S.; ANTONIETTI, D.; GALLI, S.; STEFANELLO, S. Regeneração *in vitro* de *Cyrtopodium paranaense* Schltr. (Orchidaceae) a partir de regiões meristemáticas. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Palotina, v.4, p. 100-109, 2015.

CHEN, J.T.; CHANG, C.; CHANG, W.C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 143-149, 1999.

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

FAVETTA, V.; COLOMBO, R. C.; FARIA, R. T. Cultivo *in vitro* de *Vanda tricolor* Lindl. em meios de cultura simplificados. **Revista de Ciência Agrária**, Belém, v. 57, n.2, p. 114-117, 2014.

FERREIRA, W.M.; SUZUKI, R.M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M.I.B.; BASEIA, L.G.; LICHSTON, J.E. (Eds.). **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal: Imagem Gráfica, p. 67-68, 2008.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. **Revisão das listas das espécies da flora e da fauna ameaçadas de extinção do Estado de Minas Gerais: Relatório Final**. Belo Horizonte, 2007.

GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.; LEMOS, E. G. M. Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) (Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizante comercial. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 3, n.3, p. 210-214, 2012.

FLACHSLAND, E.A.; TERADA, G.; FERNÁNDEZ, J.M., MEDINA, R.D.; SCHININI, A.; REY, H.; MROGINSKI, L.A. Plant regeneration from root-tips culture of *Cyrtopodium brandonianum* Barb. Rodr. (Orchidaceae). **Propagation of Ornamental Plants**, v. 11, n.4, p.184-188, 2011.

HERRMANN, M.H.; FREITAS, E.M.; 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.

JORGE, J.; JURAS, M.C.; SUZUKI, R.M. Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.13, n. 3, p. 134-141, 2015.

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

NASIRUDDIN, K.M.; BEGUM, R.; YASMIN, S. Protocorm like bodies and plantlet regeneration from *Dendrobium formosum* leaf callus. **Asian Journal of Plant Science**, v. 2, n. 13, p. 955-957, 2003.

NOVAK, S.D; WHITEHOUSE, G. Auxin regulates first leaf development and promotes the formation of protocorm trichomes and rhizome-like structures in developing seedlings of

Spathoglottis plicata (Orchidaceae). **AOB Plants**, 5, 2013. pls053 Disponível em: <http://aobpla.oxfordjournals.org/content/5/pls053.full> DOI: 10.1093/aobpla/pls053

NOVAK, S. D.; LUNA, L. J.; GAMAGE, R. Role of auxin in orchid development. **Plant Signaling & Behavior**, v.9 (10), 2014, e972277. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4622584/> DOI:10.4161/psb.32169

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; DIAS, J. M. M.; OTONI, W. C.; VILLANI, E. M. A. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.1, p. 9-15, 2012.

STEFANELLO, S.; KARSTEN, J.; MULLER, T. S.; TOMCZAK, A. P.; BONETT, L. P.; SCHUELTER, A. R. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 53-59, 2009.

STUMPF, E. R.T.; FISCHER, S.Z.; BARBIERI, R. L.; GARRASTAZU, M. C. **O setor produtivo de flores e plantas ornamentais nos Coredes Sul e Centro-Sul do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Documento 145, 26 p., 2005.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 819p.

UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v.13, n. 2, p. 267-269, 2007.

WATANABE, D.; MORIMOTO, M. S.; KIHARA, G. T. E.; MORIMOTO, L. M. **Orquídeas: manual de cultivo**. 3.ed. São Paulo: AOSP: Associação Orquidófila de São Paulo, 2002.