

## Morfologia da germinação de sementes e crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner em diferentes meios nutritivos.

Renato Fernandes Galdiano\* Junior, Cibele Mantovani, Elisângela Soares Gomes,  
Eduardo Custódio Gasparino, Fabíola Vitti Moro, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil  
\*Autor correspondente, e-mail: renatofgaldianojr@yahoo.com.br

### Resumo

O objetivo do presente trabalho foi documentar o processo de germinação inicial e crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* sob diferentes meios nutritivos a fim de aperfeiçoar o processo de propagação dessa espécie. Plântulas de 90 dias ( $0,8 \pm 0,1$  cm de comprimento) foram repicadas entre os meios nutritivos Vacin & Went, WPM, Knudson-C, Phytamax® e ½ MS. Após 90 dias de crescimento (180 dias depois da semeadura), as características biométricas da altura da planta, número de folhas, número de raízes, largura da maior raiz, comprimento da maior raiz e massa de matéria fresca (parte caulinar e radicial) foram avaliadas e as médias separadas pelo teste de Tukey a 5%. O embrião de *Cattleya walkeriana* origina, a partir do polo micropilar da semente, uma esférula que gera uma estrutura cônica clorofilada denominada protocormo após 30 dias da semeadura. Aos 60 dias, o protocormo desenvolve folíolos na parte superior e papilas absorptivas na porção inferior. O meio de cultura ½ MS favoreceu o crescimento *in vitro* e pode ser recomendado para a produção de plantas de *Cattleya walkeriana*.

**Palavras-chave:** germinação *in vitro*, orquídea nativa, protocormo.

### Seed germination morphology, and *in vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner under different culture media

### Abstract

The aim of this work was to analyze the early seedling development and *in vitro* growth of *Cattleya walkeriana* under different culture media in order to improve the process of propagation of this species. Seedlings 90-day old ( $0,8 \pm 0,1$  cm of length) were transferred into culture media Vacin & Went, WPM, Knudson-C, Phytamax® and ½ MS. After 90 days, biometric characteristics of shoot length, root number, width of largest root and fresh weight were evaluated and means separated by Tukey's test at 5%. *Cattleya walkeriana* embryo yields from seed micropylar end a conical chlorophylated structure denominated protocorm 30-day after sowing. At 60 days after sowing, protocorm develops leaflets at upper portion, and rhizoids in the lower. ½ MS culture medium favored *in vitro* growth and can be recommended for the production of *Cattleya walkeriana*.

**Keywords:** *in vitro* germination, native orchid, protocorm

## Introdução

Orchidaceae, uma das maiores e mais diversificada família das Angiospermas, possui cerca de 25.000 espécies que habitam todas as regiões do globo, exceto Antártida e algumas áreas desérticas; no Brasil, ocorrem 235 gêneros e 2.419 espécies conhecidas (Barros et al., 2012a). A principal utilização atual destas plantas é como ornamental (Chug et al., 2009), sendo muitas espécies amplamente cultivadas para produção como flores de corte e plantas envasadas.

*Cattleya walkeriana* Gardner (figura 1A) é nativa do Cerrado central brasileiro entre os Estados das regiões Norte (Tocantins), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal) e Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) (Barros et al., 2012b). Em razão de seu tamanho reduzido, variabilidade de cores e facilidade de cultivo, tem despertado grande atenção dentro e fora do país por orquidicultores (Menezes, 2011).

Devido à coleta predatória indiscriminada, aumento das fronteiras agrícolas com conseqüente fragmentação de hábitat e impactos das mudanças climáticas, diversas orquídeas estão atualmente entre as espécies ameaçadas de extinção. *Cattleya walkeriana* foi incluída na lista de plantas presumivelmente em extinção no Estado de Minas Gerais (Fundação Biodiversitas, 1997), porém ainda não é considerada em vias de extinção por deficiência de dados, segundo a última listagem divulgada pelo IBAMA (Brasil, 2008).

Diversos trabalhos elucidaram a importância da propagação *in vitro* de orquídeas para produção comercial e para repovoar populações reduzidas. Tal abordagem tem se mostrado uma importante alternativa para auxiliar a redução da pressão sob populações naturais que tem sofrido com o extrativismo, a exemplo de *Laelia albida* Bateman ex Lindl. (Santos-Hernández et al., 2005), *Habenaria macroceratitis* (Stewart & Kane, 2006), *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Ávila-Díaz et al., 2009), *Rhynchostylis gigantea* Lindley Ri dl. (Li & Xu, 2009) e *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. (Roy et al., 2011).

As sementes de orquídeas não possuem reservas nutritivas, requerem fungos micorrízicos

simbiótico e apresentam baixo percentual de germinação (Faria, 2010). A propagação por germinação *in vitro* de sementes proporciona a manutenção de uma variabilidade genética maior que qualquer outro método, embora o estabelecimento de um protocolo de cultura *in vitro* é geralmente espécie-específico e dependente de uma série de fatores tais como condições de incubação, composição e quantidade de carboidratos do meio nutritivo (Arditti, 1982).

O objetivo do presente estudo foi documentar os principais aspectos da germinação de *Cattleya walkeriana* Gardner e selecionar um meio nutritivo dentre as formulações convencionais utilizadas para o crescimento *in vitro* de orquídeas.

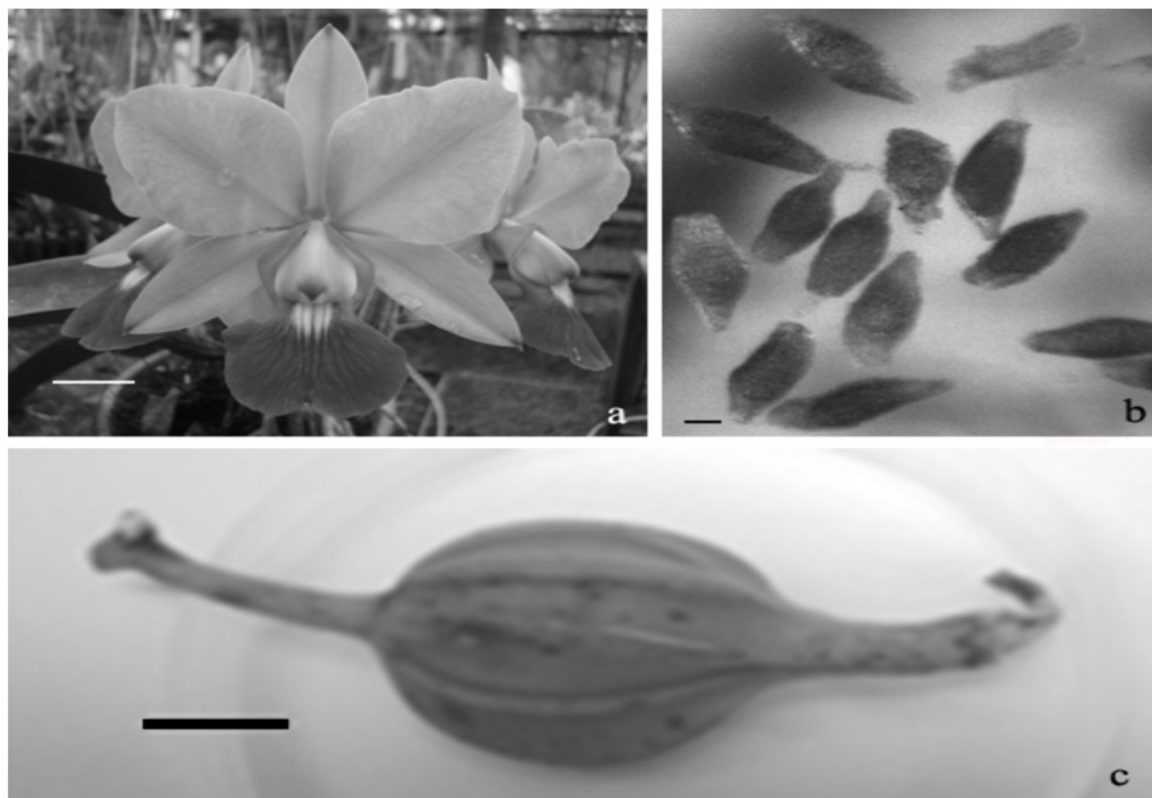
## Material e Método

### Desinfestação de cápsulas e semeadura *in vitro*

Cápsulas com sementes maduras de *Cattleya walkeriana* 'tipo', com dez meses após a polinização artificial (figura 1C), foram lavadas com detergente e água corrente e em seguida superficialmente desinfestadas em etanol 70% por 5 minutos, hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo (Qboa) durante 30 minutos e enxaguadas no interior de câmara de fluxo três vezes com água destilada e esterilizada em autoclave (121 °C e 1,1 atm durante 20 minutos, conforme Caldas et al., 1998).

Cerca de 100 mg de sementes (figura 1B) foram inoculadas em frascos de vidro de 280 mL de capacidade contendo 40 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de vitaminas, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol e 0,1 g L<sup>-1</sup> de glicina (Costa et al. 2009), 3% de sacarose e geleificado com 0,7% de ágar (A4675, Sigma®). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes de ser esterilizado em autoclave nas condições descritas acima.

A germinação e crescimento inicial ocorreram em sala de incubação sob condições controladas, com temperatura de 25 ± 2°C e iluminação incidente nos frascos de, aproximadamente, 75 µmol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas de luz durante 90 dias.



**Figura 1.** Aspecto geral da inflorescência de *Cattleya walkeriana* tipo, barra = 1 cm (a), semente madura observada em estereomicroscópio, barra = 10 µm (b), obtidas a partir de cápsula madura ainda fechada aos nove meses após polinização, barra = 1 cm (c).

#### *Documentação da morfologia da germinação por microscopia eletrônica de varredura.*

Amostras de sementes e protocormos foram coletados em intervalos de 15 dias a partir da semente e prefixadas em solução 4% de glutaraldeído em tampão  $K_2HPO_4$  0,1 M, pH 7,2, a 4°C por no mínimo 72 h. Em seguida foram lavados três vezes na mesma solução tampão sem glutaraldeído e fixados em tetróxido de ósmio 1% dissolvido em tampão  $K_2HPO_4$  0,1 M, pH 7,2, durante 1 h (Santos & Silveira, 1999). As amostras foram desidratadas em série gradual de acetona (30-100%) a temperatura ambiente por 30 min, secas ao ponto crítico em dessecador de  $CO_2$  (HITACHI HCP-2), montados em estruturas de alumínio e cobertos com 18 nm de ouro paládio em um pulverizador metálico HITACHI E102. Micrografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 500) operado a 2.500 V.

A observação das características dos protocormos procedeu-se conforme Veiret (1974) e Kraus et al. (2006).

#### *Seleção de meios nutritivos para o crescimento in vitro*

Plântulas germinadas após 90 dias em meio de cultura MS e com  $0,8 \pm 0,1$  cm de altura foram transferidas para cinco diferentes tratamentos constituídos dos meios de cultura Vacin e Went (Vacin & Went, 1949), WPM – *Wood Plant Medium* (Lloyd & McCown, 1980), Knudson-C (Knudson, 1946), Phytamax® (PP 6668, Sigma) e  $\frac{1}{2}$  MS, o qual é constituído da formulação de Murashige & Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes e demais componentes conforme citado acima. A composição de cada meio de cultura está descrita na tabela 1. O pH e quantidades de sacarose utilizados nos meios nutritivos foram mantidos em diferentes valores a fim de manter a descrição original conforme proposto pelos seus respectivos autores.

Para cada formulação foi adicionado  $40 g L^{-1}$  de homogeneizado de banana madura e  $2,0 g L^{-1}$  de carvão ativado. A manipulação do meio de cultura Phytamax® (PP6668, Sigma, EUA) foi desenvolvida conforme as recomendações do fabricante, o qual afirma que a formulação

PP668 contém estas concentrações de banana e carvão ativado. Depois de preparados, foram vertidos nos frascos de vidro de 280 mL de capacidade e esterilizados em autoclave nas condições descritas acima.

Cada tratamento foi constituído de cinco repetições em frascos de 280 mL com 40 mL do respectivo meio de cultura e 15 plântulas cada, totalizando 375, e foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado em sala de incubação *in vitro* com temperatura e luminosidade conforme anteriormente descrito

para a germinação.

Após 90 dias da inoculação (ou seja, 180 dias de cultivo *in vitro*), as plântulas foram retiradas dos frascos e analisadas a altura da planta, número de folhas, número de raízes, largura da maior raiz, comprimento da maior raiz e massa de matéria fresca da planta inteira. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias separadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa Sisvar (Ferreira, 2011).

**Tabela 1.** Componentes sais macro e micronutrientes (mg L<sup>-1</sup>) dos meios nutritivos Phytamax® (PP 6668, Sigma), Knudson-C (Knudson, 1946), ½ MS (Murashige e Skoog, 1962; com metade da concentração de macronutrientes), Vacin e Went (Vacin e Went, 1949) e WPM (Lloyd e McCown, 1980)

Componentes	VW	WPM	KC	Phytamax®	½ MS	MS
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	400	-	825	825	1700
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500	-	500	-	-	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	6,2	-	3,1	6,2	6,2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	96	-	166	220	440
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	556	1.000	-	-	-
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,012	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	-	0,025	-	0,012	0,025	0,025
Na <sub>2</sub> -EDTA	37,25	-	-	37,25	37,25	37,25
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	-	25	27,8	27,8	27,8
KI	-	-	-	0,41	0,41	0,41
KNO <sub>3</sub>	525	-	-	950	950	1900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250	170	250	85	85	170
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	8,6	-	5,3	8,6	8,6
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	7,5	22,3	7,5	-	22,3	22,3
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	-	8,45	-	-
Myo-inositol	-	-	-	0,1	0,1	0,1
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	990	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250	370	250	185	185	370
<b>Tabela 1</b> (cont.)						
MgSO <sub>4</sub>	-	-	-	90,35	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,12	0,25	0,25
Ácido Nicotínico	-	-	-	1,0	0,5	0,5
Piridoxina.HCl	-	-	-	1,0	0,5	0,5
Thiamina.HCl	-	-	-	10,0	0,1	0,1
Sacarose	20.000	30.000	30.000	20.000	30.000	30.000
Peptona	-	-	-	2.000	-	-
Agar	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000
pH	5,3	5,7	5,3	5,7	5,7	5,7

## Resultados e Discussão

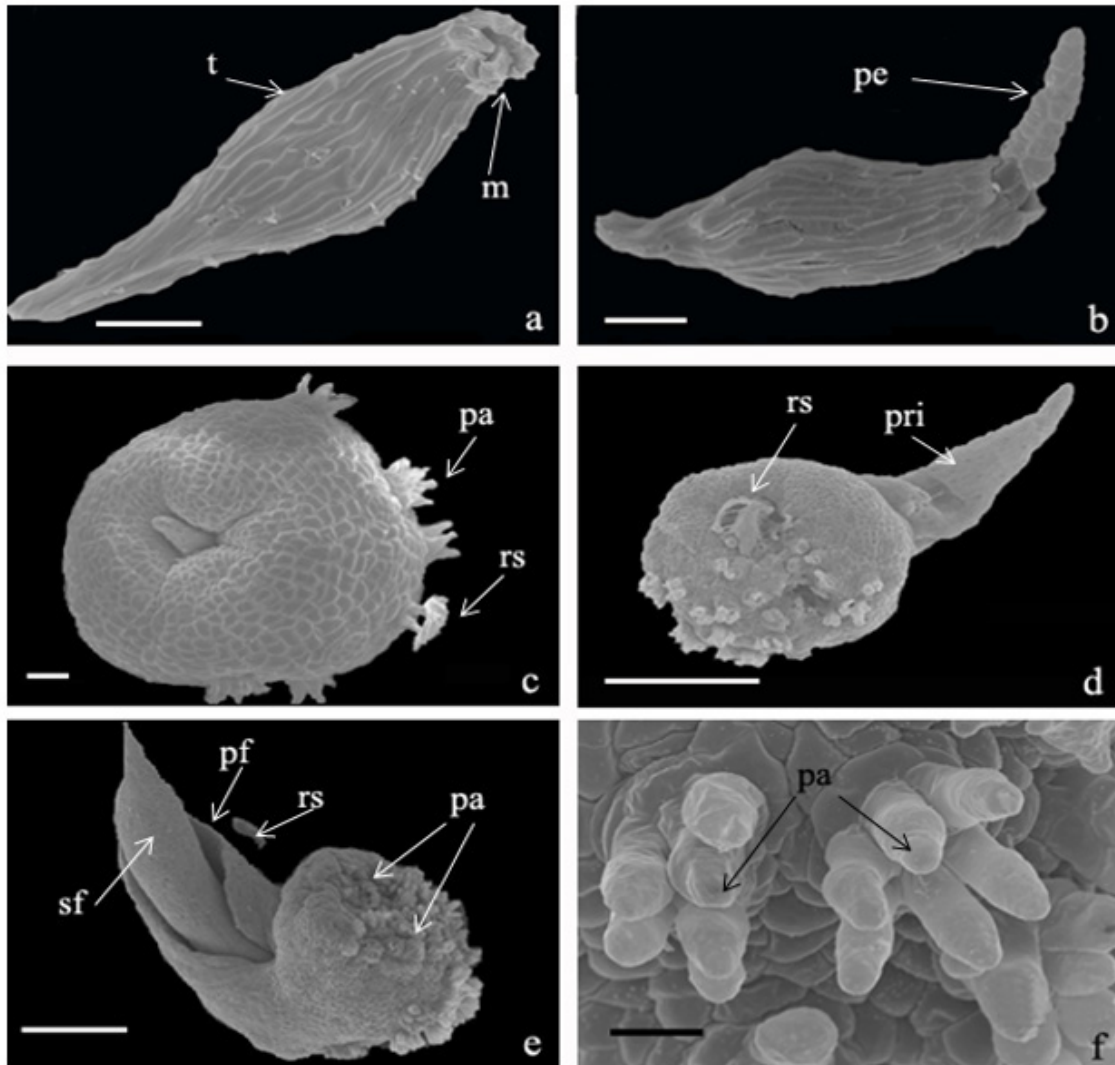
As sementes de *Cattleya walkeriana* são diminutas (com cerca de 250 µm) e apresentam uma testa reticulada (Figura 2a). Tais características são aspectos que podem ser encontrados na maioria das espécies de plantas dessa família (Arditti, 1992). A partir da primeira quinzena de cultivo, é verificada a protrusão do tecido do embrião das sementes pela

embebição de água e nutrientes e emersão por meio da ruptura do eixo da micrópila, a qual apresenta uma extremidade aberta (Figura 2b).

Iniciado o processo de germinação, o embrião de *Cattleya walkeriana* forma uma esférula a qual posteriormente configura o formato de uma estrutura cônica, observada entre 30-45 dias após a sementeira (Figura 2 c-d), tal estrutura tuberiforme é denominada

de protocormo e corresponde, em orquídeas, a plântula em desenvolvimento (Arditti, 1992; Kraus et al., 2006). Na base do protocormo ocorre a formação de papilas adsortivas ou rizóides, enquanto a parte superior (ponta micropilar do embrião) ocorre a formação do ápice vegetativo caulinar o qual continua a crescer.

Aos 60 dias após da sementeura verifica-se a formação de plântulas com dois folíolos e maior frequência de papilas adsortivas (Figura 2e). Conforme Chang et al (2005), estas estruturas se originam a partir de células individuais da superfície (Figura 2f).



**Figura 2.** Micrografias eletrônicas da germinação de *Cattleya walkeriana* *in vitro*. (a) Aspecto geral da morfologia externa da semente, barra = 50  $\mu$ m; (b) embrião em processo de germinação, 15 dias após sementeura (DAS), barra = 50  $\mu$ m; (c) protocormo em início de formação aos 30 DAS, barra = 100  $\mu$ m; (d) protocormo com 45 DAS, no qual é observado a aparência de um cone, barra = 500  $\mu$ m; (e) protocormo com 60 DAS e (f) detalhe dos rizóides, barra = 50  $\mu$ m. t – testa reticulada, m – eixo da micropila, pe – protusão do embrião, pri – primórdio foliar, rs – resquício da semente, pf - primeiro folíolo, pa – papilas adsortivas, sf – segundo folíolo.

Entre os diferentes meios nutritivos utilizados para o crescimento de *Cattleya walkeriana*, diferenças significativas foram observadas. Maiores valores para os parâmetros analisados foram verificados no meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS, enquanto os meios de cultura Vacin & Went e WPM apresentaram a menor eficiência para o crescimento *in vitro* de plântulas desta

orquídea (Tabela 2).

O meio de cultura MS é reconhecido na micropropagação de plantas e utilizado para uma série de explantes e diferentes culturas vegetais (Santos-Serejo et al., 2006) por ser bastante completo e enriquecido. Observa-se que a formulação  $\frac{1}{2}$  MS apresentou resultados significativamente maiores que a formulação

Phytamax® PP668, a qual também possui metade da concentração de sais macronutrientes MS, mas a concentração original de alguns dos micronutrientes MS e, segundo o fabricante, contém adição de reguladores vegetais. Tais distinções podem explicar a razão do desempenho diferente de *Cattleya walkeriana* nesse meio comercial em comparação com a formulação ½ MS.

Para o cultivo *in vitro* de orquídeas tropicais, diversas formulações nutritivas foram propostas e praticamente uma infinidade de modificações foram exploradas para o subcultivo e desenvolvimento de espécies de hábito terrestre ou epífita (Arditti et al., 1982). Por exemplo, para *Bletia purpurea* Lam. (Dutra et al., 2008) e *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & P. Castro (Suzuki et al., 2009), o meio Vacin & Went é o mais recomendado enquanto para *Laelia albida* o meio Knudson-C é mais utilizado (Santos-Hernández et al., 2005).

O meio de cultura MS é o mais adequado e mais comumente utilizado para a cultura *in*

*vitro* de plantas (Santos-Serejo et al., 2006; Costa et al., 2009). Foi formulado a partir da análise dos tecidos de tabaco e possui elevada quantidade de sais, em razão de sua quantidade de sais de K e N (Beyl, 2000). Para o cultivo *in vitro* de orquídeas, a redução pela metade da quantidade de sais macronutrientes da formulação MS foi benéfica para o crescimento de plântulas de *Cattleya walkeriana*. Assim como os resultados deste estudo, ½ MS proporcionou maior crescimento para *Cyrtopodium paranaense* Schltr. e *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. (Rego-Oliveira & Faria, 2005).

Tais aspectos serão úteis para a aclimatização destas plantas em casa de vegetação, etapa limitante para a propagação de plantas a partir de cultivo *in vitro* (Chandra et al., 2010). Dado ao fato de que a multiplicação de orquídeas é realizada com a utilização desta ferramenta, a produção de plantas melhor crescidas estarão mais bem preparadas para superar as condições limitantes dessa fase.

**Tabela 2.** Médias da altura da planta (AP, mm), número de folhas (NF), número de raízes (NR), largura da maior raiz (LR, mm), comprimento da maior raiz (CMR, mm) e massa de matéria fresca (MMF, mg) de *Cattleya walkeriana* após 90 dias de cultivo *in vitro*. Jaboticabal – SP, 2011

Tratamentos	AP (mm)	NF	NR	LR (mm)	CMR (mm)	MMF (mg)
1 – Vacin e Went	3,11c <sup>1</sup>	2,13b	1,63c	1,22c	25,3c	0,10d
2 – WPM	2,78c	2,15b	1,67c	1,18c	28,1c	0,11cd
3 – Knudson-C	4,41a	2,27b	1,92c	1,35b	31,2bc	0,14c
4 – Phytamax®	3,75b	2,28b	2,11b	1,23c	38,8b	0,16b
5 – ½ MS	4,31a	2,56a	2,42a	1,61a	48,6a	0,18a
Média	3,67	2,28	1,80	1,31	28,4	0,12
CV(%)	24,7	20,77	12,57	15,57	16,94	25,82

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas em cada coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### Agradecimentos

Ao CNPq pelas bolsas de pesquisa. Ao Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos pela assessoria no experimento de microscopia eletrônica de varredura.

### Referências

Arditti, J., Clements, M.A., Fast, G., Hadley, G., Nishimura, G. Ernst, R. 1982. Orchid seed germination and seedling culture – a manual. In: Arditti, J. (ed.) *Orchid Biology: reviews and perspectives*. v. 2. Cornell University Press: New York, p.243-370.

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA. 641 p.

Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, C.,

Salgado-Garciglia, R. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99: 335–343.

Barros, F. de, Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N. 2010. Orchidaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000179>>. Acesso: 26 set. 2012.

Barros, F. de, Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M. 2012. *Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB031789>>. Acesos em: 10 de out. 2012.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente (2008). Instrução normativa de setembro de 2008 – Lista

- oficial das espécies da flora ameaçada de extinção (anexo I) e lista oficial da flora brasileira com deficiência de dados. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 24 de setembro de 2008. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom\\_boletins/\\_arquivos/83\\_19092008034949.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf)>. Acesso em: 15 out. 2011.
- Beyl, C.A. Getting started with tissue culture-media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. 2000. In: Trigiano, R.N., Gray, D.J. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2. ed., Boca Raton: CRC Press LCC. p.21-38.
- Caldas, L.S., Haridasan, P., Ferreira, M.E. 1998. Meios Nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S., Buso, J.A. (ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa Cenargen: Brasília, v.1. p. 87-132.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32: 1199–1205.
- Chang, C., Chen, Y.C., Yen, H.F. 2005. Protocorm or rhizome? The morphology of seed germination in *Cymbidium dayanum* Reichb. *Botanical Bulletin Academy Sinici* 46: 71-74.
- Chugh, S.; Guha, S.; Rao, U. 2009. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulture* 122: 507-520.
- Costa, M.A.P.C., Pereira, M.J., Rocha, M.A., Hansen, D.S., Alves, R.M.O., Souza, E.H. & Garcia, F.R. 2009. Micropropagação de orquídeas. In: Junghans, T.G., Souza, A.S. *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. EMBRAPA MFT: Cruz das Almas v.1, pp.351-370.
- Dutra, D., Johnson, T.R., Kauth, P.J., Stewart, S.L., Kane, M.E., Richardson, L. 2008. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 94:11–21.
- Faria, R.T., Assis, A.M., Carvalho, J.F.R.P. 2010. *Cultivo de orquídeas*. Mecenas: Londrina 208p.
- Fundação Biodiversitas. 1997. Lista das espécies presumivelmente ameaçadas de extinção da flora do Estado de Minas Gerais. Disponível em <<http://www.biodiversitas.org.br/listasmg/MG-especies-presumivelmente-ameacadas.pdf>>. Acesso em 1 set. 2012.
- Krauss, J.E., Kerbauy, G.B., Monteiro, W.R. 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. *Hoehnea* 33: 177-184.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- Li, Z.Y., Xu, L. 2009. *In vitro* propagation of white-flower mutant of *Rhynchosstylis gigantea* (Lindl.) Ridl. through immature seed-derived protocorm-like bodies. *Journal of Horticulture and Forestry* 1: 93-97.
- Lloyd, G., Mccown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings* 30: 421-427.
- Menezes, L.C. 2011. *Cattleya walkeriana*. Ibama: Brasília, 273 p.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Rego-Oliveira, L.V., Faria, R.T. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum* 27: 1-5.
- Roy, A.R., Patel, V.V., Patel, S., Sajeev, B.C.D. 2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): an *in vitro* protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae* 128: 325–331.
- Santos, J. M. Dos, Silveira, A. 1999. A SEM improved technique for studying host-pathogen of *Meloidogyne* spp. *Acta Microscopica* 6: 562-563.
- Santos-Hernández, L., Martínez-García, M., Campos, J.E., Aguirre-León, E. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *HortiScience* 40: 439–442.
- Santos-Serejo, J.A., Junghans, T.G., Soares, T.L., Silva, K.M. 2006. Meios nutritivos para a micropropagação de plantas. In: Souza, A.S.; Junghans, T.G. (Ed.) *Introdução à micropropagação de plantas*. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: Cruz das Almas, pp.79-98.
- Ferreira, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039-1042.
- Stewart, S.L., Kane, M.E. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae) a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86: 147-158.
- Suzuki, R.M., Moreira, V.C., Nakabashi, M., Ferreira, W.M. 2009. 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* 36: 657-666.

Vacin, E.F., Went, F.W. 1949. Some pH in nutrient solutions. *Botanical Gazette* 110: 605-617.

Veiret, Y. 1974. Development of the embryo and the young seedling stages of orchids. In: Withner, C.L. (ed.) *The orchids: scientific studies*. J. Wiley & Sons: New York. USA. pp.223-266.