



CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Schomburgkia crispa* Lindley EM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DE *Salvia hispanica* L.

K. C. C ASSIS^{1*}, C. M. S. GUARDABAXO², M. C. L. M. BEGUELINE¹, B. N. REZENDE¹, L. F. SILVA¹, A. L. R. MACIEL²

¹ Faculdade de Ciências Agronômicas Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – FCA/Unesp, Botucatu-SP, Brasil

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas – IFSULDEMINAS, Muzambinho-MG, Brasil

Article history: Received 18 August 2020; Received in revised form 17 November 2020; Accepted 18 November 2020; Available online 30 December 2020.

RESUMO

O uso de meios de cultura alternativos para o cultivo *in vitro* de plantas está sendo cada vez mais utilizado para atender as necessidades nutricionais diminuindo os custos de produção. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência das concentrações dos sais do meio de cultura MS e do extrato de chia no crescimento *in vitro* de plântulas de *Shamburquia crispa* Lindley. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado - DIC, em esquema fatorial 5x5, sendo os tratamentos compostos por diferentes concentrações de sais do meio de cultura MS (0, 25, 50, 75 e 100%) e concentrações do extrato de chia (0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g L⁻¹), com quatro repetições e quatro plântulas por parcela. Os dados foram submetidos à análise de variância e para a comparação das médias dos tratamentos, foi realizado o teste Scott Knott a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR 5.3. Decorridos 90 dias da instalação, foram analisados: taxa de sobrevivência (%), número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz e comprimento da parte aérea. A redução dos sais do meio de cultura MS (0, 25 e 50%) associada à adição do extrato de chia (10,5 e 14 g L⁻¹) promovem maior crescimento e desenvolvimento de explantes de *Schomburgkia crispa* Lindley cultivadas *in vitro*.

Palavras chaves: Explantes. Meio de cultura. Orquídeas.

GROWTH *IN VITRO* OF *Schomburgkia crispa* Lindley IN THE INCREASED CULTURE OF *Salvia hispanica* L.

ABSTRACT

The use of alternative culture media for the *in vitro* cultivation of plants is being increasingly used to meet nutritional needs, reducing production costs. In this context, the present work aimed to evaluate the influence of the concentrations of salts of the MS culture medium and of the chia extract on the *in vitro* growth of seedlings of *Shamburquia crispa* Lindley. The experimental design used was completely randomized - DIC, in a 5x5 factorial scheme, with the treatments being composed of

* k.assis@unesp.br

different concentrations of salts of the MS culture medium (0, 25, 50, 75 and 100%) and concentrations of chia extract (0, 3.5, 7.0, 10.5 and 14.0 g L⁻¹), with four replications and four seedlings per plot. The data were submitted to analysis of variance and, to compare the treatment means, the Scott Knott test was performed at 5% significance. All analyzes were performed with the aid of the SISVAR 5.3 program. After 90 days of installation, the following were analyzed: survival rate (%), number of leaves, number of roots, length of the largest root and length of the aerial part. The reduction in salts of the MS culture medium (0, 25 and 50%) associated with the addition of chia extract (10.5 and 14 g L⁻¹) promotes greater growth and development of *Schomburgkia crispa* Lindley explants grown in vitro.

Keywords: Culture medium. Explants. Orchids.

INTRODUÇÃO

As orquídeas destacam-se como importantes plantas ornamentais, de grande interesse botânico e econômico, em função da beleza e exuberância de suas flores (SHEEHAN, 1992; CHUGH; GUHA; RAO, 2009). O elevado número de espécies e híbridos tropicais possibilita variadas formas, cores e flores, exploradas comercialmente em todo o mundo (HSU, 2003).

O gênero *Schomburgkia* é composto por aproximadamente dezoito espécies epífitas encontradas na região tropical da América e Oeste Asiático (JONES; WOLF; MILLS, 1991; OSTETTO, 2015). A espécie *Schomburgkia crispa* Lindley é encontrada em matas de galeria e matas secas do cerrado brasileiro (MENDONÇA et al., 1998). A *S. crispa* encontra-se na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção dentro da família Orchidaceae (CNCFlora, 2017).

A propagação realizada em condições naturais das orquídeas é dificultada devido à falta de endosperma e tamanho diminuto da semente, bem como baixíssimos teores de lipídios e proteínas a serem consumidos no processo de germinação. (FERREIRA; LIMA; PANSARIN, 2010). Na natureza, a germinação é dependente de associação simbiótica entre as sementes de orquídeas com fungos micorrízicos (BOLDRINI et al., 2010).

O cultivo de sementes *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica que permite elevar a

taxa de germinação, tornando a propagação de orquídeas comercialmente viável, contribuindo para a preservação de espécies em extinção e a multiplicação de grande número de plantas de elevada qualidade em curto espaço de tempo (GIMENES, 2013).

Os fatores que frequentemente determinam o sucesso do cultivo *in vitro* são a origem do explante e o meio nutritivo onde são cultivados. A formulação do meio de cultura é essencial para a planta, podendo ser formulado com diferentes combinações de acordo com as necessidades de cada espécie (FARIA et al., 2002; SILVA et al., 2015).

Os meios mais utilizados para o cultivo *in vitro* são o Knudson (1946), o Vacin e Went (1949) e o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sendo que cada meio específico é identificado pela composição e concentração de sais minerais, vitaminas, reguladores de crescimento e outros suplementos orgânicos (VENTURA et al., 2002). Segundo Schneiders et al. (2012), o meio de propagação utilizado para *Cattleya*, *Laelia*, *Laeliocattleya* e *Brassocattleya* pode ser o Knudson e ½ MS.

Para redução dos custos, estudos com produtos orgânicos (água de coco, polpa de banana, extrato de cenoura, entre outros) adicionados aos meios de cultura convencionais são realizados com diversas espécies vegetais (SOARES et al., 2013).

A Chia (*Salvia hispanica*) é uma planta nativa da Guatemala e região sul do México, cultivada nas Américas do Sul e Central, cuja semente é fonte de antioxidantes naturais e ácidos graxos essenciais. Sua semente contém de 25% a 40% de óleo, sendo 60% deste composto de ácido α -linolênico (ω -3), e 20% de ácido linoleico (ω -6). Estes ácidos graxos são precursores da síntese de ácidos graxos poli-insaturados, fundamentais para a manutenção das funções celulares normais, além de ácidos graxos essenciais, a semente de chia contém compostos fenólicos, que atividades antioxidante, anti-inflamatórias, antitrombóticas e anti-tumorais. Na indústria a

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS) Campus Muzambinho no período de março a junho de 2018.

Como material propagativo foram utilizados explantes de 2 cm. Os explantes utilizados possuíam 8 meses e se desenvolveram a partir da semeadura *in vitro* de sementes de *S. crisper* em meio de cultura MS em julho de 2017. As sementes utilizadas na produção dos explantes foram provenientes de cápsulas coletadas em plantas maduras através de polinização natural no Setor de Jardinagem da mesma instituição.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado - DIC, em esquema fatorial 5x5, sendo os tratamentos compostos por diferentes concentrações dos sais do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962): 0, 25, 50, 75 e 100% e concentrações do extrato de chia (0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g L⁻¹), com quatro repetições e quatro plântulas por parcela que foram inoculadas em frascos 250cm³ com 50mL de meio de cultura, de acordo com os tratamentos.

produção de óleo de chia é feita através de prensagem das sementes a frio, este processo gera como resíduo a torta de chia, utilizada na fabricação de farinha de chia e ração animal, sendo estes, produtos de baixo valor agregado. A extração de compostos de interesse da torta de chia possibilita a valorização biológica e nutricional deste subproduto (GUINDANI; MEZZOMO; FERREIRA, 2014).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência das concentrações dos sais do meio de cultura MS e do extrato de chia no crescimento *in vitro* de plântulas de *S. crisper*.

A chia foi triturada em moinho de facas e adicionada ao meio de cultura acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 \pm 0,1 antes da adição do ágar e, em seguida, o meio foi esterilizado a 120 °C e 1,5 atmosferas de pressão, durante 20 minutos.

A inoculação das plântulas foi realizada em câmara de fluxo laminar, em seguida, os frascos contendo os explantes foram mantidos em câmara tipo B.O.D. (CE-300/350-AU - Marca: CIENLAB) com irradiância de 35 mmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, temperatura de 25 \pm 2°C e fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro).

Decorridos 90 dias da instalação, foram analisados: taxa de sobrevivência (%), número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz e comprimento da parte aérea. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com o emprego do Software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011), sendo a diferença significativa entre tratamentos determinada pelo teste F. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de folhas em explantes de *S. crispera* aumentou com a adição do extrato de chia (3,5; 7,0; 10,5 e 14 g L⁻¹) nas concentrações de 0, 25 e 50% dos sais do meio MS. No entanto, nas concentrações de 75 e 100% dos sais do meio MS, pôde-se observar que as maiores concentrações do extrato de chia (10,5 e 14 g L⁻¹) promoveram um decréscimo significativo no número de folhas (Tabela 1).

Com o incremento da chia, mesmo em pequenas concentrações ocorre acréscimo no teor de sais, vitaminas e reguladores no meio de cultura promovendo desenvolvimento da parte aérea. Afirmação é corroborada por Soares et al. (2013) que também observaram que o incremento de sais minerais, juntamente com uma dose de hormônios de crescimento, proporcionou um aumento no número de folhas em *Cattleya*. No entanto quando o meio já possuía grande concentrações de sais oriundos da formulação MS o incremento atingiu níveis

tóxicos devido à alta concentração de sais devido ao antagonismo entre os nutrientes nessa condição, ou seja, um nutriente em excesso pode ter acentuado ou induzido a deficiência de outro.

Os explantes que foram inoculados em meio MS com 50% dos sais com a adição de extrato de chia nas concentrações de 10,5 e 14 g L⁻¹ apresentaram maior altura de plantas (Tabela 1).

O potencial da chia nas maiores concentrações está correlacionado as concentrações intermediárias do meio MS. O potencial de meios alternativos para incremento em altura também foi evidenciado por Brahn et al. (2006), em orquídeas do gênero *Schomburgkia* sp. obtiveram resultados satisfatórios ao utilizar meio simplificado com 60 g L⁻¹ de tomate e 60 g L⁻¹ de polpa de banana, proporcionando aumento da altura da parte aérea.

Tabela 1. Número de folhas, altura de planta, número de raízes, número de pseudobulbos, comprimento > raiz e sobrevivência de explantes de *Schomburgkia crisa* Lindley em diferentes concentrações de sais do meio MS e extrato de chia. (Muzambinho, 2018).

Sais MS (%)	Extrato de chia (g L ⁻¹)									
	0	3,5	7	10,5	14	0	3,5	7	10,5	14
	Número de folhas					Altura de planta (cm)				
0	2,68 Bb	3,81 Ab	5,12 Aa	5,81 Aa	6,25 Aa	1,09 Ab	0,87 Ab	1,36 Aa	1,21 Aa	1,45 Aa
25	3,13 Bc	3,12 Ac	5,12 Ac	6,37 Ab	9,12 Aa	1,08 Aa	0,92 Aa	1,18 Aa	0,99 Aa	1,41 Aa
50	4,06 Bb	4,25 Ab	4,31 Ab	6,12 Aa	6,62 Aa	0,93 Ab	0,78 Ab	1,05 Ab	1,40 Aa	1,46 Aa
75	6,56 Aa	5,37 Aa	2,81 Ab	3,62 Bb	3,56 Cb	1,09 Aa	1,26 Aa	0,26 Bb	1,16 Aa	1,28 Aa
100	5,62 Aa	4,50 Ab	4,25 Ab	3,43 Bb	1,37 Cb	1,01 Aa	1,05 Aa	0,96 Aa	1,11 Aa	0,15 Bb
CV(%)	51,27					48,3				

Sais MS (%)	Extrato de chia (g L ⁻¹)									
	0	3,5	7	10,5	14	0	3,5	7	10,5	14
	Número de raízes					Número de pseudobulbos				
0	5,37 Aa	2,81 Ab	4,00 Ab	3,68 Ab	3,56 Ab	3,37 Aa	1,50 Bb	2,06 Ab	2,31 Ab	2,00 Ab
25	5,00 Aa	3,12 Ab	3,31 Ab	3,43 Ab	3,93 Aa	2,43 Ba	2,18 Ba	2,62 Aa	2,43 Aa	3,18 Aa
50	3,06 Bb	2,93 Ab	3,00 Ab	4,31 Aa	5,50 Aa	2,18 Ba	1,50 Bb	1,81 Aa	2,37 Aa	2,75 Aa
75	3,37 Ba	3,25 Aa	2,31 Ba	3,00 Aa	4,25 Aa	2,37 Bb	3,31 Aa	1,43 Ab	1,87 Ab	2,31 Ab
100	2,37 Ba	2,62 Aa	1,68 Ba	2,00 Ba	0,25 Bb	1,62 Ba	1,81 Ba	1,87 Aa	1,68 Aa	0,43 Bb
CV(%)	52,06					56,32				

Sais MS (%)	Extrato de chia (g L ⁻¹)									
	0	3,5	7	10,5	14	0	3,5	7	10,5	14
	Comprimento > raiz (cm)					Sobrevivência (%)				
0	1,46 Aa	0,55 Ac	0,98 Ab	0,83 Ab	1,35 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
25	1,10 Ba	0,64 Ab	1,01 Aa	0,89 Aa	0,85 Ba	100 Aa	87 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
50	0,61 Ca	0,53 Ab	0,49 Bb	0,77 Aa	0,88 Ba	85 Aa	93 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
75	0,51 Cb	0,70 Ab	0,56 Bb	0,58 Bb	0,91 Ba	87 Aa	100 Aa	87 Aa	87 Aa	93 Aa
100	0,61 Ca	0,63Aa	0,46 Ba	0,55 Ba	0,13 Cb	100 Aa	100 Aa	87 Aa	87 Aa	13 Bb
CV(%)	52,04					14,51				

(*) Médias seguida pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferiram entre si pelo Teste Scott Knott ao nível de 0,05 de significância

As maiores médias para o número de pseudobulbos, foram observadas com a ausência de sais do meio MS e de extrato de chia, ou seja, o tratamento considerado testemunha e na concentração de 75% de sais e 3,5 g L⁻¹ extrato de chia. Os menores valores foram encontrados para aqueles tratamentos onde foram combinadas altas concentrações de sais e altas concentrações de chia evidenciando o efeito antagônico devido a salinidade.

Embora o meio MS favoreça o crescimento e desenvolvimento de várias espécies vegetais, a utilização de composições

mais diluídas, como o meio DSD1 e 1/2MS (GALDIANO JUNIOR et al., 2013), para algumas espécies de orquídeas e alguns híbridos de *Cattleya*, tem apresentado melhores resultados (AKTAR; NASIRUDDIN; HOSSAIN, 2008).

Para o comprimento do sistema radicular, os tratamentos correspondentes à ausência de chia e às concentrações de 7,0; 10,5 e 14,5 g L⁻¹ apresentaram resultados satisfatórios quando combinados ao meio de cultura MS com 0, 25 e 50% dos sais (Tabela 1). No entanto, pôde-se observar que os menores valores para esta

variável foram obtidos nas porcentagens mais elevadas dos sais do meio de cultura MS, independente da adição das diferentes concentrações de extrato de chia (Tabela 1).

Resultados semelhantes foram obtidos por Thorpe et al. (2008), que determinaram que meios que contêm altos níveis de sais, frequentemente inibem a iniciação de raízes e devem ser substituídos por meios que contêm baixos níveis, como o MS ½, quando o objetivo for o enraizamento. Araújo et al (2006), trabalhando com crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea observou que o aumento das concentrações de polpa de frutas influencia positivamente na formação do sistema radicular raízes.

Na Tabela 1, observa-se que os maiores valores para a variável comprimento da maior raiz, foram obtidos nas concentrações de extrato de chia a 0, 7, 10,5 e 14 g L⁻¹ adicionados ao meio de cultura MS nas porcentagens de 0, 25 e 50% de sais. Semelhantes aos resultados apresentados para a variável número de raízes, os menores valores apresentados para o comprimento da maior raiz foram observados com porcentagens mais elevadas dos sais do meio de cultura.

Segundo Cid (2014) existe um stress causado às plantas cultivadas *in vitro* quando existe níveis não adequados de água e de nutrientes no meio de cultura. A proliferação e aumento das raízes parece ser uma resposta adaptativa da planta para procura dos mesmos.

Diversos trabalhos vêm sendo realizados visando a otimização de protocolos de micropropagação de orquídeas. Pereira (2016) trabalhando com a cultivar *Epidendrum flexuosum* com meio de cultura Knudson

CONCLUSÕES

A redução dos sais do meio de cultura MS (0, 25 e 50%) associada à adição do extrato de chia (10,5 e 14 g L⁻¹) promovem maior

suplementado com polpa de banana obteve resultados favoráveis nos parâmetros relacionados ao crescimento da parte aérea das plântulas.

O meio de cultura MS é reconhecidamente um meio muito rico em macronutrientes, micronutrientes e vitaminas (DEZAN et al., 2012), no entanto, as exigências nutricionais são bastante específicas, variando grandemente entre as diferentes espécies. O suprimento inadequado de um elemento essencial (excesso ou deficiência) pode resultar em prejuízos para o desenvolvimento vegetal. O excesso de nutrientes, por exemplo, pode provocar danos por salinidade, ou seja, ocorre um desequilíbrio osmótico que afeta negativamente a absorção de água pelas raízes

As orquídeas apresentam bastante adaptabilidade a meios de cultura alternativos, Soares, Ribeiro e Sorgato (2017) utilizando meio de cultura proposto por Campos (2002), modificado por adição de 70 g L⁻¹ de tomate tipo italiano sem sementes e casca, 50 g L⁻¹ de banana nanica sem casca, 3 mL L⁻¹ de fertilizante NPK 10-10-10, 7 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, 25 g L⁻¹ de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁), 150 mL L⁻¹ de água de coco, 3 g L⁻¹ de carvão ativado obtiveram germinação de 70% das sementes e desenvolvimento inicial acentuado na espécie *Dendrobium nobile* Lind.

Os meios de cultura comerciais apresentam valores extensivamente caros. O uso de compostos orgânicos e a redução dos sais em meios de cultura podem ser técnicas viáveis para o crescimento e o desenvolvimento de orquídeas pela simplicidade de utilização, pela disponibilidade dos produtos e pelo baixo custo final (SU; RIBEIRO; FARIA, 2012).

crescimento e desenvolvimento de explantes de *Schomburgkia crispa* Lindley cultivadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTAR, S.; NASIRUDDIN, K.M.; HOSSAIN, K. Effects of Different Media and Organic Additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium* Orchid. **Journal of Agriculture & Rural Development**. v.6, p.69-74, 2008.
- ARAÚJO, A. G; PASQUAL, M.; VILLA, F; COSTA, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídeas. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v.53, n.310, p.608- 613, 2006.
- BOLDRINI, R.F., SANTOS, W.O., CRUZ, Z.M.A, RAMOS, A.C. Bases da associação micorrízica orquidoide. **Natureza on line**, v.8, n.3, p.140-145, 2010.
- BRAHM, R. Ü.; GOMES, J. C. C.; BOSENBEC- -KER, V. K. Meios de cultura alternativos para o crescimento e desenvolvimento de orquídeas *in vitro*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v.1, n.1, p. 1.623-1.626, 2006.
- CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. 3 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325p.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, U. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulture**, v.122, n.4, p.507-520, 2009
- CNCFlora. Centro Nacional de Conservação da Flora. Lista Vermelha. 2017. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal>>. Acesso em 10 nov. 2020.
- CUNHA, T; CORDEIRO, G. M; MASSARO, R; DEZAN, L. F; PEDROSO-DEMORAES, C. Desenvolvimento in vitro de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, v.7, n.1, p.1-5, 2011.
- DEZAN, L. F.; CANASSA, F.; SOUZA-LEAL, T.; DIOGO, J. A.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G. M.; PEDROSO-DEMORAES, C. Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificado. **Idesia**, v.30, n.2, p.53-58, 2012.
- FARIA, R.T.; SANTIAGO, D.C.; SARIDAKIS, D.P.; ALBINO, U.B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using in vitro propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.2, n.3, p.489-492, 2002.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; PANSARIN, E. R. Orchidaceae na região central de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v.61, p.243-259, 2010.
- GALDINO JÚNIOR, R.F; MANTOVANI, C; CASSANO, O. A; LEMOS, M. G. E. Desenvolvimento inicial e crescimento in vitro de *Cattleya violaceae* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, v.43, n.2, p.127-134, 2013.
- GIMENES, R. **Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento de *Zygopetalum crinitum* Lodd. e *Cattleya schilleriana* Rchb.f. (Orchidaceae) durante as fases *in vitro* e de aclimatização**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal. 2013.
- GUINDANI, C.; MEZZOMO, N.; FERREIRA, S.R.S. Extrato de torta de chia (*Salvia hispanica*) obtido por diferentes métodos de extração. **XX Congresso Brasileiro de**

Engenharia Química, Florianópolis, SC, 19 a 22 de Outubro de 2014.

HSU, C.C. **Protocorm-like body induction and plant regeneration from etiolated leaves of in vitro Phalaenopsis**. 2003. 88 p. Tese (Doutorado em Agricultura) - Institute of Tropical Agriculture and Intl Cooperation, University of Science & Technology, Pingtung, 2003

JONES JUNIOR, JB; WOLF, B; MILLS, HA. **Plant analysis handbook: a practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide**. Atenas: Micro-Macro Publishing, 1991, 213p

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

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds), **Cerrado: ambiente e flora**. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, Brasília. p. 289-556, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Scandinávia, v.15, p.495-497, 1962.

OSTETTO, S. **Orquídeas de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: Alvorada. 2015. 141 p.

PEREIRA, E. C. **Crescimento in vitro de orquídea (Epidendrum flexuosum) em meio Knudson visando a micropropagação**. 2016. 15 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Bacharelado em Ciências Biológicas.) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2016.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 2, p. 185- 191, 2012.

SHEEHAN, T. J. Orchids. In: LARSON, R.A. (Ed.). **Introduction to floriculture**. San Diego: Academic Press, 1992, 246p.

SHERLOCK, E. M. **Propagação in vitro de Encyclia alboxanthina fowlie (Orchidaceae): espécie endêmica da Chapada Diamantina-Bahia**. 2009, 84f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Feira de Santana, Feira de Santana.

SILVA, A. L. L. Avaliação de uma receita para o cultivo de orquídeas *in vitro*. **Orquidário**, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p. 28-30, 2003.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P.Q.; ROSA, JUNIOR. E. J. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, Dourados, MG, v. 31, n. 1, p.63-67, jan. - mar. 2013.

SOARES, J. S; RIBEIRO L. M; SORGATO, J. C. Germinação e crescimento in vitro de *Dendrobium nobile* Lindl. sem subcultivo em meio de cultura alternativo. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 11, n. 4, p. 365-372, 2017.

SILVA, J. A. T.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*. **Plant cell reports**, v. 34, n.10 p.1685-1706, 2015.

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

THORPE, T; STASOUA, C; YEUNG, E. C;
KLERK, G. J. D; ROBERTS, A; GEORGE, E.
F. The components of plant tissue culture media
II: organic additions, osmotic and pH effects
and support systems. In: GEORGE, E.F. **Plant
propagation by tissue culture.** 3.ed.
Netherland: Springer, 2008. v.1, 501p.

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

VENTURA G. M.; DIAS, J. M. M.;
TEIXEIRA, L. S.; CARVALHOS, S. V.;
MOTOIKE, Y. S.; NOVAIS, F. R.; CECON, R.
P. Organogênese in vitro a partir de gemas
apicais e axilares de plantas adultas de
orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**,
v.47, p.613-628, 2002.