

Morfogênese *in vitro* de plântulas de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) em diferentes concentrações de meio de cultura basal

In vitro morphogenesis of *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) seedlings in different concentrations of basal culture medium

Morfogénesis *in vitro* de plântulas de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) en diferentes concentraciones de medio de cultivo basal

Recebido: 10/10/2023 | Revisado: 22/10/2023 | Aceitado: 23/10/2023 | Publicado: 25/10/2023

Francielle Kern de Moraes

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-3501-6884>
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
E-mail: franciellekormoraes@gmail.com

Dara Damiana de Souza Guanais

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6935-2958>
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
E-mail: gunais.agronomiaufsc@gmail.com

Paulo Cesar Poeta Fermino Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5334-9834>
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
E-mail: paulo.fermino@ufsc.br

Resumo

Cattleya intermedia Graham ex Hook consiste numa orquídea nativa brasileira do sul da Mata Atlântica com interesse econômico de planta ornamental. A cultura de tecidos vegetais possibilita a produção de orquídeas em larga escala, visando a comercialização e a conservação das espécies. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de meio de cultura basal MS no crescimento inicial *in vitro* da parte aérea e radicular de plântulas de *C. intermedia*, visando sua propagação como estratégia para uso em biofábricas de plantas. Plântulas germinadas *in vitro* foram submetidas ao crescimento e desenvolvimento em meio de cultura Murashige & Skoog nas diferentes concentrações salinas de 100%, 50% e 25%). O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições para cada tratamento, seguidos de análise de variância e teste SNK. O uso de meio de cultura basal MS na concentração integral em cultivo de *C. intermedia* favorece a maior sobrevivência das plântulas, o maior percentual e número de brotações regeneradas. Para o enraizamento adventício de plântulas no cultivo *in vitro*, o uso de meio de cultura basal diluído à 25% favorece o percentual de enraizamento e o comprimento médio das raízes.

Palavras-chave: Concentrações salinas; Crescimento *in vitro*; Enraizamento *in vitro*; Multiplicação *in vitro*; Propagação *in vitro*.

Abstract

Cattleya intermedia Graham ex Hook is a native Brazilian orchid from the south of the Atlantic Forest with economic interest as an ornamental plant. Plant tissue culture makes it possible to produce orchids on a large scale, with a view to marketing and conserving the species. The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of MS basal culture medium on the initial *in vitro* growth of the aerial and root parts of *C. intermedia* seedlings, with a view to propagating them as a strategy for use in plant biofactories. Seedlings *in vitro* germinated were subjected to growth and development in Murashige & Skoog culture medium at different salt concentrations (100%, 50% and 25%). The experiment was organized in a completely randomized design, with ten replicates for each treatment, followed by analysis of variance and the SNK test. The use of MS basal culture medium at full concentration in *C. intermedia* cultivation favors greater seedling survival and a higher percentage and number of regenerated shoots. For the adventitious rooting of seedlings *in vitro* cultivation, the use of basal culture medium diluted to 25% favors the percentage of rooting and the average length of the roots.

Keywords: Salt concentrations; *In vitro* growth; *In vitro* rooting; *In vitro* multiplication; *In vitro* propagation.

Resumen

Cattleya intermedia Graham ex Hook es una orquídea nativa brasileña del sur de la selva atlántica con interés económico como planta ornamental. El cultivo de tejidos vegetales permite producir orquídeas a gran escala, con vistas a la comercialización y conservación de la especie. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de

diferentes concentraciones de medio de cultivo basal MS sobre el crecimiento inicial *in vitro* de las partes aéreas y radiculares de plántulas de *C. intermedia*, con vistas a su propagación como estrategia para su uso en biofactorías vegetales. Las plántulas germinadas *in vitro* fueron sometidas a crecimiento y desarrollo en medio de cultivo Murashige & Skoog a diferentes concentraciones de sal (100%, 50% y 25%). El experimento se organizó en un diseño completamente aleatorizado, con diez repeticiones para cada tratamiento, seguido de un análisis de la varianza y de la prueba SNK. El uso del medio de cultivo basal MS a plena concentración en el cultivo de *C. intermedia* favorece una mayor supervivencia de las plántulas y un mayor porcentaje y número de brotes regenerados. Para el enraizamiento adventicio de plántulas en cultivo *in vitro*, el uso de medio de cultivo basal diluido al 25% favorece el porcentaje de enraizamiento y la longitud media de las raíces.

Palabras clave: Concentraciones salinas; Crecimiento *in vitro*; Enraizamiento *in vitro*; Multiplicación *in vitro*; Propagación *in vitro*.

1. Introdução

A espécie *Cattleya intermedia* é uma orquídea endêmica do Brasil, com ocorrência no bioma da Floresta Atlântica, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (Flora e Fauna do Brasil, 2023). É uma planta que apresenta fácil cultivo, rusticidade e tolerância a baixas temperaturas, além de possuir uma grande variedade de cores das suas pétalas, que vai desde o branco até rosa (Endres-Junior et al., 2015). A espécie vem sofrendo intensas atividades de extração por consequência de seu elevado valor ornamental, provocando declínio de suas populações naturais (Endres-Junior et al., 2015). Recentemente, *C. intermedia* está inserida na lista de espécies ameaçadas da flora do estado do Rio Grande do Sul (Rio Grande do Sul, 2014) e na categoria vulnerável da lista vermelha da flora do Brasil (Menine Neto et al., 2013). No mercado nacional de orquídeas, *C. intermedia* tem bastante procura nos orquidários produtores do sul do Brasil.

As orquídeas são conhecidas por apresentar sementes com minúsculo tamanho, de acordo com as espécies, o tamanho das sementes varia entre 0,05 a 6 mm e seu peso de 0,24 a 0,31 µg. Uma única cápsula pode conter de 20 a 4 milhões de sementes em seu interior (Arditti & Ghani, 2000). Os mesmos autores informam que as sementes de orquídeas detêm algumas limitações que estão relacionadas ao processo germinativo, como exemplo a espessura da parede das células do tegumento e a quantidade insuficiente de endosperma presentes no embrião. Adicionalmente estas sementes podem germinar sem estar em associação com fungos, sendo cultivadas em meio de cultura com nutrientes minerais, carboidratos e outros compostos orgânicos, sendo chamado de cultivo assimbiótico ou sementeira *in vitro* (Johnson et al., 2012).

A germinação de sementes de orquídeas *in vitro* vem sendo realizada desde o início do século passado, quando Knudson em 1922 descreveu a germinação em meio de cultura asséptico (Arditti, 2008). Os meios nutritivos usados fornecem substâncias essenciais para o crescimento das plantas. Para as orquídeas os meios nutritivos mais empregados são o MS e o Knudson, que promovem rapidez e uniformidade na obtenção de plântulas (Arditti, 2008). Como na natureza a taxa de germinação de sementes é baixa e o desenvolvimento das plântulas é considerado lento, o cultivo *in vitro* possibilita eficiência e uniformidade para o crescimento de plântulas (Abrão et al., 2014).

O desenvolvimento de protocolos para o crescimento inicial *in vitro* de orquídeas tem sido obtido com a avaliação de diferentes composições salinas, incluindo diferentes meios de cultivo e concentrações dos mesmos visando a conservação da espécie e a utilização em biofábricas de plantas (Araujo et al., 2009; Suzuki et al., 2010; Juras et al., 2019; Ferreira et al., 2022). Geralmente, o nitrato é a forma de nitrogênio mais facilmente absorvida pelas plantas, embora isso possa variar entre as espécies e pode ser influenciado por fatores ambientais (Mengel & Kirkby, 1978). De acordo com Malavolta et al. (1997), o teor de clorofila presente tecidos vegetais indica o nível de nitrogênio absorvido. O nitrogênio é fundamental para o crescimento das plantas e qualquer deficiência afeta absorção de luz durante a fotossíntese, influenciando negativamente o desenvolvimento das plantas (Araujo et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de meio de cultura basal MS (Murashige & Skoog, 1962) no crescimento inicial *in vitro* da parte aérea e radicular de plântulas de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook, visando sua propagação como estratégia para uso em biofábricas de plantas.

2. Metodologia

Cápsulas maduras de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook foram coletadas no orquidário da empresa de biotecnologia “Cultivar Orquídeas in vitro”, localizada em Arealva-SP e cedidas para o estudo. No Laboratório, as cápsulas foram lavadas em água corrente com adição de duas gotas de detergente neutro, desinfetadas por 2 min em solução de etanol 70%, seguida por 15 min em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo), e finalmente por tríplice lavagem em água destilada esterilizada em câmara de fluxo laminar (Fermino Junior et al., 2021).

Após a desinfecção, as cápsulas foram excisadas, as sementes foram removidas manualmente com auxílio de pinça e inoculadas em meio de cultura com sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962 – Sigma-Aldrich®), sem regulador de crescimento vegetal, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de Agar Vetec® para a germinação *in vitro*.

Aos sessenta dias, os protocormos desenvolvidos com duas folhas (Figura 1a), conforme classificação de Stewart e Zettler (2002) foram inoculados em meio de cultivo para crescimento *in vitro*, composto por sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962 – Sigma-Aldrich®) nas concentrações 100%, 50% e 25% da formulação original, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, e 6 g.L⁻¹ de Agar Vetec®.

Ao cento e cinquenta dias de cultivo, os parâmetros morfogênicos avaliados foram o percentual de sobrevivência, percentual de calogênese, percentual de brotações adventícias, número de brotos regenerados, altura dos brotos, número de folhas, percentual de enraizamento, número de raízes adventícias e comprimento das raízes. Os cultivos *in vitro* foram realizados em frascos de vidro transparente contendo 20 mL de meio de cultivo e fechados com tampa convencional. Os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20min a 1,06 kg cm⁻². Os frascos de cultura foram incubados em sala de crescimento a 25 ±2 °C, 16 h de luz e 8h de escuro, com lâmpadas brancas fluorescentes de fluxo de fótons de 50 μmol m⁻² s⁻¹ (Fermino Junior et al., 2021).

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições para cada tratamento, sendo cada unidade amostral composta por um frasco contendo dez protocormos. Os resultados foram submetidos análise da variância (ANOVA) com aplicação do teste F e as médias quando significativas estatisticamente, comparadas pelo teste SNK a 5% de probabilidade, usando o software estatístico SISVAR 5.6 (Ferreira, 2011). As variáveis discretas provenientes de contagem (número) foram transformadas por $(x + 0,5)^{1/2}$, onde x é o percentual ou o valor obtido de cada variável.

3. Resultados e Discussão

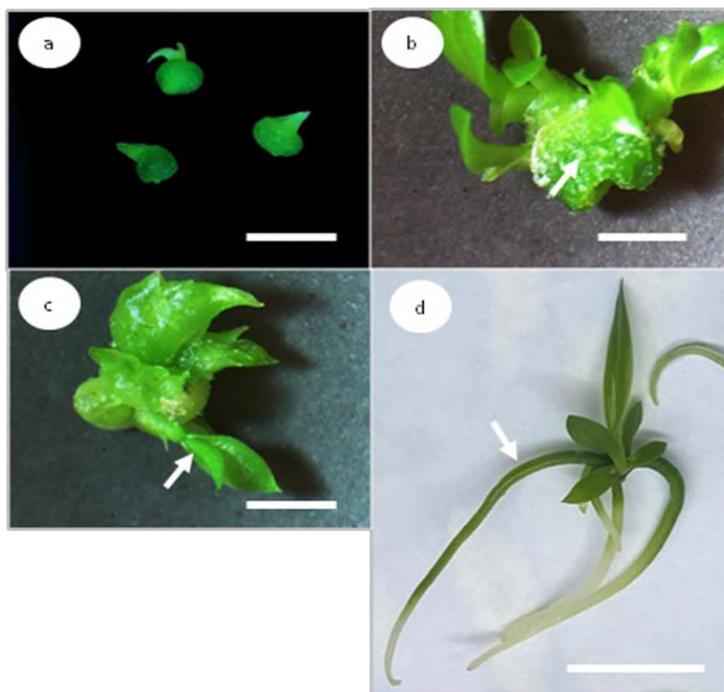
O uso de diferentes concentrações de sais do meio de cultura básico MS no crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook promoveu resposta morfogênica diferenciada em alguns dos parâmetros investigados (Tabela 1). O percentual de sobrevivência das plântulas (%SB) e o percentual de formação de massa calogênica (%CG) na base das plântulas (Figura 1b) em cultivo foi maior com o uso do meio MS na concentração integral, e reduziu com a diminuição da concentração salina.

Tabela 1 - Morfogênese *in vitro* da parte aérea de plântulas de *Cattleya intermedia* desenvolvidas em diferentes concentrações de meio de cultura básico MS. Legenda: %SB = percentual de sobrevivência das plântulas; %CG = percentual de calogênese nas plântulas; %BR = percentual de brotações adventícias; NB= número de brotos regenerados; AB= altura das brotações (cm); NF= número de folhas na plântula.

MEIOS	%SB*	%CG*	%BR*	NB*	AB	NF*
MS	96,0 ± 8 a	52,5 ± 20 a	27,7 ± 17 a	2,2 ± 0,9 a	1,9 ± 0,3 a	3,8 ± 0,9 a
MS/2	81,0 ± 21 b	30,7 ± 19 b	21,6 ± 22 a	1,7 ± 0,9 a	1,7 ± 0,4 a	3,2 ± 0,4 a
MS/4	50,0 ± 0 c	4,0 ± 8 c	8,0 ± 17 b	0,4 ± 0,9 b	1,5 ± 0,4 a	3,2 ± 0,5 a
CV %	5,1	10,3	13,4	28,7	22,5	8,3
Média	75,6	29,0	19,1	1,4	1,7	3,4

Nota: *Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$. As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo Teste SNK ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: Próprios autores (2023).

Figura 1 - Aspectos da morfogênese *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook desenvolvidas em diferentes concentrações de meio de cultura básico MS. a. Protocormos no estágio de duas folhas emitidas; b. Explante com formação de calo (seta) na base; c. Microbrotos regenerados (seta) no explante em meio de cultura; d. Planta regenerada com raízes (seta) adventícias. Barra = 1 cm.



Fonte: Autoria própria (2023).

A formação de brotações múltiplas (%BR) e o número de brotos regenerados (NB – Figura 1c) foram maiores com o uso de MS na concentração integral (MS) e na redução à metade da concentração salina (MS/2), sendo menor na concentração salina mais diluída (MS/4). A altura dos brotos regenerados (AB) e o número de folhas desenvolvidas (NF) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com o uso de diferentes concentrações do meio de cultura basal MS.

O meio de cultura MS Murashige e Skoog (1962) é um meio muito rico em macronutrientes, micronutrientes e vitaminas (Dezan et al., 2012), no entanto as exigências nutricionais para cada espécie de planta são bastante específicas. O suprimento não adequado de um elemento essencial (excesso ou deficiência) pode resultar em danos para o desenvolvimento vegetal. O excesso de nutrientes pode provocar danos por causa da salinidade, ou seja, ocorre um desequilíbrio osmótico que

afeta negativamente a absorção de água pelas raízes (Schwalbert et al., 2014). De acordo com George et al. (2008), a adição de componentes ao meio de cultura, especialmente macronutrientes e fontes de carbono, representa decréscimo considerável no potencial osmótico do meio. No presente estudo, o uso da concentração integral do meio MS indica a existência de uma quantidade adequada de macro e micronutrientes, bem como de um balanço osmótico para o crescimento e desenvolvimento da parte aérea, expressos pelo maior percentual de sobrevivência, e maior percentual e número de brotações adventícias.

Algumas espécies de orquídeas *in vitro* apresentam maior desenvolvimento da parte aérea quando cultivadas em meio de cultura MS com a concentração salina reduzida (Pedroso-de-Moraes et al., 2009; Cordeiro et al., 2011; Cunha et al., 2011; Dezan et al., 2012), diferindo dos resultados obtidos em *C. intermedia*. No estudo de crescimento *in vitro* de *Cattleya bowringiana* com diferentes concentrações do meio de cultura MS, também obteve o maior número de brotos por plântula e o comprimento da parte aérea com o uso do meio MS na concentração integral (Palaoro et al., 2018). Conforme Ferreira et al., (2017), a escolha do meio de cultura para o desenvolvimento das orquídeas é essencial para o adequado crescimento, e o ajuste do mesmo deve ser específico.

A formação de raízes adventícias (%ER) e o comprimento médio das raízes (CR– Figura 1d) *in vitro* em plântulas de *C. intermedia* foi maior (100%) com o uso de meio de cultura basal MS diluído a 25% (MS/4), e menor nas concentrações salinas mais elevadas (Tabela 2). O número de raízes adventícias regeneradas (NR) não foi modificado comparando-se as diferentes concentrações salinas do meio basal MS.

Tabela 2 – Rizogênese *in vitro* de plântulas de *Cattleya intermedia* desenvolvidas em diferentes concentrações de meio de cultura básico MS. Legenda: %ER= percentual de enraizamento das plântulas; NR= número de raízes adventícias regeneradas; CR= comprimento médio das raízes.

MEIOS	%ER*	NR*	CR
MS	71,0 ± 23 b	3,0 ± 0,7 a	1,5 ± 0,4 b
MS/2	78,3 ± 20 b	2,3 ± 0,5 a	1,4 ± 0,2 b
MS/4	100 ± 0 a	2,8 ± 0,4 a	2,7 ± 0,6 a
CV %	7,0	9,3	24,7
Média	83,1	2,7	1,9

Nota: *Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$. As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo Teste SNK ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: próprios autores (2023).

Na fase do enraizamento *in vitro*, frequentemente, os meios de cultura são preparados com a redução da concentração salina (Diniz et al., 2014), uma vez que elevadas concentrações salinas tendem a inibir todas as fases da rizogênese (Grattapaglia & Machado, 1998). De acordo com Damiani e Schuch (2009) o desenvolvimento de um sistema de enraizamento mais eficiente resulta em mudas com maior qualidade fisiológica e diminuição de perdas durante a fase de aclimatização na micropropagação de plantas.

Os resultados obtidos no presente estudo com *C. intermedia* estão de acordo com Rego-Oliveira e Faria (2005) trabalhando com *Catesetum fimbriatum*, e Sorace et al. (2008) com plântulas de *Oncidium bauer*, em que o maior número de raízes foi conseguido com a utilização do meio MS diluído. Entretanto, o número e comprimento das raízes desenvolvidas em *Cattleya bowringiana* no cultivo *in vitro* com a concentração integral de meio MS foram maiores do que em meio com redução da concentração salina (Palaoro et al., 2018).

4. Conclusão

O uso de meio de cultura basal MS na concentração integral em cultivo *in vitro* de *C. intermedia* favorece a maior sobrevivência das plântulas, o maior percentual e número de brotações regeneradas.

Para o enraizamento adventício de plântulas no cultivo *in vitro*, o uso de meio de cultura basal diluído à 25% (MS/4) favorece o percentual de enraizamento e o comprimento médio das raízes.

A avaliação de diferentes tipos de meios de cultura (macro e micronutrientes) e dos aditivos (sacarose, carvão ativado) poderá melhorar o protocolo de crescimento *in vitro* de *C. intermedia* em novas pesquisas a serem desenvolvidas.

Referências

- Abrão, M. C. R., Jorge, J., Pescador, R., Ferreira, W. M., & Suzuki R. M. (2014). Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 12, 141-147.
- Araújo, A. G., Pasqual, M., Rodrigues, F. A., Carvalho, J. G., & Zarraga, D. Z. A. (2009). Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 31, 35-39. 10.4025/actascibiolsoci.v31i1.309
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation of Orchids*. (2nd ed.), BlackWell Publishing Ltd.
- Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145(3), 367-421.
- Cordeiro, G. M., Pedroso-de-Moraes, C., Massaro, R., & Cunha, T. (2011). Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindley) em diferentes meios de cultura. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*, 18, 22-28.
- Cunha, T., Cordeiro, G. M., Massaro, R., Dezan, L. F., & Pedroso-de-Moraes, C. (2011). Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. *Scientia Plena*, 7, 1-5.
- Damiani, C. R. & Schuch, M. W. (2009). Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. *Ciência Rural*, 39(2), 563-566. 10.1590/S0103-84782009000200040
- Dezan, L. F., Canassa, F., Souza-Leal, T., Diogo, J. A., Massaro, R., Cordeiro, G. M., & Pedroso-de-Moraes, C. (2012). Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. *Idesia*, 30(2), 53-58. 10.4067/S0718-34292012000200007
- Diniz, J. D. N., Almeida, J. L., Oliveira, A. B., & Vidal, F. R. (2014). Multiplicação e enraizamento *in vitro* de minirosa. *Revista Ciências Agrônomicas*, 45(1), 68-73. 10.1590/S1806-66902014000100009
- Endres-Júnior, D., Sasamori, M. H., Silveira, T., Schmitt, J. L., & Droste, A. (2015). Reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) em borda e interior de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 13(1), 33-40.
- Fermino Junior, P. C. P., Guanais, D. D. S., & Nadai, M. G. Indução, proliferação e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (ESP) de *Schomburgkia crispa* Lindl. (Orchidaceae). *Agrarian Academy*, 8(16), 48-55. 10.18677/Agrarian_Academy_2021B5
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042. 10.1590/S1413-70542011000600001
- Ferreira, W. M., Oliveira, A. M. D., Viana, J. C., Suzuki, R. M., & Oliveira, J. R. G. D. (2022). Asymbiotic germination, initial development *in vitro* and acclimatization of *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, a Brazilian Savanna orchid species. *Rodriguésia*, 73, e01272020. 10.1590/2175-7860202273043
- Ferreira, W. M., Vasconcelos, M. C., Silva, C. C. N., Oliveira, H. R., & Suzuki, R. M. (2017). Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. *Iheringia, Série Botânica*, 72(1), 57-65. 10.21826/2446-8231201772106
- Flora e Funga do Brasil (2023). *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11329>
- Grattapaglia, D. & Machado, M. A. Micropropagação. In Torres, A. C., Caldas, L. S., & Buso, J. A. (1998). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* (pp. 183-230). v. 1. 1ª ed. Brasília, Brasil: SPI/Embrapa - CNPH.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd. Ed. Dordrecht, Netherland: Springer.
- Hubner, M. (2003). Por que cultivamos a *Cattleya intermedia*? *O mundo das orquídeas*, 26, 6-11.
- Johnson, T. R., Kane, M. E., & Pérez, H. E. (2012). Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). *Plant Growth Regulation*, 63, 89-99. 10.1007/s10725-010-9516-3
- Juras, M. C. R., Jorge, J., Pescador, R., Ferreira, W. M., Tamaki, V., & Suzuki, R. M. (2019). *In vitro* culture and acclimatization of *Cattleya xanthina* (Orchidaceae), an endangered orchid of the Brazilian Atlantic Rainforest. *Rodriguésia*, 70, e01422017. 10.1590/2175-7860201970014
- Malavolta, E., Vitti, G. C., & Oliveira, S. A. (1997). *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2ª Ed. Piracicaba, Brasil: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato.
- Mengel, K., & Kirkby, E. A. (1978). *Principles of Plant Nutrition*. 1 st. Ed. Worblaufen-Bern, Switzerland: International Potash Institute.

Menine Neto, L., Barros, F. de V. F., Furtado, S. G., Judice, D. M., Fernandez, E. P., Sfair, J. C., Barros, F. S. M., Prieto, P. V., Kutschenko, D. C., Moraes, M. A., Zanata, M. R. V., & Filho, L. A. F. S. (2013). Orchidaceae. In: Martinelli, G., & Moraes, M. A. (Orgs.) *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologiae Plantarum*, 15, 473-479. 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Palaoro, G. J., Schmildt, O., Ferreira, J. P., Figueiredo, D. D. C., Schmildt, E. R., & Alexandre, R. S. (2018). Crescimento *in vitro* de *Cattleya bowringiana* O'Brien (Orchidaceae) em diferentes níveis de macronutrientes e sacarose. *Nucleus*, 15(1), 31-40.

Pedroso-de-Moraes, C., Diogo, J. A., Pedro, N. P., Canabrava, R. I., Martini, G. A., & Martelilne, M. A. (2009). Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Revista Brasileira de Biociências*, 7, 67-69.

Rego-Oliveira, L. V., & Faria, R. T. (2005). *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and comercial fertilizers formulation. *Acta Scientiarum: Agronomy*, 27(1), 1-5.

Rio Grande do Sul. (2014). Decreto como espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul, Decreto n. 52.109, *Lex-Diário Oficial do Rio Grande do Sul*, ano LXXII, n. 233, 2-11.

Schwalbert, R., Maldaner, J., Aita, M. F., Amaral, G. A., & Tarouco, A. K. (2014). Concentrações de sais do meio MS no cultivo *in vitro* de *Desmodium incanum*. *Enciclopedia Biosfera*, 10(18), 1009-1015.

Sorace, M., Faria, R. T., Damasceno-Junior, C. V., Gomes, G. P., Barbosa, C. M., Vieira, F. G. N., Lopes da Silva, G., Takahashi, L. S. A., & Schnitzer, J. A. (2008). Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. *Semina: Ciências Agrárias*, 29(4), 775-782.

Stewart, S. L., & Zettler, L. W. (2002). Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habena riarepens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany*, 72(1), 25-35. 10.1016/S0304-3770(01)00214-5

Suzuki, R., Almeida, V., Pescador, R., & Ferreira, W. (2010). Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). *Hoehnea*, 37, 731-742. 10.1590/S2236-89062010000400004