

# EFEITO DAS CITOCININAS NA MULTIPLICAÇÃO DE PLANTULAS DE *Epidendrum secundum* Jacq. (ORCHIDACEAE) OBTIDAS *in vitro*

Célia dos Santos Araújo<sup>1</sup>  
Maria Tereza Faria<sup>2</sup>  
Sérgio Tadeu Sibov<sup>3</sup>

## RESUMO

Orchidaceae Juss. é uma das maiores famílias dentre as angiospermas, com estimativa de aproximadamente 24.000 espécies. O gênero *Epidendrum* tem grande importância ornamental, mas produtores deste encontram problemas, como custos elevados e lenta taxa de propagação sexual e vegetativa para a produção em larga escala. O cultivo *in vitro* tem sido utilizado para aumentar a produção de mudas de alta qualidade genética e para redução de custo de produção. *Epidendrum secundum* Jacq. representa uma das mais populares espécies de Orchidaceae que impulsionando o agronegócio florícola nacional, pois é amplamente comercializada como flor de corte e de vaso, além de ser utilizada na produção de híbridos. As citocininas são substâncias reguladoras do crescimento, no meio de cultura são indispensáveis para o desenvolvimento de gemas. O presente trabalho visou avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *E. secundum* efeito das citocininas na multiplicação e a aclimatização de plântulas obtidas *in vitro*. Com os resultados obtidos conclui-se que o meio (A) Knudson modificado Arditti é o mais favorável no processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *E. secundum*; maior brotação ocorre em tratamentos com concentrações intermediárias de BAP, por volta de 5 mg/L.; a fibra de coco como substrato favorece a transferência de plântulas de *E. secundum* desenvolvidas *in vitro*.

**Palavras-chave:** BAP, germinação, sementes, agronegócio

## INTRODUÇÃO

Orchidaceae Juss. é uma das maiores famílias dentre as angiospermas, com estimativa de aproximadamente 24.000 espécies (DRESSLER, 1993). Apresenta distribuição cosmopolita, mas sua maior concentração ocorre nas regiões tropicais com aproximadamente 880 gêneros (PRIDGEON *et al.* 1999). Está bem representada no Brasil com cerca de 2.350 espécies distribuídas em 200 gêneros (PABST & DUNGS 1975, 1977; AZEVEDO, 2007). Estes números colocam o Brasil como o terceiro país do mundo em diversidade para esta família de plantas, perdendo apenas para Equador e Colômbia (SOUZA & LORENZI, 2008).

Segundo Dressler (1993), as principais características de um grupo em evolução ativa estão presentes dentro da família Orchidaceae e, por isso, as espécies, gêneros, tribos e subtribos são de difícil delimitação. Cameron *et al.* (1999) e Pridgeon *et al.* (1999) dividem Orchidaceae em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae (abrigoando parte das

<sup>1</sup>Aluno do curso de Ciências Biológicas – Licenciatura – Faculdade Araguaia.

<sup>2</sup>Docente do curso de Ciências Biológicas - Faculdade Araguaia. e-mail - hyptissp@yahoo.com.br.

<sup>3</sup>Professor Adjunto de Genética da Universidade Federal de Goiás

Epidendroideae *sensu* Dressler (1993), Orchidoideae (englobando as Spiranthoideae *sensu* Dressler (1993) e Epidendroideae.

Epidendroideae é a maior das cinco subfamílias, com um número de gêneros e espécies superior ao de todas as outras subfamílias juntas, e tem como principal característica a antera geralmente incumbente, ou seja, voltado para o lado interno do filamento (DRESSLER, 1993). O gênero *Epidendrum* L., possui cerca de 1.000 espécies, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (RASMUSSEN, 1985). Tem como principais características diferenciais os caules longos, eretos e finos, raramente intumescidos em pseudobulbos, as folhas geralmente opostas. No Brasil ocorrem 107 espécies (PABST & DUNGS, 1975). Este gênero é alvo de pesquisas relacionadas com a micropropagação *in vitro*, principalmente, com a finalidade de compreender aspectos taxonômicos, morfológicos e cromossômicos (ASSIS, 2009).

*Epidendrum secundum* Jacq. representa uma das mais populares espécies do gênero, impulsionando o agronegócio florícola nacional, pois é amplamente comercializada como flor de corte e de vaso, além de ser utilizada na produção de híbridos. Tal orquídea foi recentemente considerada apenas uma espécie altamente polimórfica, apresentando alta variação morfológica contínua entre suas populações (BARROS, 2007). Infelizmente, apesar de toda a importância ornamental do gênero, produtores de *Epidendrum* encontram problemas, como custos elevados e lenta taxa de propagação sexual e vegetativa para a produção em larga escala (CHEN, L.; CHEN, J; CHANG, 2002).

Um das ferramentas indispensáveis à propagação e conservação de espécies de orquídeas é a sementeira *in vitro*, uma vez que as metodologias empregadas proporcionam a produção com velocidade superior de crescimento em relação aos métodos convencionais de propagação, maior produção em menor tempo e espaço físico e a obtenção de plantas livres de patógenos (SANTOS *et al.*, 2006). Além disso, o cultivo *in vitro* tem sido utilizado para aumentar a produção de mudas de alta qualidade genética e para redução de custo de produção, pela simplificação de meios de cultura (STANCATO, 2001; PEDROSO-DE-MORAES *et al.*, 2009).

Raven *et al.* (2007), definem os hormônios vegetais como substâncias orgânicas, ativas em pequenas quantidades, produzidas em um tecido e transportadas para outro, onde provocam respostas fisiológicas. Indicam que o

termo hormônio vem do grego e significa “excitar”. Chamam a atenção para o fato de que muitos hormônios possuem influências inibidoras, sendo, portanto, mais apropriado considerá-los como mensageiros químicos do que como estimuladores.

Os equivalentes sintéticos dos hormônios vegetais são denominados reguladores de crescimento. Nas diferentes técnicas utilizadas na cultura de tecidos são utilizados reguladores de crescimento ao invés de hormônios vegetais, pois os reguladores são mais baratos e padronizados.

As citocininas são substâncias reguladoras do crescimento responsáveis, principalmente, pela divisão celular nas plantas, formam um grupo de reguladores de crescimento muito importante para o cultivo *in vitro*. Na fase de estabelecimento de um processo de micropropagação, este grupo de reguladores de crescimento não só é favorável como necessário para o desenvolvimento do explantes. As citocininas no meio de cultura são indispensáveis para o desenvolvimento de gemas (FORNI, 1993).

O presente trabalho visou avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *Epidendrum secundum* Jacq., o efeito das citocininas na multiplicação e a aclimatização de plântulas obtidas *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de março a dezembro de 2012.

### *Germinação e crescimento inicial*

Cápsulas de *E. secundum* foram obtidas por autofecundação de plantas pertencentes à Coleção de Bromélias e Orquídeas do Cerrado localizada na Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG. As cápsulas foram colhidas quatro meses após a autofecundação.

A primeira fase do procedimento consistiu na desinfestação de uma cápsula de *E. secundum*. A cápsula foi devidamente lavada com detergente e água corrente com o auxílio de uma escova. Em seguida, a cápsula foi imersa em solução de hipoclorito de sódio 25% (hipoclorito de sódio comercial com 2% de cloro ativo) durante 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar a cápsula foi lavada duas vezes em água destilada autoclavada, aberta com o auxílio de um

bisturi e as sementes inoculadas em vidros com 50 ml de meio de cultura. Foram utilizadas duas formulações de meios de cultura adequados para orquídeas, o KNUDSON (1946) modificado ARDITTI (1977) e o meio de HOMMA & ASAHIRA (1985) composto por macronutrientes de Tomale (1954), micronutrientes e compostos orgânicos de RINGE & NITSHI (1968). Foi adicionado aos meios de cultura 2% de sacarose e o pH ajustado para 5,8 antes de serem esterilizados em autoclave por 20 minutos sob a temperatura de 121°C. Depois de inoculados, os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1°C. A coleta de dados do desenvolvimento inicial foi realizada a cada trinta dias tendo como variável a altura da parte aérea. Após noventa dias as plântulas foram transferidas para novos meios de cultura, para que o desenvolvimento continuasse normalmente.

#### *Desenvolvimento in vitro*

A segunda fase do experimento consistiu na avaliação do efeito das citocininas no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *E. secundum*. Foram realizados seis tratamentos e dez repetições para cada tratamento. Em frascos de 200 ml, as plântulas foram acomodadas em número de cinco por frasco. Os tratamentos receberam as seguintes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP): 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 mg/L. O pH foi ajustado para 5,8 antes de ser autoclavado durante 20 minutos a 121° C. A avaliação ocorreu após 35 dias, tendo como variável o número de brotos por plântula.

#### *Aclimatização*

Para o experimento de aclimatização foram utilizadas 50 plantas desenvolvidas no meio KNUDSON (1946) modificado por ARDITTI (1977) selecionadas a partir do experimento de desenvolvimento inicial. As plantas foram retiradas dos vidros, e as raízes foram lavadas em água corrente. Foram utilizadas bandejas de polietileno para mudas com 50 células de 9 cm de profundidade e 50 cm<sup>3</sup>. As células foram preenchidas com substrato composto por fibra de coco (USIFIBRAS), sobre a qual as plantas foram acomodadas. A variável utilizada para avaliar o sucesso da aclimatização foi a taxa de sobrevivência após trinta dias.

## *Análise Estatística*

O delineamento utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. A normalidade dos dados obtidos para os tratamentos foi testada pelo teste de Lilliefors. Os tratamentos foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido por teste Tukey quando paramétricos ou por análise de variância pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes de comparações múltiplas (Teste de Student-Newman-Keuls ou de Dunn) na ausência de normalidade ou homogeneidade de variâncias. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram conduzidas com auxílio dos softwares Biostat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *Germinação e crescimento inicial*

O processo de desinfestação das cápsulas utilizando os materiais e os tempos recomendados mostraram-se eficientes. Não houve perda de repetições por contaminação em nenhum dos tratamentos. O fato de a cápsula estar completamente fechada e sem sinais de injúrias e doenças também contribuiu para a ausência de contaminação. Quatro dias após a semeadura, notou-se que as sementes de *E. secundum* contidas nos dois tratamentos apresentaram-se intumescidas e com coloração verde (característico da clorofila), indicando o primeiro estágio de desenvolvimento do embrião. Os resultados para germinação foram satisfatórios para os dois meios de cultura utilizados para semeadura de *E. secundum*. Após 15 dias de cultivo *in vitro* foi observado o surgimento dos primórdios foliares nos meios KNUDSON (1946) modificado ARDITTI (1977) (**A**) e HOMMA & ASAHIRA (1985) (HS) (Fig. 1). Nota-se no gráfico (Fig. 2) que os protocormos presentes nos meios A e HS convertiam-se em plântulas praticamente ao mesmo tempo. Após o período de noventa dias, as plântulas apresentaram uma variação na altura praticamente uniforme para os dois tratamentos, e a diferença só foram evidenciados nos últimos três meses de avaliação.



**Figura 1.** Protocormos iniciais de *Epidendrum secundum* aclorofilados no meio Knudson C (1946) modificado Arditti (1977), 90 dias após a sementeira *in vitro* e primeiros primórdios foliares com aproximadamente 8 mm de comprimento. Fotos: Luciano Lajovic.

**Figura 2.** Diferença entre as médias de crescimento inicial dos protocormos após 240 dias de cultivo.

Os resultados da análise estatística para o crescimento inicial a partir de sementes de *E. secundum*, semeadas nos dois diferentes meios de cultura indicam que há diferença significativa entre os meios. As médias referentes ao crescimento inicial médio dos protocormos originados a partir de sementes de *E. secundum* nos dois diferentes meios de cultura foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Observa-se pelas médias que após 240 dias de cultivo, o meio **A** apresentou a maior média para o crescimento inicial de protocormos, quando comparado ao meio **HS** (Tabela 1).

**Tabela 1.** Diferença entre as médias de crescimento dos meios de cultura utilizados nos tratamentos.

Tratamentos	Médias	Meios de Cultura
<b>A</b>	3.72 Knudson modificado Arditti	a
<b>HS</b>	2.57 Homma & Asahira	b

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

De acordo FRÁGUAS (2003), o meio Knudson é o mais utilizado para germinação e desenvolvimento de orquídeas, mas apesar de suas modificações, ainda não foi possível determinar uma fórmula padrão que atenda as necessidades nutricionais de todas as espécies, e por esse motivo, os testes experimentais são de fundamental importância para a identificação da concentração adequada para cada espécie. Neste experimento, o meio KNUDSON (1946) modificado ARDITTI (1977) foi favorável ao estabelecimento *in vitro* de *E. secundum*.

#### *Multiplicação in vitro*

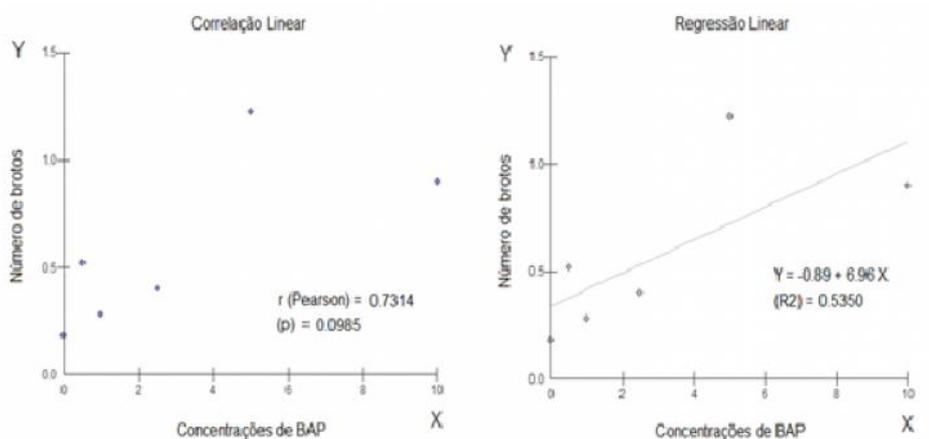
Os resultados para os tratamentos contendo diferentes concentrações de BAP foram avaliados tendo como variável o número de brotos por planta para cada tratamento, visto que as citocininas são responsáveis pela divisão celular em células vegetais e conseqüentemente pelo processo de multiplicação. BAP corresponde ao grupo de citocininas que atualmente apresenta melhores resultados na micropropagação *in vitro* (NONATO, 2008). Neste experimento, o maior número de brotações (1, 22) ocorreu na concentração de 5 mg/L de BAP, 35 dias após o início do experimento (Tabela 2). Embora pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis as médias de brotações nas concentrações de 5 e 10 mg/L não tenham diferenças significativas, pelo gráfico da correlação entre as duas variáveis (Fig. 3) percebe-se que há uma tendência de diminuição do valor da média a partir da concentração de 5 mg/L.

**Tabela 2.** Média da variável número de brotos (NB) nos diferentes tratamentos após 35 dias de cultivo *in vitro* de *E. secundum*.

Tratamentos	NB		
T0	0.18 00		b
T0,5	0.52 00		b
T1	0.28 00		b
T2,5	0.40 00		b
T5	1.22 00	a	
T10	0.90 00	a	b

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

BAP é uma das citocininas mais utilizadas na indução de brotos em cultura de tecidos (MALIK *et al.*, 2005). Geralmente, o nível de citocininas é alto em tecidos com capacidade mitótica, como as regiões meristemáticas, sendo necessárias para manter os ciclos de divisão celular e diferenciação celular (WERNER *et al.*, 2001). ARAGÃO (2011), afirma que o BAP é ideal para estimular o desenvolvimento de gemas axilares, além de ser de baixo custo e aquisição.



**Figura 3.** Gráficos indicando a Correlação e Regressão Lineares entre o número médio de brotos em plântulas de *E. secundum* cultivadas *in vitro* e as diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) suplementadas ao meio Knudson C modificado.

Jesus (2010) defende no seu trabalho com a utilização de BAP para indução de brotos em cafeeiro, que a utilização deste regulador de crescimento é ideal para proliferação de gemas axilares, sendo o tipo de citocininas e a sua concentração os fatores que mais influenciam no sucesso da micropropagação *in vitro*. O autor afirma que concentrações elevadas de BAP promovem o desbalanceamento endógeno dos fitormônios, o que pode reduzir o crescimento das brotações.

No trabalho de Nonato (2008), testando o efeito do BAP no subcultivo *in vitro* de Curauá (*Annanas erectifolius*), os melhores resultados para brotações por explantes foram obtidos na concentração de 2,5 mg/L de BAP. Neste experimento foi obtido um resultado semelhante com tratamento de 5 mg/L de BAP para o maior número de brotos por plântulas de *E. secundum*. Isso indica

que concentrações extremas tendem a inibir o desenvolvimento e crescimento dos brotos enquanto que concentrações intermediárias pode favorecer a multiplicação de brotos.

### *Aclimatização*

Dentre as 50 plantas separadas para aclimatização, apenas 3 morreram. O que corresponde a uma taxa de 6% de perdas. Este resultado foi considerado positivo, tendo em vista que as plântulas obtidas e cultivadas *in vitro* são muito frágeis quando comparadas com as que se desenvolvem no meio natural. Isso ocorre porque o ambiente *in vitro* afeta a morfogênese das plantas, devido a sua fragilidade pelo fato de terem sido cultivadas em condições de baixa irradiância e umidade relativa. De acordo com CASTRO (2005), as plântulas devem ser transferidas de um ambiente asséptico e heterotrófico, como o da cultura de tecidos, para o ambiente externo de forma gradativa e cuidadosa, para evitar sua morte (CASTRO, 2005).

Portanto, cuidado especial deve ser tomado na escolha do substrato e ambiente provisório (casa de vegetação) que acomodará as novas plantas até que estas se tornem resistentes aos fatores físicos e biológicos encontrados no novo ambiente. O mais indicado, segundo pesquisadores, é manter as plântulas em um ambiente favorável, por aproximadamente quatro semanas, para que as novas plantas possam se adaptar ao meio externo, neste caso, um meio intermediário para esta fase de adaptação como um telado ou sombrite (CASTRO, 2005).

ASSIS (2010) afirma que os resíduos agrícolas como substrato é uma excelente alternativa no cultivo de orquídeas. Principalmente pelo fato de reduzir os custos e o acúmulo desses materiais no ambiente. O autor aponta para o fato de que resíduos agrícolas como fibra de coco, casca de pinus, casca de arroz carbonizada, fibra de piaçava e bagaço de cana-de-açúcar estão entre os materiais com grande potencial como substrato no cultivo de algumas espécies de orquídeas. Neste experimento de aclimatização, o uso de fibra de coco como substrato foi bastante favorável para a transferência de plântulas de *E. secundum* para o ambiente intermediário de aclimatização.



**Figura 3.** Plantas de *Epidendrum secundum* Jacq no dia em que foi montado o experimento de aclimatização (a); Plantas de *E. secundum* após 20 dias em fase de aclimatização (b).

### CONCLUSÃO

- O meio (A) Knudson modificado Arditti é o mais favorável no processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Epidendrum secundum* Jacq.
- Maior brotação ocorre em tratamentos com concentrações intermediárias de BAP, por volta de 5 mg/L.
- A fibra de coco como substrato favorece a transferência de plântulas de *Epidendrum secundum* Jacq desenvolvidas *in vitro*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRANDE, Solange Rocha Monteiro de. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Embrapa Cerrados**, 2002.
- ARAGÃO, Ana Katarina Oliveira et al. O Efeito do BAP (6-BENZILAMINOPURINA) Sobre a Indução de Brotos em Explantes de Pau Brazil. *Cerne*, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, jul./set, 2011.
- ASSIS, Adriane Marinho et al. Cultivo de orquídea em substratos à base de casca de café, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Departamento de Agronomia/Fitotecnia, 2010.
- ASSIS, Felipe Nollet Medeiros de. Variação Numérica e Evolução Cariotípica em *Epidendrum*l (*Orchidaceae: Epidendroideae*). **Programa de Pós-Graduação em Agronomia**, Areia – Paraíba, 2009.

- AYRES, M.; AYRES-Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. BioEstat 5.0: **Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/ MCT-CNPq, p 364, 2007.
- AZEVEDO, C.O. & VAN DEN BERG, C. A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. **Hoehnea** 34(1): 1-47, 2007.
- AZEVEDO, Cecília Oliveira de. A Família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. Feira de Santana, Bahia, 2004.
- CAMERON, K.M., CHASE, M.W., WHITTEN, W.M., KORES, P.J., JARRELL, D.C., ALBERT, V.A., YUKAMA, T., HILLS, H.G. & GOLDMAN, D.H.A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: Evidence from *rbcL* nucleotide sequences. **Am. J. Bot.** 86(2): 208-224, 1999.
- CARVALHO, Julita Maria Frota Chagas et al. Micropropagação In Vitro de *Ricinus Communis* L. Utilizando a Citocinina 6-Bencilaminopurina. **Embrapa**, 2007.
- CASTRO, Ana Hortência Fonseca et al. Propagação do murici (*Byrsonima verbascifolia*) por cultivo in vitro de embriões. Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS) **Lavras**, MG, 2005.
- CHEN, L. R.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, v. 38, p. 441–445, 2002.
- DRESSLER, R.L. Phylogeny and classification of the orchid family. **Dioscorides Press, Portland**, 1993.
- FICK, Tiago Antonio. **Estabelecimento in vitro e Propagação de Cordiatrichotoma (Vell.) Arrabida ex Steudel (Louro-Pardo)**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Santa Maria – Rio Grande do Sul, 2007.
- FORNI, P.C. **Níveis de “MS”, BAP, número de gemas do explante e período de repicagem na produção de brotos, folhas e material seco e, níveis de 2,4-D e cinetina área tamanho e fenótipo de calos de Coffea arábica** L. cv. Catuaí Vermelho, 2077-2-5-44. Lavras: ESAL, 1993.
- HOMMA, Yoshiyuki and TADASHI, Asahira. New Means of Internodal Phalaenopsis Sections of Propagation with Flower Stalk. J. Japan. **Soc. Hort. Sci.** 54 (3): 379-387, 1985.

JESUS, Adriana Madeira Santos et al. Desenvolvimento *in vitro* de Brotações de Cafeeiro em Diferentes Meios de Cultura e Reguladores de Crescimento de planta, **Scientia Agraria**, Curitiba, v.11, n.6, p.431-436, Nov./Dec, 2010.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, p. 30-33, 1997.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A Conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n.1, p. 147-155, 2005.

NONATO, Carla Viviane de Freitas et al. Efeito do Bap no Subcultivo *In Vitro* de Brotos de Curauá (*Annanaserectifolius*).L. B. SMITH). **Embrapa Amazônia Oriental**, 2008.

PABST, G. F. J. & DUNGS, F. *Orchidaceae Brasilienses*, vol. 1. Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim, 1975.

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

PINHEIRO, F. & BARROS, F. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. **Nordic Journal of Botany** 25, pp. 129-136, 2007.

PRIDGEON, A. M., CRIBB, P., CHASE, M.; RASMUSSEN, F. N. *Genera Orchidacearum*.V. 1. General Introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae. Oxford: **Oxford University Press**, 1999.

RASMUSSEN F.N. Orchids. In: Dahlgren P et al, editor. The families of Monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. p. 49-74.1985.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 7 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, p.830, 2007.

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

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. *Botânica Sistemática - Guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Nova Odessa, Plantarum, 2008.

STANCATO, G. C. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 7, p. 25-33, 2001.

UNEMOTO, L.K., FARIA, R.T., MENEGUCE, B. & ASSIS, A.M. Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore-(Gesneriaceae). *Acta Scientiarum Agronomy*, 28: 503-506, 2007.