

Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (*Orchidaceae*) obtidas por propagação *in vitro*

Liane Terezinha Dorneles & Vania Trevelin

Universidade de Caxias do Sul, UCS, Campus Universitário da Região dos Vinhedos, CARVI, Centro de Ciências Naturais, Exatas e de Tecnologia, Alameda João Dal Sasso, 800, CEP95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brasil. ltdornel@ucs.br; vaniatre@hotmail.com

Recebido em 12.VI.2009. Aceito em 20.IX.2011

RESUMO - A propagação *in vitro* da orquídea *Cattleya intermedia* foi realizada em laboratório a partir da semeadura em meio de cultura Vacin & Went (1949) modificado. Após a germinação, foram realizadas subculturas até as plantas atingirem um tamanho aproximado de cinco centímetros, sendo em seguida aclimatizadas em *Sphagnum* e casca de *Pinus*, por quatro meses, onde o seu desenvolvimento foi monitorado através de medições mensais de raízes e folhas. Houve uma sobrevivência de 27% das aclimatizadas em *Pinus*, e 53% para as aclimatizadas em *Sphagnum*. Seguindo a esse período, as mudas foram introduzidas na mata, onde, através de acompanhamento periódico, observou-se uma sobrevivência de 83% das plântulas aclimatizadas.

Palavras-chave: conservação de orquídeas, epífitas, sobrevivência

ABSTRACT - Acclimatization and reintroduction of *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (*Orchidaceae*) from *in vitro* propagation. The *in vitro* propagation of *Cattleya intermedia* was developed in a laboratory from seeding in modified Vacin and Went (1949) culture medium. After germination, two subcultures were carried out until the plants reached a size of about five centimeters. Then the plants were acclimatized in *Sphagnum* and *Pinus* bark substratum for four months where their development was monitored through monthly measurements of roots and leaves. There was a survival of 27% of the plants acclimatized in *Pinus* bark and 53% in *Sphagnum* substratum. After this period of acclimatization, the seedlings were reintroduced to the woods and a regular monitoring showed that 83% of the acclimatized plants survived.

Key words: orchid conservation, epiphytes, survival

INTRODUÇÃO

A família *Orchidaceae* apresenta mais de 25.000 espécies, estando distribuída em todo o mundo, sendo sua maior importância o potencial ornamental de suas flores, o que a torna um alvo de grande atividade extrativista e, conseqüentemente, ameaça várias espécies de extinção (Sutteworth *et al.* 1982). Segundo Anjos-Silva (2001), no Brasil existem 725 gêneros com 2900 espécies distribuídas em diversos habitats. No Rio Grande do Sul,

existem 38 espécies de orquídeas ameaçadas de extinção (Rio Grande do Sul, 2002), entre elas a *Cattleya intermedia* Graham ex Hook.

A sub-bacia do Rio Burati localiza-se em uma área de formação de Floresta Estacional Decidual, uma área de Mata Atlântica que contém uma grande diversidade de espécies vegetais, sendo que hoje algumas delas se encontram ameaçadas, entre elas diversas espécies de orquídeas. Segundo Freitas & Jasper (2001), estudos de distribuição, migração e outros parâmetros ecológicos têm mostrado a di-

minuição na população de algumas espécies, provavelmente devido à grande ação antrópica nestas áreas, localizadas próximo a cidades com crescente atividade industrial. A manutenção dessas espécies dentro do seu ecossistema natural é de grande importância, pois as orquídeas são grandes indicadores da qualidade ambiental.

A propagação *in vitro* de orquídeas ameaçadas de extinção é uma ferramenta de grande utilidade para a sua conservação, já que as sementes podem germinar *in vitro* sem nenhum tipo de relação simbiótica, pois os nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião já estão presentes no meio de cultura, apresentando, desta forma, um alto potencial de produção de plantas (Arditti *et al.* 1990). Na natureza as sementes dependem de vários fatores para germinarem, pois segundo Arditti (1967) na sua maioria não possuem endosperma e o embrião não possui cotilédone, sendo dispersas pelo vento, onde germinam e se desenvolvem mediante uma relação simbiótica com fungos micorrízicos, os quais vão fornecer os nutrientes necessários até que a planta possa realizar fotossíntese (Stancato *et al.* 2001).

A aclimatização de plantas consiste na retirada das mesmas do cultivo *in vitro* e sua transferência para condições *ex vitro*. A adaptação a esta condição é considerada delicada devido à influência de diversos fatores como: temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes (Grattapaglia & Machado, 1990; Kozai *et al.*, 1992). Além disso, ainda podemos observar que o pH do meio de cultura, dos substratos e dos forófitos também é um fator relevante para a adaptação das espécies. Entretanto Lone *et al.* (2008), testando diferentes substratos para a aclimatização de *C. intermedia*, relataram que os valores médios de pH, apresentaram-se muito variados, não influenciando no desenvolvimento das plantas.

Segundo Guerrant & Kaye (2007) a ciência da reintrodução com objetivo de conservar espécies ameaçadas é bastante nova e muito ainda precisa ser aprendido. Para a reintrodução de orquídeas não é diferente, sendo a dificuldade de aclimatização e de adaptação das plantas aos forófitos na mata os maiores entraves, pois poucos trabalhos relatam esta prática (Rublo *et al.*, 1989; Seeni & Latha, 2000). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de aclimatização e reintrodução de *C. intermedia* propagada *in vitro* em um fragmento de Mata Atlântica visando à conservação desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

A cápsula de *Cattleya intermedia* com 75% do estado de maturação foi obtida através de doação do Sr. Luiz Alberto Pascotini do Círculo Orquidófilo de Santa Maria (COSMAR), Rio Grande do Sul.

Para a obtenção das plântulas *in vitro* a cápsula contendo as sementes foi desinfetada em álcool 70% por três minutos e em solução de hipoclorito de sódio 20% do produto comercial por vinte minutos. Em seguida, foi lavada por três vezes em água autoclavada estéril em câmara de fluxo, onde foi aberta, e as sementes distribuídas em frascos de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura (Vacin & Went 1949), semi-sólido acrescido de água-de-coco 10%, sacarose 3%, e polpa de banana. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 20 minutos a 120°C a 1Atm. Os frascos contendo as sementes foram colocados em câmara de germinação Tecnal (modelo T E 401) com temperatura de 25 °C + 1 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro por um período aproximado de quatro meses, quando as plântulas foram transferidas para frascos de 250 mL contendo 100 mL do mesmo meio de cultura por duas vezes.

Ao atingirem aproximadamente cinco centímetros de comprimento, as plantas foram retiradas dos frascos e lavadas em água corrente para eliminação de todo o meio de cultura. Em seguida, foram avaliados o número e comprimento de raízes e folhas, e as plantas foram aclimatizadas em vasos com *Sphagnum* e casca de *Pinus*, onde permaneceram por 120 dias em sala de aclimatização com luz natural de intensidade aproximada de 15000 lux. Neste período, mensalmente as plantas foram cuidadosamente retiradas dos substratos e avaliadas conforme descrito acima. Após o período de aclimatização, as plantas foram transferidas para a mata em forófitos de *Vitex megapotamica* (Spreng) Mold. (forófito um e três) e *Myrcia palustris* DC. (forófito dois), sendo fixadas com cordões de fibra vegetal em alturas variando de 0,8 a 2,0 metros. Durante a aclimatização no laboratório, em intervalos quinzenais e após a transferência para a mata em intervalos mensais, durante os seis primeiros meses as plantas foram borrifadas com solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), diluída dez vezes. Os substratos utilizados na aclimatização e as cascas dos forófitos tiveram seu pH medido, com um volume de substrato para dois de água destilada, conforme Kämpf (2005). O nível de iluminação foi medido com o auxílio de luxímetro digital (Instrutherm modelo LD-200).

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Science), versão 16. Foi realizada a Análise de Variância (teste F) e as médias foram comparadas pelos testes (Tukey) e testes de proporções (Qui-Quadrado), considerando-se nível de significância 0,05 em todas as análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas retiradas do cultivo *in vitro* foram aclimatizadas em substrato de *Sphagnum*, com pH de 4,2 e em casca de *Pinus*, com pH de 4,0, valores estes considerados abaixo do desejado (5,0 - 5,5) para *C. intermedia*, conforme citado por Kämpf (2005). Para Yamakami *et al.* (2006) o pH e, principalmente, o tipo de substrato exercem influência marcante no desenvolvimento de plantas híbridas de *Cattleya*. O número final de plântulas aclimatizadas e transferidas para o campo foi de 16 e 8 para o substrato *Sphagnum* e *Pinus*, respectivamente (Fig. 1). Assim, este trabalho obteve-se 53% de sobrevivência nas plantas aclimatizadas em substrato de *Sphagnum*, diferindo significativamente daquelas aclimatadas em *Pinus* cuja sobrevivência foi de 27% ($\chi^2 = 5, 554$; $p = 0, 018$).

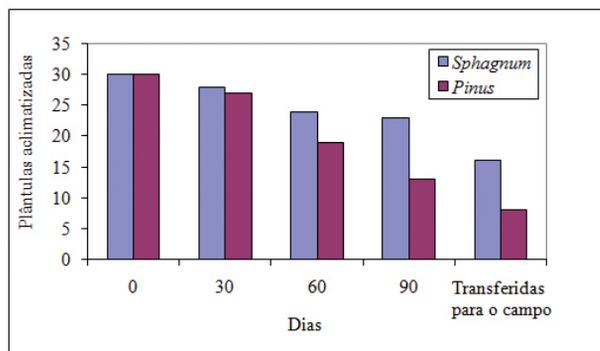


Fig. 1. Sobrevivência de *C. intermedia* durante a aclimatização em laboratório nos substratos *Sphagnum* e casca de *Pinus* e as plantas transferidas para o campo.

Estes resultados concordam com Keithly *et al.* (1991), que relataram que a perda na aclimatização de plântulas de orquídeas obtidas *in vitro* pode exceder a 50% durante os primeiros seis meses em casa de vegetação. Acredita-se que o melhor desempenho na sobrevivência das plantas aclimatizadas em *Sphagnum* seja devido à maior umidade proporcionada por este substrato, quando comparado com *Pinus*, uma vez que o estresse hídrico pós cultivo *in vitro* é um dos

fatores preponderantes na sobrevivência das plantas aclimatizadas. Outro fator importante na aclimatização foi a textura do substrato, pois as plantas aclimatizadas em *Pinus* podem ter sofrido danos maiores em suas raízes, comparadas as aclimatizadas em *Sphagnum*, quando foram submetidas às medições. Seeni & Latha (2000) mencionaram que plantas que sofrem danos no sistema radicular apresentam uma baixa capacidade de aclimatização. Podem-se considerar os valores de 53% e 27% de sobrevivência em *Sphagnum* e em *Pinus*, respectivamente, bons tendo em vista que a aclimatização é uma das etapas mais difíceis para a utilização desta técnica para fins de conservação de espécies ameaçadas de extinção. Silva *et al.* (2006) obtiveram entre 4 e 40% de sobrevivência na aclimatização de *C. tigrina* comparando o cultivo não hidropônico versus hidropônico. Kozai, *et al.* (1992) relataram que a aclimatização é o período mais suscetível a perdas na propagação das plantas devido às grandes alterações nas condições de cultivo.

Observou-se diferença significativa no número médio de raízes produzidas no substrato casca de *Pinus* ($F = 18,929$; $p < 0,001$). Através do teste de Tukey, com nível de significância 0,05, pode-se afirmar que as médias da primeira e segunda medição, realizadas no momento da retirada das plantas da cultura *in vitro* (0 dias) e aos 30 dias da aclimatização, diferem significativamente das médias da terceira e quarta medições, realizadas aos 60 e 90 dias (Fig. 2). Da mesma forma, o número médio de raízes produzidas no substrato *Sphagnum* também sofreu redução significativa ao longo do tempo ($F = 18,826$; $p < 0,001$).

Com as avaliações mensais no período de aclimatização foi possível constatar que as raízes provenientes do cultivo *in vitro* morriam enquanto que novas eram emitidas (Fig. 3). Assim, o número médio e comprimento caíram durante o período de aclimatização nos dois substratos.

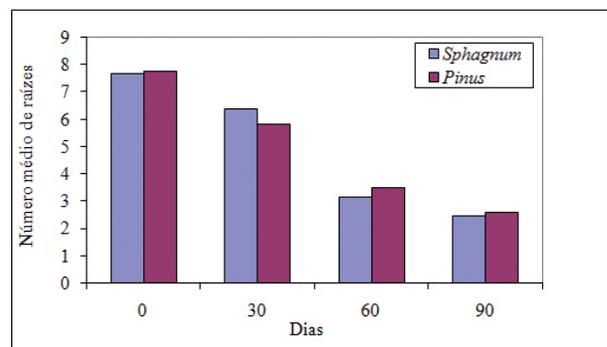


Fig. 2. Número médio de raízes nas medições de *C. intermedia* aclimatadas em laboratório nos substratos *Sphagnum* e casca de *Pinus* durante 90 dias.

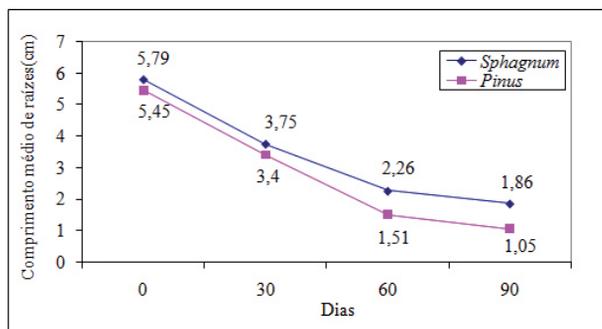


Fig. 3. Comprimento médio das raízes de orquídea *C. intermedia* aclimatadas em laboratório nos substratos *Sphagnum* e casca de *Pinus* durante 90 dias.

Segundo Mayer *et al.* (2008), as raízes provenientes da cultura *in vitro* cessam o seu crescimento e são provavelmente pouco eficientes devido à estrutura anatômica delicada (diâmetro e sistema vascular reduzidos). Os mesmos autores também observaram o surgimento de novas raízes em plantas aclimatizadas de *Cymbidium Hort.*

Para as folhas, não foi observada diminuição significativa do número entre as medições para as aclimatizadas em *Pinus* ($F = 1,916$; $p = 0,133$). Entretanto, para as plantas aclimatizadas em substrato de *Sphagnum*, observou-se diferença significativa do número de folhas ($F = 8,233$; $p < 0,001$). A quantidade média de folhas para a primeira medição difere significativamente das demais (Fig. 4). Nas medições realizadas aos 30, 60 e 90 dias em *Pinus* o número de folhas praticamente não oscilou, porém em *Sphagnum* aos 60 dias houve um aumento no número de folhas, devido à emissão de novas folhas, e posteriormente a queda aos 90 dias, pois algumas folhas remanescentes do cultivo *in vitro* morreram.

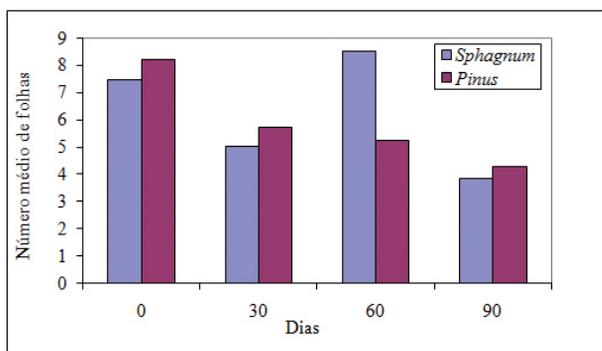


Fig. 4. Número médio de folhas nas medições de *C. intermedia* aclimatadas em laboratório nos substratos *Sphagnum* e casca de *Pinus* durante 90 dias.

O comprimento médio das folhas das plantas aclimatizadas em musgo *Sphagnum* apresentou pri-

meiramente uma queda, se mantendo entre os 30 e 60 dias, e aumentou posteriormente, enquanto que em *Pinus*, ocorreu um pequeno aumento entre o início da aclimatização até os 60 dias, e após uma pequena queda, aos 90 dias (Fig. 5).

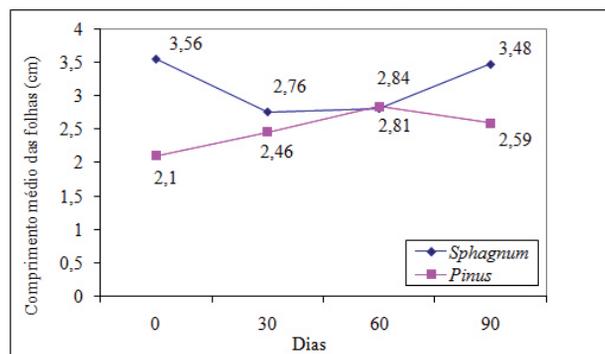


Fig. 5. Comprimento médio das folhas de orquídea *C. intermedia* aclimatadas em laboratório nos substratos *Sphagnum* e *Pinus* durante 90 dias.

Segundo Fabbri *et al.* (1986), durante a aclimatização, as folhas formadas *in vitro* podem persistir ou sofrer senescência. A persistência das folhas depende da espécie e das condições do ambiente durante a aclimatização. As plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar um aparato fotossintético competente ou não. Nas culturas não competentes como o morango, as folhas deterioram rapidamente durante a aclimatização, contribuindo somente com os nutrientes preexistentes (Grout & Millam, 1985). Mayer *et al.* (2008) relataram que em *Cymbidium 'Joy Polis'* as folhas formadas *in vitro* se mantiveram no período de 45 dias avaliados, indicando que, apesar das alterações anatômicas observadas, a cultivar aparentava possuir um aparato fotossintético competente. Neste trabalho, observou-se uma influência grande do substrato no número médio de folhas, visto que, em substrato de *Pinus*, ocorreu uma diminuição gradativa enquanto que, em substrato *Sphagnum*, o número médio de folhas oscilou entre as medições. Provavelmente esse resultado justifica-se pelo fato de ter ocorrido maior perda de plantas em substrato de casca de *Pinus*.

Durante a aclimatização, pôde ser avaliada a intolerância à umidade excessiva, onde algumas plântulas em substrato *Sphagnum* foram perdidas devido ao apodrecimento de suas raízes. Segundo Bicalho apud Colombo *et al.* (2005), para orquídeas epífitas, uma drenagem livre que proporcione acesso ao ar às raízes é fundamental para o seu desenvolvimento. As plantas sobreviventes no período de aclimatização e em boas condições foram levadas para a mata e

fixadas em três forófitos. O nível de iluminação medido nas diferentes alturas variou entre 5000 e 10000 lux para os forófitos um e dois, e de 3000 e 5000 lux para o forófito três. Esta variação de luminosidade foi ocasionada pela interferência do estrato superior da mata sobre o feixe luminoso.

A sobrevivência após seis meses na mata foi variável (Fig. 6). A maior perda ocorreu no forófito (3), onde nenhuma planta sobreviveu. Tendo em vista que o forófito (1) é da mesma espécie e nele a sobrevivência foi de 90%, acredita-se que a morte dessas plantas tenha sido influenciada pela menor incidência de iluminação, o que teria dificultado o estabelecimento da espécie, além do ataque de insetos cortadores.

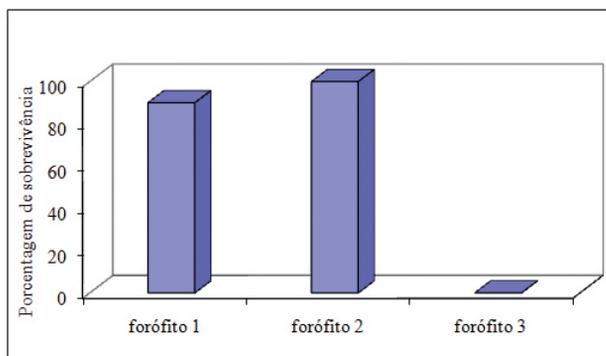


Fig. 6. Percentual de sobrevivência das plântulas de *C. intermedia* nos três forófitos, após seis meses de reintrodução na mata.

No forófito (2) a sobrevivência foi de 100%, sendo que três plantas apresentaram apenas a parte aérea. Acredita-se que estas ainda possam emitir novas raízes, como o que ocorreu no período de aclimatização no laboratório. As demais plantas deste forófito apresentaram bom desenvolvimento da parte aérea e radicular, com crescimento de cerca nove centímetros em algumas raízes, o que demonstrou uma boa adaptação às condições ambientais de reintrodução (Figs. 7A,B).

No total das plantas reintroduzidas, obteve-se 83% de sobrevivência. Seeni & Latha (2000) obtiveram entre 70 e 80 % de sobrevivência no estabelecimento de *Vanda coerulea* na mata. As plantas reintroduzidas no forófito (1) tiveram um crescimento médio da parte aérea e raízes de aproximadamente 6,5 centímetros, resultado inferior ao obtido pelas plantas reintroduzidas no forófito (2), que foi de 8,5 centímetros (Fig. 7A,B).

Acredita-se que esta diferença no desenvolvimento das plantas entre os dois forófitos possa ser atribuída às variações de luminosidade ou do pH verificada nas cascas dos mesmos, que para o (1) foi

de 5,25 enquanto que para o (2) foi de 7,06, ainda que este valor esteja bem acima dos valores ótimos observados para a espécie em cultivos comerciais como relatado por Kämpf (2005). Outros fatores, como os compostos presentes na casca do forófito (2), também podem ter influenciado a adaptação das plantas. No ambiente natural é frequentemente observado a presença de orquídeas em plantas pertencentes à família Myrtaceae o que provavelmente justifique a melhor adaptação. Para Seeni & Latha (2000) a sobrevivência na mata não apresentou especificidade em relação à planta hospedeira, entretan

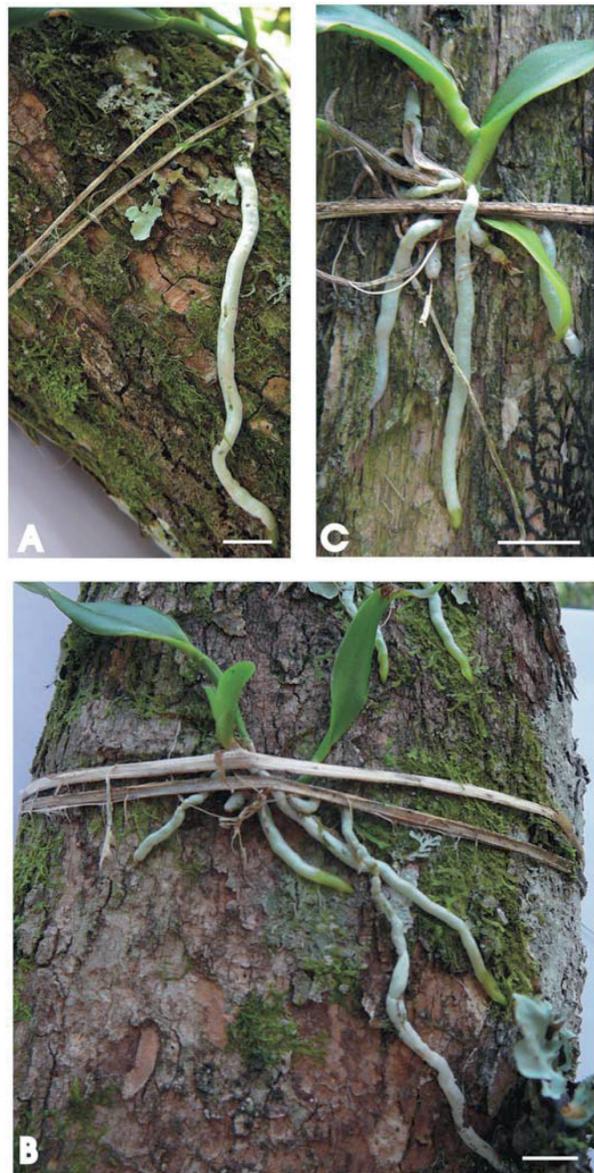


Fig. 7 A-C. A, B. Plântulas de *C. intermedia* fixadas ao forófito (2). A. Comprimento de uma das raízes; B. desenvolvimento da parte aérea e raízes após seis meses de reintrodução na mata. Na parte superior da figura se observa raízes de outra plântula fixada ao mesmo forófito; C. Planta fixada ao forófito (1), com raízes e folhas bem desenvolvidas após seis meses de reintrodução na mata.

to, estes autores sugerem o uso de espécies arbóreas com casca grossa como parte de uma eficiente estratégia de reintrodução de orquídeas epífitas, como as utilizadas neste trabalho.

A utilização da solução nutritiva de Hoagland diluída foi fundamental para a sobrevivência tanto na aclimatização das plantas em laboratório quanto na mata. Silva *et al.* (2006) relataram que na aclimatização de *C. tigrina* em cultivo hidropônico, a utilização de soluções nutritivas do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), causaram uma maior proliferação de microorganismos, provavelmente devido aos compostos orgânicos deste meio, o que levou à diminuição da sobrevivência das plantas. Acredita-se que a utilização da solução de Hoagland propiciou um nível nutricional adequado para superação do estresse, tanto durante a aclimatização como na reintrodução, visto que poucos relatos foram encontrados na literatura para reintrodução de epífitas (Seeni & Latha, 2000; Rublo *et al.* 1989).

Este trabalho obteve sucesso na aclimatização e reintrodução de *C. intermedia* a partir de propagação *in vitro*. Ficou evidenciado que a utilização de uma solução nutritiva de baixo teor nutricional foi fundamental nas duas fases. Para a reintrodução na mata o nível de luminosidade parece ser preponderante no estabelecimento desta espécie, entretanto, devido à grande quantidade de fatores envolvidos, como espécie do forófito, pH e rugosidade da casca, umidade relativa do ar entre outros, e tendo em vista, os poucos resultados prévios em bibliografia para o processo de adaptação sugere-se a continuidade destes estudos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade de Caxias do Sul, pela bolsa de Iniciação Científica para a segunda autora, às técnicas do Laboratório de Biologia, licenciada em Biologia, Vera Lucia C. B. Balestrin e a bacharel em Química, Adriana Bortolini, da Universidade de Caxias do Sul e ao Sr. Luiz Alberto Pascotini do Circulo de Orquidófilos de Santa Maria pelo fornecimento da cápsula de *C. intermedia* e a Dra. Cintia Giacomello Paese pelo auxílio na análise estatística dos dados.

REFERÊNCIAS

Anjos-Silva, E. 2001. Conservação de Bromélias, Orquídeas e Cactus do Cerrado. *In* Resumos do 12 Encontro

de Biólogos do Conselho Regional de Biologia – (CRBio-1 Conselho Federal de Biologia, org). Mato Grosso do Sul, p. 30-31.

Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33:197.

Arditti, J., Ernst, R., Yam, T.W. & Glabe, C. 1990. The contributions of orchid mycorrhizae fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana*, 5(4):249-255.

Colombo, A.L., Faria, T.R., Assis, A.M. & Fonseca, I.C.B. 2005. Aclimatação de um híbrido de *Cattleya* em substrato de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 27(1):145-150.

Fabbri, A., Sutter, E.G & Dunston, S.K. 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia Horticulture*, 28:331-337.

Freitas, E.M. de & Jasper, A. 2001. A. Avaliação da flora Orchidaceae de uma porção de Floresta Estacional Decidual do município de Lajeado, Rio Grande do Sul. *Pesquisas Botânica*, 51:113-127.

Grattapaglia, D. & Machado, M.A. 1990. Micropropagação. *In* Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas (A.C. Torres & L.S. Caldas, eds.). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, p. 99-170.

Grout, B.W.W. & Millam, S. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Annals of Botany*, 55:129-131.

Guerrant, E.O. & Kaye, T.N. 2007. Reintroduction of rare and endangered plants: common factors, questions and approaches. *Australian Journal of Botany*, 55:362-370.

Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. University of Califórnia, Berkeley, Circular 347, 139 p.

Kämpf, A.N. 2005. Produção comercial de plantas ornamentais. *Agrolivros*, Guaíba, 256 p.

Keithly, J.H.; Jones, D.P.; Yokoyama, H. 1991 Survival and Growth of Transplanted Orchid Seedlings Enhanced by DCPTA. *HortScience*, 26(10):1284-1286.

Kozai, T., Fujiwara, K., Hayashi, M. & Aitkem-Citristie, J. 1992. The in vitro environment and its control in micropopagation. *In* Transplant production systems. (K. Kurata & T. Kozai. ed.). Kluwer Academic, Dordrecht, p. 247-282.

Lone, A.B, Barbosa, C.M., Takahashi, L.S.A & Faria, R.T. 2008. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em

- substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 30(4):465-469.
- Mayer, J.L.S., Ribas, L.L.F., Bona, C. & Quoirin, M. 2008. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium Hort.* (Orchidaceae) cultivadas ex vitro e in vitro. *Acta Botanica Brasilica*, 22(2):323-332.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Rio Grande do Sul. Secretaria do Meio Ambiente 2002. Espécies da flora ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul. <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/espéciesameaçadas> (acesso em 16.03.2009).
- Rublo, A., Chavez, V. & Martinez, A. 1989 In vitro seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana*, 4:68-73.
- Seeni, S. & Latha, P.G. 2000. In vitro multiplication and eco-rehabilitation of the endangered Blue Vanda. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61:1-8.
- Silva, A.L.L., Franco, E.T.H., Horbach, A.M. & Walter, J.M. 2006. Aclimatização de Mudanças de *Cattleya tigrina* A. Rich. Ex Beer (Orchidaceae) em Sistema Hidropônico. *Caderno de Pesquisa. Série Biologia*, 18(1):129-139.
- Stancato, G.C., Bemelmans, P.F. & Vegro, C.L.R. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes in vitro e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 7(1):25-33.
- Sutteworth, F.C., Zim, H.S. & Dillon, G.W. 1982. Orquídeas: guia dos orquidófilos. *Expressão e Cultura*, Rio de Janeiro. 158 p.
- Vacin, E.F. & Went, F.W. 1949. Some pH changes in nutrient solution. *Botanical Gazette*, 110:605-617.
- Yamakami, J.K., Faria, R.T., Assis, A.M. & Oliveira, L.V.R. 2006. Cultivo de *Cattleya lindley* (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 28(4):523-526.

