



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PORTO NACIONAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE, ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO

LAÍS RAMOS ALVES

**ANÁLISE DA PROPAGAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL *IN VITRO*, E
ACLIAMATIZAÇÃO DE *Brassavola martiana* Lindl (ORCHIDACEAE)**

PORTO NACIONAL - TO

2018

LAÍS RAMOS ALVES

**ANÁLISE DA PROPAGAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL *IN VITRO*, E
ACLIAMATIZAÇÃO DE *Brassavola martiana* Lindl (ORCHIDACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Orientador: Dr. Wagner de Melo Ferreira

Co-Orientador: Dr. Horllys Gomes Barreto

PORTO NACIONAL (TO)

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

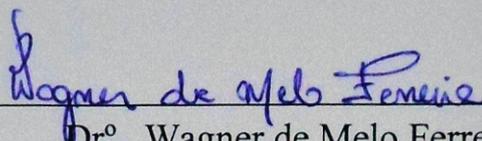
- A474a Alves, Laís Ramos.
ANÁLISE DA PROPAGAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL IN VITRO, E ACLIMATIZAÇÃO DE *Brassavola martiana* Lindl (ORCHIDACEAE). / Laís Ramos Alves. – Porto Nacional, TO, 2018.
44 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Porto Nacional - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, 2018.
Orientador: Wagner de Melo Ferreira
Coorientador: Horllys Gomes Barreto
1. Propagação in vitro. 2. Aclimatização. 3. Germinação. 4. Orquidea. I.
Título

CDD 577

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

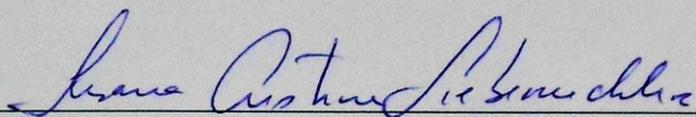
Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BANCA EXAMINADORA



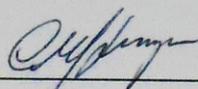
Drº. Wagner de Melo Ferreira

Universidade Federal do Tocantins - UFT (Presidente)



Drª. Susana Cristine Siebeneichler

Universidade Federal do Tocantins - UFT



Drº. Clovis Maurílio de Souza

Universidade Federal do Tocantins - UFT

Aprovada em: 16 de março de 2018

Local de defesa: Auditório do Neamb

Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Porto
Nacional - To

Dedico esse trabalho a todos os Biólogos pela árdua missão em defesa da vida nas suas mais diversas formas e belezas.

AGRADECIMENTOS

Todo aprendizado passa por caminhos imprevisíveis e a caminhada até um objetivo é árdua, mas cheia de recompensas. Durante esses dois anos testei meus limites, me desafiei, errei, acertei, aprendi, mas a melhor parte foram as pessoas que tive a oportunidade de conhecer e àquelas que já faziam parte da minha vida, das quais recebi muito apoio e carinho. A essas pessoas eu dedico meus agradecimentos.

A Deus, o sentido da minha vida.

Aos meus pais Helmo e Flausa, minha melhor escola, o livro mais perfeito e lindo que li. Com eles aprendi as melhores lições.

Aos meus irmãos Priscila e Lucas por serem os melhores presentes que ganhei de Deus. Com eles aprendi a partilhar.

Ao meu esposo Rotterdam Tulio, a parte que faltava em mim, pela compreensão. Com ele aprendi que posso voar mais longe.

A toda a minha família por terem acreditado que eu era capaz.

Ao meu orientador Wagner de M. Ferreira e ao co-orientador Horllys G. Barretos pelos aprendizados e pela amizade. Com eles aprendi que posso me superar sempre e que o conhecimento não tem limites.

Aos meus colegas de turma e amigos: Esmeralda, Roney, Marina, Orimar e Ozana pelos momentos que compartilhamos. Com eles aprendi a lidar com as dificuldades e o sentido da união.

Aos meus amigos do laboratório de Cultivo de Plantas *in vitro*, a família que ganhei na faculdade. Com eles aprendi o valor da cooperação e da empatia.

Aos meus amigos pela amizade. Com eles aprendi que uma vida sem amigos é uma vida vazia e sem sentido. Os amigos são presentes, surgem quando menos esperamos e com eles compartilhamos nossos maiores sonhos.

A todos que de alguma forma me permitiu ser um ser humano melhor.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação por todo o ensinamento durante esses anos, os quais contribuiu significativamente para me tornar um profissional mais capacitado.

Aos membros da banca pelo aceite do convite e pelas valiosas contribuições para a melhoria do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e a Universidade Federal do Tocantins pelo apoio.

Obrigada a todos!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

A família Orchidaceae apresenta imensa diversidade taxonômica, bioquímica, fisiológica e genética. Por essa razão não existe um modelo único que possibilite o sucesso na propagação *in vitro* para todas as suas espécies e variedades. Assim, esse trabalho teve como objetivo estudar aspectos envolvidos com a propagação, o desenvolvimento inicial *in vitro* e a aclimatização de *Brassavola martiana* Lindl., espécie ocorrente no estado do Tocantins. Testou-se os efeitos dos meios de cultura de Knudson C [KC], de Vacin e Went [VW] e de Murashige e Skoog nas concentrações de 100 e 50% de seus macronutrientes [MS e ½MS] na germinação e desenvolvimento inicial *in vitro*. Analisou-se também a influência da idade das sementes no processo germinativo. Foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações de sacarose (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6%) bem como do ácido naftalenoacético (ANA) e da benziladenina (BA) em combinações de 0; 0,57; e 2,28 µM na multiplicação e desenvolvimento de plantas, em experimentos separados. Verificou-se também a possibilidade de se multiplicar a espécie por meio de segmentos caulinares estiolados. Por fim, foi desenvolvido um protocolo para aclimatização de *B. martiana* utilizando-se substratos comerciais. O meio ½MS foi o mais promissor para a germinação de *B. martiana*, enquanto que o KC foi o melhor para o desenvolvimento dos protocormos e formação de novas plantas. Para a obtenção de uma germinabilidade superior a 60% recomenda-se utilizar sementes com pelo menos 7 meses de idade. A adição de 3% de sacarose ao meio de cultura favoreceu a multiplicação e desenvolvimento *in vitro*. O uso de concentrações iguais de ANA e BA (0,57 µM) favoreceu o desenvolvimento tanto da parte aérea quanto das raízes. A utilização de segmentos caulinares estiolados foi eficaz para a propagação de *B. martiana*. Para a aclimatização, as plantas de *B. martiana* devem inicialmente serem transferidas para recipientes comunitários contendo o substrato Bioplant e após oito semanas transplantadas para vasos individuais contendo o substrato Ouro Negro e cultivados durante 90 dias. A porcentagem de sobrevivência das plantas foi considerada satisfatória.

Palavras-Chave: Propagação *in vitro*, germinação, aclimatização

ABSTRACT

The Orchidaceae family presents immense taxonomic, biochemical, physiological and genetic diversity. For this reason, there is no single model that allows the success of *in vitro* propagation for all species and varieties. Thus, the objective of this work was to study aspects involved in the propagation, initial *in vitro* development and acclimatization of *Brassavola martiana* Lindl., A species occurring in the state of Tocantins. The effects of the cultivation media of Knudson C [KC], Vacin and Went [VW] and Murashige and Skoog at the concentrations of 100 and 50% of their macronutrients [MS and ½MS] on initial *in vitro* germination and development. The influence of seed age on the germination process was also analyzed. The effects of different concentrations of sucrose (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% and 6%) as well as naphthaleneacetic acid (ANA) and benzyladenine (BA) were evaluated in combinations of 0; 0.57; and 2.28 µM in plant multiplication and development, in separate experiments. It was also verified the possibility of multiplying the species by means of stretched cauline segments. Finally, a protocol for the acclimatization of *B. martiana* was developed using commercial substrates. The ½MS medium was the most promising for the germination of *B. martiana*, while the KC was the best for the development of protocorms and formation of new plants. To obtain germinability higher than 60%, it is recommended to use seeds at least 7 months old. The addition of 3% sucrose to the culture medium favored multiplication and development *in vitro*. The use of equal concentrations of ANA and BA (0.57 µM) favored the development of both shoot and roots. The use of styrofoam segments was effective for the propagation of *B. martiana*. For acclimatization, *B. martiana* plants should initially be transferred to community vessels containing the Bioplant substrate and after eight weeks transplanted into individual pots containing the Ouro Negro substrate and cultured for 90 days. The percentage of plant survival was considered satisfactory.

Key words: *In vitro* propagation, germination, acclimatization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	07
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	09
2.1 Espécie estudada.....	09
2.2 Influência dos meios de cultura na germinação <i>in vitro</i>	10
2.3 Efeitos da sacarose na multiplicação e desenvolvimento <i>in vitro</i>	11
2.4 Efeitos de fitohormônios na multiplicação e crescimento <i>in vitro</i>	12
2.5 Micropropagação a partir de segmentos caulinares estiolados.....	13
2.6 Influência da idade das sementes na germinação	14
2.7 Aclimatização.....	14
2.8 Análises estatísticas.....	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
3.1 Influência dos meios de cultura na germinação <i>in vitro</i>	15
3.2 Efeitos da sacarose na multiplicação e desenvolvimento <i>in vitro</i>	20
3.3 Efeitos de fitohormônios na multiplicação e crescimento <i>in vitro</i>	23
3.4 Micropropagação a partir de segmentos caulinares estiolados.....	25
3.5 Influência da idade das sementes na germinação	27
3.6 Aclimatização.....	28
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Considerada uma das maiores e mais diversificadas família de plantas, a Orchidaceae possui, aproximadamente, 35.000 espécies distribuídas em 800 gêneros; desses, 200 gêneros e 2.300 espécies ocorrem naturalmente no Brasil (FARIA et al., 2012). O elevado número de espécies e híbridos de orquídeas tropicais propicia a existência de uma gama de variadas formas e cores de flores (SOARES et al., 2011) e tornam essas espécies as mais cobiçadas e exploradas mundialmente (FARIA et al., 2006).

Espécies epifíticas, como representantes dos gêneros *Cattleya*, *Laelia* e *Brassavola*, de ocorrência natural no Brasil (PAULA; SILVA, 2001), são muito apreciadas e de importante interesse econômico, pois são bastante procuradas por colecionadores, orquidófilos e decoradores. No entanto, em decorrência da frequente destruição de seus habitats naturais, somado ao comércio e exploração ilegal devido às suas características ornamentais, muitas espécies de orquídeas estão desaparecendo na natureza em níveis preocupantes, levando inúmeras espécies à extinção (GALDIANO JÚNIOR et al., 2012; SCHNEIDERS et al., 2012).

Além disso, as sementes de orquídeas são desprovidas de cotilédone e apresentam endospermas extremamente reduzidos, o que compromete a nutrição do embrião durante o processo germinativo (FERREIRA et al., 2010) e dependem exclusivamente da associação com fungos micorrízicos específicos para completar seu desenvolvimento (AGUSTINI; SUFAATI; SUHARNOZ, 2009). Entretanto, com a utilização das técnicas de multiplicação *in vitro*, espécies vulneráveis a extinção podem se tornar disponíveis em grandes quantidades e, desse modo, será possível reduzir a extração não controlada do ambiente bem como utilizá-las em programas de reintrodução das espécies em seus habitats naturais (SOARES et al., 2012).

Por meio do cultivo *in vitro* de plantas é possível também realizar a multiplicação das plantas, em espaço físico reduzido e em curto intervalo de tempo (GEORGE, 1993). É extensa a literatura difundida acerca do cultivo *in vitro* de orquídeas e há muitas variações entre os protocolos estabelecidos (TAN et al., 2011; VASUDEVAN; STADEN, 2011; DEB: PONGENER, 2012; CAMARGO et al., 2015; SILVA et al., 2017; SANTOS; GIANINI; PEDROSO-DE-MORAIS, 2017; MENGARDA et al., 2017).

De modo geral, são utilizados explantes oriundos de órgãos vegetativos capazes de regenerar uma planta inteira. Contudo, em vários casos adota-se também o uso de sementes como forma de propagação das espécies. 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. Atualmente, essa técnica é bastante utilizada e, por meio dela, muitas espécies são literalmente salvas da extinção (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

O sucesso na tecnologia e aplicação dos métodos de multiplicação *in vitro* deve-se à melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e dos tecidos em cultura (SCHNEIDERS et al., 2012). O meio nutritivo a ser utilizado precisa fornecer todas as substâncias essenciais para a germinação e desenvolvimento *in vitro* (SOARES et al., 2012). Cada etapa desse processo exige uma necessidade nutricional específica (JORGE; JURAS; SUZUKI, 2015) e a fórmula do meio de cultura deve conter os nutrientes de acordo com as exigências de cada espécie (FARIA et al., 2002).

Como a família Orchidaceae apresenta imensa diversidade taxonômica, bioquímica, fisiológica e genética, não existe um modelo único que possibilite o sucesso na propagação *in vitro* de todas as espécies e variedades (KERBAUY, 2011), sendo de fundamental importância considerar tais exigências, que incluem também os nutrientes utilizados (SUZUKI et al., 2009), fonte e concentração de carboidratos (BESSON et al., 2010), concentrações de reguladores de crescimento (MENGARDA et al., 2017), dentre outros, que também podem influenciar a germinação e o crescimento dessas espécies *in vitro*.

Em meios de cultivo, além dos nutrientes minerais, a incorporação de açúcares é também imprescindível. Como no cultivo *in vitro* as plântulas não são suficientemente autotróficas, faz-se necessário a adição de uma fonte de carbono ao meio de cultura (FARIA et al., 2012). Segundo esses autores, o principal carboidrato utilizado nesse tipo de cultivo é a sacarose. A fonte e a concentração de açúcares incorporados ao meio de cultura podem interferir no desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies, incluindo as orquídeas.

Outros componentes acrescentados ao meio de cultura são as vitaminas e os reguladores de crescimento. As vitaminas funcionam como cofatores enzimáticos e em condições naturais as plantas sintetizam essas substâncias para utilizá-las em seu crescimento e desenvolvimento (FARIA et al., 2012).

Os reguladores de crescimento ou hormônios vegetais, por sua vez, influenciam a regulação do metabolismo, crescimento e morfogênese, e suas concentrações adequadas variam de acordo com o tipo de explante, da espécie e cultivares dentro de uma mesma espécie (LIMA et al., 2002). Para isso, diversos autores relatam a importância da suplementação do meio de cultura com combinações de reguladores de crescimento a fim de garantir a eficiência dessa técnica (MORAIS et al., 2012). Segundo Melo et al. (2001), a

adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem como principal papel suprir prováveis deficiências endógenas de hormônios nos explantes. Dessa forma, o sucesso do cultivo *in vitro* está diretamente relacionado com a manipulação isolada ou combinada de reguladores de crescimento (VIDAL; DINIZ; SILVA, 2013).

O êxito do cultivo *in vitro* também depende da adaptação da planta a uma condição *ex vitro*. As plantas durante seus ciclos de vida nem sempre encontram condições ambientais onde todos os fatores sejam favoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento. Assim, antes de serem transferidas para o ambiente natural, plantas produzidas *in vitro* precisam ser gradativamente aclimatizadas para que se tornem capazes de suportar eficientemente as condições naturais.

Portanto, a fase de aclimatização se apresenta como um dos maiores desafios para o cultivo *in vitro* e como uma das mais difíceis etapas para o estabelecimento de uma nova planta no ambiente natural (TOMBOLATO; COSTA, 1998). O sucesso dessa fase depende também do tipo de substrato a ser utilizado para o transplante, que deve ter boa capacidade de retenção de água e, ao mesmo tempo, propiciar condições favoráveis para as trocas gasosas das raízes (KÄMPF, 2000). Assim, após o estabelecimento de um protocolo eficaz de aclimatização, é possível reintroduzir as espécies em seus ambientes naturais.

Levando-se em consideração o exposto acima, este trabalho teve por objetivo estudar aspectos envolvidos com a propagação e o desenvolvimento inicial *in vitro* de *Brassavola martiana* Lindl. (Orchidaceae) bem como desenvolver um protocolo para sua aclimatização, visando gerar informações úteis para estudos botânicos e para sua conservação.

2 MATERIAS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultivo de Plantas *in vitro* da Seção de Propagação e Desenvolvimento de Plantas do Cerrado, no Núcleo de Estudos Ambientais (Neamb) da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus de Porto Nacional.

2.1 Espécie estudada

A família *Orchidaceae* é constituída de grande número de gêneros, espécies e híbridos e, dentre os principais gêneros encontrados no Brasil, destaca-se o gênero *Brassavola* (FARIA et al., 2012). *Brassavola martiana* Lindl. (Figura 1) é uma espécie epífita e semi-umbrófila.

Possui folha única, disposta no ápice de pseudobulbo roliço e quase imperceptível, que apresenta forma arcuada a ereta, persistente, filiforme, sulcada, alongada, estreita, com cerca de 23-30 cm de comprimento e 0,5-1 cm de largura (BONATES, 1993).

Esta espécie possui elevado valor ornamental, pois além da sua rusticidade, apresenta floração bastante abundante e duradoura, produzindo inflorescências com flores alvas e labelo internamente amarelo. Além disso, o gênero *Brassavola* é importante economicamente por originar híbridos do intercruzamento com *Cattleya*, *Laelia* e *Epidendrum* (SOARES et al., 2012).

B. martiana é uma espécie nativa no Brasil, porém não é endêmica. Sua distribuição no Brasil compreende os estados de Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima. É encontrada em florestas ciliares ou de galeria, florestas de igapó e de várzea e na savana amazônica (BARROS et al., 2015). Não há registros na literatura de sua ocorrência no estado do Tocantins, porém os indivíduos utilizados no presente estudo foram coletados nos municípios de Lagoa da Confusão e Ipueiras, de acordo com os registros no Herbário do Tocantins (n° 7338 e n° 8986).

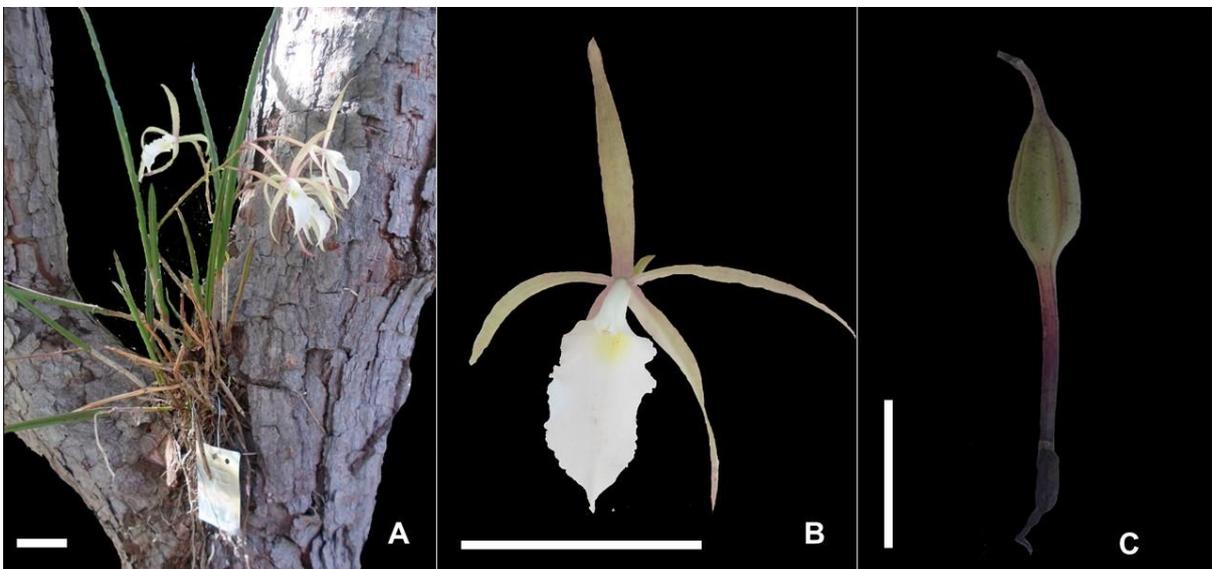


Figura 1- A- Indivíduo de *Brassavola martiana* em área natural na Universidade Federal do Tocantins, Campus de Porto Nacional; B- Flor, C- Fruto. (Barras = 3 cm).

2.2 Influência dos meios de cultura na germinação *in vitro*

Sementes oriundas de frutos coletados em 2015, provenientes de indivíduos crescendo no viveiro de plantas da Universidade Federal do Tocantins, campus de Porto Nacional, foram

utilizadas no presente estudo. Previamente à sementeira, as sementes foram embebidas em água autoclavada e deionizada por 30 minutos antes da assepsia. O processo de assepsia consistiu na imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio comercial na concentração de 15% [v/v], adicionada de algumas gotas de detergente doméstico, mantida sob agitação durante 10 minutos, seguidos de duas lavagens de 15 minutos cada com água autoclavada e deionizada. Todo esse processo foi realizado em uma câmara de fluxo laminar.

Logo após a desinfestação das sementes, a fim de se testar o melhor meio para a germinação, as mesmas foram inoculadas em frascos com capacidade de 90 mL contendo 25 mL dos meios de cultura de Knudson C (1946) [KC], de Vacin e Went (1949) [VW] e de Murashige e Skoog (1962) nas concentrações de 100 e 50% de seus macronutrientes [MS e ½MS], todos suplementados com 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol e 2% de sacarose, totalizando 10 frascos por tratamento. Os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $35\text{-}40 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$.

A análise da taxa de germinação foi realizada conforme Suzuki et al. (2009). Trinta dias após os primeiros indícios de germinação (visualizado pela presença de material clorofilado no meio de cultura) foi realizada a contagem das sementes germinadas (5 repetições/tratamento). Foram consideradas germinadas as sementes com embrião entumescido, designado de fase de protocormo. Essa contagem foi feita com o auxílio de um microscópio estereoscópico (marca MIKROS), utilizando três lâminas quadriculadas para cada repetição.

Noventa dias após o início da germinação os indivíduos contidos em cinco repetições por tratamento foram avaliados de acordo com a quantidade de órgãos sobre eles formados. Foram considerados quatro estágios de desenvolvimento: estágio 1 - protocormo (embriões entumescidos de coloração verde); estágio 2 – protocormo com uma folha; estágio 3 – protocormo com duas folhas e estágio 4 – plântula (folhas e raízes). Com base nessa avaliação foi calculado o índice de crescimento baseado em Spoerl (1948): as porcentagens de indivíduos obtidos para cada estágio de desenvolvimento, em cada repetição, foram multiplicadas pelos pesos 1, 2, 3 e 4 de acordo com os respectivos estágios. O índice de crescimento de cada repetição foi dado pela média da somatória de todos os estágios de desenvolvimento nelas presentes.

2.3 Efeitos da sacarose na multiplicação e desenvolvimento *in vitro*

Estudou-se a influência de diferentes concentrações de sacarose (1, 2, 3, 4, 5 e 6%, além do controle - ausência do carboidrato) na multiplicação e desenvolvimento *in vitro* de *B. maritima*. Foram utilizadas plantas ($1,5 \pm 0,5$ cm de comprimento), oriundas da germinação *in vitro*, cujas raízes foram completamente removidas. O experimento foi composto de 6 repetições por tratamento.

Cada repetição consistiu em um frasco com volume de 125 mL contendo 50 mL de meio KC contendo os mesmos suplementos citados no item 2.2, no qual foram colocadas 5 plantas (n=30). Os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfuradas, cujos furos foram preenchidos com pequenos tufo de algodão que foram umedecidos com uma solução de permanganato de potássio após a inoculação dos explantes. As condições experimentais foram as mesmas descritas para o experimento de germinação.

Os resultados foram avaliados pelas seguintes variáveis: número de brotos e raízes formados/explante, comprimento do maior broto (medida da base até a gema apical) e da maior raiz, e massas da matéria seca dos brotos e das raízes após 120 dias de cultivo. Para as medições das massas secas, as plantas foram separadas, com auxílio de um bisturi em brotos e raízes, que foram colocadas individualmente em sacos de papel e submetidas à estufa (a 45°C) por aproximadamente 5 dias.

2.4 Efeitos de fitohormônios na multiplicação e crescimento *in vitro*

Para avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura, foram utilizados a benziladenina [BA] e o ácido naftalenoacético [ANA], em diferentes combinações de 0,57 e 2,28 μM , além do controle (ausência de hormônios), conforme apresentado na Tabela 1. Foram utilizadas plantas ($1,5 \pm 0,5$ cm de comprimento) oriundas da germinação *in vitro*, cujas raízes foram completamente removidas. O experimento foi composto de 6 repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de um frasco com volume de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura, no qual foram colocadas 5 plantas (n=30). Os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfuradas, cujos furos foram preenchidos com pequenos tufo de algodão que foram umedecidos com uma solução de permanganato de potássio após a inoculação dos explantes. As condições experimentais foram as mesmas descritas para o experimento de germinação, e as variáveis analisadas foram as mesmas descritas no experimento de sacarose.

Tabela 1 - Combinações dos reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) e benziladenina (BA) utilizados para avaliar o desenvolvimento inicial *in vitro* de *Brassavola martiana*.

Tratamentos	Hormônios	
	ANA (μM)	BA (μM)
1	0,0	0,0
2	0,0	0,57
3	0,0	2,28
4	0,57	0,0
5	0,57	0,57
6	0,57	2,28
7	2,28	0,0
8	2,28	0,57
9	2,28	2,28

2.5 Micropropagação a partir de segmentos caulinares estiolados

Para verificar a possibilidade de multiplicar a espécie por meio de segmentos de caules estiolados, plantas com $3 \pm 0,2$ cm de comprimento oriundas da germinação foram transferidas para frascos de 150 mL contendo o meio KC (que proporcionou o melhor resultado de crescimento), acrescido de 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol e 4% de sacarose, conforme Ferreira et al. (2011).

Os frascos de vidro contendo 50 mL de meio de cultura foram mantidos no escuro por 180 dias à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Com o estiolamento dos caules, os mesmos foram seccionados em segmentos de cerca de 1 cm contendo pelo menos uma gema axilar os quais foram transferidos para frascos de mesma composição de meio de cultura, exceto pela concentração de sacarose que foi reduzida para 2%. Foram utilizadas duas combinações de reguladores de crescimento: 2,28 μM de BA e 0,57 μM de ANA e 4,56 μM de BA e 1,14 μM de ANA e o tratamento controle que consistiu na ausência de reguladores. Foram utilizados 5 frascos de 100 mL, contendo 25 mL de meio de cultura onde foram inoculados 5 segmentos caulinares estiolados. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento na presença de luz nas mesmas condições ambientais descritas para o experimento de germinação. Os resultados foram avaliados 60 dias após a transferência para a presença de luz. Foi considerada para a análise a porcentagem de segmentos caulinares estiolados que originaram brotos.

2.6 Influência da idade das sementes na germinação

Com a finalidade de testar a influência da idade das sementes de *B. martiana* no processo germinativo, foram feitas polinizações manuais em quatro matrizes localizadas na casa de vegetação e duas distribuídas em forófitos (*Curatella americana* L. e *Sheflera morototoni*) no Campus de Porto Nacional da Universidade Federal do Tocantins. Empregou-se tanto a autopolinização quanto a polinização cruzada. A polinização foi feita no período de janeiro a março de 2017, época em que as plantas floresceram. Os frutos resultantes da polinização foram coletados aproximadamente 3 meses após a polinização e tiveram suas sementes inoculadas em meio de cultura após passarem por processo de assepsia descrito no item 2.2. Sementes oriundas de frutos resultantes da autopolinização foram postas para germinar 30, 60 e 120 dias após a polinização (DAP), enquanto que aquelas oriundas de frutos resultantes da polinização cruzada foram semeadas 150, 180 e 210 DAP. Após 30 dias da inoculação foi feita a contagem de sementes que germinaram.

2.7 Aclimatização

A etapa inicial da aclimatização consistiu na retirada das plantas do meio de cultura e plantio em substrato sólido. Foram selecionadas 60 plantas (com raízes e folhas já formados), retiradas dos frascos e lavadas em água corrente para a retirada de meio de cultura. Antes do plantio em substrato, foram feitas medições de números de folhas, raízes e altura dos indivíduos. O experimento foi dividido em duas fases. Na Fase 1, as plantas foram transferidas para 3 recipientes plásticos 9 cm altura x 19 cm largura e 29 cm comprimento com tampas (20 plântulas/ recipiente) contendo um substrato composto por Bioplant [Nova Ponte, MG] (Tabela 2) acrescido de Esfagno triturado nas proporções de 1:0, 1:1; 2:1. Os recipientes foram mantidos em sala de crescimento com uma irrigação de 250 mL de água por dia, por meio de aspersão. Quatro semanas após a transferência das plantas os potes tiveram suas tampas removidas. Após 60 dias do plantio, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, número de folhas, brotos e raízes formadas, comprimento do maior broto (medida da base até a gema apical) e da maior raiz. Após a medição, as plantas foram transferidas para vasos plásticos individuais, medindo 7 cm altura x 7 cm de diâmetro basal com quatro furos na parte inferior, contendo dois substratos Ouro Negro e Bioplant (Tabela 2) nas proporções de 0:1; 1:0; 1:1; 2:1 e 3:1 (Fase 2). Para evitar o efeito do tratamento da Fase 1 na Fase 2, as plantas de cada tratamento da primeira fase foram distribuídas aleatoriamente dentro de todos os

tratamentos da Fase 2. A irrigação do substrato foi feita diariamente até o ponto de capacidade de campo do substrato e as plantas tiveram suas folhas aspergidas com água. Após 90 dias a análise do experimento foi realizada utilizando-se as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência, número de folhas, brotos e raízes formadas, bem como as massas da matéria seca da parte aérea e das raízes.

Tabela 2 - Composição dos substratos, de acordo com as especificações em suas respectivas embalagens, utilizados na aclimatização de *Brassavola martiana*.

COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS	
Bioplant	Ouro Negro
Casca de pinus, Esterco	Casca de pinus
Serragem, Fibra de coco	Fibra de coco
Vermiculita, Casca de arroz	Pó de coco
Cinzas, Gesso agrícola	Elementos minerais
Carbonato de cálcio, Magnésio	(macro e micro nutrientes)
Termofosfato magnésiano	
Aditivos (fertilizantes)	

2.8 Análises estatísticas

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado. Para avaliar os dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados utilizando o Programa R (versão 3.4.2).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência dos meios de cultura na germinação *in vitro*

O início da germinação das sementes de *B. martiana* foi observado aos 15 dias após a inoculação no meio de cultura, fato esse observado também para a espécie *Brassavola tuberculata* (ROSA et al., 2012). Encontra-se na literatura uma variedade de trabalhos sobre o tempo de germinação das espécies de orquídeas e isso está intimamente relacionada as especificidades de cada espécie. Protocormos de *Cattleya bicolor* foram visualizados 20 dias após a inoculação das sementes (SANTOS et al., 2007), enquanto que os de *Cattleya forbesii*

foram observados 30 dias após a sementeira (SCHNEIDERS et al., 2012). Para a espécie *Oncidium flexuosum*, Pereira et al. (2005) observaram protocormos aos 7 dias após a inoculação das sementes.

Para espécies ocorrentes no Tocantins, trabalhos realizados no Laboratório de Cultivo *in vitro* da UFT evidenciam tempos de germinação também variados, o que corrobora a variação no tempo germinativo encontrado para espécies nativas de outras regiões. Ferreira et al. (2017) observaram os primeiros indícios de germinação em *Alatiglossum fuscopetalum* aos 10 dias após a inoculação de sementes, Oliveira (2015) e Ferreira et al. (2018, no prelo) relataram que a germinação de sementes de *Encyclia flava* e *Catasetum macrocarpum*, respectivamente, iniciou 15 dias após a sementeira, enquanto que Oliveira (2016) verificou que para a espécie *Cyrtopodium paludicolum* os primeiros indícios de germinação aconteceram apenas após 21 dias de cultivo.

Em relação à influência do meio na germinação, foi constatado que o meio $\frac{1}{2}$ MS apresentou germinabilidade de 62,21%, resultado esse superior aos outros meios testados (Tabela 3). Os meios KC e VW foram semelhantes estatisticamente, apresentando 39,14% e 35,91%, respectivamente. Por outro lado, o meio MS apresentou resultado bem abaixo da média, onde apenas 14,33% das sementes germinaram. É possível que por ser rico em nutrientes, o meio MS tenha provocado a inibição na germinação de *B. martiana*, espécie epifítica que naturalmente se desenvolve em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes.

Conforme Ferreira et al. (2011), a germinabilidade de orquídeas em cultivos assimióticos varia entre 50 e 95%, podendo chegar até 100%. Entretanto, algumas espécies podem apresentar germinabilidade abaixo desses valores como o que foi verificado em *B. martiana*. Jorge; Juras; Suzuki (2015) observaram que a maior porcentagem de germinação em *Cattleya warneri* foi obtida utilizando os meios MS e $\frac{1}{2}$ MS (88% e 86%, respectivamente), quando comparados com os meios KC e VW (34% e 46%, respectivamente). Segundo Ferreira et al. (2017) o meio de cultura mais adequado para a germinação de sementes de *Alatiglossum fuscopetalum* foi o $\frac{1}{2}$ MS, resultado semelhante ao encontrado para *B. martiana*.

Em contrapartida, alguns estudos encontraram resultados distintos em relação a porcentagem de germinação, como no caso de *Cattleya bicolor* onde o melhor meio de cultura foi o VW [66%] (SUZUKI et al., 2010), enquanto que em *Hadrolaelia tenebrosa* o meio mais promissor foi o KC [67%] (SUZUKI et al., 2009). Trinta dias após a sementeira *in vitro* de

Cattleya loddigesii, o meio MS (78%) e o meio VW (74%) propiciaram as maiores taxas de germinação (ABRÃO et al., 2014). O meio ½MS, em comparação com o MS, tem se mostrado satisfatório para algumas espécies cultivadas *in vitro* e favoreceu um maior percentual germinativo de sementes de *Cattleya labiata*, assim como nos híbridos de *Cattleya violacea* estriata pedrinho x *Cattleya violacea* pedrinho e *Cattleya violacea* pedrinho x *Cattleya violacea* (MELO et al., 2015).

Tabela 3. Germinabilidade de *Brassavola martiana*. MS e ½MS = Murashige e Skoog, KC = Knudson e VW = Vacin e Went. Os valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Meio de Cultura	Germinabilidade (%)
MS	14,33 c
½MS	62,21 a
KC	39,14 b
VW	35,91 b

Dados da literatura comprovam que espécies de orquídeas epífitas cultivadas *in vitro* não são exigentes quanto às concentrações de sais minerais no meio (MORAES et al., 2009; CORDEIRO et al., 2011; CUNHA et al., 2011), uma vez que vivem em ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes (STANCATO, 2008). Além disso, sob o ponto de vista financeiro, essa redução de 50% dos macronutrientes do meio MS é favorável a contenção de custos para produção (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). A espécie *B. martiana*, assim como outras espécies de epífitas, não necessita de grande demanda por nutrientes minerais para o desenvolvimento do embrião e a conseqüente germinação.

Em relação especificamente ao nitrogênio presente no meio de cultura, Morais et al. (2012) observaram que o meio MS apresentou baixa taxa de germinação para a orquídea *Vanilla planifolia*, o que segundo os autores pode estar associado à concentração de nitrogênio no meio e à função metabólica desse elemento, onde as altas concentrações de amônio e nitrato podem inibir a germinação, o mesmo pode ter ocorrido com *B. martiana* no meio MS o qual proporcionou a taxa germinativa mais baixa.

Há uma relação entre os nutrientes presentes no meio de cultura e a germinação, e foi descrita por Kauth; Vendrame; Kane (2006) em estudos com a espécie *Calopogon tuberosus* onde foi verificado que uma maior concentração de amônio em relação ao nitrato no meio de

cultura foi benéfica para a germinação dessa espécie. Contudo, existem espécies que apresentam outras exigências, como no caso de *Hadrolaelia tenebrosa*, onde a melhor taxa de germinação foi observada no meio KC no qual a relação nitrato/amônio é igual a 1,1 (SUZUKI et al., 2009). Segundo esses autores é possível que essa espécie necessite de concentrações semelhantes de nitrato e amônio. No caso de *B. martiana* essa relação é de 1,9 no meio MS meia força, o que mostra que uma maior concentração de nitrato em relação a amônio foi importante para a germinação dessa espécie.

Outro fator importante observado é que a ausência de citocininas no meio não afetou a germinação de *B. martiana*. Esse grupo hormonal participa da mobilização dos lipídios, substâncias de reserva contida no embrião das orquídeas e que são utilizadas durante a germinação (SUZUKI et al., 2009). As sementes de *H. tenebrosa*, assim como as sementes de *B. martiana*, germinaram em meios destituídos de citocininas, o que denota já disporem de adequado nível endógeno dessa classe hormonal (SUZUKI et al., 2009). Em conjunto, esses resultados evidenciam que a escolha do meio de cultura é importante para o processo de germinação e varia entre espécies (SUZUKI et al., 2009).

A análise do crescimento inicial pós-germinativo de *B. martiana* verificada aos 90 dias após a semeadura e avaliada por meio do índice de crescimento foi dividida em quatro fases que levam em consideração o desenvolvimento do protocormo até a formação da plântula.

A estrutura esférica e clorofilada denominada de protocormo (Figura 2A– estágio 1) se desenvolve a partir do intumescimento do embrião e é constituído por um conjunto de células parenquimáticas, revestidas pela epiderme (KRAUS et al., 2006). Após alguns dias é possível observar a formação da primeira folha (Figura 2B- – estágio 2). Logo em seguida começa a surgir duas ou mais folhas na porção superior do protocormo (Figura 2C- estágio 3) enquanto que na porção inferior ocorre o surgimento da raiz (Figura 2D- estágio 4). O surgimento de uma ou mais raízes marca o fim do estágio de protocormo e o início da formação da plântula.

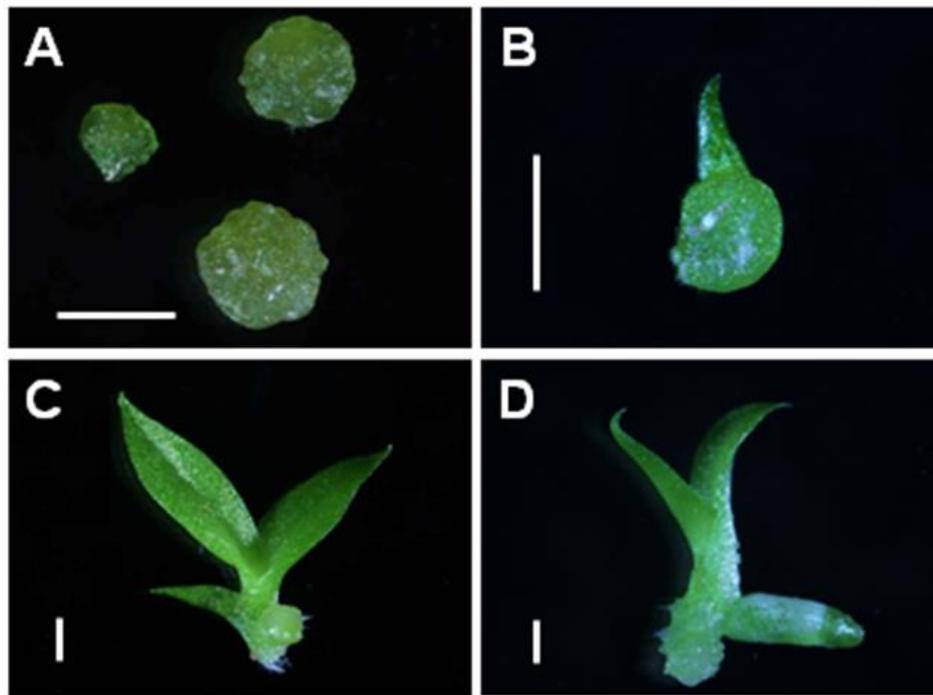


Figura 2 - Estágios de desenvolvimento de *Brassavola martiana* 90 dias após os primeiros indícios de germinação *in vitro*. A – protocormo clorofilado; B – protocormo com uma folha; C – protocormo com duas ou mais folhas; D – plântula com folhas e uma ou mais raízes. Barras = 1 mm.

Os resultados observados 90 dias após a germinação mostraram que os meios que proporcionaram melhores resultados em relação ao índice de crescimento foram o KC e VW, ambos não havendo diferenças significativas entre eles (Tabela 4). Com isso pode-se inferir que essa espécie após a germinação, ou seja, nas primeiras fases de seu crescimento, prefere meios menos ricos em nutrientes, que se assemelham às condições dos ambientes oligotróficos que naturalmente habitam. O meio KC possui 38% a mais de nitrato em relação ao meio VW, o que pode ter contribuído para um valor mais alto no índice de crescimento em *B. martiana*, embora estatisticamente esses meios não tenham apresentado diferença.

Tabela 4. Índice de crescimento de *Brassavola martiana* 90 dias após a germinação. MS e ½MS = Murashige e Skoog, KC = Knudson e VW = Vacin e Went. Os valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Meio de Cultura	Índice de crescimento
KC	354,81 a
VW	348,66 a
MS	298,93 b
½MS	280,27 b

Um fato importante a ser considerado para a espécie *B. martiana* é que ela parece possuir uma baixa demanda de nutrientes do meio tanto para a germinação, quanto para o posterior crescimento inicial pós-germinativo (90 dias), substituindo o meio ½MS mais favorável para a germinação pelo KC para o crescimento inicial. Uma explicação para essa substituição pode estar no fato de que o meio Knudson provoca um lento desenvolvimento inicial dos protocormos (de dois a três meses de cultivo após a sementeira *in vitro*) de algumas espécies de orquídeas, ocorrência essa relatada por Faria e Stancato (1998). Isso provavelmente explica porque só depois de 90 dias o meio Knudson se mostrou mais eficiente no desenvolvimento de *B. martiana*. Silva et al. (2017), estudando a orquídea epifítica *Cyrtopodium saintlegerianum*, verificaram que embora não tenha ocorrido uma diferença significativa entre os meios MS e KC foi possível observar que o meio KC foi o mais eficiente para a formação de folhas e raízes. Essa observação corrobora os resultados descritos por Melo et al. (2015) no qual afirmam que a baixa concentração de nutrientes no meio de cultivo induz o desenvolvimento de raízes e com isso melhora a absorção dos mesmos. Embora os meios KC e VW não tenham diferido estatisticamente, o meio KC apresentou resultados numericamente superiores e por essa razão foi utilizado nos experimentos seguintes.

3.2 Efeitos da sacarose na multiplicação e desenvolvimento *in vitro*

Os resultados relativos aos efeitos das concentrações de sacarose na multiplicação e desenvolvimento *in vitro* de *B. martiana* estão apresentados na Tabela 5. O tratamento com ausência de sacarose no meio (0%) não foi adequado para a espécie em estudo, circunstância

essa que levou a morte das plântulas. A ausência de sacarose afeta negativamente o desenvolvimento *in vitro* de orquídeas, fato esse também evidenciado por Ferreira et al. (2017). Plântulas cultivadas *in vitro* necessitam de uma oferta de carboidratos como fonte de energia, embora possam exibir algum grau de crescimento autotrófico (PINTO; FREITAS; PRAXEDES, 2010). Portanto, a ausência de carboidrato no meio impediu o desenvolvimento da espécie em estudo.

Tabela 5. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na multiplicação e desenvolvimento de *Brassavola martiana* após 120 dias de cultivo *in vitro*. NB = Número de brotos; CMB = comprimento do maior broto; NR = número de raízes; CMR = comprimento da maior raiz; MSR = massa da matéria seca de brotos; MSR = massa da matéria seca das raízes. ns = não significativo com a ANOVA ($\alpha = 5\%$).

Sacarose	Variáveis					
	NB	CMB (cm)	MSB (g)	NR	CMR (cm)	MSR (g)
1%	1,3 ns	0,6 ns	0,0140 ns	4,2 ns	1,7 ns	0,0108 ns
2%	1,7 ns	0,6 ns	0,0235 ns	4,8 ns	1,6 ns	0,0100 ns
3%	2,2 ns	0,7 ns	0,0193 ns	6,1 ns	1,6 ns	0,0124 ns
4%	2,2 ns	0,7 ns	0,0159 ns	6,5 ns	1,2 ns	0,0130 ns
5%	2,7 ns	0,9 ns	0,0192 ns	7,2 ns	1,5 ns	0,0165 ns
6%	1,3 ns	0,4 ns	0,0135 ns	4,4 ns	1,2 ns	0,0108 ns

Os tratamentos de 1 a 6% de sacarose não apresentaram diferenças estatísticas entre si (Tabela 5). Portanto, a avaliação foi feita com base nos valores numéricos para cada variável analisada. Em relação ao número de brotos e comprimento do maior broto, o tratamento com 5% de sacarose foi o mais eficaz. Entretanto, o maior acúmulo de massa seca nos brotos ocorreu em 2% desse carboidrato (Tabela 5).

No que se refere às raízes, tanto a formação quanto o acúmulo de massa seca foram mais favorecidos por 5% de sacarose, enquanto que o comprimento das raízes foi maior na concentração de 1%. Em geral, esses resultados mostraram que, embora os tratamentos não tenham diferido significativamente entre si, os valores mais elevados para a maioria das variáveis analisadas em *B. martiana* foram obtidos com a adição de 5% de sacarose ao meio de cultura.

Resultados semelhantes foram relatados por Junior; Sasamori; Droste (2014), estudando os efeitos de concentrações de sacarose variando de 1 a 6% no desenvolvimento *in vitro* da orquídea *Anathallis adenochila*. Eles observaram que a concentração de 6% foi a mais promissora no que diz respeito à altura da planta, número de folhas, número de raízes e

comprimento da maior raiz, tanto utilizando o meio MS quanto ½MS. Rego-Oliveira et al. (2003) também relataram que a concentração de 6% foi o melhor tratamento para as variáveis altura da planta, comprimento e formação de raízes e matéria fresca em *Oncidium varicosum*. Em conjunto esses resultados, incluindo os obtidos no presente trabalho, mostram que concentrações mais altas de sacarose favorecem o desenvolvimento de algumas espécies orquídeas.

No entanto, faz-se necessário salientar que alguns estudos mostram os efeitos negativos de concentrações acima de 5% de sacarose. Esses efeitos estão relacionados à diminuição do potencial osmótico do meio de cultura (ARDITTI; ERNST, 1992; PAIVA NETO; OTONI, 2003) e à inibição do processo fotossintético (CAPELLADES; LEMEUR; DEBERGH, 1991; HDIDER; DESJARDINS, 1994)

Os resultados obtidos para *B. martiana* são antagônicos àqueles encontrados por Galdiano Junior et al. (2013) onde o meio de cultura enriquecido com 2% de sacarose apresentou a maior eficiência para o crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii*, enquanto que Sorace et al. (2008) constataram que a concentração de 4% foi a mais eficaz para a formação e crescimento das raízes de *Oncidium baueri*. A adição de 3% de sacarose ao meio de cultura demonstrou ser mais eficiente para o desenvolvimento de algumas espécies de orquídeas descritas em diversos estudos como Dignart et al. (2009), com *Cattleya walkeriana*, Besson et al. (2010), com *Miltonia flavescens*, Fráguas et al. (2003) e Pivetta et al. (2010), com *Cattleya labiata* x *Laelia itambana* e *Caularthron bicornutum*, respectivamente.

Ferreira et al. (2017) constataram que concentrações de 1% a 3% de sacarose favoreceram o crescimento de *Alatiglossum fuscopetalum*. Assim, é possível afirmar que as exigências de sacarose no cultivo *in vitro* são diferentes entre espécies ou híbridos de orquídeas. As concentrações de 2% a 3% são comumente usadas em estudos com orquídeas *in vitro* (RODRIGUES et al., 2012; GALDIANO JUNIOR, 2013; BERKA, VENTURIERI; TEIXEIA, 2014; MENGARDA et al., 2017; SILVA et al., 2017) por suprir as necessidades da grande maioria das espécies e ter um custo menos elevado, mas existem algumas espécies que são mais exigentes quanto a essas concentrações.

Por fim, é importante salientar que a quantidade elevada de açúcares no meio de cultura é uma das razões que contribuem para um aumento considerável nos custos de produção de mudas propagadas *in vitro*, além de oportunizar o desenvolvimento de microorganismos o que, muitas vezes, dificulta o processo de aclimatização. Portanto, a

concentração ideal de sacarose deve ser analisada à luz dos objetivos que precisam ser alcançados.

Na concentração de 2% de sacarose, 70% da biomassa acumulada foi deslocada para a parte aérea, enquanto que no tratamento utilizando 3% de sacarose 61 % da biomassa total foi alocada para a parte aérea. Verifica-se então que em relação as raízes o tratamento com 3% de sacarose é 30% superior ao tratamento a 2%. Esse maior aporte de biomassa para as raízes somado ao maior número de brotos e raízes formados pode favorecer o processo de aclimatização.

Assim, considerando o exposto acima, o fato de que os resultados obtidos não apresentaram diferenças estatísticas e que as plantas de *B. martiana* se desenvolveu satisfatoriamente em concentrações mais baixas de sacarose, apresentando um bom vigor, recomenda-se a utilização de 3% de sacarose para o cultivo *in vitro* de *B. martiana*.

3.3 Efeitos de fitohormônios na multiplicação e crescimento *in vitro*

Os resultados dos efeitos dos fitohormônios na multiplicação de *B. martiana* estão dispostos na Tabela 6. Para as variáveis número, comprimento e massa da matéria seca de brotos, e comprimento da maior raiz não houve diferença significativa entre os tratamentos. Esses resultados refletem um coeficiente de variação alto para essas variáveis como indicado na Tabela 6. Isso muito provavelmente resulta do fato de que as plantas são oriundas de sementes e assim, apresentam grande variabilidade genética. Em relação ao número de brotos e raízes a adição de 0,57 μ M de ANA em conjunto com 0,57 μ M de BA ao meio de cultura foi o melhor tratamento. Oliveira (2015), estudando a espécie *Encyclia flava* encontrou resultados semelhantes usando essas mesmas concentrações de ANA e BA. Segundo esse autor, a presença de uma fonte de citocinina, até determinada concentração, é favorável para a formação de brotos, e em alguns casos a utilização simultânea de uma auxina e uma citocinina pode favorecer esse processo, como observado para a espécie *B. martiana*.

A utilização conjunta desses fitohormônios nas mesmas concentrações (0,57 μ M) foi considerada ótima para a espécie em estudo, uma vez que foi importante tanto para o desenvolvimento da parte aérea, quanto para a parte radicial, embora para a maioria das variáveis analisadas não tenham apresentado diferenças estatísticas. Além disso, verificou-se, com base nos resultados obtidos, que concentrações mais altas de auxinas causaram uma

diminuição na formação de brotos. Verificou-se que a formação de raízes foi prejudicada pelo aumento na concentração do BA, na presença do ANA.

Resultados bastante semelhantes foram obtidos por Ferreira et al. (2018, no prelo) em *Catasssetum macrocarpum*. Em *Alatiglossum fuscopetalum* Ferreira et al. (2017) também verificaram que o aumento na concentração do BA na presença da auxina AIB provocou uma redução no número de raízes formadas. Em conjunto esses resultados mostram que para essas três espécies de orquídeas concentrações crescentes de BA na presença de uma auxina reverte o efeito promotor das auxinas na formação de raízes.

Tabela 6. Efeito dos reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) e da benziladenina (BA) na multiplicação e crescimento de *Brassavola martiana* após 120 dias de cultivo *in vitro*. NB = Número de brotos (cv 52,5); CMB = comprimento do maior broto (cv 26,9); MSB = massa da matéria seca de brotos (cv 49,1); NR = número de raízes (cv 34,0); CMR = comprimento da maior raiz (cv 73,3); MSR = massa da matéria seca das raízes (cv 48,6). Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Tratamentos ANA/BA (µM)	Variáveis					
	NB	CMB (cm)	MSB (g)	NR	CMR (cm)	MSR (g)
0/0	2,3 a	0,9 a	0,0214 a	5,7 ab	2,4 a	0,0164 ab
0/0,57	2,8 a	1,1 a	0,0397 a	6,6 ab	2,6 a	0,0160 ab
0/2,28	4,0 a	1,3 a	0,0373 a	6,7 ab	2,1 a	0,0218 ab
0,57/0	3,7 a	1,1 a	0,0305 a	7,5 ab	1,2 a	0,0084 b
0,57/0,57	4,5 a	1,0 a	0,0341 a	8,8 a	2,0 a	0,0170 ab
0,57/2,28	4,1 a	0,9 a	0,0237 a	7,2 ab	1,9 a	0,0147 b
2,28/0	2,7 a	1,1 a	0,0246 a	8,4 ab	2,6 a	0,0220 ab
2,28/0,57	3,1 a	1,0 a	0,0270 a	8,6 ab	2,4 a	0,0289 a
2,28/2,28	3,4 a	0,9 a	0,0296 a	4,4 b	3,8 a	0,0100 b

No que se refere ao comprimento do maior broto observou-se que não houve diferença estatísticas entre os tratamentos, e pôde-se observar que o aumento na concentração da auxina não afetou essa variável, mesmo sabendo-se do papel das auxinas na expansão celular e, conseqüentemente, no aumento longitudinal dos órgãos vegetais. É provável que a espécie estudada já tenha uma concentração endógena de auxinas suficiente para estimular o crescimento dos brotos formados, como apontado por Moraes; Asmar; Luz (2014), e que a adição do ANA ao meio de cultura tenha sido inibitória para o crescimento longitudinal desses brotos. Isso coloca em evidência a teoria de que a indução ou a inibição dos processos

morfogenéticos *in vitro* dependem do balanço e da interação entre as substâncias de crescimento endógenas e exógenas (MONFORT et al., 2012).

Em relação ao crescimento longitudinal das raízes a combinação mais alta dos dois fitorreguladores (2,28/2,28 μM) foi a mais eficiente. Isso mostra que essas duas classes hormonais em elevadas concentrações atuaram sinergisticamente para essa variável em *B. martiana*. Em *Dendrobium nobile*, Soares (2010) relata que existe uma concentração ótima de BA para estimular o crescimento das raízes e que concentrações acima ou abaixo daquele ideal podem comprometer o crescimento. Essa autora ainda afirma que raízes com maiores comprimentos auxiliam as plantas a buscarem os nutrientes necessários para seu desenvolvimento. No caso de plantas produzidas *in vitro*, essa característica é importante para a fase de aclimatização.

No que diz respeito à massa seca dos brotos o melhor tratamento foi 0,57 μM de BA, enquanto que para a massa da matéria seca das raízes o mais eficaz foi na combinação de 2,28 μM de ANA e 0,57 μM de BA, apresentando um valor numericamente maior do que os demais tratamentos. Ainda em relação a essa variável foi verificado que o aumento na concentração do BA foi inibitório, especialmente na concentração mais elevada de ANA. Diferentemente do que se observou no presente estudo, Ori (2006) e Souto et al. (2010), trabalhando com as espécies *Phalaenopsis amabilis* e *Cattleya bicolor*, respectivamente, observaram que o acúmulo de massa seca das raízes mostrou ser significativamente melhor quando as plantas das duas espécies foram submetidas a concentrações isoladas de ANA.

As auxinas em particular têm um efeito positivo na ocorrência de diferenciação celular de raiz (LASKOWSKI et al., 2008; BIELACH et al., 2012), auxiliando sua formação e desenvolvimento, mas isso não é uma regra. Apesar do desenvolvimento das raízes está associada a adição de auxinas no meio de cultura, sua combinação com uma citocinina demonstrou ser relevante para o cultivo *in vitro* de *B. martiana*. Esses resultados demonstram que as espécies de orquídeas apresentam sensibilidade variada a distintas concentrações de hormônios no meio de cultura e que o balanço ideal deve ser investigado para cada espécie.

3.4 Micropropagação a partir de segmentos caulinares estiolados

Decorrido o período de seis meses de incubação no escuro foi possível observar nas plantas de *B. martiana* características morfológicas que denotam condições de crescimento na ausência de luz como caules esbranquiçados e alongados com entrenós mais longos (Figura 3

A, B e C). Nessa fase, o crescimento em comprimento do caule é priorizado em relação a espessura, contrário do que acontece na presença de luz quando os crescimentos tanto em espessura quanto em comprimento são simultâneos. Dessa forma, é possível visualizar com facilidade as regiões nodais e, assim, segmentar os caules. Alguns dias após a transferência para a presença de luz, os segmentos caulinares estiolados começaram a se tornar clorofilados. Suzuki;

Kerbaui; Zaffar (2004) relataram que plantas de *Catasetum fimbriatum* também apresentam capacidade de estiolamento caulinar quando crescidas *in vitro* na ausência de luminosidade podendo os segmentos nodais oriundos desse processo serem transferidos para a luminosidade e utilizados para a propagação vegetativa. No caso de *B. martiana*, sessenta dias após a transferência para a presença de luz foi possível observar formação de brotos em aproximadamente 70% dos segmentos. Um exemplo desse último caso está ilustrado na Figura 3D. Resultado semelhante foi descrito por Ferreira et al. (2011), no qual 70% dos segmentos estiolados de *Dendrobium Second Love* formaram brotos após 3 a 4 semanas de transferência para a presença de luz.

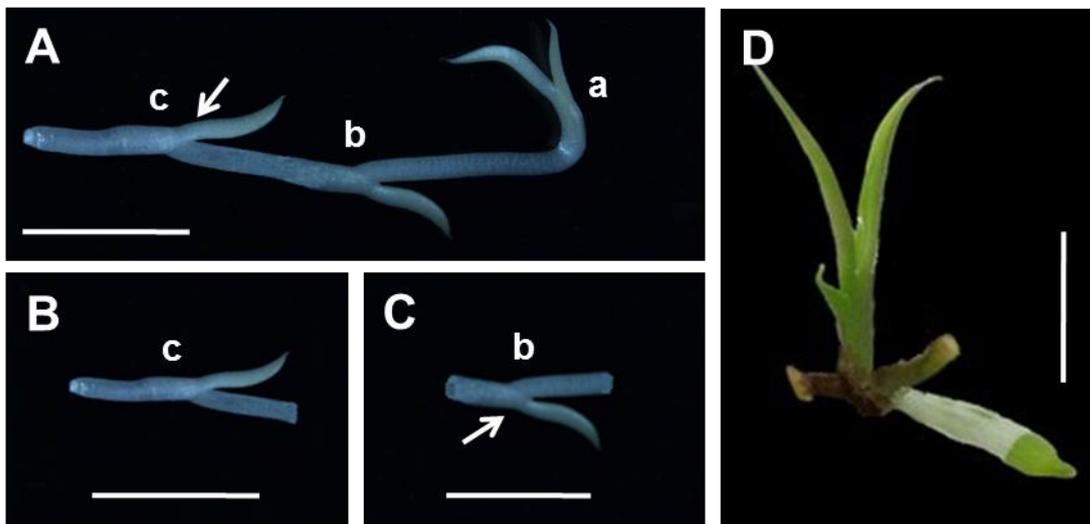


Figura 3. Utilização de caules crescidos na ausência de luminosidade para micropropagação de *Brassavola martiana*. (A) Seqüência de segmento caulinar estiolado após 180 dias de incubação no escuro (a, b e c) a partir do ápice caulinar; o segmento apical a é descartado e os demais são transferidos para a presença de luz (B-C). Broto clorofilado formado após transferência para a presença de luz (D). As setas em A e C indicam regiões nodais com escama protegendo uma gema axilar que dará origem ao broto. Barras = 1 cm.

O tratamento com ausência de reguladores de crescimento apresentou um percentual de 68% de formação de brotos. A incorporação de 0,57 μM de ANA e 2,28 μM de BA mostrou favorecer esse processo uma vez que 78% dos segmentos geraram brotos. No entanto, dobrando a concentração desses reguladores de crescimento (1,14 μM de ANA e 4,56 μM de BA), a porcentagem de formação de brotos diminuiu, atingindo 64%. Isso indica que embora a presença conjunta de ANA e BA no meio de cultura seja oportuna para a formação de brotos nos segmentos caulinares estiolados de *B. martiana*, concentrações acima de valores ótimos tendem a inibir esse processo.

Em contrapartida, para a propagação da orquídea *Dendrobium* Second Love, Ferreira et al. (2011) observaram que a adição de uma citocinina e uma auxina não favoreceu aumentos significativos no número de brotos, logo, não sendo necessário a incorporação de reguladores de crescimento no meio para a propagação de segmentos dessa espécie.

Em suma, considerando os dados apresentados é possível afirmar que a técnica de propagação por meio do estiolamento caulinar é viável para *B. martiana* e deve ser considerada como uma alternativa promissora para a obtenção de novas plântulas dessa espécie em larga escala.

3.5 Influência da idade das sementes na germinação

Os resultados referentes ao efeito da idade das sementes no processo germinativo estão apresentados na tabela 7. Sementes de 60 e 90 dias de idade (oriundas da autofecundação) não germinaram. Esse resultado permite inferir que embora o processo de fecundação tenha ocorrido, os embriões ainda estão imaturos e, conseqüentemente, não estão aptos a germinar.

Sementes com 120, 150 e 180 dias de idade, sendo a primeira oriunda da autofecundação e as duas últimas da fecundação cruzada, exibiram baixas taxas germinativas. É possível que essas sementes mais jovens (incluindo aquelas oriundas da autofecundação) apresentem maior sensibilidade ao tratamento de assepsia com o hipoclorito de sódio, como discutido por Suzuki et al. (2012), o que pode comprometer o processo germinativo.

As sementes com 210 dias (7 meses após a polinização) apresentaram taxa de germinação mais elevada, superior a 60%. Esses resultados mostram que provavelmente *B. martiana* possui um sistema reprodutivo intermediário, que, segundo Bernal; Guerra; Oliveira (2007), apresenta porcentagem de fecundação cruzada entre 5 e 95%. Esse sistema de reprodução apresentada por *B. martiana* permite tanto a autopolinização quanto polinização

cruzada, e dessa forma contribui positivamente para sua multiplicação natural no sentido de que não é restrito a um único sistema reprodutivo.

Tabela 7. Efeito da idade das sementes no processo germinativo de *Brassavola martiana* sob condições *in vitro*. DAP = dias após polinização

Polinização	Inoculação	Idade (DAP)	Germinação (%)
06/02/2017 (auto)	06/04/2017	60 dias	0
12/01/2017 (auto)	12/04/2017	90 dias	0
06/02/2017 (auto)	06/06/2017	120 dias	0,11
12/01/2017 (cruzada)	12/06/2017	150 dias	0,43
12/01/2017 (cruzada)	12/07/2017	180 dias	0,68
17/03/2017 (cruzada)	17/10/2017	210 dias	64,4

No que diz respeito ao processo germinativo, os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos relatados por Sousa (2013) para a espécie *B. tuberculata*, cujas sementes com idade de até 120 dias não germinaram. A partir dessa idade o referido autor observou um aumento gradativo da germinação de sementes com até 210 dias de idade, com taxa germinativa acima de 90%.

Suzuki et al. (2012) também relataram que a porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *Hoffmannseggella cinnabarina* foi afetada pela idade das sementes. Esses autores verificaram um aumento gradativo na porcentagem de germinação de sementes com idade variando de 4 a 9 meses. Cabral (2014) verificou que a taxa de sementes potencialmente viáveis dos frutos de *Encyclia patens* provenientes da polinização manual, foi de 81,8% para autopolinização e 73,6% para polinização cruzada, para *Phymatidium delicatulum* foi de 57,93% para autopolinização e de 82,52% para polinização cruzada, enquanto que para a espécie *Mesadenella cupidata* a porcentagem foi de 78,7% e 70,9% para autopolinização e polinização cruzada respectivamente.

Em conjunto, esses resultados indicam para a possibilidade de que a germinação foi influenciada pelo estágio de maturação das sementes e não pelo tipo de polinização empregado. Além disso, é possível que o estágio de maturação da cápsula também tenham afetado a germinação. Embora no momento da coleta eles tenham apresentado características de maturação (coloração amarelada), as capsulas ainda não apresentavam sinais de deiscência. Informações mais precisas só serão obtidas com a continuidade desse estudo. Esses resultados

são preliminares e mais testes são necessários para elucidar a influência do sistema reprodutivo e da idade da semente no processo germinativo de *B. maritima*.

3.6 Aclimatização

A porcentagem média de sobrevivência das plantas nos primeiros 60 dias de plantio após a transferência para condições *ex vitro* (Fase 1) está descrito na tabela 8.

Independentemente da composição do substrato testado, a espécie apresentou resultados positivos durante essa primeira fase *ex vitro*, apresentando uma porcentagem de sobrevivência acima dos 95%. Considerando que a aclimatização é uma fase crítica e importante no processo de propagação *in vitro*, a espécie *B. maritima* se mostrou resistente ao primeiro transplante. Esse resultado corrobora os descritos por Macedo et al. (2014) e Mengarda et al. (2017), em estudos com a espécie *B. tuberculata* onde a porcentagem média de sobrevivência foi de 70%. Segundo Macedo et al. (2014), a sobrevivência das plantas pode estar associada à variabilidade genética, havendo indivíduos que se adequam mais ou menos às condições *ex vitro*.

Outro fator que pode ter contribuído para a sobrevivência das plantas é a presença de Esfagno em dois dos substratos testados, nos quais apenas um indivíduo não sobreviveu. Assim, é possível inferir que a presença de Esfagno é importante nessa primeira etapa de transferência e que, em virtude dele favorecer a porosidade e ao mesmo tempo retenção adequada de água, consegue manter as raízes suficientemente aeradas e úmidas. Esses atributos propiciam suprimento hídrico adequado para a sobrevivência dos indivíduos, uma vez que plantas cultivadas *ex vitro* exibem uma taxa de transpiração mais elevada do que quando mantidas *in vitro* (SCHMITZ et al., 2002), portanto, tendem a sofrer maior estresse hídrico.

Tabela 8. Efeitos dos substratos Bioplant e Esfagno na aclimatização de plantas de *Brassavola maritima* 60 dias após a transferência para condições *ex vitro*. PS = porcentagem de sobrevivência, NF = número de folhas; NB = número de brotos; CMB = comprimento do maior broto; NR = número de raízes; CMR = comprimento da maior raiz. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Tratamentos	Variáveis					
	PS*	NF	NB	CMB (cm)	NR	CMR (cm)
Bioplant:Esfagno						

1:0	96.0	4a	1a	1.4 a	4a	4.0 a
1:1	98,3	5b	1a	1.2 ab	4a	3.6 a
2:1	98,3	5b	1a	1.1 b	4a	3.7 a

* Não foi possível realizar teste estatístico para essa variável.

Em relação às variáveis analisadas (Tabela 8), é possível perceber um certo padrão entre os tratamentos realizados. Os substratos contendo Esfagno foram significativamente superiores àqueles sem a presença desse componente em relação ao número de folhas.

Nas medições realizadas no momento da transferência do meio de cultura para o substrato, as plântulas tinham em média 5 folhas, as quais foram mantidas após os 60 dias de cultivo. Segundo Dorneles e Trevelin (2011), a persistência da folha na planta depende da espécie, do substrato e da capacidade fotossintética de cada indivíduo. Esses autores inferiram ainda que para *Cattleya intermedia* a presença de Esfagno no substrato pode ter auxiliado a produção de novas folhas, característica também observada em *B. martiana*.

Em relação ao número de brotos e raízes e ao comprimento da maior raiz não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Cada indivíduo produziu em média um broto independente do tratamento, porém o comprimento foi numericamente maior no tratamento sem a presença de Esfagno, diferindo estatisticamente do tratamento 2:1 (Bioplant:Esfagno). Foram formadas 4 raízes por planta, com comprimentos superiores a 3,5 cm.

Considerando que, de maneira geral, diferenças marcantes não foram detectadas entre os tratamentos, sugere-se a utilização de Bioplant (1:0) como substrato inicial para a aclimatização de *B. martiana*. Esse substrato atende as exigências da espécie nessa primeira fase de transferência para condições *ex vitro*, além de ser mais viável economicamente uma vez que se utiliza apenas um componente.

Os resultados das variáveis utilizadas na Fase 2 estão apresentados na Tabela 9. Nessa fase, a sobrevivência média foi de 66,28%. A porcentagem mais alta foi no tratamento 1:0, apresentando 97,1%, enquanto que o tratamento que apresentou a maior perda de plantas foi o que continha apenas o substrato Bioplant. Contudo, pode-se considerar esses valores de sobrevivência positivos, visto que a aclimatização é uma das etapas mais difíceis do cultivo *in vitro*.

Foi observado que a mortalidade de plantas aumentou na segunda fase em relação a primeira. Considerando a quantidade de plantas que morreram nessa segunda fase, o

tratamento 1:0 (Ouro Negro: Bioplant) é o mais indicado uma vez que, para o processo de aclimatização, a sobrevivência é de extrema importância para o estabelecimento da espécie. É importante ressaltar também que nos tratamentos onde houve maiores perdas de plantas (0:1 e 1:1) as raízes encontravam-se apodrecidas, sinalizando a intolerância das mesmas ao acúmulo de água no substrato. Esse fato também foi relatado por Dorneles e Trevelin (2011) durante a aclimatização de *Cattleya intermedia*. Isso pode explicar o fato do tratamento utilizando apenas o substrato Ouro Negro ter sido favorecido maior sobrevivência, uma vez que este por possuir partículas maiores e ser mais poroso, consegue drenar melhor a água. Colombo et al. (2005), afirmam que uma boa drenagem do substrato é fundamental para o desenvolvimento saudável das raízes de orquídeas epífitas.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis número de folhas e de brotos, massa seca da parte aérea e número de raízes. Para as massas seca das raízes, o resultado mais satisfatório foi o tratamento 3:1 que também foi significativamente superior apenas ao tratamento 0:1.

Tabela 9. Efeito dos substratos Ouro Negro e Bioplant na aclimatização de plantas de *Brassavola martiana* 90 dias após o plantio. PS = porcentagem de sobrevivência, NF = número de folhas; NB = número de brotos; MSPA = massa da matéria seca da parte aérea; NR = número de raízes; MSR = massa da matéria seca de raízes (MSR). Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Tratamentos Ouro Negro: Bioplant	Variáveis					
	PS*	NF	NB	MSPA(g)	NR	MSR(g)
0:1	48.6	3.2 a	1 a	0.0092 a	3.1 a	0.0087 a
1:0	97.1	3.4 a	1 a	0.0125 a	3.9 a	0.0127ab
1:1	57.1	3.0 a	1 a	0.0121 a	3.4 a	0.0105ab
2:1	68.6	3.3 a	1 a	0.0089 a	3.4 a	0.0102ab
3:1	60.0	3.7 a	1 a	0.0117 a	4.1 a	0.0141 b

* Não foi possível realizar teste estatístico para essa variável.

A inclusão do substrato Ouro Negro nessa segunda fase se mostrou benéfica para o processo de aclimatização de *B. martiana*, especialmente para o favorecimento do sistema radicial, ao permitir maior aeração do solo, propiciando condições mais adequadas ao desenvolvimento das raízes. A quantidade de raízes associada a um maior comprimento é essencial e deve ser estimulada para maior sobrevivência durante a aclimatização de

orquídeas (SORACE et al., 2007; COSTA et al., 2009). Os valores referentes às massas da matéria seca das raízes refletem bem essa associação.

É possível inferir que em ambas as fases de aclimatização analisadas as plantas de *B. martiana* apresentam um padrão semelhante de desenvolvimento. Essa espécie parece ser tolerante a diferentes condições do substrato. Isso deve estar associado a uma possível plasticidade fenotípica que a permite sobreviver e se desenvolver em condições rizosféricas distintas.

A diminuição no número de folhas pode estar associada ao fato de que algumas folhas remanescentes do cultivo *in vitro* atingiram a senescência e/ou não sobreviveram ao transplante, o que obedece a especificidade da espécie e/ou as circunstâncias do ambiente durante a aclimatização. Segundo Franco et al. (2007), o processo de abscisão pode estar relacionado a uma estratégia da planta que diminuindo as demandas respiratórias e reduzindo a área exposta de estruturas desnecessárias conseguem reduzir os efeitos produzidos por diferentes tipos de estresse, o que no caso do presente estudo está associado à transferência para um ambiente menos favorável em termos de umidade do ar e do próprio substrato.

De acordo com os resultados obtidos na Fase 2 e considerando o custo/benefício e a taxa de sobrevivência da espécie, é recomendado apenas a utilização do substrato Ouro Negro para o cultivo da orquídea *B. martiana*. As partículas maiores que compõem esse substrato parecem não ser um impedimento para o desenvolvimento do sistema radicial dessa espécie. Outra característica desse substrato é sua capacidade de drenagem de água o que é favorável para a espécie em estudo nessa fase de desenvolvimento. Esse fato é importante, pois torna as plantas mais aptas a transferência para condições de casa de vegetação (fase posterior), onde há uma diminuição drástica da umidade relativa e aumento na intensidade luminosa, características mais semelhantes àsquelas encontradas no ambiente natural onde essas espécies ocorrem.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio MS com metade dos macronutrientes ($\frac{1}{2}$ MS) foi o mais promissor para a germinação de *B. martiana*, enquanto que o KC foi o melhor para o desenvolvimento dos protocormos e formação de novas plantas. Para a multiplicação e desenvolvimento *in vitro* de plantas de *B. martiana* recomenda-se a utilização do meio KC enriquecido com 3% de sacarose.

O uso dos reguladores de crescimento ANA e BA se mostrou eficiente tanto para a indução de brotos quanto para a formação de raízes. De modo geral, o uso de concentrações iguais de ANA e BA (0,57 μM) favoreceu o desenvolvimento tanto da parte aérea quanto das raízes, apresentando valores numericamente maiores para NB e NR, além de ter contribuído para o crescimento da planta como um todo.

A utilização de segmentos caulinares estiolados foi eficaz para a propagação de *B. martiana*. Quando transferidos para a presença de luz a utilização do meio KC suplementado com 0,57 μM de ANA e 2,28 μM de BA proporcionou os melhores resultados.

Com base nos dados obtidos, é possível que o sistema reprodutivo de *B. martiana* seja intermediário uma vez que houve formação de sementes tanto por autopolinização quanto por polinização cruzada. Para a obtenção de uma germinabilidade superior a 60% recomenda-se utilizar sementes com pelo menos 7 meses de idade, ou seja, 210 dias após da polinização.

Para a etapa inicial de aclimatização, as plantas de *B. martiana* oriundas da propagação *in vitro* devem ser primeiramente transferidas para recipientes comunitários contendo o substrato Bioplant e mantidas em sala de crescimento por oito semanas (Fase 1). Após esse período, elas podem ser transplantadas para vasos individuais contendo o substrato Ouro Negro e cultivados durante 90 dias no mesmo ambiente anterior (Fase 2). Nos dois casos os melhores resultados apresentaram porcentagens de sobrevivência superior a 95% e as plantas apresentaram ótimo vigor, características que as tornam potencialmente capazes de suportar a transferência para condições de viveiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, M. C. R.; JORGE, J.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociência**, v. 12, p. 141-17, jul. 2014.

AGUSTINI, V.; SUFAATI, S.; SUHARNO. Mycorrhizal Association of Terrestrial Orchids of Cycloops Nature Reserve, Jayapura. **Biodiversitas**, v. 10, n. 4, p. 175-180, jun. 2009.

ARDITTI, J. 1974. *Orchid Biology. Reviews and perspectives*. Ithaca, Cornell University Press. Arditti, J. & Ernest, R. 1992. **Micropropagation of Orchids**. 1 ed. Irvine, John Wiley & Sons.

BARROS, F. D.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S. G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C. O.; GUIMARÃES, L. R. S. 2015. ORCHIDACEAE in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB37244>>. Acesso em: 10 Nov. 2016.

BERKA, M. G.; VENTURIERI, G. A.; TEIXEIRA, T. N. Development of *Cattleya amethystoglossa* x *nobilior* (Orchidaceae) in simplified culture media. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 4, p. 425-428, Oct./Dec. 2014.

BESPALHOK JCF, GUERRA EP, OLIVEIRA R (2007). **Sistemas reprodutivos de plantas cultivadas**. Disponível em: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%204.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2018.

BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; BONETT, L. P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 9-13, jan. 2010.

BIELACH, A.; DUCLERCQ, J.; MARHAVÝ, P.; BENKOVÁ, E. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. **Biological sciences**, v. 395, n. 1595, p. 1469-1478, jun. 2012.

BONATES, L. C. M. Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia. II - Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo cam de uma campina da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 23, n. 4, p. 315-348, abr. 1993.

CABRAL, P. R. de M. **Biologia reprodutiva e polinização de orquídeas nativas do estado de São Paulo: *Encyclia patens* Hook., *Phymatidium delicatulum* Lindl. e *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay**. 2014. 116f. Dissertação (Mestre em Ciências, Área Entomologia) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, 2014.

CAMARGO, S. S.; RODRIGUES, D. B.; RODRIGUES, C. M.; ASSIS, A. M. de; FARIA, R. T. de.; SCHUCH, M. W. Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. **Ciência Rural**, v. 45, n.11, p. 2007-2012, nov. 2015.

CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, n. 1, p. 21-26, jan. 1991.

COLOMBO, A. L, FARIA, T. R.; ASSIS, A.M.; FONSECA, I. C. B. Aclimação de um híbrido de *Cattleya* em substrato de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 145-150, jan./mar. 2005.

CORDEIRO, G. M.; MORAES, C. P. de; MASSARO, R.; CUNHA, T. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley X *Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindley em diferentes meios de cultura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 18, p. 22-28, jul. 2011.

COSTA, M. A. P. C.; BASTOS, M. J. S. M.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. de S.; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. 2009. Micropropagação de orquídeas. In: Junghans, T.G.; Souza, A.S. (eds.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2 ed. Brasília, Embrapa, p 373-392.

CUNHA, T.; CORDEIRO, G. M.; MASSARO, R.; DEZAN, L. F.; MORAIS, C. P. de. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, v. 7, pp. 1-5, jul. 2011.

DEB, C. R.; PONGENER, A. Studies on the *in vitro* regenerative competence of aerial roots of two horticultural important *Cymbidium* species. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 235-241, jan. 2012.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, F.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.

DORNELES, L. T.; TREVELIN V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (*Orchidaceae*) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia, Série Botânica**, v. 66, n.2, p. 167-174, nov. 2011.

FARIA, R. T. de; STANCATO, G. C. Orquídea – sementeira. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p. 37-39. (Boletim técnico, 174).

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**, v. 2, n. 3, p. 489-492, dez. 2002.

FARIA, R. T.; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de Agar. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 71-74, jan./mar. 2006.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. Londrina: Mecenaz, 2012. 116 p.

FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; FARIA, R. T.; RIBEIRO, J. P. N.; CASAL, C. A. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 636-639, jan. 2010.

FERREIRA, W. de M.; SUZUKI, R. M.; PESCADOR, R.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; KERBAUY, G. B. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium Second Love* (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 47, p. 420-427, jan. 2011.

FERREIRA, W. de M.; VASCONCELOS, M. C. de; SILVA, C. C. N.; OLIVEIRA, H. R. de; SUZUKI, R. M.; Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as effected by culture medium, sucrose and growth regulators. **Iheringia, Série Botânica**, v. 72, n. 1, p. 57-65, abr. 2017.

FERREIRA, W. de M.; OLIVEIRA, S.; SUZUKI, R. M.; SILVA, K. SOARES JUNIOR, J. Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. **Rodriguésia**, 2018. No prelo.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V. de; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 292, p. 719-726, maio 2003.

FRANCO, M.; GUEVARA, G.; MESA, N.; URUEÑA, G. Hardening of the national flower of Colombia, the threatened *Cattleya trianae* (Orchidaceae), from *in vitro* culture with previous invigoration phase. **Revista de Biología Tropical**, v. 55, n. 2, p. 681-691, jun. 2007.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, jan. 2012.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P.D. (1984). Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Ltd., Edington, 709p.

GEORGE, E. F. 1993. **Plant propagation by tissue culture** Part 2. Exegetics, Edington. 1361 p.

HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36 n. 1, p. 27-33, jan. 1994.

JORGE, J.; JURAS, M. C. R.; SUZUKI, R. M. Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 3, p. 134-141, jul./set. 2015.

JUNIOR, D. E.; SASAMORI, M. H.; DROSTE, A. *In vitro* propagation of *Anathallis adenochila* (Loefgr.) F. Barros (Orchidaceae), a species endemic to southern and southeastern Brazil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 28, n. 4, p. 489-494, out./dez. 2014.

KÄMPF, A. N. 2000. **Substrato. Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 254p.

KAUTH, P. J., VENDRAME, W. A.; KANE, M. E. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 91-102, abr. 2006.

KERBAUY, G. B. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, cap.10, p.178-205, 2011.

KNUDSON, L. A new nutrient Solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, W. R. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb.f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, v. 33, n. 2, p.177-184, mar. 2006.

LASKOWSKI, M.; GRIENEISEN, V. A.; HOFHUIS, H.; COLETTE, A.; HOGEWEG, P.; MARÉE, A. F.; SCHERES, B. Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. **PLOS Biology**, v. 6, n. x, p. 2721-2735, out. 2008.

LIMA, G. P. P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I. M. T.; CEREDA, M. P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ CV MCOL 22) cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 2, p. 107-110, maio 2002.

MACEDO, M. C. de; ROSA D. B. C. J.; SOARES, J. S.; TATARA, M. B.; HOFMMANN, N. T. K.; ROSA, Y. B. C. J. Armazenamento de sementes e aclimatização de *Brassavola tuberculata* Hook. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 2883-2894, nov./dez. 2014.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirobeira *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. **Bioscience Journal**, v. 17, n. 1, p. 49-59, jun. 2001.

MELO, G. M. de; PAULINO, P. M. de S.; WILLADINO, L. G.; CAMARA, T, R; ULISSES, C. Germinação assimbiótica do gênero *Cattleya* em diferentes meios nutritivos. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.11, n.1, p. 19-26, 2015.

MENGARDA, L. H. G.; COLA, G. P. A.; OLIVEIRA, FREITAS, S. C. de; FREITAS, A. R. de. Multiplication, rooting *in vitro*, and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. (orchidaceae), an orchid endemic to the Brazilian Atlantic rainforest. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 3, p. 730-738, maio/jun. 2017.

MONFORT, L. E. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T.; SANTOS, F. M. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 458-463, fev. 2012.

MORAES, C. P. de; DIOGO, J. A.; PEDRO, N. P.; CANABRAVA, R. I.; MARTINI, G. A.; MARTELINE, M.A. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, p. 67-69, ago. 2009.

MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n. 2, p.350-355, jan. 2014.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, jan. 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, jan. 1962.

OLIVEIRA, A. M. de. **Germinação, crescimento inicial e multiplicação *in vitro* de *Cyrtopodium paludicolum* HOEHNE (ORCHIDACEAE)**. 2016. 34f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Tocantins, 2016.

OLIVEIRA, J. R. G. de. **Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Encyclia flava* (LINDL.) PORTO E BRADE (ORCHIDACEAE)**. 2015. 27f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Tocantins, 2015.

ORI, S. S. **Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* (Lineu) Blume (Orchidaceae) cultivada *in vitro***. 2006. 131f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio ambiente) - Instituto de Botânica da secretaria de meio ambiente, São Paulo, 2006.

PAIVA NETO, V. B.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, v. 97, p. 193-202, fev. 2003.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2001. 63 p.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. de L.; BORGES, A. C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 29, p. 199-206, jan. 2005.

PINTO, J. R. S.; FREITAS, R. M. O.; PRAXEDES, S. C. Stimulation of *in vitro* development of *Cattleya granulosa* by sucrose. **General and Applied Plant Physiology**, v. 36, n. 3-4, p. 183-188, set. 2010.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, R.; FARIA, R. T. F.; TAKANE, R. J. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1897- 1902, set. 2010.

REGO-OLIVEIRA, L. do V. R.; FARIA, R. T. de; FONSECA, I.; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 265-272, maio 2003.

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; DIAS, J. M. M.; VILLANI, E. M. DE A. Concentrações e composições químicas do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídea. **Revista Ceres**, v. 59, n. 1, jan./fev. 2012.

ROSA, Y. B. C. J.; JÚNIOR, G. A. M.; SOARES, J. S.; ROSA, D. B. C. J.; MACEDO, M. C. de; CEZAR, A. M. A. Estudo da viabilidade de sementes de *Brassavola tuberculata* hook. em função do período de armazenamento, tempo de cultivo e tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 19, n. 2, p. 155-160, jul. 2012.

SANTOS, L. O. G.; GIANINI, P. F.; C. PEDROSO-DE-MORAES. Crescimento *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* C.V. “madame pompa dour” cultivadas em diferentes meios de cultura e níveis de pH. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 213-226, jan. 2017.

SANTOS, R. P.; CRUZ, A. C. F. da; IAREMA, L.; FERNANDES, K. R. G.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Avaliação da eficiência do Dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* propagadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 888-890, jan. 2007.

SCHMITZ, J. A. K.; SOUZA, P. V. D. de; KAMPF, A. N. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural**, v. 32, p. 937-944, dez. 2002.

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

SILVA, C. de S.; ARAÚJO, L. G. de; SOUSA, K. C. I.; SILVA, D. M.; SIBOV, S. T.; FARIA, P. R. Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado **Ornamental Horticultura**, v. 23, n. 1, p. 96-100, fev. 2017.

SILVA, J. A. T. da; HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; SONGJUN, Zeng. Acclimatization of *in vitro* -derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 110-124, maio 2017.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G. de. Estiolamento e luz artificial no cultivo *in vitro* de orquídeas nativas e híbrida. **Ciência Rural**, set. 2010.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; ARAUJO, A. G. de. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 503-507, jul. 2011.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C. de; SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; ROSA, C. B. C. J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, v. 24, n. 3, p. 226-233, jul./set. 2012.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; YAMAMOTO, L. Y.; SCHNITZER, J.; TAKAHASHI, L. S. A. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 195-200, abr./jun. 2007.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; DAMASCENO JÚNIOR, C. V.; GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p.775-782, out./dez. 2008.

SOUSA, G. G. **Germinação e crescimento *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE)**. 2013. 92f. Tese (Doutorado em Agronomia- Produção Vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados, 2013.

SOUTO, J. S.; MORIMOTO, J. M.; FERREIRA, W. M.; NAKABASHI, M.; SUZUKI, R. M. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 2, p.179-185, jan. 2010.

SPOERL, E. Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. **American Journal of Botany**, v. 35, p. 88-95, fev. 1948.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. 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, n. 1, p. 25-33, jan. 2001.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: Adição de polpa de frutos. **Bragantia**, v. 67, n. 1, p. 51-57, ago. 2008.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 929-935, jan. 2004.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. de M.; Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 657- 666, nov. 2009.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. de M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 4, p. 731-742, out. 2010.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. de M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant**, v. 48, p.500-511, set. 2012.

TAN, B. C.; CHIN, C. F.; ALDERSON, P. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 457-463, nov. 2011.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. 72p. (Boletim Técnico, 174).

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH Changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, jun. 1949.

VASUDEVAN, R.; STADEN, J. V. Cytokinin and explant types influence *in vitro* plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 107, p. 123-129, jun. 2011.

VIDAL, F. R. DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. da. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 64-70, jan./mar. 2013.