

Francis Pereira-Dias

MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DE
ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS DE
Cattleya tigrina A. Rich (ORCHIDACEAE) CULTIVADAS *in*
vitro ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CAMADA FINA
CELULAR

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao Curso
de Graduação Ciências
Biológicas, do Centro de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito
parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora:
Profa. Dra. Marisa Santos
Coorientadora:
Profa. Dra. Rosete Pescador

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Pereira-Dias, Francis

Morfo-histodiferenciação de estruturas semelhantes a protocormos de *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae) cultivadas in vitro através da técnica de camada fina celular / Francis Pereira-Dias ; orientadora, Marisa Santos ; co-orientadora, Rosete Pescador. - Florianópolis, SC, 2013.

95 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Anatomia Vegetal. 3. Culturas de tecidos. 4. Epiderme. 5. Folha. I. Santos, Marisa. II. Pescador, Rosete. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Francis Pereira-Dias

**MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DE
ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS DE
Cattleya tigrina A. Rich (ORCHIDACEAE) CULTIVADAS *in vitro*
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CAMADA FINA CELULAR**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciência Biológicas”, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação Ciências Biológicas.

Florianópolis, 10 de julho de 2013.

Prof. Dra. Maria Risoleta Freire Marques
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Marisa Santos, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Rosete Pescador, Dr.^a
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior, Dr.
Universidade Federal do Acre

Prof.^a Ana Cláudia Rodrigues, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Thaysi Ventura de Souza, Msc.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense

Este trabalho é dedicado à
família Pereira Dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus Uno, Trino e Verdadeiro pelo dom da vida e pela graça de poder amá-lo através das suas obras.

À família Pereira Dias pelo apoio concedido para a execução deste trabalho. Aos meus pais agradeço o dom da família. Agradeço a formação de valores que recebi, o gosto pelo estudo e pelo trabalho. Agradeço-lhe os incalculáveis carinhos, doações e gratuidades de um amor paternal.

Aos meus irmãos Diego e Bruno. Sou-lhes grata pelo dom da irmandade, pelos carinhos, longas conversas, pelo primeiro café na UFSC e por tantos outros que vieram após. Agradeço-lhe uma vida compartilhada, pela amizade e respeito.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marisa Santos minha estima e agradecimentos pelos muitos anos de orientação e pela amizade construída. Agradeço-lhe por ter aberto meus olhos ao maravilhoso mundo da Anatomia Vegetal. Sou-lhe grata pelos muitos ensinamentos profissionais e pessoais, bem como por ter compartilhado comigo todo seu amor à Botânica através de um trabalho íntegro e ético.

À minha coorientadora Profa. Dra. Rosete Pescado pelo apoio na execução deste trabalho, mas também pelas inspiradoras conversas de Fisiologia Vegetal. Agradeço-lhe por me fazer vislumbrar outros horizontes sem temer alcançá-los.

À Profa. Dra. Ana Claudia Rodrigues por todas as instigantes conversas no laminário ao redor de um cafezinho. Agradeço ainda a formação complementar advinda da monitoria em Anatomia Vegetal. Sou-lhe grata pelas muitas lições de docência que aprendi com a professora por meio de sua grandiosa didática.

Ao Professor Dr. Miguel Pedro Guerra por ter me oportunizado um aprendizado inimaginável na Disciplina de

Práticas em Cultura de Tecidos Vegetais. Agradeço a indicação de estudo na Universidade da Califórnia, Davis (UC Davis, USA). Sou-lhe mui grata pela experiência que detive em Davis, USA, e também pela sua solidez em ensinar seus alunos.

Ao Professor Dr. Eduardo Blumwald pela orientação durante meu intercâmbio na UC Davis. Agradeço ainda pelas varias lições de vida que o trabalho em seu laboratório me proporcionou-me. Sei que a experiência em Davis impactou grandiosamente minha vida profissional e pessoal, a isso sou lhe grata.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas pela formação, sobretudo aos professores do Departamento de Botânica de quem aprendi grandiosamente sobre Botânica. Em modo particular à Profa. Dra. Clarice Loguércio Leite pela sua indicação de trabalhar no Laboratório de Anatomia Vegetal sob orientação da Profa. Dra. Marisa Santos.

Aos membros hodiernos e passados dos Laboratórios de Anatomia Vegetal e Fisiologia Vegetal da Botânica, BOT/CCB/UFSC. Agradeço a amizade compartilhada no ambiente de trabalho. Um especial agradecimento à Julia pela colaboração neste trabalho. Aos mestrandos desse laboratório agradeço o exemplo, bem como o conhecimento que obtive através de vocês. Um especial agradecimento a Roberta e ao Sérgio por me atraírem ao maravilhoso mundo da biologia do desenvolvimento vegetal. Da mesma forma, expresso meu sincero agradecimento às biólogas Chirle e Elize pelo apoio técnico recebido.

Aos membros atuais e passados do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, FIT/CCA/UFSC. Agradeço o aprendizado no âmbito da cultura de tecidos vegetais, bem como as práticas metodológicas por detrás desta pesquisa. Sou grata ao Dorival, Douglas, Yohan e Ramon pelo constante apoio na execução deste trabalho. Agradeço também a Bióloga Camila pelo auxílio técnico na microscopia. Agradeço a todos que compõe o corpo discente deste laboratório por trazem tanto humor para dentro do ambiente de trabalho. Um especial agradecimento à Monique a

quem dividi infindáveis horas decifrando a técnica de TCL durante a disciplina de Práticas em Cultura de Tecidos Vegetal.

Aos membros do Laboratório do Prof. Blumwald (UC Davis), meu sincero agradecimento pelo aprendizado nas áreas de Biologia Molecular e Genética, e pela formação profissional que detive ao fazer parte deste laboratório. Um especial agradecimento a Dra. Ellen Tumminbang por quem aprendi muito sobre brassinoesteroídes e sobre a arte da Ciência.

Aos colegas da turma 08.1 pela amizade ao longo desta graduação. Agradeço em especial à ‘micela’ Emily, Tatiana, Natália, Thaís e Bruna, por terem compartilhado comigo trabalhos, estudos, festas e PPCCs; mas, sobretudo, pelos muitos brindes que fizemos ao longo deste curso.

Aos meus amigos as alegrias recebidas por meio da nossa amizade. Agradeço de modo particular os amigos da igreja (Saint James Parish e Santíssima Trindade), a eles meu especial agradecimento pela fé compartilhada. É um alívio na caminhada da vida poder gozar de pessoas inspiradoras e que te elevam a busca do Eterno. Um especial agradecimento à Chenling Xu pelo suporte concedido para a execução deste trabalho.

Ao CNPq e ao Programa Brasil Ciências sem Fronteiras Sem Fronteiras, Graduação Sanduíche – CNPq/CAPES/IIIE, meu agradecimento pela bolsa de estudos.

Aos muitos outros que corroboraram com minha formação acadêmico-pessoal meu sincero.

*Como são numerosas Senhor as tuas
obras! A todas fizestes com sabedoria.*

SI 105(104), 24

RESUMO

Cattleya tigrina é orquídea epífita de grande valor econômico ornamental que, todavia, encontra-se ameaçada. A cultura de tecido vegetal e suas técnicas, como a de camada fina celular (TCL), vêm sendo usadas para conservação de espécies como *C. tigrina*. Entretanto, pouco se sabe sobre as estruturas semelhantes a protocormos (ESP) advindas da técnica de TCL. Este estudo visa analisar a morfo-histodiferenciação de ESPs desenvolvidas *in vitro* através da técnica de TCL em folhas de *C. tigrina*. Folhas oriundas de plântulas cultivadas *in vitro* foram destacadas, seccionadas e inoculadas em placa de petri contendo meio de cultura MS/2 suplementado com peptona de soja, AgNO₃ e fitagel. O mesmo procedimento foi usado com folhas inteiras, como grupo controle. Observou-se o desenvolvimento das ESP por 107 dias, sendo amostras (folha seccionada e inteira) fixadas a cada sete dias. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, infiltradas em historresina e coradas com azul de toluidina, para análise em microscopia óptica. Folhas *in vivo* foram utilizadas para a execução de testes histoquímicos. A folha é dorsiventral e hipostomática. A epiderme é uniestratificada e os estômatos são anomocíticos. O mesofilo é formado por clorênquima com idioblastos contendo ráfides. O feixe vascular é colateral com bainha parenquimática perivascular. O surgimento das ESPs nas folhas seccionadas pelo TCL apresentou uma diferença de sete dias em relação ao grupo controle de folhas inteiras. As ESPs surgem associadas à região foliar seccionada. Histologicamente, a origem das ESPs advém da epiderme. Atividade meristemática foi observada, desde o sétimo dia após o seccionamento pelo TCL, caracterizada por núcleos conspicuos, protoplasto denso, paredes delgadas e evidências de divisões celulares. ESPs assemelham-se ao ápice caulinar, com primórdios foliares aos 46 dias. Os resultados obtidos preenchem as lacunas sobre a morfo-histodiferenciação de ESPs de *C. tigrina*, reafirmando a eficácia da técnica de TCL para a micropropagação da espécie.

Palavras-chave: Anatomia Vegetal. Culturas de tecidos. Epiderme. Folha.

ABSTRACT

Cattleya tigrina, an epiphyte orchid, has great ornamental value, despite from that, this is an endangered species. Plant tissue culture through its techniques, like thin cell layer (TCL), has provided means to conserve species such as *C. tigrina*. However, scanty is the knowledge of the structure of the protocorm like bodies (PLB) that are produced using TCL technique. This study analyzes the morpho-histodifferentiation of PLBs obtained through the TCL of *C. tigrina* leaves. Leaves from *in vitro* seedlings were detached, sectioned and inoculated in a petri dish containing MS/2 media, supplemented with peptone, AgNO₃ and phytigel. Equal procedure was applied to a non-sectioned leaf, as a control group. The development of the PLBs was observed for 107 days, each seven days along this period samples were fixed. The samples were fixed with glutaraldehyde 2.5% in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.2, embedded in hydroxyethyl methacrylate, stained with toluidine blue and further analyzed in light microscope. *In vivo* leaves were used for histochemical procedures. The leaf is dorsiventral and hypostomatic. The epidermis is uniseriated and the stoma anomocytic. The mesophyll is composed by a chlorenchyma and idioblast containing raphydes. The vascular bundle is collateral and surrounded by a parenchymatic perivascular sheath. In the sectioned leaves the constitution of the PLBs occurs seven days earlier than in non-sectioned leaves. PLB's were formed in the area that the sectioning is made. Histologically, the PLBs are derived from the epidermis. Starting the seven days after the sectioning, intense meristematic activity was characterized by the conspicuous nucleus, dense protoplast, thin cell walls and cell division evidence. The formed PLBs resemble an apical meristem, and have the first leaf primordia after 46 days. The obtained results fill in the gaps in the morphohistodiferentiation of *C. tigrina*'s PLB and indicate the effectiveness of the TCL technique in the micropropagation.

Keywords: Epiderm. Leaf. Plant Anatomy. Plant Tissue Culture.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESP – Estrutura Semelhante a Protocormo
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
TCL – *Thin Cell Layer*, ou Camada Fina Celular
LAVEG – Laboratório de Anatomia Vegetal
LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
MS/2 – Meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) suplementado com metade dos macro e micronutrientes
TDZ – Thidiazuron
± – mais ou menos
% – por cento
® – marca registrada
°C – graus Celsius
°GL – graus Gay Lussac
µm – micrômetro
µmol – micromol
µM – micromolar
µL – microlitro
cm – centímetro
g – grama
h – hora
L – litro
M – molar
mg – miligrama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 <i>CATTLEYA</i> E A FAMÍLIA ORCHIDACEAE	24
1.2 DESENVOLVIMENTO DAS ORQUÍDEAS	33
1.2.1 Características do desenvolvimento a partir do proembrião	33
1.2.2 Desafios da biologia do desenvolvimento: protocormos e estruturas semelhantes a protocormos	37
1.3 COMO CONSERVAR? TÉCNICA DA CULTURA DE TECIDOS EMPREGADA PARA O CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ORQUÍDEAS	40
2 OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVOS GERAIS	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3 METODOLOGIA	47
3.1 ORIGENS DAS AMOSTRAS DE <i>Cattleya tigrina</i>	47
3.2 METODOLOGIA APLICADA AOS EXPERIMENTOS EM CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	49
3.2.1 Meio de cultura usado para a técnica de TCL	49
3.2.2 Descrição da Técnica de TCL	50
3.2.3 Análise das amostras advindas da técnica de TCL	52
3.3 METODOLOGIA APLICADA AOS EXPERIMENTOS EM ANATOMIA VEGETAL	53
3.3.1 Microscopia óptica	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 HISTOLOGIA DA FOLHA INTEIRA DE <i>Cattleya tigrina</i>	57
4.2 MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DAS ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS	59
4.3 MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DAS ESPs OBTIDAS ATRAVÉS DE FOLHAS INTEIRAS	67
4.4 DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICA DE TCL, E O PAPEL DA EPIDERME NA OBTENÇÃO DE ESPs	68

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 *CATTLEYA* E A FAMÍLIA ORCHIDACEAE

As orquídeas destacam-se dentre as demais famílias de plantas pelo seu grandioso número de espécies. Segundo Dressler (1990), o número de espécies de orquídeas chega à 1/10 ou 1/14 dentre todas as fanerógamas. Ao todo, são estimados 20 mil a 25 mil espécies de orquídeas, presentes em 725 gêneros (Arditti, 1966; Dressler, 1990).

Além do grande número de espécies, uma segunda característica é atribuída a esta família, as orquídeas são tidas como as plantas mais derivadas de sua superordem Lilliflorae (Dressler, 1990).

Um terceiro atributo das orquídeas advém da sua ampla distribuição. Muitos autores, dentre os quais Dressler (1990), atribuem o adjetivo de cosmopolita às orquídeas, haja vista sua vasta localização que se estende desde a Suécia e o Alasca até a Terra do Fogo e a Ilha Macquarie. Apesar desta ampla distribuição, a maior diversidade de espécies de orquídeas ainda se dá nos trópicos (Dressler, 1990). Por conta disso, alguns autores, como Good (1974) denominam a família Orchidaceae como subcosmopolita.

São igualmente variadas as formas de vida das orquídeas. Arditti (1966) ressalta que as orquídeas habitam

inúmeros e distintos ambientes. As orquídeas podem crescer tanto nas florestas tropicais, como planícies subtropicais, além de campos alpinos, pântanos, charnecas e desertos; desde os profundos vales até o cume das montanhas (Arditti, 1966). Nesses distintos ambientes, as orquídeas podem ser encontradas tanto como epífitas, rupícolas, terrestres ou saprófitos (Dressler, 1990).

Apesar das várias formas de vida, o epifitismo é a forma de vida mais expressiva nas florestas tropicais. Benzing (1990) afirma que as orquídeas são as plantas que apresentam uma superioridade numérica em relação as demais epífitas, sendo 70% das epífitas (Gentry & Dodson, 1987). Para Benzing (2012), dois terços das espécies de orquídea apresentam a forma de vida epifítica. Por conta disso, as orquídeas epífitas e seu abundante número de indivíduos estariam contribuindo significativamente com a riqueza de espécies nas florestas tropicais (Kersten, 2010).

Além da riqueza, as orquídeas epífitas também acrescentam à biodiversidade das florestas tropicais. O trabalho de Dunsterville (1961, *apud* Dressler, 1990) ilustra bem essa contribuição das orquídeas epífitas que não é somente ao número de plantas, mas, igualmente à diversidade de espécies nos trópicos. Em um único forófito na Venezuela, Dunsterville (1961, *apud* Dressler, 1990) observou 47 distintas espécies de orquídeas. Todas elas apresentavam a forma de vida epifítica (Dunsterville, 1961 *apud* Dressler, 1990). Assim sendo, é claro que as orquídeas, sobretudo as epífitas, contribuem numericamente e em biodiversidade nas florestas tropicais.

Além da contribuição à biodiversidade e à riqueza das florestas tropicais, é igualmente relevante o interesse econômico atrelado às orquídeas, sobretudo às epífitas. Campos (2008) ressalta que a beleza, o exotismo, as fragrâncias e a diversidade das flores fazem das orquídeas, indiscutivelmente, plantas de grande interesse na indústria de horticultura. Dentre vários gêneros de epífitas que despertam interesse de cultivo, está o gênero *Cattleya* Lindl. Para Cruz, Borba & van den Berg (2003) *Cattleya* é dos gêneros de Orchidaceae um dos mais importantes devido ao valor ornamental, sobretudo, por conta da beleza de suas flores.

A flor de *Cattleya* além de ser um atrativo à orquidofilia é também um importante atributo taxonômico. A análise da flor de *Cattleya* é importante para diferenciar este gênero dos demais, como, por exemplo, o gênero *Cattleya* diferencia-se das orquídeas do gênero *Epidendrum* L., por não apresentar o labelo fusionado à coluna (Withner, 1988). Já a separação entre *Cattleya* e *Laelia* Lindl. é mais tênue. Tradicionalmente, a separação se deu baseada no número de políneas, sendo oito as políneas em *Laelias* ao passo que apenas quatro em *Cattleya* (van den Berg & Chase, 2004). Os mesmos autores, porém, ressaltaram que o número de políneas não é um caráter forte para separar esses gêneros. Sendo assim, propuseram uma separação que leve também em conta uma análise molecular das filogenias. As filogenias mais recentes, com base na biologia molecular revelaram que as *Laelia* detêm afinidade com as espécies de *Sophronitis* (van den Berg *et al.*, 2000; Buzatto *et al.*, 2010).

Mais ainda, segundo as novas filogênias, *Sophronitis* adentra o gênero *Cattleya* (van den Berg *et al.*, 2009). Logo, a revisão taxonômica de *Cattleya*, feita por van den Berg *et al.* (2009) demonstrou haver uma expansão do gênero *Cattleya*, mas que mantém a monofilia do gênero.

A literatura atribui outras características que definem as *Cattleya*. As *Cattleya* distinguem-se pela presença de um rizoma forte e de aspecto lenhoso, além do ramicaule que constitui o pseudobulbo (Withner, 1988). Com relação ao metabolismo, há metabolismo do ácido crassuláceo (CAM) nas *Cattleyas* como padrão para a fixação de carbono em suas folhas (Knauff & Arditti, 1969; Harrison & Arditti, 1978; Arditti, 1979). Num aspecto florístico, as *Cattleya* apresentam inflorescências terminais. Além disso, detêm uma grande variedade na morfologia e coloração de suas flores.

A variedade das flores das *Cattleya* está intimamente ligada à genética dessas plantas. O leque de variações encontradas nas espécies de *Cattleya* advém dos cruzamentos feitos naturalmente ou por ação antrópica. Era sabido, em 1958, que, dentre os híbridos de *Cattleya*, 26 eram naturais e 238 artificiais, produzidos por cultivo (Withner, 1988). Mas como podem ser possíveis tantos híbridos? Uma das razões que justificam o grande número de híbridos está no âmbito celular dessas plantas. As *Cattleya* apresentam, em geral, um número diploide de cromossomos de 40 (Withner, 1988). Não é o número 40 em si que confere a habilidade de formar híbridos mas o número par de cromossomos que garante uma correta

segregação durante os processos de meiose e mitose. Isto é importante pois são muitos os cruzamentos feitos na hibridização. Logo, sendo par os cromossomos não apenas resultam em boas segregações, mas permitem gerar híbridos férteis. Por fim, a fertilidade dos híbridos corrobora a manutenção de gerações na natureza e nos orquidários, atributos extremamente valorizado entre os orquidófilos.

Se por um lado a formação de híbridos é benéfica em termos de cultivo, por outro ela traz uma grande dificuldade de análise taxonômica, sobretudo no que diz respeito às revisões do nome científico em relação ao táxon ocupado. Afinal, Withner (1988) menciona que espécies cuja origem se dá de uma hibridização intergênica podem até mesmo vir a fazer parte de outro gênero. Um exemplo disso, é a espécie deste estudo *Cattleya tigrina* A. Rich. É relatado haver grande dificuldade apresentada por parte dos criadores (Allikas, 2010) e cientistas (Withner, 1988) em diferenciar *Cattleya tigrina* de *Cattleya guttata* Lindl.

Recentemente, *Cattleya tigrina* teve uma revisão taxonômica, segundo Withner (1988) a espécie foi alvo de grande confusão na nomenclatura taxonômica. De *Epidendrum elatius* var. *leopoldii* (Verschaff. ex Lem.), em 1862, *C. tigrina* passou por inúmeras denominações taxonômicas que incluíam mudança de gênero para *Cattleya*, além de variadas mudanças de epíteto específico (Buzatto *et al.*, 2010). Até recentemente a espécie foi classificada como *C. leopoldii* Verschaff. ex Lem. Novas revisões estabeleceram o nome da espécie como sendo *C. tigrina*,

conforme a descrição de 1848. Apesar disso, ainda hoje é frequente haver dúvidas resultantes das variadas mudanças taxonômicas. Com efeito, *C. tigrina* é frequentemente confundida com outras espécies do gênero *Cattleya*. Withner (1988) e Cruz *et al.* (2003) ressaltam a dificuldade em distinguir *C. tigrina* de *C. guttata* (Lindl.) que ocasionam muitos erros. Ao passo que Buzatto *et al.* (2010) relembram a semelhança na morfologia vegetativa entre *C. tigrina* e *C. intermedia* (Graham) e afirmam a necessidade de sempre analisar as flores destas plantas e não apenas a parte vegetativa a fim de que se possa realizar uma distinção das espécies.

As flores de *C. tigrina* caracterizam-se por uma coloração marrom, associada às manchas de preto, tanto nas pétalas como nas sépalas. As manchas conferem à planta um padrão semelhante à pelagem felina dos tigres e leopardos (Buzatto *et al.*, 2010). Essa verossimilhança, entre as machas florais e a pelagem dos felinos, é constatada no epíteto específico do nome da espécie. Segundo Withner (1988), é dos epítetos específicos, até então escolhidos, mais apropriado para a espécie. Além do padrão de manchas, *C. tigrina* apresenta um labelo róseo-purpura (Cruz *et al.*, 2003; Buzatto *et al.*, 2010). O período de floração de *C. tigrina* é um importante dado que a distingue de outras espécies. *Cattleya tigrina* floresce durante no verão, entre os meses de dezembro a fevereiro (Withner, 1988; Cruz *et al.*, 2003).

Somando a essas características, *C. tigrina* é descrita como sendo uma erva epifítica, mas também pode ser rupícola

(Cruz *et al.*, 2003; Buzatto *et al.*, 2007; Buzatto *et al.*, 2010). Geograficamente, a literatura descreve a espécie, *C. tigrina*, como pertencente ao bioma da Mata Atlântica, tendo como abrangência os Estados da Pernambuco, Bahia até o Rio Grande do Sul (Cruz *et al.*, 2003; Buzatto *et al.*, 2007). O hábitat é descrito por Buzatto *et al.* (2010) como sendo de altitudes moderadas. Segundo Withner (1988), *C. tigrina* é encontrada na floresta em altitude até 100 metros. Além da altitude moderada, a espécie é encontrada em locais de alta humidade associada a períodos de secas sazonais são relatadas para esta espécie.

O ambiente em que *C. tigrina* habita, a Mata Atlântica, é *per se* um *hotspot* mundial. Aliado a isso, a espécie sofre com o uso irracional dos recursos florestais que tem levado este bioma a sofrer uma intensa devastação (Buzatto *et al.*, 2007), além de uma ocupação urbana desordenada. Conjuntamente, a exuberância das flores faz da planta um atrativo de alto valor ornamental (Ventura *et al.*, 2002). Os mesmos autores ressaltam que a floração, sendo entre os meses de verão, favorece a coleta predatória da espécie por mateiros, além do próprio impacto do turismo nas regiões de ocorrência da espécie. Segundo a Flora do Estado do Rio Grande do Sul, *C. tigrina* está vulnerável à extinção (Rio Grande do Sul, 2002). Todo esse cenário associado à parca atuação política em prol da conservação ecológica colocaram *C. tigrina* em grande risco.

Ao mesmo tempo, em que a espécie *C. tigrina* encontra-se em grande vulnerabilidade, a procura por indivíduos na natureza permanece. Mas como evitar a extração predatória de *C.*

tigrina? Dentre as políticas necessárias, estão: a reconstrução de hábitat, a segurança e a maior fiscalização do patrimônio genético do Bioma da Mata Atlântica. Além destas medidas, há também a necessidade de se utilizar técnicas aprimoradas de cultivo *in vitro* que permitam que o cultivo artificial torne-se mais atraente e acessível do que a retirada do indivíduo da natureza.

No intuito de possibilitar o cultivo *in vitro* de *C. tigrina*, variados trabalhos se esmeraram em determinar condições *in vitro* para a propagação massal desta orquídea (Moraes *et al.*, 2009; Lone *et al.*, 2010). Não obstante, a compreensão acerca do desenvolvimento das monocotiledôneas, sobretudo das orquídeas, ainda é limitada. Para elucidar, ainda são tão pouco compreendidas, as estruturas formadas durante o desenvolvimento das orquídeas. Se, pois, não houver um conhecimento básico da anatomia e fisiologia do desenvolvimento é de se esperar que o conhecimento derivado deste, o conhecimento aplicado sofra grandes retardos. Sendo assim, é preciso que haja um desenvolvimento dos conhecimentos básicos acerca do desenvolvimento biológico de culturas, como de orquídeas, que favoreçam à micropropagação e a conservação biológica.

1.2 DESENVOLVIMENTO DAS ORQUÍDEAS

1.2.1 Características do desenvolvimento a partir do proembrião

Historicamente, muitas orquídeas foram trazidas do Novo Mundo, além da Ásia, para a Europa. A exuberância das flores não apenas motivou o cultivo vegetativo, mas com ele também o desejo de entender a biologia reprodutiva das orquídeas e seu desenvolvimento. O próprio Darwin dedicou uma obra ao estudo da biologia das orquídeas, planta que lhe despertou grande fascínio. Afinal, também era do anseio desses orquidófilos e naturalistas entender como as orquídeas se desenvolvem para aprimorar o cultivo, incluindo o com fins comerciais de gêneros como *Vanilla* Mill.

Desde o princípio do estudo do desenvolvimento das orquídeas, tem sido salientado como notável o tamanho das sementes das orquídeas. As sementes das orquídeas são tão diminutas que, para Yam & Arditti (2009), elas são como pó, quando vistas ao olho nu. Além de pequenas, as sementes de orquídea caracterizam-se por sua leveza (Arditti, 1967). Do mesmo modo, chama a atenção o grandioso número de sementes produzidas por cápsula. Segundo Arditti (1967), o número de sementes descrito na literatura varia de 1300 a 4 milhões de sementes por cápsula.

Outra diferença, que as sementes de orquídeas apresentam, é serem apomíticas (Stoutamire, 1964). As sementes apomíticas, são aquelas cuja formação se dá na ausência de fecundação.

Além da semente, as características relacionadas ao proembrião chamam atenção no desenvolvimento das orquídeas. Arditti (1967) descreve os proembriões das sementes de orquídeas como pequenos, esféricos e suspensos no interior de uma membrana, transparente ou pigmentada, e tegumento. Johansen (1950), por sua vez, aponta que há falta de uniformidade na embriogênese das orquídeas devido ao tamanho e diversidade da família. Por conseguinte, variadas classificações foram feitas para descrever o desenvolvimento das orquídeas e para agrupar buscando padrões comuns. Segundo a classificação de embriões de Veyret (1974), são conhecidos três padrões de embriões de orquídeas. O primeiro tipo é aquele que se desenvolve segundo normas de desenvolvimento fixas; o segundo tipo é irregular, apresenta formas que seguem um padrão de desenvolvimento, mas detém variações entre os indivíduos da mesma espécie; o terceiro tipo é aquele em que o proembrião, já no desenvolvimento inicial, difere dos tipos fundamentais de desenvolvimento.

Além dos tipos de proembriões, são também conhecidas algumas peculiaridades da biologia do desenvolvimento das Orchidaceae. Por exemplo, a família não apresenta endosperma em suas sementes. Veyret (1974) afirma que o endosperma não se forma ordinariamente nas orquídeas, e por conta disso, é

rudimentar o desenvolvimento do proembrião. Como consequência disso, e como outra característica, na ausência desse endosperma, o proembrião é nutrido pelo tecido do suspensor (Treub, 1879 *apud* Veyret, 1974). Há casos também em que, além da ausência do endosperma, há também a falta do suspensor. Segundo os estudos de Treub, a nutrição dos embriões viria do contato do proembrião com o saco embrionário (Treub, 1879 *apud* Veyret, 1974). Juntamente com isso, a poliembrionia é uma singularidade da família Orchidaceae. Segundo Johansen (1950), poliembrionia já foi identificada tanto para *Cymbidium bicolor* Lindl. como para *Euliphia epidendreae* C. E. C. Fisch. Nesses casos pode tanto o zigoto dividir-se independentemente, como a célula do proembrião jovem se proliferar formando embriões adicionais (Johansen, 1950). O proembrião das Orchidaceae é a estrutura que germina, completando seu desenvolvimento fora do tegumento da semente, constituindo o que, Treub (1879, *apud* Veyret, 1974), denominou de protocormo. Conforme Veyret (1974), o protocormo apresenta ápice caulinar com primórdios foliares e uma base com rizóides, denominando-se de plântula somente quando surgem as raízes. Portanto, protocormo é um estágio intermediário entre o proembrião e a plântula. O protocormo já evidencia uma bipolaridade devido a presença de um ápice caulinar e uma base com rizóides (Liz, 2013).

Outra característica da família Orchidaceae é a sua interação com fungos. É frequente a presença de micorrizas, uma interação simbiote dos fungos com as orquídeas. Arditti (1967)

ressalta que infecções fúngicas são frequentes na germinação das sementes de orquídeas. Muito questionamento e estudo surgiram para compreender o porquê da infecção fúngica e a natureza dela. Hoje é sabido que ela é uma relação benéfica para ambos, a planta e o fungo.

Além destas singularidades, há ainda outra particularidade no desenvolvimento dos embriões de orquídeas, que é a formação de protocormos. Os protocormos são formados em embriões que não apresentam diferenciação morfológica (Veyret, 1974). Junto da germinação, vem o crescimento celular que se dá exceto na região apical do proembrião, segundo Veyret (1974), a zona apical é que dará origem ao protocormo cônico após o crescimento das células seguido de divisões longitudinais.

Para Veyret (1974), o protocormo é claramente distinguível devido à intensa atividade meristemática. Além disso, há diferenciação celular que vai acontecendo aos poucos no protocormo, isto é, surgem zonas. A parte apical, zona superior do protocormo, dá origem aos órgãos vegetativos da haste ao passo que a zona inferior à radícula e o futuro sistema radicular. Os primórdios foliares não demoram em serem formados, sendo o segundo primórdio foliar originado por uma certa distância do primeiro (Veyret, 1974). O mesmo autor salienta ser, esse segundo primórdio foliáceo, o ponto de delimitador da parte aérea.

Ainda que vários aspectos do desenvolvimento das orquídeas sejam descritos pela literatura, a análise da mesma revela que permanecem lacunas na compreensão da biologia do

desenvolvimento das orquídeas. Até o presente salientou-se algumas das singularidades que caracterizam as orquídeas como alguns dos elementos da biologia do desenvolvimento de orquídeas. Apesar disso, a biologia do desenvolvimento, em especial de orquídeas, é ainda uma área do conhecimento que requer constantes aprimoramentos. Dentre as razões para a necessidade do estudo está, inicialmente, a quantidade de espécimes que compõem a família Orchidaceae; por segundo, as variadas formas de vida e peculiaridades do hábitat que ocupam cada uma das espécies; terceiro, pela necessidade de melhorar os protocolos em face às novas modificações advindas da cultura de tecidos, da biologia molecular e da engenharia genética.

1.2.2 Desafios da biologia do desenvolvimento: protocormos e estruturas semelhantes a protocormos

Dentre os conceitos importantes advindos do estudo da ontogênese de orquídeas está a distinção protocormos e das estruturas semelhantes a protocormos (ESP).

O termo protocormos aparece pela primeira vez nos estudos de Treub, em 1890 (Yam & Arditti, 2009). Para Treub, protocormo era o termo que descrevia as plântulas de lycopódios. Apesar de Treub ter sido o primeiro a criar o termo protocormo, sua interpretação da estrutura foi um tanto quanto equivocada. Hoje é sabido que Treub estava analisando não um protocormo,

mas uma micorriza. Faltou a Treub, segundo Yam & Arditti (2009), dar a devida importância ao achado das micorrizas.

A descrição de protocormo hoje vigente é consistente com a descrição de Veyret (1974). Segundo esta, protocormo é uma estrutura formada a partir do proembrião de orquídea. A ontogênese do protocormo advém das células superiores do proembrião (Veyret, 1974). Essas células expandem-se e dividem-se longitudinalmente, originando uma estrutura cônica capaz de formar tanto as partes aéreas (zona superior) quanto o sistema radicular (zona inferior) (Veyret, 1974).

Já a origem do termo ESP advém da década de 60, por meio dos estudos de George Morel, em culturas de *Cymbidium* Sw. Ao mesmo tempo em que Morel estudava o novo meio de cultura chamado de “Knudson III”, ele deu o nome de ESP à “pequena e uniforme estrutura bulbosa que se assemelha exatamente com um protocormo” (Yam & Arditti, 2009). Segundo Yam & Arditti (2009), esta foi uma das contribuições mais significativas à terminologia de orquídeas. Por meio do termo de Morel, consolidou-se, como ESP, as estruturas que se assemelham a protocormos e são obtidas a partir de culturas *in vitro* de orquídeas.

Se a ESP se parece exatamente como um protocormo, por que empregar outra denominação? Esta pergunta remete a um linha de pesquisa importante da anatomia vegetal, que é a ontogênese. A ontogênese é uma subárea da anatomia vegetal que se preocupa em compreender a origem de um tecido e as estruturas derivadas dele, utilizando como base observações do

desenvolvimento. Apoiando-se na ontogênese é, então, possível compreender porque Morel emprega o termo ESP, em lugar de apenas protocormo, ficando também mais elucidada a diferença que existe nesses conceitos.

Assim sendo, os protocormos originam-se do proembrião de orquídeas. Mais precisamente, a descrição de Veyret (1974) define como origem dos protocormos as células da região apical do proembrião. Ao passo que a ESP, descrita por Morel, têm por origem não o proembrião, mas nas pontas do caule de *Cymbidium* (Yam & Arditti, 2009). Além da origem caular, sabe-se hoje que as ESP podem igualmente serem originadas de outras estruturas como as extremidades dos brotos, caule e raiz e as camadas finas (TCL) dos nós caulinares (Zhao *et al.*, 2008).

As ESPs e os protocormos não apenas distingue quanto suas origens, mas também a forma de obtenção destas estruturas. Arditti (2007) traz também como conceito das ESP o fato delas serem obtidas *in vitro* por explantes ou calos. Logo, as ESPs demonstram ser um termo que vem consolidar a formação de tecidos meristemáticos advindos de técnicas da cultura de tecidos em orquídeas. Vale salientar pelas razões supracitadas que outros termos da cultura de tecidos, tais como calos e culturas nodulares, não seriam tão adequados quanto ESPs para referir novas estruturas formadas em orquídeas.

Se por um lado é possível compreender a diferença entre protocormo e ESP, por outro lado é importante e urgente

compreender mais sobre a natureza de uma das técnicas que viabiliza a sua produção, a TCL.

1.3 COMO CONSERVAR? TÉCNICA DA CULTURA DE TECIDOS EMPREGADA PARA O CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS

Dentre as diversas técnicas que viabilizam a obtenção das ESPs, está a técnica de camada fina celular, do inglês, *thin cell layer* (TCL). Esta técnica foi primariamente desenvolvida em 1973 em *Nicotiana tabacum* L., pela pesquisadora Marie Tran Than Van (1973), e hoje é altamente empregada na cultura de tecidos vegetais e para diferentes plantas.

A alta aplicabilidade da TCL se deve a sua capacidade de aumentar grandiosamente a produção. Traduzindo isso para números, enquanto a produção convencional de orquídeas, através de ápices caulinares, pode gerar em um ano 11 mil plântulas, a produção advinda de uma única TCL é capaz de gerar ao todo 80 mil no mesmo intervalo de um ano (Teixeira da Silva *et al.*, 2007). Essa alta capacidade de produção da técnica de TCL é de suma importância para a cultura de tecidos em orquídeas.

Mas, afinal, em que consiste a TCL? Conforme Teixeira da Silva *et al.* (2007), TCL é uma técnica em que o material de desejo é seccionado longitudinalmente ou transversalmente

produzindo explantes de diminuto tamanho. Esses explantes, esclarecem os autores, podem proceder dos mais variados tecidos, como: caule, folha, inflorescências, primórdios das flores, órgãos florais, cotilédones e até mesmo embriões.

Ainda que o TCL possa ser obtido por meio de secções com diferentes orientações, há variações entre as secções longitudinais e transversais. Enquanto o TCL obtido por meio de secções longitudinais carrega apenas um ou dois tipos de tecidos, o TCL advindo de secções transversais inclui um pequeno número de células de todos os tecidos (Nhut *et al.*, 2001). As orientações parecem não divergirem quantidade de explantes produzidos em relação à orientação. Não obstante, os diferentes tecidos utilizados por cada uma das orientações de seccionamento devem ser levados em conta pelo pesquisador, a fim de adequar a técnica ao experimento.

Em suma, a técnica de TCL consiste em seccionar um pequeno pedaço de um órgão do vegetal, obtendo ao final uma fina camada de tecido (Teixeira da Silva, 2003; Teixeira da Silva *et al.*, 2006). Algumas vantagens obtidas por meio desta técnica podem ser elencadas. Um benefício da técnica, é que a fina camada de tecido permite um maior isolamento do tecido desejado. Por conta disso, é possível induzir programas morfogénéticos específicos com uma maior facilidade (Teixeira da Silva, 2003). Outro préstimo da técnica é compreender as interações numa escala micro. Isso por que a técnica garante uma porção suficiente de interação tecido/célula (Nhut *et al.*, 2001).

Em suma, para Nhut *et al.* (2001), o grande atributo da técnica é a viabilidade de se ter um sistema experimental simplificado.

Não seria vantajoso, utilizar a técnica de TCL quando o estudo visa interações entre os órgãos vegetais. Afinal, o experimento com o TCL não permite compreender o tecido como um todo, haja vista as secções realizadas. Só se pode compreender numa escala micro um pequeno conjunto de células que compõe o tecido. Há também que se considerar que as amostras todas advêm de cultura de tecidos, assim as variações morfoanatômicas das culturas precisam ser levadas em conta.

Apesar disso, compreender a interação tecido/célula garante ainda outra vantagem. A técnica de TCL permite um maior domínio, no sentido de que parâmetros controlados (como reguladores exógenos, luz, entre outros) podem ser dirigidos a grupos e tipos de células específicos (Chugh, Guha & Rao, 2009). Esse maior controle não apenas é interessante para estudos fisiológicos e de cunho genético, mas também para estudos ontogenéticos. Os estudos ontogenéticos podem se valer das poucas camadas de tecidos para compreender melhor a origem do material desenvolvido. Exemplificam isso, as várias menções na literatura de que a técnica do TCL é útil para melhor compreender a morfogênese (Tran Thanh Van, 1981; Nhut *et al.*, 2001).

Somando ao que fora mencionado, outra facilidade do TCL é o fato de usar uma pequena quantidade de material. O fato de utilizar uma pequena quantidade de material, mas ser capaz de produzir uma grande quantidade de material (Teixeira da Silva *et*

al., 2007), permite que a técnica possa ser empregada para criação de bancos de conservação. Promover a criação de bancos de conservação para orquídeas é importante, pois muitas vezes, métodos de propagação vegetativa não se encontram disponíveis para muitas orquídeas endêmicas, como *Aerides maculosum* Lindl. (Murthy & Pyati, 2001). Para esses caso, a utilização do TCL pode ser um bom aliado à conservação.

É muito frequente correlacionar a cultura de tecidos com fins comerciais, porém, não raro a cultura de tecidos corrobora indiretamente com a conservação de espécies. Várias orquídeas são endêmicas e sofrem com a retirada da natureza e exploração comercial (Ventura *et al.*, 2002). Criar protocolos e técnicas que viabilizem o cultivo *in vitro* é uma primeira medida para prevenir a extração de espécies da natureza. Em um segundo momento, bons protocolos viabilizam uma multiplicação em larga escala que tem serventia tanto para a comercialização, como para a conservação do recurso genético e, quiçá também a disponibilização de material para aclimatização *ex vitro* e reinserção na natureza. Segundo Fay (1992), trabalhos com uma espécie de *Cattleya*, também ameaçada, obtiveram êxito na propagação *in vitro*. Este dado corrobora, e lança dados otimistas, da relevante contribuição da cultura de tecidos ao conhecimento da biologia de orquídeas, como *C. tigrina* e da viabilidade de se buscar novas alternativas em prol da conservação desta espécie.

Compreende-se assim que a cultura de tecidos é uma importante ferramenta e que pode ser usada também para

salvaguardar o patrimônio genético, sobretudo, das espécies ameaçadas. A cultura de tecidos é também área dinâmica que apresenta novas técnicas como a de TCL. O TCL tem sido uma técnica vantajosa é capaz de elevada produção massal, mas também, útil para a compreensão da biologia vegetal em um microambiente.

Nesse sentido, o presente estudo esmera-se em apontar a importância do conhecimento da biologia básica da morfo-histodiferenciação de ESPs, no intuito de lançar alicerces para à técnica de TCL. Visa-se ainda corroborar com conceitos fundamentais da biologia vegetal das orquídeas, crentes de que eles possam ser usados *a posteriori* em estudos que visem conservação da espécie *C. tigrina*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a morfo-histodiferenciação de estruturas semelhantes a protocormos obtidos das folhas de *Cattleya tigrina* A. Rich. (Orchidaceae) cultivadas *in vitro* e através da técnica de TCL.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho consistem em analisar e descrever:

- i) histologia da folha inteira;
- ii) as estruturas semelhantes a protocormos (ESPs);
- iii) a morfo-histodiferenciação das ESPs;
- iv) o tempo de surgimento das ESPs vindas das folhas submetidas à técnica do TCL, comparando-as com as folhas inteiras (grupo controle);
- v) o desenvolvimento das ESPs pelo uso de TCL;

3 METODOLOGIA

3.1 ORIGENS DAS AMOSTRAS DE *Cattleya tigrina*

Todo o material usado para a técnica do TCL e demais análises das ESPs derivadas das TCLs provém de plântulas cultivadas *in vitro* no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV/CCA).

As plântulas cultivadas *in vitro* são oriundas de experimentos realizados por Fritsche (2009). Fritsche (2009) obteve sementes de *Cattleya tigrina* A. Rich que foram submetidas às técnicas de assepsia, inoculadas e cultivadas *in vitro* até tornarem-se também plântulas *in vitro*.

Para manter estas culturas e empregá-las para futuros trabalhos de TCL, procedeu-se a técnica do subcultivo comumente usada na cultura de tecidos vegetais.

Para o subcultivo e, conseqüente manutenção das plântulas *in vitro*, foram usados frascos de vidro com capacidade para 350 mL. Foram preparados meio de cultura, contendo metade da concentração de macro e micronutrientes do meio tipo MS (Murashige & Skoog, 1962). Foram ainda acrescidos ao meio 1 g.L⁻¹ de peptona de soja, bem como carvão ativado (Synth®) na proporção de 1 g.L⁻¹. Para gelificar do meio de cultura foi empregado ágar, 7,5 g.L⁻¹. A este meio de cultura

manteve-se o pH padrão de $5,8 \pm 0,5$, sendo que não foram acrescentados fitorreguladores ao meio.

Uma vez tendo o meio pronto, 30 mL de meio de cultura foi colocado em cada um dos frascos de vidro. Estes foram devidamente vedados, por meio da tampa de plástico, e por uma camada dupla de filme de PVC. Ao final deste processo, o meio de cultura foi autoclavado ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 1 kgf.cm^{-2} por 15 min) e, posteriormente, resfriado em temperatura ambiente. O meio de cultura foi armazenado em ambiente escuro. Manteve-se, como padrão, o uso de meio de cultura fresco, isto é, que tenha sido produzido durante um intervalo de tempo de no máximo 15 dias.

O repique do material fez uso deste meio de cultura. Utilizou-se de uma câmara de fluxo para a realização do procedimento, sendo empregadas para o fim do repique todas as técnicas padrão de assepsia. Ao final, deste processo foi possível manter frascos de vidro contendo amostras de *C. tigrina* num estadio de plântula, sob condições assépticas condizentes aos padrões da cultura de tecidos vegetais (Fig. 1A e 1B).

As amostras oriundas do repique permanecem em uma sala de crescimento no LFDGV, submetidas a uma intensidade luminosa de $50\text{-}60\text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dado por lâmpadas de fluorescência branca e fria, à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ em total escuro por 12 horas (Fig. 1A).

3.2 METODOLOGIA APLICADA AOS EXPERIMENTOS EM CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Como descrito *a priori*, as amostras de *Cattleya tigrina in vitro* são oriundas do trabalho de Fritsche (2009) e foram repicadas segundo a metodologia supracitada. Essas plântulas *in vitro* foram usadas para a aplicação da técnica de camada fina celular (TCL). As plântulas utilizadas já detinha raízes e um tamanho de 2 cm ($\pm 0,5$ cm), como ilustrado na Figura 1C.

3.2.1 Meio de cultura usado para a técnica de TCL

Para realizar a técnica de TCL foi empregado um meio de cultura distinto do meio de cultura em que as plântulas de *C. tigrina* eram armazenadas e repicadas.

Utilizou-se, como meio de cultura, o meio de Murashige & Skoog (1962) modificado. Embora fossem mantidas as formulações salinas e de vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), empregou-se metade da concentração de macro e micronutrientes e suplementou-se o meio com 1 g.L⁻¹ de peptona de soja, AgNO₃ 1 μ M.L⁻¹ e 2 g.L⁻¹ de Phitagel TM Sigma®.

Ao meio de cultura para o TCL, foram ainda acrescidos reguladores de crescimento. Como regulador de crescimento

utilizado foi tiadiazuron Pestanal® Riedel-de Haën (do inglês Thidiazuron, TDZ) na concentração de 2,5 µM. O TDZ é descrito pela literatura como uma feniluréia de atividade citocinínica (Taiz & Zeiger, 2009). Esta atividade citocinínica é importante, pois auxilia na indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESP) conforme prevê a técnica de TCL. Sendo que a concentração de TDZ usada, está embasada em trabalhos prévios desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, (FIT/CCA) que demonstraram que dentre várias concentrações de TDZ, a de 2,5 µM era a que produziu maior número de ESPs por TCL (Pereira-Dias *et al.*, 2011).

Uma vez estando pronto o meio de cultura, este foi autoclavado e vertido para placas de petri de vidro em câmara de fluxo. Utilizou-se 10 mL de meio de cultura, por placa de petri de dimensões de 100 x 18 mm.

Estando gelificado o meio de cultura, as placas de petri foram serradas, em seguida vedadas, revestidas com papel alumínio e armazenadas em local escuro à temperatura ambiente para os procedimentos experimentais subsequentes.

3.2.2 Descrição da Técnica de TCL

Os explantes usados para a técnica de TCL foram folhas de plântulas cultivadas *in vitro*.

Selecionaram-se para isso, frascos contendo plântulas. Os frascos foram abertos em câmara de fluxo laminar. Escolheram-se folhas de plântulas com o tamanho de 1-1,5 cm (Fig. 1C e 1D). Algumas dessas folhas foram reservadas para os estudos de anatomia vegetal.

Folhas foram destacadas da plântula com auxílio de pinça histológica e seccionadas transversalmente de maneira condizentes à técnica de TCL usada por Teixeira da Silva (2003); Steinmacher (2005); Teixeira da Silva *et al.* (2007). As secções foram feitas com auxílio um bisturi e pinça histológicos. Utilizou-se papel milimétrico para obter a espessura foliar de 1,5 mm ($\pm 0,5$ mm) para cada secção.

Cada uma das secções foliares foi posicionada nas placas de petri de vidro mantendo-se a ordem em que eram obtidas e um espaçamento padrão (Fig. 1E). Padronizou-se ainda para que a face abaxial das secções fosse mantida voltada ao meio de cultura. Assim sendo, montaram-se as placas de petri contendo três folhas que foram totalmente seccionadas usando a técnica de TCL (Fig. 1F). Ao final, cada placa de petri detinha estes três materiais em uma conformação triangular que garantiu uma padronização do experimento (Fig. 1F).

Além das folhas seccionadas também foram utilizadas folhas inteiras (Fig. 1D e 1F) como grupo controle. Essas folhas inteiras passaram pelo mesmo procedimento de seleção que as folhas seccionadas, tendo o mesmo tamanho. Não foi realizado nenhum tipo de separação entre as placas de petri, ou meio de cultura usados para as folhas seccionadas pelo TCL. Assegurou-

se com este procedimento uma uniformidade entre controle e TCL.

Após montadas as placas de petri, contendo em cada uma três folhas seccionadas ou três folhas inteiras, as placas eram então vedadas duplamente com filme de PVC e cobertas com uma folha de papel alumínio. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento B.O.D aclimatizada com temperatura média de 23 °C (± 2 °C) com um foto-período de 16/8 horas (luz/escuridão). As amostras foram mantidas sob observação semanal para observar a presença de ESPs.

3.2.3 Análise das amostras advindas da técnica de TCL

As amostras de folhas seccionadas e inteiras em suas respectivas placas foram acompanhadas a cada sete dias por um total de 107 dias.

As placas de petri contendo as amostras eram selecionadas aleatoriamente para serem submetidas aos processos e metodologias condizentes à anatomia vegetal.

Antes de serem submetidas à metodologia da anatomia vegetal, as amostras foram analisadas em microscópio estereoscópico de Captura Digital (Olympus SZH10) e capturadas as imagens por meio do Software Olympus DP Controller.

3.3 METODOLOGIA APLICADA AOS EXPERIMENTOS EM ANATOMIA VEGETAL

3.3.1 Microscopia óptica

Para responder as perguntas sobre a histodiferenciação propostas por este trabalho foram realizadas estudos com amostras de folha seccionada pela técnica de TCL e com amostras do grupo controle de folhas não seccionadas.

Conjuntamente com a análise morfológica supramencionada as amostras foram fixadas de modo a manter o padrão de separação feito durante os seccionamento pela técnica do TCL. Desta forma, cada frasco de ependorf detinha separadamente cada uma das secções. Uma nomenclatura minuciosa foi empregada a fim de denominar para cada uma das secções da folha, qual era a folha pertenciam, qual era a sua posição nesta folha, a qual placa estavam associadas bem como a data da análise e o tempo que permaneceram na placa. Igual zelo foi empregado para as amostras de folhas inteiras.

A cada sete dias, amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, em pH 7,2, por três horas. Parte das amostras também foi fixada em paraformaldeído 2%, a fim de viabilizar futuros estudos com microscopia de imunofluorescência.

Ambas as amostras fixadas (glutaraldeído e paraformaldeído) foram lavadas por três vezes em tampão

fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,2. Em seguida, foram desidratadas em uma série etílica gradual até que chegassem ao valor de etanol 70° GL. Após chegarem ao etanol 70° GL, as amostras receberam safranina alcoólica (Johansen, 1940). O acréscimo da safranina alcoólica se deu em detrimento a transparência das amostras e a dificuldade de orientá-las na fase de emblocamento. Verificou-se que usando a safranina alcoólica era possível orientar as amostras sem causar quaisquer danos que comprometessem a análise em microscopia óptica.

Para confecção de lâminas permanentes, as amostras foram desidratadas até etanol 96° GL. Posteriormente, para infiltração em hidroxietilmetacrilato (Jung's Historessin – marca Leica®), o material foi mantido em solução de pré-infiltração, *overnight*, e em solução de infiltração, por mais três horas, e, a seguir, foram montados os blocos utilizando a solução endurecedora, conforme instruções do fabricante.

Os blocos obtidos foram seccionados usando um micrótomo de rotação Leica, RM 2125 RT. Foram feitas secções longitudinais e transversais contendo 5 µm de espessura. Uma chapa aquecedora foi usada para a confecção das lâminas e secagem do material das laminas contendo as secções. As amostras foram coradas com azul de toluidina (O'Brien, Feder & McCully, 1964)

As amostras de folhas com zero dia foram aquelas amostras fixadas no mesmo dia em que a técnica de TCL foi executada. Além das análises mencionadas anteriormente, foram também realizados os testes histoquímicos do Sudan III (Costa,

1982), Sudan IV (Gerlach, 1984), tionina (Purvis *et al.* 1964, *apud* Kraus & Arduin, 1997) e cloreto férrico (Johansen, 1940). Para realizar os testes histoquímicos foi preciso realizar secções à mão livre, que fizeram uso de bloco de isopor, como apoio, e lâmina de barbear, para o seccionamento.

Finalmente, as amostras foram observadas em microscopia óptica Leica MPS 30 DMLS, sendo as imagens capturadas com o auxílio de uma câmara digital (Sony Cyber-Shot 5.1 DSC W180). Imagens também foram obtidas junto ao laboratório FlourBeg (BEG/CCB) utilizando o microscópio óptico (Olympus, modelo BX41) e o software Q-capture (Pro 5.1, Q-imaging).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 HISTOLOGIA DA FOLHA INTEIRA DE *Cattleya tigrina*

Anatomicamente, as folhas de *Cattleya tigrina* cultivadas *in vitro* apresentam uma tendência à equifacialidade mostrando um mesofilo homogêneo e (Fig. 1G), mas os estômatos estão restritos à face abaxial (Fig. 1G e 1H). Segundo Withner, Nelson & Wejksnora (1974), folhas hipoestomáticas são frequentemente encontradas nas orquídeas.

A epiderme foliar é uniestratificada (Fig. 1G e 1H). Os estômatos, situados abaxialmente, são do tipo anomocíticos (Fig. 1I e 1J). Os estômatos de *C. tigrina* não apresentam células subsidiárias, e conforme descrição de Esau (1974), ao redor dos estômatos anomocíticos encontram-se células epidérmicas ordinárias. As descrições da epiderme de *C. tigrina* são coerentes com os relatos encontrados na literatura. Segundo os relatos de Stebbins & Khush (1961), é frequente a presença de estômatos anomocíticos na epiderme de orquídeas.

Observou-se, ainda, algumas evidências de estômatos em formação, sendo que alguns mostravam o poro estomático ainda fechado. Algumas células epidérmicas ordinárias também mostravam evidências de recente divisão celular. Tais fatos indicam que a folha ainda estava em fase de desenvolvimento, o que é coerente com a origem da folha, obtida de uma plântula.

Somando a isso, é possível observar em secção transversal da epiderme foliar a presença de uma ampla câmara subestomática (Fig. 1L). A ampla câmara subestomática foi também observada em secção na região polar das células-guarda (Fig. 1K) e em secção na região média das células-guarda (Fig. 1L). Deter uma ampla câmara subestomática é caráter xérico comumente discutido no âmbito da anatomia ecológica (Lambers, Stuart & Pons, 2008). Para Haberlandt (1914) a importância das câmaras subestomáticas está em proporcionar a aeração interna do mesofilo. Mesmo que o ambiente em que *C. tigrina* esteja seja *in vitro*, esse é também um local ao qual a planta adapta-se. Nesse sentido, para a planta *in vitro* a câmara subestomática, que detém a função de armazenamento de ar, estaria desempenhando papel essencial para a aeração tecidual.

Além dessas características, em secção transversal, observa-se que as células-guarda do estômato apresentam uma delimitação parede-cutícula espessa na região do ostíolo (Fig. 1L).

Já com relação ao mesofilo, este é formado por um clorênquima homogêneo, composto por grandes células isodiamétricas (Fig. 1G e 1H). No mesofilo encontram-se idioblastos contendo ráfides (Fig. 1M). Para Prychid & Rudall (1999), a presença de idioblastos com ráfides é bastante frequente para plantas da família Orchidaceae. Outrossim, foi observada a presença de mucilagem, pois ocorreu reação positiva (cor rosada) com uso de tionina (reagente de cor azul), tanto nas células parenquimáticas do mesofilo, quanto nas células

epidérmicas (Fig. 1N).

Com relação ao sistema vascular, verifica-se que o feixes vasculares são colaterais (Fig. 1H e 2A), sendo circundado por uma bainha parenquimática perivascular (Fig. 2A). Em secções longitudinais, constatou-se que os elementos de vaso apresentam espessamento anelado e espiralado, típico de elementos traqueais de protoxilema.

Em suma, verifica-se que a lâmina foliar utilizada para o emprego da técnica de TCL é uma folha jovem, com alguns tecidos demonstrando estar em desenvolvimento

4.2 MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DAS ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS

Morfologicamente, as ESPs desenvolveram-se, sobretudo, nas secções foliares condizentes à região mediana e mediano-basal da folha de *Cattleya tigrina* (Fig. 2B). As primeiras constatações da presença das ESPs se deu aos 21 dias, verificou-se uma correlação entre o surgimento ESPs com a região foliar seccionada (Fig. 2B, 2C e 2D).

Outrossim verificou-se que as ESPs não surgiram individualmente, pelo contrário, no mesmo local em que uma nova ESP surgia ocorreram outras novas ESPs em área adjacente (Fig. 2E).

Outro atributo notado morfolologicamente foi a alteração

na morfologia da secção (Fig. 2C-2M, 3A-3C). As modificações vistas foram um intumescimento além da perda da morfologia inicial. Esses fatos ocorreram concomitantemente com o desenvolvimento de novas ESPs nas folha seccionada. Compreende-se assim que foram as ESPs quem contribuíram para uma mudança no tamanho e morfologia das secções foliares.

A morfodiferenciação durante o desenvolvimento das ESPs podem ser constatadas nas Figuras 2C-2M e 3A-3C. Primeiramente, verifica-se que as ESPs são estruturas pequenas, cônico-bulbosas que se projetam para além do mesofilo de uma folha seccionada de *C. tigrina* (Fig. 2D-2F).

As ESPs apresentam-se, inicialmente, com uma coloração translúcida (Fig. 2F), mas posteriormente, com o desenvolvimento ficam com coloração esbranquiçada (Fig. 3A-3C). Não apenas a coloração alterou-se com o desenvolvimento das ESPs, mas também a forma. As várias multiplicações celulares ocasionam uma mudança de uma forma cônica-bulbosa para esférica (Fig. 2F *versus* 3A).

Em estágios subsequentes, em que as ESPs apresentam-se mais desenvolvidas, é possível observar pequenas saliências na superfície das ESPs (Fig. 3A). As saliências descritas estão atreladas à formação de outras ESPs menores junto da ESP inicial (Fig. 3A-3C).

Histologicamente, constatou-se a vinculação da epiderme com o surgimento das ESPs. As evidências que corroboram com esta observação se dão já aos sete dias após

serem inoculadas. Com sete dias após o TCL, a epiderme foliar apresenta as células ordinárias com indícios de maior atividade mitótica do que as células parenquimáticas (Fig. 3D). As evidências de maior atividade das células epidérmicas são: a presença de um protoplasto denso, núcleos conspícuos (Fig. 3E), paredes celulares delgadas, além de evidências de mitose celular (Fig. 3F e 3G). Essas evidências permaneceram ao longo de todo o desenvolvimento das ESPs, haja vista que as ESPs sucedem de várias divisões celulares.

Igualmente, a atividade celular das células ordinárias foi maior nas amostras após do TCL do que nas amostras de zero dia. Inicialmente, as células epidérmicas não apresentavam o protoplasto denso quicá indícios de divisão celular, conforme observado na folha de zero dia (Fig. 1K e 1L). Não obstante, 14 dias após a realização da técnica de TCL observou-se que algumas células epidérmicas iniciaram divisões oblíquas e periclinais (Fig. 3F e 3G).

Após o aumento da atividade celular, verificou-se que o processo que lida na formação das ESPs segue com expansão das células epidérmicas (Fig. 3F-3H). As células ordinárias da epiderme tornam-se altas (Fig. 3I, seta preta). Subsequentemente ao aumento celular, indícios de mitose celulares são observados. Predomina das mitoses celulares sobretudo no sentido anticlinal (Fig. 3I, seta branca).

A partir dessas divisões celulares na epiderme surgem as primeiras elevações epiderme celular (Fig. 4A-4C). As elevações são modestas num primeiro momento (Fig. 4C). Todavia, com o

passar do desenvolvimento da ESPs, a elevação torna-se mais proeminente (Fig. 4D e 4E). Então, a ESP adquire forma esférica, ou de domo (Fig. 4F e 4G).

O termo ‘domo’ parece ideal para descrever a expansão e diferenciação da elevação inicial da ESP. Este termo foi usado por Arditti (1979) ao descrever as ESPs. A denominação de domo é válida, pois correlaciona com a estrutura da mais alta cúpula circular ou zimbório presente nas antigas igrejas. De fato, além da forma esférica, o termo ‘domo’ carrega consigo o posicionamento, ou seja, os conceitos de região superior. Para o caso das ESPs este termo é relevante e condiz com o fato de que a ESP culmina com a formação de um princípio de um ápice caulinar. Por essas razões, adotou-se neste trabalho a terminologia de Arditti (1979).

Além de verificar que as ESPs adquirirem a forma de domo, observa-se que adjacente a ESP, existem células com maior atividade celular, isto é, protoplastos densos e alguns idícios de atividade mitótica (Fig. 3H e 3I, 4B, 4E e 4F). Essa atividade foi menos intensa que nas células ordinárias. Assim, não se pode concluir que as células do clorênquima e junto a nervura mediana estariam contribuindo de forma significativa para a formação das ESPs.

Outra característica reparada é que as ESPs em forma de domo detêm as células epidérmicas ordinárias modificadas. Outrora, as células ordinárias eram altas e isodiamétricas (Fig.1K), posteriormente, passaram a ser pequenas e justapostas (Fig. 3J e 4E). Do mesmo modo, outra diferença observada foi

com o plano de divisão celular. Com o surgimento da forma de domo nas ESPs prevalecem as divisões periclinais nas células ordinárias (Fig. 3F). A soma dessas alterações associadas ao processo de dediferenciação celular, levaram a epiderme das ESPs no estágio de domo a tender à protoderme (Fig. 4A-4H).

A partir do estágio de domo, e nos subsequentes é perceptível nas ESPs a presença de túnica e corpo assemelhando-se aos ápices caulinares. A túnica é a região mais externa do domo da ESP: é uma camada unicelular, com células pequenas, justapostas e que se expandem através de divisões periclinais (Fig. 5A). Por outro lado, o corpo região mais interna do domo da ESP: é caracterizada por células também pequenas e não justapostas, com capacidade de dividir-se em diferentes planos celulares (Fig. 5A).

Aos 42 dias, são notados nas ESPs os primeiros primórdios foliares (Fig. 5B). Inicialmente, os primórdios foliares apresentam-se como diminutas elevações que se projetam na lateral das ESPs (Fig. 5D). A literatura descreve a formação dos primórdios foliares de *Cattleya* como subsequentes a formação do meristema apical (Arditti, 1979).

Com o desenvolvimento das ESPs verifica-se que os primórdios foliares aumentam em tamanho e em número de camadas celulares (Fig. 5B-5F, 6A e 6B). Aos 93 dias, é possível observar já a presença de estômatos e uma consistente diferenciação entre as faces abaxial e adaxial (Fig. 6C). Não raro é possível averiguar a presença de apenas um dos primórdios foliar aparente, como exemplificado na Figura 5F. A mesma

figura revela o prolongamento da epiderme de um primórdio foliar em conexão com células da túnica e corpo de uma ESP recém-formada.

Conjuntamente a formação das ESPs deu-se a formação dos tecidos vasculares a partir das células procambiais iniciais. O início do procâmbio ocorreu apenas nos estádios mais avançados do desenvolvimento das ESPs. No surgimento do procâmbio verifica-se uma clara distinção entre as células procambiais e as células circunvizinhas (Fig. 6D); enquanto estas detêm processo de vacuolização, aquelas apresentam um protoplasto denso. Procedeu-se, conforme a descrição de Esau (1959) para ápices caulinares, a formação de várias divisões celulares que se limitaram no sentido transversal.

Ao final do processo de constituição do procâmbio, foi notada uma clara distinção das células procambiais com o tecido entorno (Fig. 6D-6F). Nessa situação, as células procambiais apresentavam-se em grupos de células pequenas com denso protoplasto (Fig. 6D-6F).

Decorrente estádios, revelam o procâmbio com alongadas células com um protoplasto menos denso (Fig.6F). O espessamento da parede e a formação de paredes secundárias sucedem à medida que a diferenciação da célula procambial em elemento de vaso ocorre (Fig. 6F).

No mais avançado estádio detecta-se a formação de novas ESPs a partir das pré-existentes (Fig. 6B). Torna-se necessário para estudos mais prolongados que haja uma distinção nomenclatural das ESPs, a fim de proporcionar ao estudo uma

maior clareza das ESPs primordiais *versus* as derivadas. Sendo assim, se propõe para o estudo de ESPs em orquídeas a denominação de ESPs primárias para aquelas que são iniciais, secundárias (um estágio anterior à ESP primária), terciárias (anterior à ESP secundária) e assim sucessivamente (Fig. 6B). Já aplica-se neste estudo essa conceituação.

A Figura 6B retrata claramente o surgimento de novas ESPs a partir de pré-existentes. Ilustra-se na mesma figura as diferentes orientações e estádios de desenvolvimento das ESPs nesta fase. Nota-se ainda algumas das ESPs originando-se de tecidos mais periféricos das ESPs primárias ou iniciais (ESP1, Fig. 6B). Das ESPs primárias emergem ESPs secundárias, sobretudo na região adjacente à nervura mediana da ESP primária (vide ESP 2 na Fig. 6B).

Utilizando-se da mesma imagem a Figura 6B, é possível ainda compreender outros aspectos relevantes desse estágio de morfo-histodiferenciação das ESPs. Na região mais central da ESPs projetando-se perpendicularmente em relação a esta, percebe-se uma ESP bem desenvolvida, com tecidos em processo de diferenciação e primórdios foliares evidentes (Fig.6B). Numerosas divisões periclinais são encontradas nos primórdios foliares nesse estágio. A epiderme do primórdio foliar é predominantemente uniestratificada, verificando-se um processo inicial de diferenciação celular. Não obstante, é perceptível que ainda há características meristemáticas nesse primórdio foliar, pois encontra-se numa fase de maturação (Fig. 7B). Logo, ainda observa-se que o tecido mais periférico apresenta ora umas

células diferenciadas em epiderme ora células ainda meristemáticas da protoderme.

Em detrimento a essa etapa transitória de diferenciação dos tecidos com uma manutenção da atividade meristemática é que se observa o surgimento de novas ESPs. Observando a Figura 7A, semelhantemente ao retratado na Figura 6B uma transição protoderme/epiderme é observada. Por conta dessa atividade meristemática remanescente é que formou-se uma ESP terciária a partir de uma ESP primária. O estágio inicial de desenvolvimento da ESP terciária é observado na Figura 7A (vide ESP3). A ESP terciária relembra neste estágio um proembrião de Orchidaceae. Esta nova ESP também advém da epiderme de um primórdio foliar (da ESP1, à direita da ESP3 como indica a Figura 7A). A epiderme do primórdio foliar da ESP1 parece estar de forma contínua com as células do corpo da ESP3 (Fig. 7A, seta). Além da continuidade na epiderme, observa-se uma segunda evidência que são as múltiplas mitoses vistas no corpo da ESP3. Além desses indícios de divisão celular, fora constatado a presença de núcleos conspícuos e protoplasto denso (Fig. 7A), características comuns de todas as ESPs vistas em formação.

4.3 MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DAS ESPs OBTIDAS ATRAVÉS DE FOLHAS INTEIRAS

As folhas inteiras produziram ESPs aos 29 dias. O que é uma diferença de sete dias após em relação as folhas seccionadas pelas técnica do TCL.

A incidência de ESPs voltadas à face adaxial foi superior às voltadas à face abaxial. Possivelmente, a orientação da amostra no meio de cultura favoreceu o surgimento de ESPs voltadas à face adaxial e não à face abaxial. (Fig. 7B). Outro aspecto verificado é que o surgimento das ESPs não se deu apenas em tamanho, como também em número pelo surgimento doutras ESP secundárias.

As ESPs foram verificadas, sobretudo, nas regiões mediano-basal e basal, além de terem sido observadas em regiões onde ocorreram lesões. Na base foliar as ESPs de formato globular surgem em vários pontos, nunca aparecendo individualmente (Fig. 7C e 7D). Em uma primeira instância, o formato cônico é decorrente do desenvolvimento do ápice caulinar com seus primórdios foliares (Fig. 7B). Todavia, o desenvolvimento das ESPs secundárias e terciárias levam à formação de uma massa irregular (Fig. 7C-7E).

Aos 84 dias as ESPs constituem uma massa celular irregular, decorrente de novas ESPs sobre as precedentes, sendo que nas mais desenvolvidas já são distintos primórdios foliares e raiz adventícia (Fig. 7E). A partir do surgimento de raiz, segundo

Veyret (1974), o protocormo passa a constituir uma plântula. Sendo assim, as estruturas formadas em *C. tigrina*, a partir do momento em que surgem raízes nas ESPs, também estarão constituindo plântulas.

Ainda que estádios de desenvolvimento subsequentes das ESPs advindas de folha seccionada não foram do escopo deste trabalho, é válido notar que a presença da raiz adventícia é de suma importância para a absorção de nutrientes. Por ser uma etapa que precede a formação da raiz, é nesse estágio o momento de definição do início da bipolaridade nas ESPs, conforme sugere Liz (2013).

4.4 DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICA DE TCL, E O PAPEL DA EPIDERME NA OBTENÇÃO DE ESPs

Ao longo da morfo-histodiferenciação das ESPs foi evidenciado a presença marcante da epiderme celular na formação das novas ESPs. De fato, a epiderme demonstrou haver maior atividade celular (núcleos conspícuos, protoplastos densos, paredes celulares delgadas), bem como indícios de mitose. Todavia, por quê a epiderme haveria ser o tecido originário das ESPs e não outros tecidos? Esta pergunta premeia conceitos da genética e da biologia molecular. É preciso, assim, considerar a epiderme não como um tecido, mas observar suas unidades celulares. Com efeito, as células epidérmicas são células cujo

processo de diferenciação foi sutil, pois, não houve diferenciação terminal. Conforme Grafi (2004), a diferenciação terminal é aquela em que o destino da célula não pode ser mais alterado. As células com a diferenciação terminal detêm alterações no protoplasto, muitas vezes perda do núcleo (Grafi, 2004), além das modificações na parede celular. O destino de células como elementos de vaso exemplifica bem a diferenciação terminal celular.

Em um contraponto aos elementos de vaso, as células da epiderme ainda que tenha um caminho de diferenciação celular, este foi sutil, visto que uma célula ordinária detém ainda seu protoplasto ativo. A célula ordinária não apresenta paredes celulares com um espessamento secundário, mais ainda são células adultas especializadas que mesmo assim carregam uma grande plasticidade. A plasticidade das células epidérmicas vêm sendo atribuída aos graus de ubiquitinação de histonas, como a H2A (Alatzas & Foundouli, 2006) e ao remodelamento da cromatina (Verdeil *et al.*, 2007). Todos esses fatores cumulam na habilidade das células epidérmicas de retornarem ao seu estado de células meristemáticas, ao passo que o mesmo não aconteça com outras células que compõem a folha.

O retorno de uma célula diferenciada, como a célula epidérmica ao estágio de célula indiferenciada, como a célula da protoderme, é chamado de dediferenciação. De modo amplo a dediferenciação e significa readquirir a atividade meristemática. Para Nagata *et al.* (1994), a dediferenciação de células é algo que está atrelado à totipotência das células vegetais. Mais ainda, os

autores descrevem que a expressão de três genes de regulação auxínica: *parA*, *parB* e *parC*, estariam associados a dediferenciação de células do mesofilo já diferenciadas e não mitóticas (Nagata *et al.*, 1994). Sendo assim, de alguma forma a técnica de TCL e/ou as condições do meio atuaram interferindo na rota de maneira a sinalizar às células a se dediferenciarem e a plasticidade das células epidérmicas foi fundamental para que esse processo de dediferenciação pudesse ocorrer.

A ação de hormônios como citocinina foi também importante no processo de dediferenciação celular. Murthy, Murch & Saxena (1998) realçam que o TDZ, no âmbito da cultura *in vitro*, também tem a capacidade de dediferenciar as células, podendo agir como moduladores de reguladores endógenos em situações de estresse. Não apenas isso, o papel citocinínico do TDZ confere um estímulo à formação de meristemas apicais em detrimento aos radicais. A atuação da citocinina formando meristemas apicais é conhecida desde 1965 no clássico trabalho de Skoog e Miller (Taiz & Zeiger, 2009).

É válido ressaltar que essa plasticidade das células epidérmicas não foi algo pontual, porém constante. Ao longo da análise as características de intensa atividade celular (núcleos conspicuos, protoplasto denso, indícios de mitose celular) foi recorrente. Do mesmo modo, manutenção da plasticidade foi observado o constante o surgimento novas ESPs a partir de pré-existentes (Fig. 6B e 7B). Juntos essas observações reiteram a concepção da manutenção da plasticidade e das características meristemáticas na epiderme das ESPs existentes.

Mais ainda, comparando a folha seccionada pela técnica de TCL com a folha inteira, constata-se serem maiores as possibilidades de formar ESPs na folha seccionada. Afinal, as laterais da folha, região em que ocorreu a secção, estavam “abertas” favorecendo a formação por quaisquer tecidos constituintes da folha. Embora todos os tecidos detinha o potencial hipotético de gerar ESPs, a concreta formação das ESPs deu-se apenas na epiderme. Certamente, os motivos expostos anteriormente, plasticidade e capacidade de dediferenciação, conferem a epiderme elementos para que desta possam-se originar as ESPs.

A proveniência da epiderme, de fato, já é algo apontado pela literatura. Veyret (1974) em seu escrito sobre o desenvolvimento do embrião de orquídeas, menciona que um ou vários “protocormos” podem se diferenciar das células epidérmicas de outro protocormo inicial. Mesmo que o relato de Veyret (1974), fora feito para protocormos, ele já elucida o papel da epiderme na formação de protocormos derivados do protocormo inicial. Apesar da existência desses relatos a correlação da epiderme com o surgimento das ESPs não tinha sido explanado até então.

É possível ainda aludir à epiderme o sucesso de produção obtido no emprego da técnica do TCL. As propriedades meristemáticas da epiderme, a plasticidade e capacidade de dediferenciação, explicam os bons resultados obtidos no emprego da técnica de TCL (Teixeira da Silva, 2003; Teixeira da Silva *et al.*, 2007). Teixeira da Silva *et al.* (2007)

relata a obtenção 80 mil plântulas em um ano a partir de uma única TCL. Isto só é viável graças a plasticidade da epiderme, pois é através dela que novas ESPs surgem a partir de pré-existentes. Sem essa plasticidade e manutenção do caráter meristemático, uma única TCL só poderia dar origem a uma única plântula, pois logo que uma ESP se formasse todo o tecido se diferenciaria. Felizmente, é o oposto que ocorre, garantindo assim uma grandiosa formação de ESPs num processo contínuo.

Um segundo motivo ao êxito da técnica de TCL se deve ao seu potencial de indução de programas morfogenéticos específicos que são promovidos pela técnica de TCL (Teixeira da Silva, 2003). Apesar de se utilizar um pequena parcela de todos os tecidos que compõem a folha, com uma secção transversal, a indução dos programas morfogenéticos específicos parece estar atrelado somente à epiderme. Fica claro o papel da técnica de TCL em tornar a epiderme celular mais vigorosa mitoticamente.

Ademais outro benefício da técnica de TCL é a criação de rotas de entradas de substâncias contidas no meio de cultura. Sem um sistema radicular formado e num estado de mixotrofia as folhas seccionadas e inteiras dependem do meio de cultura. As secções feitas pela técnica do TCL conferem à amostra regiões por onde os nutrientes podem adentrar e nutrir as células. Mesmo não sendo tão eficiente como o sistema radicular, as aberturas conferidas pelas regiões seccionadas demonstram suficientes nutrir o tecido. Essas células que mais recebem os nutrientes, sobretudo o bordo, região periférica da secção, base foliar; demonstram ser as mesma regiões em que a formação das ESPs é

alavancada. Nesse sentido, a criação de rotas de nutrição parece relevante atributo da técnica de TCL, e mecanismo chave para a formação das ESPs.

Por fim, é importante salientar que a utilização da técnica de TCL demonstrou ser eficaz em demonstrar a morfo-histodiferenciação das *ESPs*. Por meio dela compreendeu-se o importante papel da epiderme tanto para a formação das ESPs como no sucesso da própria técnica de TCL.

Figura 1: *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae), amostras com zero dia. Legenda: ep=epiderme; c=clorênquima; cs=câmara subestomática; fv= feixe vascular; i=idioblasto; s= estômato. **A:** Frascos contendo as culturas de *in vitro* em sala de crescimento no LFDGV (FIT/CCA). **B:** Plântulas *in vitro*. **C:** Detalhe de uma plântula. Barra=1cm. **D:** Folha de uma plântula, exemplificando o tamanho da folha usada. Barra=2mm. **E:** Folha seccionada em uma placa de petri, exemplificando o procedimento da técnica de TCL executado. Barra=1cm. **F:** Esquema demonstrando o posicionamento triangular das amostras na placa de petri só com folhas inteiras (placa de petri, esquerda inferior) e com folhas seccionadas pela técnica do TCL (placa de petri, direita superior). **G:** Secção transversal da lâmina foliar. Barra=500µm. **H:** Detalhe da secção transversal da folha. Barra=200µm. **I:** Secção paradérmica da lâmina foliar. Barra=100µm. **J:** Detalhe de um estômato. Barra=50µm. **K:** Detalhe dos tecidos periféricos de uma folha seccionada transversalmente. Estômato evidenciado em secção polar das células guarda. Barra=50µm. **L:** Detalhe de um estômato (seta), seccionado transversalmente na porção média das células-guarda, destacando parede-cutícula espessa externa e internamente ao ostíolo. Barra=50µm. **M:** Detalhe das ráfides encontradas em idioblastos entre células do clorênquima, em secção transversal de folha *in vivo* Barra=50µm. **N:** Detalhe de tecidos periféricos de uma secção transversal de folha, evidenciando reação positiva com tionina (reagente de cor azul), indicando presença de mucilagem. Barra=50µm.

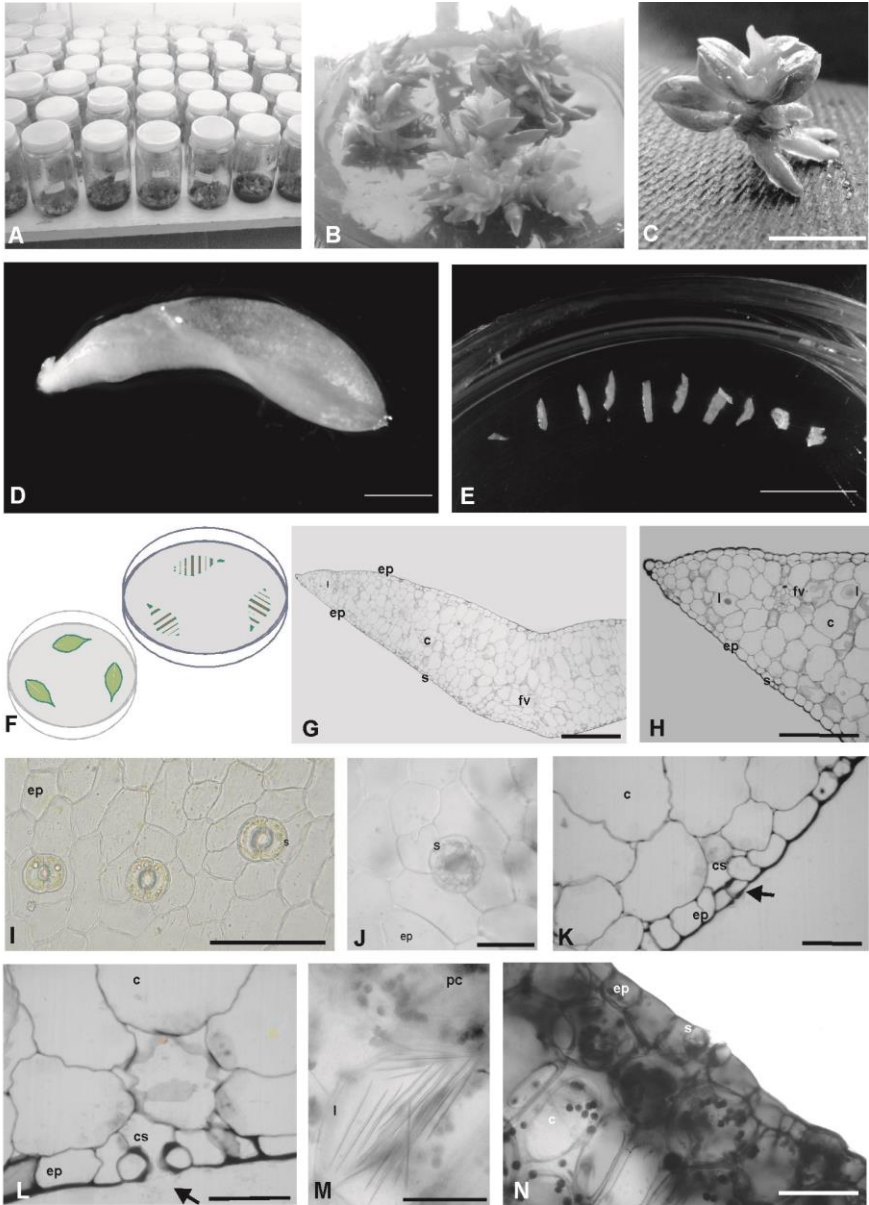


Figura 2: *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae). Legenda: bp=bainha parenquimática; c=clorênquima; fv= feixe vascular. **A:** Detalhe do feixe vascular em uma amostra com zero dia. Barra=50µm. **B:** Folha seccionada, seta indica vários ESPs em diferentes estádios de desenvolvimento. Barra=1cm. **C:** Secção foliar obtida pela técnica de TCL após inoculação. Proeminências de ESPs podem ser vistas na lateral seccionada da lâmina foliar. Barra=1mm. **D:** Lateral da secção foliar demonstra presença de um ESP globular em desenvolvimento inicial. Barra=1mm. **E:** Detalhe de uma secção foliar, TCL, as ESPs são indicados na seta. Barra=2mm. **F:** Seta aponta um ESP em uma secção foliar. Barra=1mm. **G:** Detalhe de uma secção foliar, apresentando intumescência e mudança na morfologia por conta da formação das ESPs. Barra=2mm. **H:** Secção foliar apresenta com uma ESP bem desenvolvida na lateral da secção foliar e crescendo da lateral inferior acima. Barra=1mm. **I:** Secção foliar com ESP. Observa-se que a amostra seccionada curvou-se com a formação da TCL. Barra=2mm. **J:** ESP desenvolvidos em folha seccionada pela técnica de TCL. Barra=1mm. **K:** Secção foliar com ESP. Barra=1mm. **L:** Secção foliar com ESPs desenvolvidos. Barra=1mm. **M:** Secção foliar com ESPs. Barra=1mm.

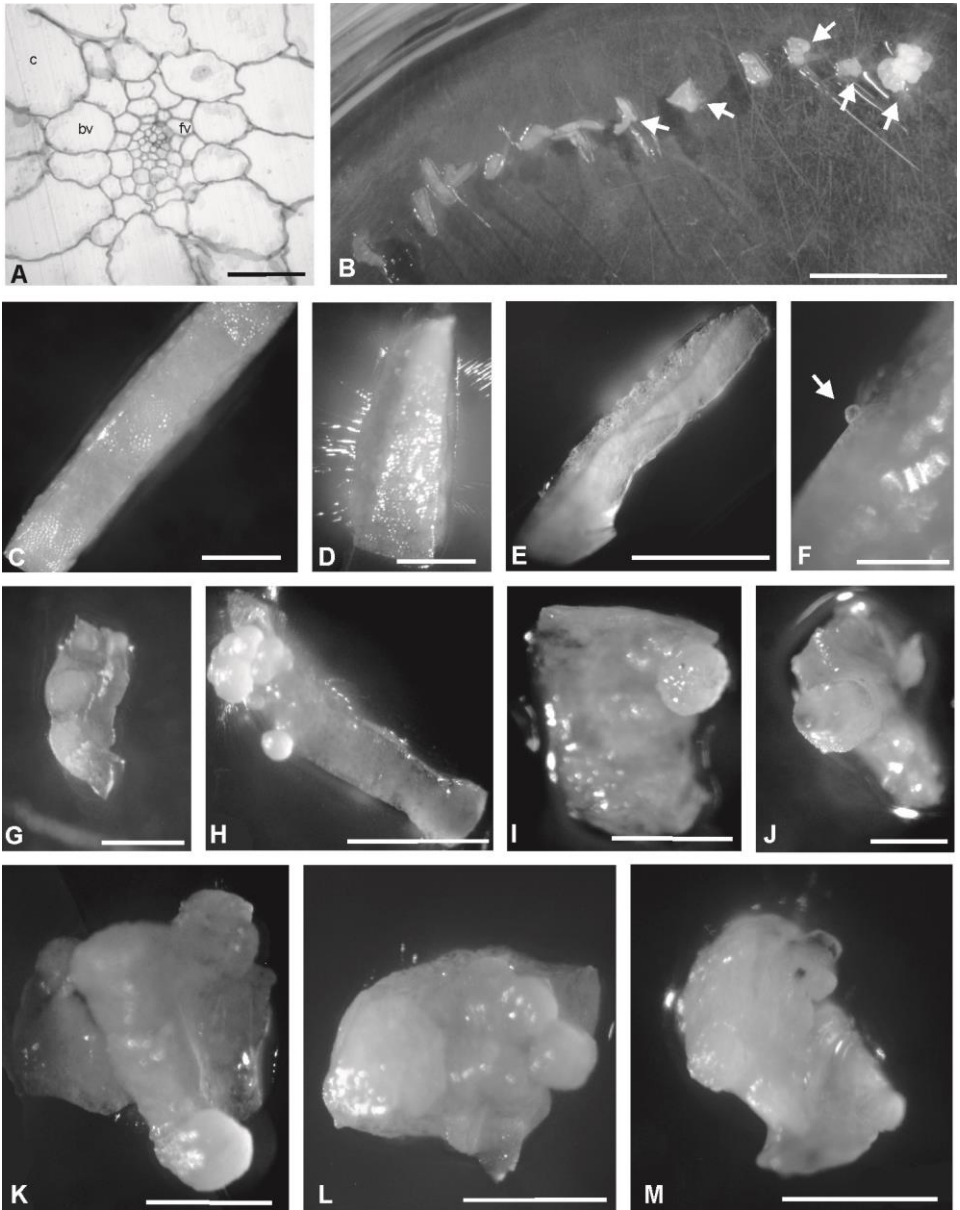


Figura 3: Folha seccionada de *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae), pela técnica de TCL. Legenda: ep=epiderme; c=clorênquima; fv= feixe vascular. **A:** Secção foliar demonstrando ESP bem desenvolvido na amostra. Barra=1mm. **B:** Secção foliar após TCL. Verifica-se a coloração esbranquiçada da ESP bem como a grande expansão celular formada. Barra=1mm. **C:** Secção foliar demonstrando um ESP bem desenvolvido na amostra. Barra=1mm. **D:** Secção transversal da lâmina foliar de uma folha seccionada sete dias. Barra=300µm. **E:** Detalhe das células epidérmicas em uma secção foliar com sete dias após TCL. Verifica-se a presença de grande atividade celular (células com núcleos conspícuos, indicando atividade mitótica) nas células ordinárias. Barra=200µm. **F:** Folha com indícios de divisão celular recente, periclinal e obliquamente, nas células epidérmicas da face abaxial. Barra=150 µm. **G:** Secção foliar transversal, seta indica um acúmulo de células com núcleos conspícuos e indícios de mitose celular. Barra=800 µm. **H:** Detalhe do acúmulo de células em uma secção transversal da face adaxial. Barra=500µm. **I:** Secção transversal de amostra indícios de divisão anticlinal (seta preta), células mais altas, e de divisões periclinais (seta branca) nas células epidérmicas. Barra=150µm. **J:** Secção transversal de amostra. Setas indica início de formação de ESP a partir de células epidérmicas. Barra=50µm.

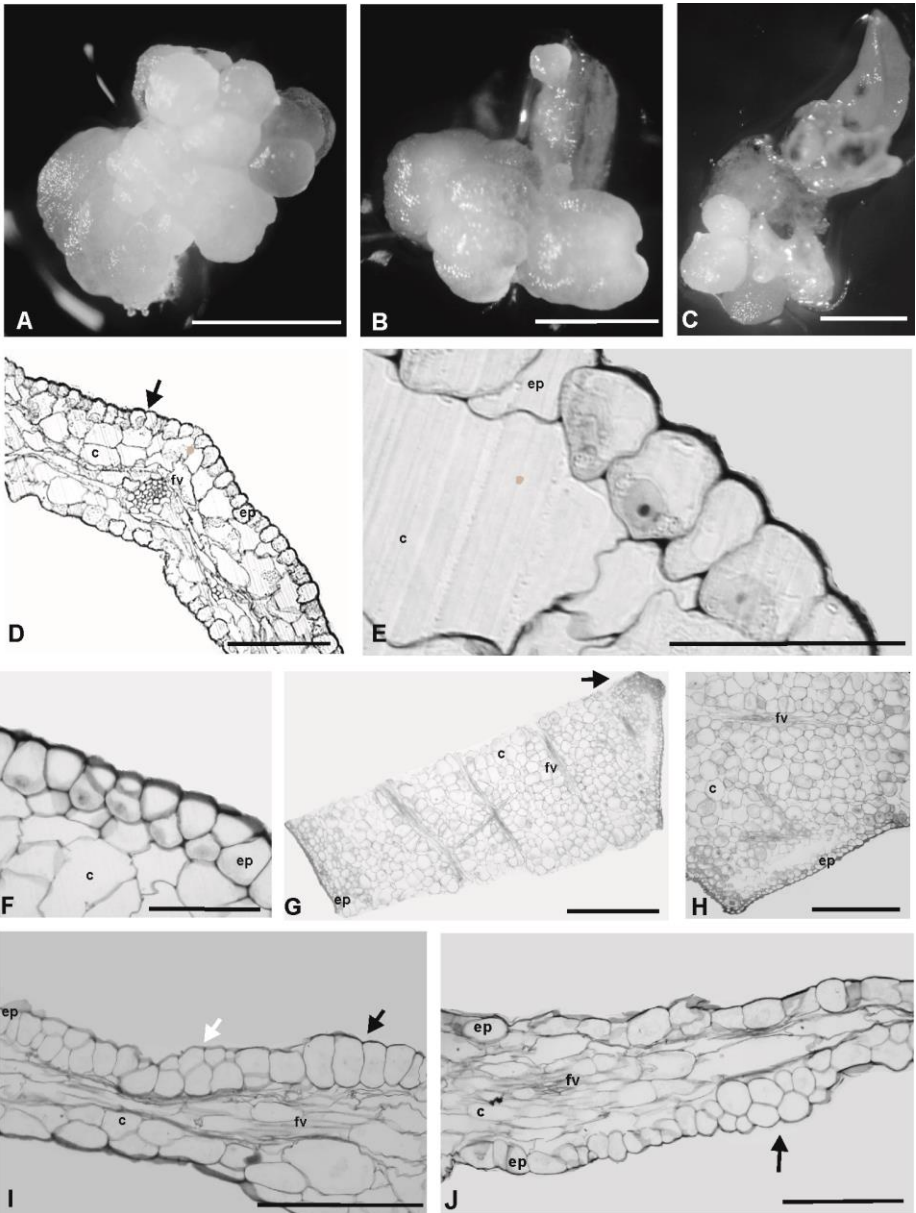


Figura 4: Folha seccionada de *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae), pela técnica de TCL. Legenda: ep=epiderme; c=clorênquima; cs=câmara subestomática; fv= feixe vascular; i=idióblasto; mf=meristema fundamental; p=protoderme. **A:** Secção transversal amostra, epiderme apresenta-se com várias camadas. Barra=300µm. **B:** Secção transversal, seta indicando uma pequena proeminência equivalente ao início da formação de um ESP. Barra=150µm. **C:** Desenvolvimento inicial de uma ESP em uma secção foliar. Seta indica a epiderme já pluriestratificada com células em alta atividade celular. Barra=150 µm. **D:** Secção transversal de amostra indicando na seta o desenvolvimento da epiderme produz elevação inicial mais proeminente da ESP. Barra=300µm. **E:** Detalhe da epiderme celular com várias camadas e células epidérmicas com protoplastos densos e núcleos conspícuos. Barra=150µm. **F:** Vista geral da secção transversal de amostra. Seta indica desenvolvimento da ESP, a epiderme produz elevação que ganha aspecto ápice caulinar e a forma de um domo. Barra=150µm. **G:** Seta indica detalhe do desenvolvimento de um ESP advindo de uma secção foliar. Barra=100µm. **H:** Seta indica visão geral de uma ESP sendo formada em uma secção foliar. Barra=300µm.

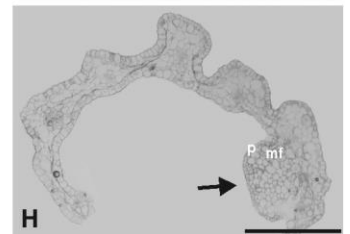
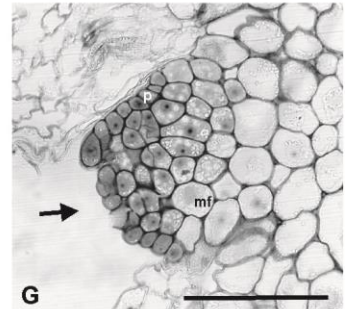
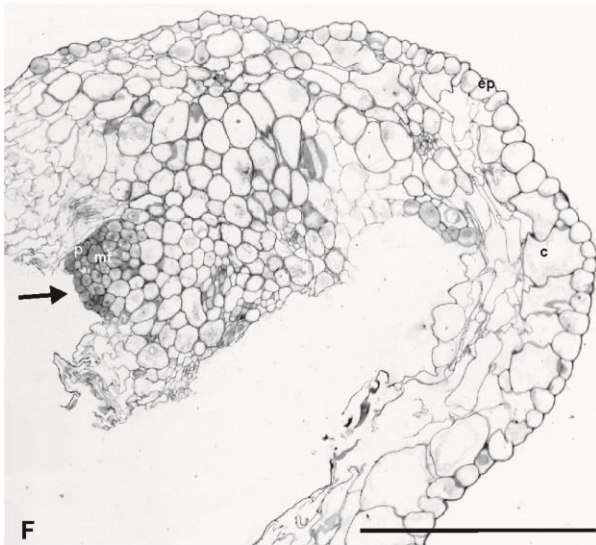
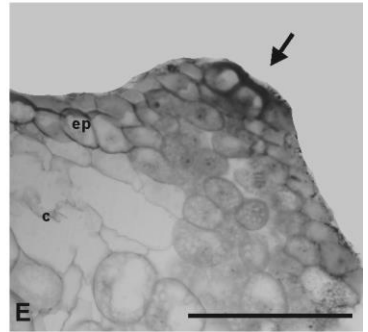
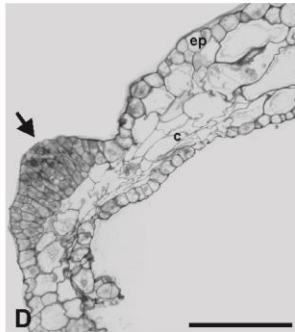
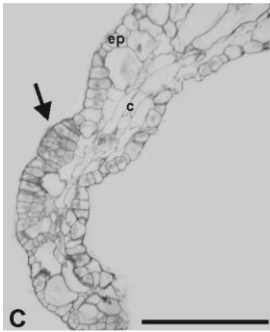
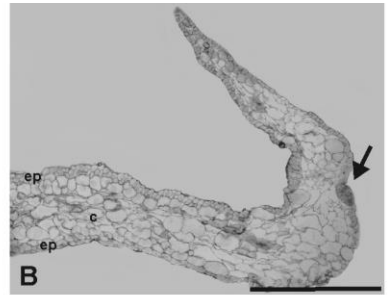
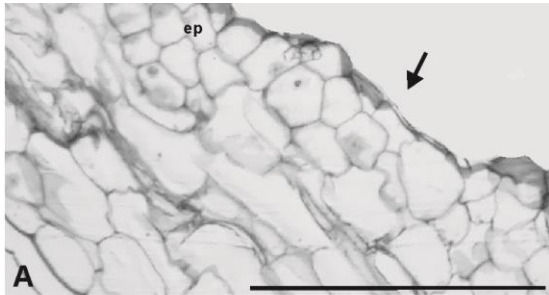


Figura 5: Folha seccionada de *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae), pela técnica de TCL. Legenda: ep=epiderme; c=clorênquima; co=corpo; fv= feixe vascular; mf=meristema fundamental; p=protoderme; pf=primórdio foliar, t=túnica. **A:** ESP desenvolvida em forma de domo a partir de uma secção foliar. Barra=100µm. **B:** ESP desenvolvida, seta indica elevação na lateral da ESP correspondente ao primórdio foliar. Barra=300µm. **C:** EPS em estágio mais avançado de desenvolvimento vindo de uma secção foliar. Células com característica meristemáticas, verifica-se que a túnica composta por uma protoderme, e o corpo por um meristema fundamental. Barra=500µm. **D:** Secção foliar, revela o início da formação dos primórdios foliares em uma ESP. Seta indica a elevação celular correspondente à formação dos primórdios foliares. Barra=500µm. **E:** Estágio posterior de desenvolvimento dos primórdios foliares. Barra=500µm. **F:** Primórdio foliar bem desenvolvido, verifica-se para esta amostra um desenvolvimento desigual dos primórdios foliares. Barra=500µm.

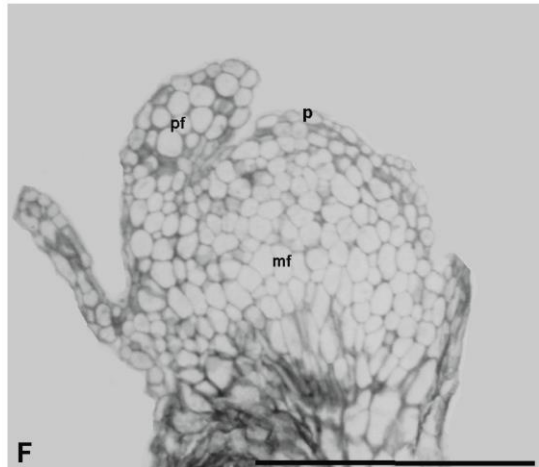
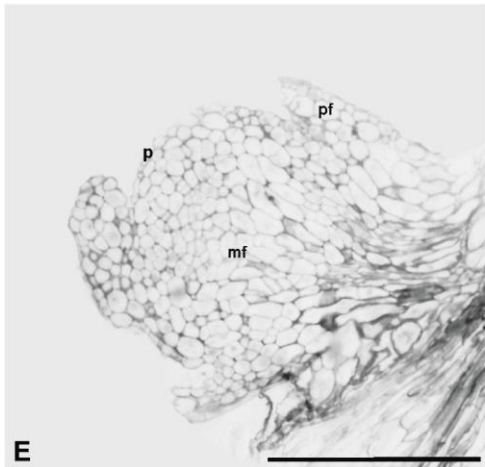
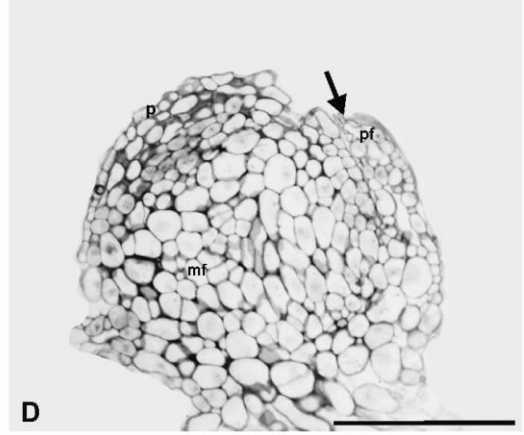
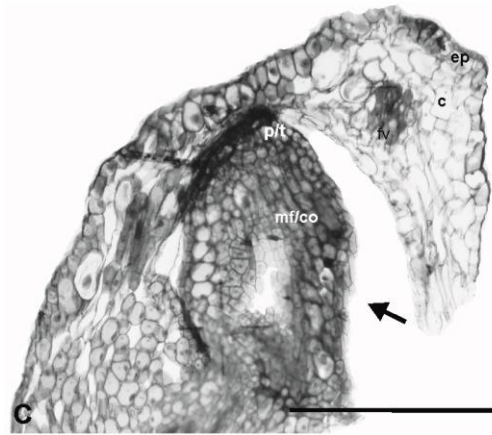
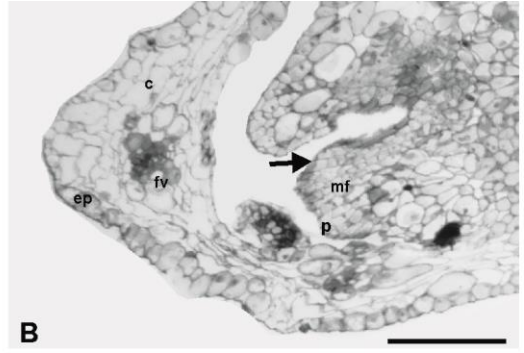
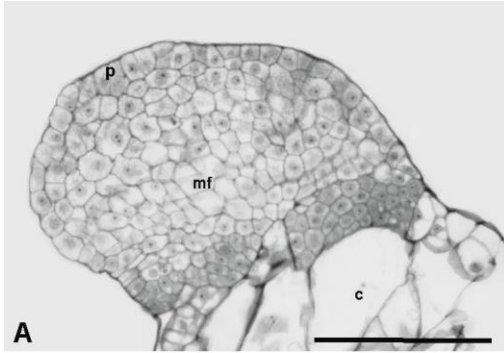


Figura 6: *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae), pela técnica de TCL. Legenda: ep=epiderme; c=clorênquima; co=corpo; cs=câmara subestomática; fi=folha seccionada inicial; fv= feixe vascular; nme=nervura mediana do explantes; mf=meristema fundamental; p=protoderme; pf=primórdio foliar, s= estômato; t=túnica. **A:** Secção transversal de um primórdio foliar bem desenvolvido. Estádio de início da diferenciação da protoderme e meristema fundamental. Barra=500µm. **B:** Secção transversal de uma explantes. ESPs orientam-se em vários planos. ESP1, primeiro a se desenvolver já em estágio mais desenvolvido, com primórdios foliares bem desenvolvidos. ESP2 estágio intermediário de desenvolvimento. ESP3 em estágio inicial de desenvolvimento. Seta indica divisões periclinais da epiderme, indicando possível local de surgimento de um novo ESP. Barra=700µm. **C:** Secção transversal de um primórdio foliar. Seta indica estômato desenvolvendo-se na face abaxial deste primórdio foliar. Barra=150µm. **D:** Secção transversal do procâmbio em desenvolvimento de uma secção foliar. Seta aponta a presença de células com núcleos conspicuos. Barra=30µm. **E:** Secção transversal de um procâmbio em desenvolvimento em uma amostra, observa-se na seta o desenvolvimento de um elemento de vaso. Barra=10µm. **F:** Secção transversal de um procâmbio em desenvolvimento, em amostra verifica-se que o procâmbio já forma um conjunto de células distinto do tecido circunvizinho. Barra=20µm.

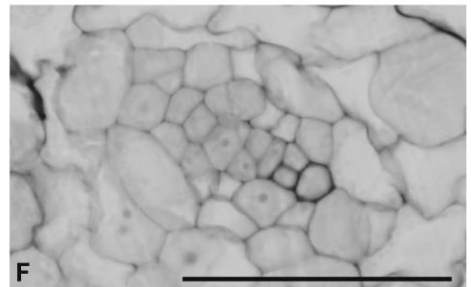
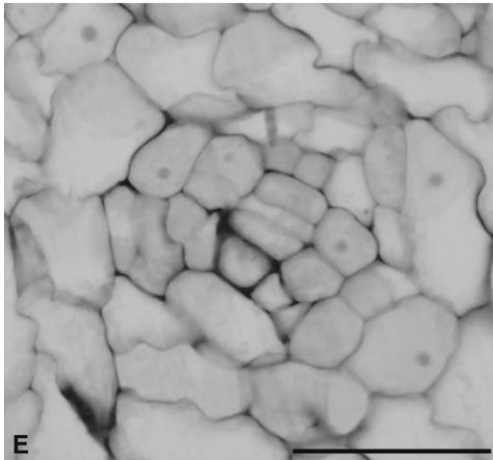
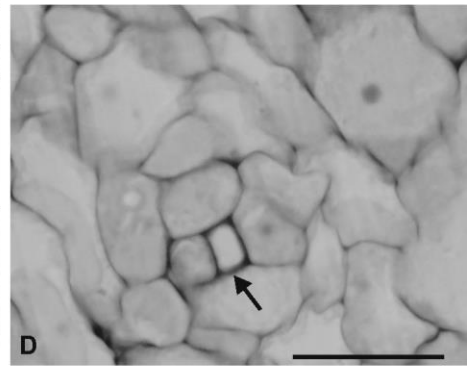
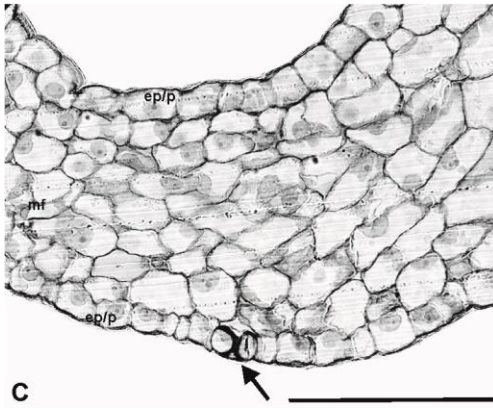
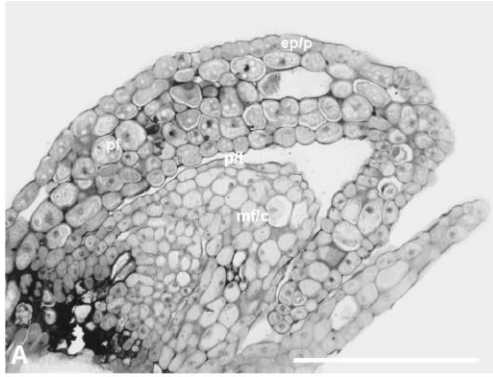
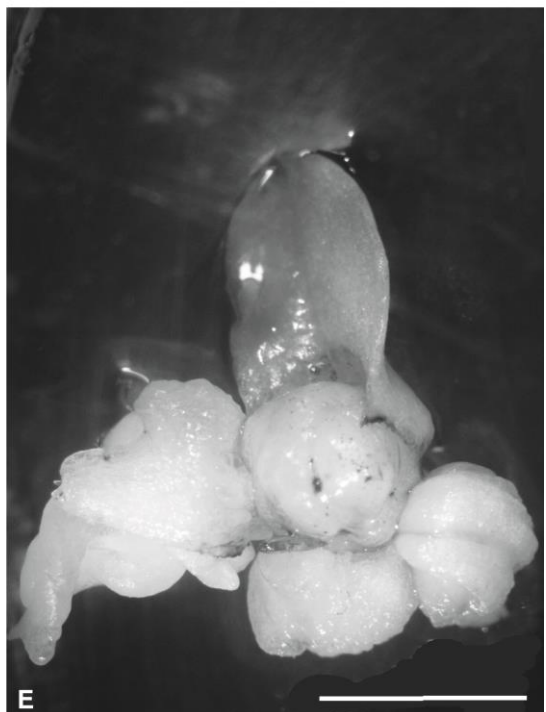
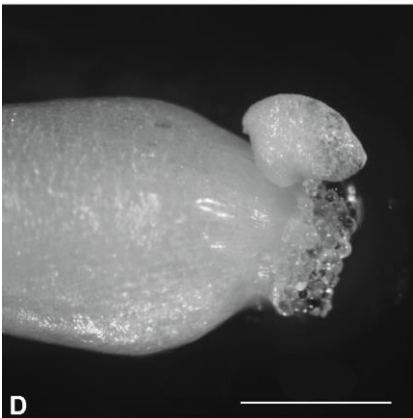
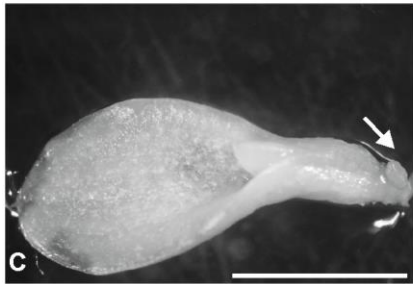
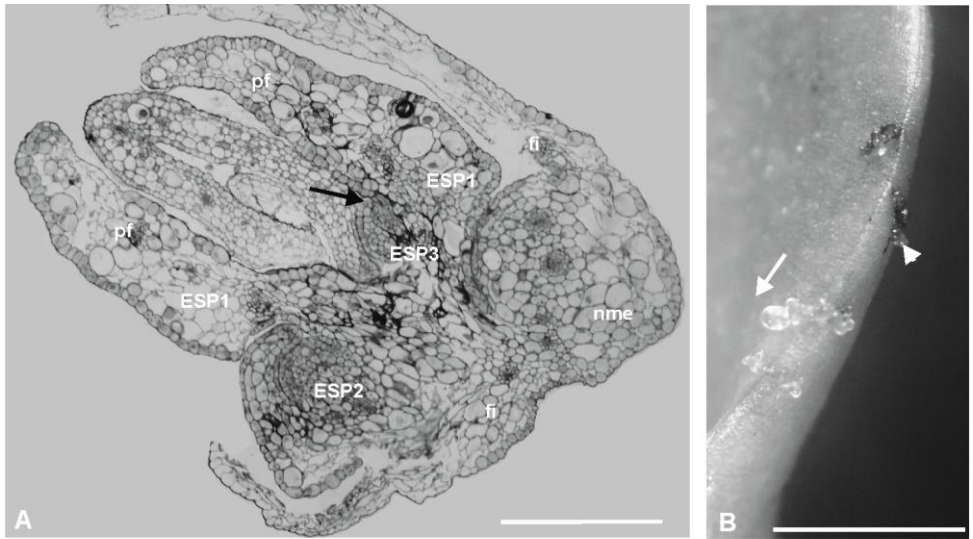


Figura 7: *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae). Legenda: fi=folha seccionada inicial; nme=nervura mediana do explantes; mf=meristema fundamental; p=protoderme; pf=primórdio foliar. **A:** Secção transversal de um ESP. As ESPs jovens são observadas. ESP2 oriundo da epiderme do explantes. ESP3 oriundo da protoderme de um primórdio foliar (ESP1, como indicado na seta). ESP1 oriundo da epiderme de uma secção foliar feita pela técnica do TCL. Barra=700µm. **B:** Seta indica uma ESP no bordo de uma folha inteira (controle). Ponta de seta indica um ESP sendo formado em local de ferimento. Barra=2cm. **C:** ESP sendo formada em uma folha inteira. Barra=5mm. **D:** Várias ESPs sendo formada na base de uma folha inteira. Barra=2mm. **E:** ESP bem desenvolvida em uma folha inteira. Barra=5mm.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As áreas da Cultura de Tecidos Vegetais e Anatomia Vegetal ainda que convencionadas como áreas de pesquisa distinta, refletiram neste trabalho uma importante sobreposição. Alçando mão da morfo-histodiferenciação foi visto o desenvolvimento de ESPs a partir de folhas de *Cattleya tigrina* cultivadas *in vitro*. Verificou-se um processo de dediferenciação celular das ESPs está atrelado às células epidérmicas. Formando-se a partir delas as ESPs, e destas um ápice caulinar. Neste processo, a intensa atividade meristemática foi observada.

Mostrou-se ainda a eficácia da técnica de TCL como importante ferramenta de estudo na geração de ESPs e na compreensão da morfo-histodiferenciação dessa estrutura.

O presente estudo ainda que no âmbito biologia básica estabelece alicerces por meio da qual, é possível desenvolver futuros estudos mais avançados e quiçá metodologias que favoreçam a conservação do patrimônio florístico brasileiro, para espécies ameaçadas como a *C. tigrina*.

É sem dúvida primordial que as lacunas existentes entre a biologia vegetal aplicada e básica possam florir em novas descobertas sobre o universo do reino vegetal e possam contribuir para que a natureza não se perca, mas se transforme com o auxílio do conhecimento tecnológico e humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alatzas A, Foundouli A. 2006.** Distribution of ubiquitinated histone H2A during plant cell differentiation in maize root and dedifferentiation in callus culture. *Plant Science* **171**: 481-487.
- Allikas G. 2010.** *Cattleya tigrina* A. Rich. *Collector Item*. <http://www.aos.org/Default.aspx?id=161>: American Orchid Society: education, conservation and research.
- Arditti J. 1966.** Orchids. *Scientific American* **214**: 70-78.
- Arditti J. 1967.** Factors affecting the germination of orchid seeds *The Botanical Review* **33**: 1-97.
- Arditti J. 1979.** Aspects of the Physiology of Orchids. *Advances in Botanical Research* **7**: 421-655.
- Arditti J. 2007.** *Micropropagation of orchids*. Blackwell: Malden.
- Benzing DH. 1990.** *Vascular epiphytes: general biology and related biota*. Cambridge University New York.
- Benzing DH. 2012.** *Air plants: epiphytes and aerial gardens*. Cornell University Press: Ithaca.
- Buzatto CR, Ferreira PPA, Welker CAD, Seger GDdS, Hertzog A, Singer RB. 2010.** O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae: Laeliinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* **8**: 388-398.
- Buzatto CR, Freitas EM, Silva APMd, Lima LFP. 2007.** Levantamento florístico das Orchidaceae ocorrentes na Fazenda São Maximiano, Município de Guaíba, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências* **5**: 19-25.
- Campos FADB. 2008.** Considerações sobre a família Orchidaceae: taxonomia, antropismo, valor econômico e tecnologia. *O Mundo da Saúde São Paulo* **32**: 383-392.
- Chugh S, Guha S, Rao IU. 2009.** Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae* **122**: 507-520.
- Costa AF. 1982.** *Farmacognosia: Farmacognosia Experimental*. Fundação Calouste Gulbenkian Lisboa.

- Cruz DT, Borba EL, van den Berg C. 2003.** O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no Estado da Bahia, Brasil. . *Sitientibus, Ciências Biológicas* **3**: 26-34.
- Dressler RL. 1990.** *The Orchids: natural history and classification*. Harvard University Press: Boston.
- Esau K. 1959.** *Anatomía Vegetal*. Omega: Barcelona.
- Esau K. 1974.** *Anatomia das plantas com sementes*. Edgard Blücher: São Paulo.
- Fay MF. 1992.** Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. *In vitro cellular and developmental biology - plant* **28P**: 1-4.
- Fritsche Y. 2009.** Micropropagação de orquídeas. Unpublished Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Gentry AH, Dodson CH. 1987.** Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Annals Missouri Botanical Garden* **74**: 205-233.
- Gerlach D. 1984.** *Botanische Microtecknick*. Georg Thieme: Stuttgart.
- Good R. 1974.** The geography of the flowering plants. London: Longman. 53-54.
- Grafi G. 2004.** How cell differentiate: a lesson from plants. *Developmental Biology* **268**: 1-6.
- Haberlandt G. 1914.** *Physiological Plant Anatomy*. Macmillan and CO. : London.
- Harrison CR, Arditti J. 1978.** Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* **139**: 180-189.
- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. McGraw Hill Book: New York.
- Johansen DA. 1950.** *Plant embryology : embryogeny of the spermatophyta*. Chronica Botanica: Waltham.
- Kersten RdA. 2010.** Epífitas vasculares – Histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. *Hoehnea* **37**: 9-38.
- Knauff RL, Arditti J. 1969.** Partial identification of dark $^{14}\text{CO}_2$ fixation products in leaves of *Cattleya* (Orchidaceae). *New Phytologist* **68**: 657-661.
- Kraus JE, Arduin M. 1997.** *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Universidade Rural do Rio de Janeiro: Seropédica.

- Lambers H, Stuart F, Pons TL. 2008.** *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag: New York.
- Liz Rdd. 2013.** Elucidación da morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de espécies de *Cattleya* Lindl. micropropagadas Unpublished Mestre em Ciências área de concentração Recursos Genéticos Vegetais., Universidade Federal de Santa Catarina.
- Lone AB, Unemoto LK, Takahashi LSA, Faria RTd. 2010.** Sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya* (Orchidaceae) submetida a tratamentos com colchicina. *Revista Semina: Ciências Agrárias* **31**: 1337-1342.
- Moraes CPd, Santos NS, Massaro R, Cordeiro GM, Leal TS. 2009.** Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Ensaio e Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde* **13**: 57-65.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK. 1998.** Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis *In vitro cellular and developmental biology - plant* **34**: 267-275.
- Murthy HN, Pyati AN. 2001.** Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In vitro cellular and developmental biology - plant* **37**: 223-226.
- Nagata T, Ishida S, Hasezawa S, Takahashi Y. 1994.** Genes involved in the dedifferentiation of plant cells. *The International Journal of Developmental Biology* **38**: 321-327.
- Nhut DT, Le BV, Teixeira da Silva JA, Aswath CR. 2001.** Thin cell layer culture system in *Lilium*: regeneration and transformation perspectives. *In vitro cellular and developmental biology - plant* **37**: 516-523.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polyehromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- Pereira-Dias F, Santos Md, Fritsche Y, Steinmacher DA, Guerra MP. 2011.** Técnica de Camada Fina (TCL) aplicada em *Cattleya tigrina* A. Rich (Orchidaceae). XVIII Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas

- Ornamentais & V Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Planta. Joinville: Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais & V Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Planta.
- Prychid CJ, Rudall PJ. 1999.** Calcium oxalate crystals in Monocotyledons: A review of their structure and systematics. *Annals of Botany* **84**: 725-739.
- Rio Grande do Sul. 2002.** Decreto N° 42.099, de 31 de dezembro de 2002. http://www.al.rs.gov.br/legis/M010/M0100099.ASP?Hid_Tipo=TEXT0&Hid_TodasNormas=320&hTexto=&Hid_IDNorma=320: Assembleia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul
- Stebbins GL, Khush GS. 1961.** Variation in the organization of the stomatal complex in the leaf epidermis of Monocotyledons and its bearing on their phylogeny. *American Journal of Botany* **48**: 51-59.
- Steinmacher DA. 2005.** Germinação in vitro, criopreservação e embriogênese somática em pupunha. Unpublished Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Stoutamire WS. 1964.** Seeds and sSeedlings of native orchids. *The Michigan botanist* **3**: 107-119.
- Taiz L, Zeiger E. 2009.** *Fisiologia Vegetal*. Artmed,: Porto Alegre.
- Teixeira da Silva JA. 2003.** Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *African Journal of Biotechnology* **2**: 683-691.
- Teixeira da Silva JA, Van KTT, Biondi S, Nhut DT, Altamura MM. 2007.** Thin Cell Layers: developmental building blocks in ornamental biotechnology. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* **1**: 1-13.
- Tran Than Van M. 1973.** In vitro control of de novo flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissue. *Nature* **246**: 44-45.
- Tran Thanh Van K. 1981.** Control of morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology* **32**: 291-311.
- van den Berg C, Chase MW. 2004.** A reapraisal of Laeliinae: taxonomic history, phylogeny and new generic alliances. *Orchid Digest* **68**: 221-226.

- van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto-Arena MA, Culham A, Chase MW. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96-114.
- van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto-Arenas MA, Chase MW. 2009.** A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany* **104**: 417-430.
- Ventura GM, Dias JMM, Teixeira SL, Carvalho VS, Motoike SM, Novais RFd, Cecon PR. 2002.** Organogênese in vitro a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do gênero *Cattleya*. *Revista Ceres* **49**: 613-628.
- Verdeil J-L, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ. 2007.** Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science* **12**: 245-252.
- Veyret Y. 1974.** Development of the Embryo and Young Seedling Stages of Orchids. In: Withner CL, ed. *The Orchids: Scientific Studies*. New York John Wiley & Sons. 223-265.
- Withner CL. 1988.** *The Cattleyas and their relatives: Cattleya*. Timber: Portland.
- Withner CL, Nelson PK, Wejksnora PJ. 1974.** The anatomy of orchids. In: Withner CL, ed. *The Orchids: Scientific Studies*. New York: John Wiley & Sons. 267-347.
- Yam TW, Arditti J. 2009.** History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Report* **3**: 1-56.
- Zhao P, Wu F, Feng F-S, Wang W-J. 2008.** Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In vitro cellular and developmental biology - plant* **44**: 178-186.