



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
CURSO DE CIÊNCIAS RURAIS**

Karoline Günther

Micropropagação através da indução de estruturas semelhantes à
protocormos (ESPs) da *Brassia chloroleuca* Barb. Rodr., orquídea nativa
da Amazônia Ocidental

CURITIBANOS

Junho/2015

Karoline Günther

Micropropagação através da indução de estruturas semelhantes à
protocormos (ESPs) da *Brassia chloroleuca* Barb. Rodr., orquídea nativa
da Amazônia Ocidental

Projeto apresentado como exigência da
disciplina Projetos em Ciências Rurais, do
curso de Ciências Rurais, ministrado pelos
professores Antônio Lunardi Neto e Joni
Stolberg, sob orientação do professor Paulo
Cesar Poeta Fermino Junior.

CURITIBANOS

Junho/2015

RESUMO

Devido ao elevado potencial ornamental e beleza exuberante, as orquídeas possuem grande interesse econômico e ecológico, sendo a família das Orchidaceae uma das dez famílias botânicas com maior importância de conservação no Brasil. Devido à dificuldade de germinação na natureza a propagação massal por cultura de tecidos é uma técnica que viabiliza a sua comercialização, evitando a extração da espécie de ambientes naturais, conseqüentemente precavendo a sua extinção. Nas orquídeas essa propagação pode ser realizada através dos protocormos, os quais a partir da embriogênese somática desenvolverão novos indivíduos. O objetivo do trabalho será estabelecer protocolo de micropropagação em larga escala através da indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) via tTCL, e estabelecer estratégias de conservação *in vitro* de *Brassia chloroleuca* Barb.Rodr, avaliar o efeito de diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose na germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Brassia chloroleuca*, induzir a formação de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) com diferentes reguladores de crescimento a partir da técnica tTCL de folhas e protocormos de *Brassia chloroleuca* e regenerar plântulas a partir de ESPs, enraizar e aclimatizar as plantas micropropagadas. Os estudos com micropropagação de *B. chloroleuca* apresentarão um protocolo regenerativo para os estudos incipientes de propagação massal e para possível uso em biofábricas, já que esta espécie já é utilizada como planta ornamental no sudeste brasileiro, e esses estudos também fornecerão subsídios para a conservação *in vitro* de Orchidaceae da Amazônia.

Palavras-chave: micropropagação, estruturas semelhantes à protocormos, *Brassia chloroleuca* Barb.Rodr., Orchidaceae, Amazônia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Micropropagação.....	3
3.2. Micropropagação de orquídeas.....	3
3.3. Estruturas Semelhantes à Protocormos	4
3.4 . Técnica Thin Cell Layer.....	4
4. HIPÓTESE.....	5
5. OBJETIVOS	5
5.1. Geral	5
5.2. Específico	5
6. METODOLOGIA.....	5
6.1 Material Vegetal	5
6.2 Germinação e Crescimento Inicial <i>in vitro</i>	6
6.3 Indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) via tTCL.....	7
6.4 Regeneração e crescimento de plântulas	7
7. RESULTADOS ESPERADOS	8
8. CRONOGRAMA	8
10. REFERÊNCIAS.....	10

1. INTRODUÇÃO

Nas florestas tropicais, a diversidade de epífitas compreende aproximadamente um terço das plantas vasculares, as quais são representadas principalmente por Orchidaceae e Bromeliaceae (BENZING, 1990). De acordo com Martinelli & Moraes (2013), a família Orchidaceae compreende uma das dez famílias botânicas com interesse para a conservação no Brasil. Em razão da elevada beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas destacam-se como importante planta ornamental e medicinal, de grande interesse econômico, ecológico e para manutenção dos ecossistemas naturais (GALDIANO JUNIOR et al., 2012).

O Brasil possui uma das maiores floras de orquídeas do mundo, das quais muitas são epífitas e endêmicas, representadas por 240 gêneros e 2.443 espécies das quais 1.634 são endêmicas (BARROS et al., 2013). Na Amazônia brasileira existe uma quantidade de espécies de orquídeas expressiva, sendo registradas um total de 378 espécies por Silva et al. (1995). As espécies da família Orchidaceae estão listadas no Apêndice II da CITES (“Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora”) que inclui espécies em que o comércio deve ser controlado.

O cultivo e comércio de orquídeas no mundo e no Brasil, tem sido baseados no extrativismo predatório que, aliado à contínua urbanização e ao aumento das fronteiras agrícolas, contribuíram para que diversas espécies entrassem em um iminente perigo de extinção (GALDIANO JUNIOR et al., 2013).

Brassia chloroleuca Barb. Rodr. é uma espécie epifítica de orquídea nativa da Amazônia, com comercialização no sudeste do Brasil. Apresenta flores brancas, com folhas alongadas com até 20 cm de comprimento (FLORA BRASILIENSIS, 1982).

Na natureza, as sementes de orquídeas necessitam de uma associação simbiótica com fungos para iniciar a germinação e formação dos protocormos (CHUGH et al., 2009). Em condições *in vitro*, a germinação assimbiótica iniciou-se com a formulação dos meios de cultura de Knudson B e C (KNUDSON, 1946). Nas duas últimas décadas, as técnicas de cultivo *in vitro* têm sido utilizadas para a propagação de orquídeas, para o estudo de aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento e como método de conservação *ex-situ* para redução do risco de extinção (FERREIRA & SUZUKI, 2008).

Dentre os reguladores de crescimento vegetal utilizados como indutores, as citocininas 6-benziadenina (BA) e o thidiazuron (TDZ) ativam os processos de regeneração *in vitro* em orquídeas (WU et al., 2012). Para a indução das estruturas semelhantes à protocormos diversos explantes tem sido empregados, tais como folhas (WU et al., 2012), gemas apicais (MONDAL et al., 2013), e os próprios ESPs (NAING et al., 2011; LIAO et al., 2011).

A técnica conhecida como “thin cell layer (TCL)” na indução de ESPs foi originalmente descrita por Tran Than Van (1973), consistindo no seccionamento fino (1 a 2 mm) de diversos órgãos ou estruturas vegetais como folhas, raízes, gemas apicais e axilares, embriões e protocormos de modo longitudinal (ITCL) ou transversal (tTCL) em meio de cultura (TEIXEIRA DA SILVA, 2013). O uso de TCL possibilita a exposição de maior superfície de contato de diversos tecidos ou células de um tecido com o meio de cultura indutor, propiciando uma maior taxa proliferativa (TEIXEIRA DA SILVA, 2013). Estudos de micropropagação através da indução de estruturas semelhantes à protocormos e conservação *in vitro* das espécies *Brassia chloroleuca* Barb. Rodr. não existem.

Em orquídeas as estruturas semelhantes à protocormos induzidas podem ser utilizadas como explantes para a conservação *in vitro* por sementes sintéticas (TEIXEIRA DA SILVA, 2012), criopreservação (TEIXEIRA DA SILVA, 2013), ou por crescimento mínimo em temperaturas baixas (TEIXEIRA DA SILVA, 2014). A criopreservação consiste no armazenamento de tecidos em nitrogênio líquido (-196°C) e é considerada a melhor estratégia para conservação em longo prazo, sendo os ESPs nas orquídeas a estrutura alvo para os estudos (ZAINUDDIN et al., 2011). Os estudos de conservação *in vitro* de sementes de orquídeas utilizam com grande sucesso a estratégia de vitrificação e desidratação para a criopreservação em nitrogênio líquido (WU et al., 2013).

Nesse contexto, os estudos de micropropagação e conservação *in vitro* de orquídeas endêmicas da Amazônia como a *Brassia chloroleuca* fornecerá protocolos para a propagação em larga escala, reduzindo a exploração em áreas naturais, bem como, protocolos para a conservação *in vitro* desse recurso genético vegetal.

2. JUSTIFICATIVA

Fornecer subsídios para a conservação *in vitro* de uma espécie nativa, evitando a extração da espécie de ambientes naturais. Possibilitar a propagação em larga escala através da rota de embriogênese somática da orquídea, bem como, fornecer um protocolo para possível uso em biofábricas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Micropropagação

No Brasil, a micropropagação tem sido utilizada há pelo menos 25 anos, com o objetivo de aumentar a produção de mudas, com preço reduzido e preservando espécies de extinção (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

Micropropagação são técnicas de propagação de plantas *in vitro*, incluindo a cultura de ápices caulinares e segmentos nodais, embriogênese somática e formação de gemas adventícias em explantes, segundo o Glossário de Biotecnologia Vegetal (TORRES et al., 2000). Estas técnicas viabilizam a clonagem de diversas espécies, resultando na formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de pequenos fragmentos de uma planta matriz.

Entre alguns fatores que determinam o êxito da cultura de tecidos vegetais estão a origem do explante e o meio nutritivo onde são cultivados. Existem vários meios de cultura que estão sendo utilizados, em geral é composto de macro e micronutrientes, sais minerais, reguladores de crescimento, vitaminas e outros suplementos orgânicos (VENTURA et al., 2002). Sendo o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e Knudson C (KNUDSON, 1946) os mais utilizados. Técnicas de cultura de tecidos auxiliam na preservação das espécies, tendo como principais vantagens o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta importante para a obtenção de plantas livres de pragas e doenças, proporcionando a produção de um número significativo de novas mudas uniformes (FIGUEIREDO et al., 2007).

3.2. Micropropagação de orquídeas

Espécie de grande diversidade biológica, as orquídeas possuem grande importância econômica, mas apresentam dificuldade de propagação na natureza. Coletas predatórias e destruição do habitat natural são alguns motivos que às ameaçam de

extinção, sendo as técnicas de cultivo *in vitro* a melhor maneira de preservar a espécie, além de possibilitar a rápida produção de mudas. Em seu habitat de ocorrência natural, as sementes de orquídea apresentam grande dificuldade para germinar. Essa dificuldade refere-se ao fato de que as sementes não possuem reservas nutritivas e com isso necessitam de associação com fungos micorrízicos. Outro fator importante é o crescimento lento das sementes de orquídea, por isso, quase sempre são germinadas *in vitro* (DRESSLER, 1981).

As técnicas de cultivo *in vitro* para a produção de orquídeas a partir de sementes é uma alternativa viável para a obtenção de um grande número de plantas em curto espaço de tempo, produzindo plantas de espécies nativas para programas de reintrodução em áreas de preservação ambiental evitando a extinção da espécie, visando o abastecimento do mercado e suprimindo a necessidade dos produtores de orquídeas em adquirir mudas com qualidade comprovada (ARAÚJO et al., 2009).

3.3. Estruturas Semelhantes à Protocormos

Os estudos de cultivo *in vitro* de orquídeas iniciaram com as gemas e segmentos nodais como fontes de explantes (ARDITTI, 2008). Porém, obteve-se a propagação massal a partir do uso de explantes para a formação das estruturas semelhantes à protocormos (ESPs), originalmente iniciado por Morel (1960) nos estudos do cultivo de ápices caulinares de *Cymbidium*, revolucionando a industrialização nas biofábricas de orquídeas (CHUGH, 2009). A germinação de orquídea inicia com a dilatação da semente seguida pelo rompimento do tegumento e posteriormente com a liberação do embrião, que se desenvolve em uma estrutura tuberiforme, clorofilada e denominada protocormo (ARDITTI e ERNEST, 1993). Vários explantes tem sido empregados na indução das estruturas semelhantes a protocormos, entre elas as folhas (WU et al., 2012), gemas apicais (MONDAL et al., 2013), e os próprios ESPs (NAING et al., 2011; LIAO et al., 2011).

3.4 . Técnica Thin Cell Layer

As orquídeas eram espécies consideradas plantas de difícil propagação *in vitro*, mas com o surgimento da tecnologia “thin cell layer” (TCL) se tornou possível a propagação clonal massal (TEIXEIRA DA SILVA, 2012). O sistema TCL é composto de explantes de tamanho pequeno que são seccionados longitudinalmente (TCLl) (0,5 a 1 mm de largura e 5-10 mm de comprimento) ou transversalmente (TCLt) (0,1-5 mm) de

diferentes órgãos vegetais (caules, cotilédones, embriões, folhas ou órgão florais) (CHUGH, 2009). A TCL na indução de ESPs foi descrita por Tran Than Van (1973), e essa técnica vem sendo utilizada com sucesso na regeneração de várias espécies de orquídeas (MURTHY e PYATI, 2001; PARK et al., 2002; CHUGH et al., 2009).

4. HIPÓTESE

Na orquídea *Brassia chloroleuca*, os protocormos (estrutura formada logo após a germinação da semente) e as folhas apresentam células e tecidos responsivos aos reguladores de crescimento vegetal formando novos indivíduos a partir da embriogênese somática (estrutura semelhante a protocormos).

5. OBJETIVOS

5.1. Geral

Estabelecer protocolo de micropropagação em larga escala através da indução de estruturas semelhantes à protocormos via tTCL, e estabelecer estratégias de conservação *in vitro* de *Brassia chloroleuca* Barb.Rodr.

5.2. Específico

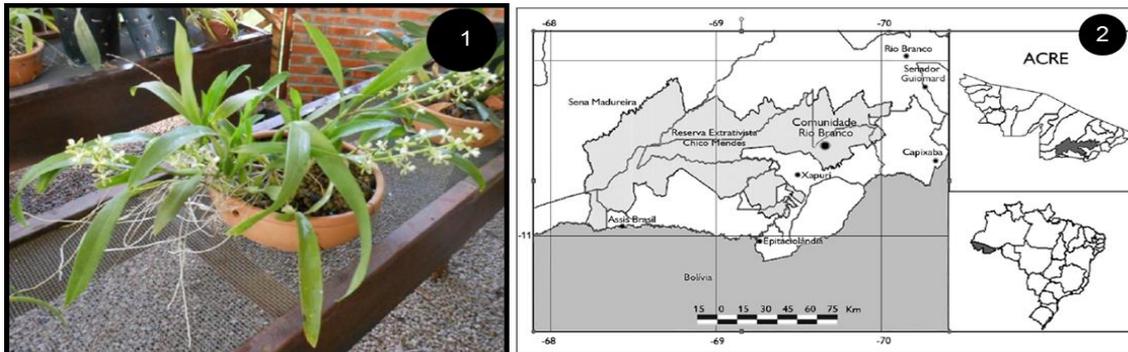
- Avaliar o efeito de diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose na germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Brassia chloroleuca*;
- Induzir a formação de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) com diferentes reguladores de crescimento a partir da técnica tTCL de folhas e protocormos de *Brassia chloroleuca*
- Regenerar plântulas a partir de ESPs, enraizar e aclimatizar as plantas micropropagadas.

6. METODOLOGIA

6.1 Material Vegetal

As coletas de cápsulas contendo sementes maduras de *Brassia chloroleuca* Barb. Rodr. (Orchidaceae) serão realizadas na Reserva Estadual Chico Mendes, localizadas no Estado do Acre. As sementes coletadas serão transportadas em frascos térmicos até o

Laboratório de Biotecnologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos.



Figuras 1-2. Plantas adultas de *Brassia chloroleuca* Barb. Rodr. (Orchidaceae), coletadas na Reserva Extrativista Chico Mendes (2).

6.2 Germinação e Crescimento Inicial *in vitro*

As sementes de *Brassia chloroleuca* Barb.Rodr. serão desinfetadas através da imersão em solução de álcool etílico a 70% por 2 minutos, seguida de lavagem em água destilada esterilizada, e posterior imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,0-2,5%) por 15 minutos, e trilavagem em água destilada esterilizada.

Em seguida, as sementes serão inoculadas em frascos de vidro transparente (268 mL) com 30 mL de meio de cultura em diferentes composições salinas para a germinação e crescimento inicial *in vitro*. Os meios de cultura utilizados serão o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), Knudson C (KNUDSON, 1946), acrescidos de 20, 30 e 40 g.L⁻¹ de sacarose e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel®. Os meios de cultura terão o pH ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave. A avaliação será feita pela porcentagem de germinação após 30 dias de inoculação. Os experimentos serão organizados em esquema fatorial 2 x 3 (tipo de meio x concentrações de sacarose).

Os mesmos meios de cultura (tratamentos) utilizados para a germinação *in vitro* serão mantidos para avaliar o crescimento inicial *in vitro* de microbrotos, sendo as avaliações realizadas após 90 dias. As avaliações consistirão em: comprimento da parte aérea e radicular; número de raízes adventícias; massa fresca e seca da plântula.

Os experimentos serão organizados em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento. Cada repetição constituiu-se de um frasco com trinta plântulas.

6.3 Indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) via tTCL

Os experimentos de indução de ESPs em *Oncidium nanum* Lindl. e *Brassia chloroleuca* Barb.Rodr. serão realizadas através da técnica denominada “transversal thin cell layer (tTCL)”, a qual consiste no seccionamento fino (2 mm) transversal com auxílio de bisturi em folhas (região basal, mediana e apical) e protocormos desenvolvidos *in vitro*. O seccionamento será realizado em câmara de fluxo laminar, em Placas de Petri esterilizadas contendo solução de polivinilpirrolidona (PVP) a 1%.

Para a obtenção de folhas, sementes serão desinfetadas (conforme descrição no item 2) e inoculadas para germinação *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementada com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel®. Após 120 dias, as folhas da base serão removidas para o seccionamento. Para a obtenção de protocormos, sementes germinadas *in vitro* após 30 dias desenvolverão os protocormos, os quais serão seccionados transversalmente.

As secções finas transversais serão inoculadas em placas de petri contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com thidiazuron (TDZ) nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 mg.L⁻¹, de ácido naftalenoacético (ANA) a 1,0 mg.L⁻¹, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel®, e 0,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. As culturas serão mantidas por 30 dias no escuro, e posteriormente, transferidas para a luz em sala de crescimento com intensidade de 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de fótons, fotoperíodo de 16h, e temperatura de 23 \pm 2 °C. Os meios de cultura terão o pH ajustados com NaOH e HCl (0,1 N) para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,06 kg.cm⁻² por 15 min.

Será utilizado delineamento completamente casualizado com 20 tratamentos em esquema fatorial 5 x 4 (concentrações x tipos de explantes). Para cada tratamento serão realizadas seis repetições, e cada repetição será composta por duas placas contendo dez secções transversais finas. As avaliações serão realizadas após 60 dias de cultivo, consistindo no percentual de formação de ESPs, e número de ESPs por explante.

6.4 Regeneração e crescimento de plântulas

As estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) induzidas de *Brassia chloroleuca* Barb.Rodr. serão transferidas para frascos de vidro (268 mL) contendo 30 mL de meio de regeneração de plântulas composto por sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 0; 0,5; 1,0 mg.L⁻¹ de ANA, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 50 mg.L⁻¹

água de coco, 0,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel®. As culturas serão mantidas em sala de crescimento com intensidade de 60 μ mol.m⁻².s⁻¹ de fótons, fotoperíodo de 16h, e temperatura de 23 \pm 2 °C. Os meios de cultura terão o pH ajustados com NaOH e HCl (0,1 N) para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,06 kg.cm⁻² por 15 min. Será utilizado delineamento completamente casualizado, com seis repetições, e cada repetição será composta por dois frascos contendo dez plântulas cada. Após 90 dias, serão avaliados o comprimento da parte aérea, número de folhas, número de raízes regeneradas, comprimento das raízes. Os dados obtidos serão analisados através da ANOVA com separação de médias pelo teste de Tukey, utilizando o programa Assistat 7.0.

7. RESULTADOS ESPERADOS

Os dados obtidos com os experimentos propostos possibilitarão a propagação em larga escala através da rota de embriogênese somática da orquídea *Brassia chloroleuca*, bem como, fornecerão um protocolo para possível uso em biofábricas, considerando ser uma espécie já utilizada no mercado de plantas ornamentais do sudeste brasileiro. A utilização de protocolos de produção, em larga escala, em biofábricas possibilita atender as demandas do mercado consumidor, auxiliando na redução da extração de indivíduos dos ambientes naturais. Os estudos de propagação *in vitro* de *Brassia chloroleuca* também fornecerão subsídios para estudos de conservação *in vitro* de germoplasma.

8. CRONOGRAMA

CRONOGRAMA DO PROJETO (2015/2016)												
Atividades	MÊS ou NÚMERO DE MESES											
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Germinação e Crescimento inicial	X	X	X									
Indução de ESPs via tTCL			X	X	X	X	X	X	X	X		
Regeneração de plântulas						X	X	X	X	X	X	
Análise de dados				X	X	X	X	X	X	X	X	
Elaboração de resumos e artigos científicos						X	X	X	X	X	X	X
Elaboração do relatório técnico final											X	X

9. ORÇAMENTO

Descrição	Qtidade. (un.)	Valor Unitário (R\$)	Valor total (R\$)
MATERIAL PERMANENTE			
Câmara de fluxo laminar	1	15.000,00	15.000,00
Autoclave vertical (100 L)	1	5.000,00	5.000,00
Destilador de água	1	1.500,00	1.500,00
Medidor de pH digital	1	1.000,00	1.000,00
Agitador magnético	1	300,00	300,00
Subtotal			22.800,00
MATERIAL DE CONSUMO			
Frascos de vidro com tampa	1000	3,00	3.000,00
Placas de Petri	500	4,00	2.000,00
Lâmpadas fluorescentes 20W (cultivo)	10	30,00	300,00
Vasos plásticos (2L)	100	5,00	500,00
Substrato Plantmax®	4	150,00	600,00
Phytigel®	4	500,00	2.000,00
Etanol absoluto (1L)	1	31,70	31,70
Hipoclorito de sódio (1L)	1	32,80	32,80
Nitrato de amônia (500g)	1	70,00	70,00
Nitrato de potássio (500g)	1	64,80	64,80
Cloreto de cálcio dihidratado (1000g)	1	32,92	32,92
Fosfato de potássio (1000g)	1	42,84	42,84
Sulfato de magnésio heptahidratado (1000g)	1	20,09	20,09
Sódio EDTA dihidratado (500g)	1	40,00	40,00
Sulfato de ferro heptahidratado (1000g)	1	24,91	24,91
Sulfato de manganês monohidratado (1000g)	1	44,49	44,49
Sulfato de zinco heptahidratado (1000g)	1	59,33	59,33
Sulfato de potássio (1000g)	1	35,36	35,36
Sulfato de amônio (1000g)	1	33,49	33,49
Nitrato de cálcio tetrahidratado (500g)	1	60,00	60,00
Ácido bórico (1000g)	1	36,20	36,20
Iodeto de potássio (500g)	1	288,00	288,00
Sulfato de cobre pentahidratado (1000g)	1	37,45	37,45
Molibdato de sódio dihidratado (500g)	1	178,92	178,92
Cloreto de cobalto hexahidratado (250g)	1	122,40	122,40
Tiamina (25g)	1	80,00	80,00
Piridoxina (25g)	1	70,00	70,00
Ácido nicotínico (500g)	1	168,07	168,07
Glicina (25g)	1	80,00	80,00
Inositol (500g)	1	182,44	182,44
Pantotenato de cálcio (25g)	1	90,00	90,00
Biotina (25g)	1	80,00	80,00
Sacarose (1000g)	1	18,19	18,19
Ágar (100g)	1	238,00	238,00
Carvão ativado (500g)	1	192,00	192,00
Subtotal			10.854,40
TOTAL GERAL			33.654,40

10. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M. RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: Wiley Publishers, 1993.
- ARDITTI, J. **Micropropagation of Orchids**. 2nd ed. Blackwell, Cambridge. 2008.
- BARROS, F. de; VINHOS, F. de; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A., FRAGA, C. N. **Orchidaceae**. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000179>>. Acesso em: 08 de abril de 2015
- BASEIA, I.G.; LICHSTON, J.E. (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal, Imagem Gráfica, p.67-68, 2008.
- BENZING, D. H. **Vascular epiphytes**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 370, 1990.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, v.122, p. 507-520, 2009.
- DRESSLER, R. L. **The orchids. Natural history and classification**. Cambridge: Harvard Univ. Press, 1981.
- FERREIRA, W.M.; SUZUKI, R.M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M.I.B.; BASEIA, I.G.; LICHSTON, J.E. (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal, Imagem Gráfica, p.67-68, 2008.
- FLORA BRASILIENSIS. **Classificação segundo a florabrasiliensis**. vol. III, Part III, Fasc. 112 Coluna 327 - 328 Publicado em 15-Mai-1982. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=21355>. Acesso em: 08 abr. 2015.
- FIGUEIREDO, M.A.de; SANTOS, F.M. dos; COSTA E SILVA, J.O.; COSTA, F.H.S.; PASQUAL, M. Variações no Meio de Cultura sobre o Crescimento *in vitro* em Híbridos de Orquídea. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.294-296, 2007.
- GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K.F.L.; LEMOS, E.G.M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, v.42, p. 801-807, 2012.
- GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, FARIA, R.T.; LEMOS, E.G.M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, p. 583-592, 2013.
- GANTAIT, S.; SINNIAN, U. R. Rapid micropropagation of monopodial orchid hybrid (Aranda Wan Chark Kuan 'Blue' 3 *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.) through direct

induction of protocorm-like bodies from leaf segments. **Plant Growth Regul**, v. 68, n.2, p. 129–140, 2012.

KNUDSON, L. A nutrient for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bull.**, v.15, 214–217, 1946.

LIAO, Y.J.; TSAI, Y.C.; SUN, Y.W.; LIN, R.S.; WU, F.S. In vitro shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v.47, p.702–709, 2011.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. **Livro vermelho da Flora do Brasil**. 1ª edição. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2013.

MONDAL, T.; ADITYA, S.; BANERJEE, N. *In vitro* axillary shoot regeneration and direct Protocorm-like body induction from axenic shoot tips of *Doritis pulcherrima* Lind. **Plant tissue culture and Biotechnology**, v.23, p.251-261, 2013.

MOREL, G. Producing virus-free cymbidiums. **American Orchid Society Bull.**, v.29, 495–497, 1960.

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

MURTHY, H. N.; PYATI A. N. Micropropagation of *Aerides Maculosum* Lindl. (ORCHIDACEAE). **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v: 37, n.2, p.223-226, 2001.

NAING, A.H.; CHUNG, J.D.; PARK, I.S.; LIM, K.B. Efficient plant regeneration of the endangered medicinal orchid, *Coelogyne cristata* using protocorm-like bodies. **Acta Physiol Plant**, v.33, p. 659–666, 2011.

PARK, S.Y.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v.38, 168–172, 2002.

SILVA, M.F.F.; SILVA, J.B.F.; ROCHA, A.E.S.; OLIVEIRA, F.P.M.; GONÇALVES, L.S.B.; SILVA, M.F.; QUEIROZ, O.H.A. Inventário da família Orchidaceae da Amazônia brasileira. Parte I. **Acta Amazonica**, v.9, p. 163-175, 1995.

STANCATO, C. G.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 25-33, 2001.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A. The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.113, p.149-161, 2012.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRANSZKI, J. Plant thin cell layers: a 40-year celebration. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.32, p. 922-943, 2013.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A. Successful storage of protocorm-like bodies of hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) under low temperature conditions. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.12.001>, 2014.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A.T.; DE SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. D. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p

TRAN THANH VAN, M. *In vitro* control of de novo flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues. **Nature**, v. 246, p.44–45, 1973.

VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; TEIXEIRA, L. S.; CARVALHO, S. V.; MOTOIKE, Y. S.; NOVAIS, F. R.; CECON, R. P. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e auxiliares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 47, n. 286, p. 613-628, 2002.

WU, K.; ZENG, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; CHEN, Z.; ZHANG, J.; YANG, Y.; DUAN, J. Efficient regeneration of *Renanthera* Tom Thumb ‘Qilin’ from leaf explants. **Scientia Horticulturae**, v.135, p.194-201, 2012.

WU, R.Y.; CHANG, S.Y.; HSIEH, T.F.; CHANG, Y.S. Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. **Scientia Horticulturae**, v. 157, p. 108-112, 2013.

ZAINUDDIN, M.; JULKIFLE, A.L.; POBATHY, R.; SINNIAM, U.R.; KHODDAMZADEH, A.; ANTONY, J.J.J.; PAVALLEKODI; SUBRAMANIAM,S. Preliminary analysis of cryopreservation of *Dendrobium* Bobby Messina orchid using an encapsulation-dehydration technique with Evans blue assay. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 11870-11878, 2011.