

Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose

Renato Fernandes GALDIANO JÚNIOR¹, Cibele MANTOVANI², Aline Olian CASSANO³, Eliana Gertrudes de Macedo LEMOS⁴

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo analisar os aspectos da germinação e avaliar o efeito de concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea*. Sementes provenientes de cápsulas fechadas foram semeadas em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) e a morfologia externa da semente à plântula foi fotodocumentada em estereomicroscópio e microscópio eletrônico de varredura. Plântulas com 90 dias após a semeadura foram repicadas em meio de cultura ½ MS (com metade da concentração de macronutrientes) com diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹), incubadas nas mesmas condições *in vitro* por mais 150 dias e em seguida as plântulas foram avaliadas quanto ao número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas, comprimento da parte aérea, massa fresca e seca total. Os dados biométricos foram submetidos à análise estatística e a eles ajustadas curvas de regressão. As sementes apresentaram testa reticulada com uma extremidade micropilar (aberta) e calazal (fechada); o embrião originou uma estrutura tuberiforme clorofilada denominada protocormo que pode apresentar rizóides, folíolos e quando provido de raiz é considerado plântula. A ausência de açúcar ou a maior concentração avaliada de sacarose foram prejudiciais ao crescimento da planta. A concentração de 27 g L⁻¹ proporcionou maior crescimento *in vitro* possibilitando maior eficiência para a propagação massal dessa espécie de elevado potencial ornamental.

PALAVRAS-CHAVE: Germinação assimbiótica, orquídea nativa, carboidrato.

Initial development and *in vitro* growth of *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe in different sucrose concentrations

ABSTRACT

The aims of this study were to analyze the initial germination aspects and evaluate the effect of sucrose concentrations on *in vitro* growth of *Cattleya violacea*. Mature seeds from closed pods were sowed on MS (Murashige and Skoog) culture medium. The external morphology of seed and plantlets were documented by light and scanning electron microscopy. Plantlets with 90 days after sowing were subcultured on ½ MS (with half-strength macronutrients concentrations) culture medium with different sucrose concentrations (0, 10, 20, 30 and 40 g L⁻¹), incubated under the same *in vitro* conditions during more 150 days followed by the evaluation of root number, root length, shoot length, fresh and dry weight. The biometric data were statistically analyzed and regression curves constructed. The seeds showed reticulate seed coat with a micropylar (opened) and chalazal (closed) end; the embryo results a chlorophyllated tuberiforme structure called protocorm, which may have rhizoids, leaflets and is considered plantlet when it has root. Absence of sucrose or the highest evaluated sucrose concentration was detrimental for plant growth. The concentration of 27 g L⁻¹ provided the highest *in vitro* growth enabling great efficiency for mass propagation of this species of high ornamental potential.

KEYWORDS: Asymbiotic germination, native orchid, carbohydrate.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Jaboticabal – SP, e-mail: renatofgaldianojr@yahoo.com.br

² FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP, e-mail: orquidariomantovani@ig.com.br

³ Laboratórios de Biologia, Centro Universitário Unifafibe, Bebedouro – SP, e-mail: aline_cassano@yahoo.com.br

⁴ FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP, e-mail: egerle@fcav.unesp.br

INTRODUÇÃO

Orchidaceae compreende uma das maiores famílias das Angiospermas pertencem à ordem Asparagales (APG 2008) e consiste de cerca de 24.500 espécies em 800 gêneros (Dressler 2005). No Brasil ocorrem 235 gêneros e 2.419 espécies (Barros *et al.* 2011), sendo reportado, na Amazônia brasileira, a existência de 709 espécies em 131 gêneros conhecidos (Silva e Silva 2004).

Cattleya é um gênero originário das regiões tropicais das Américas Central e do Sul composto de 48 espécies (Pridgeon 2006), mas em decorrência de recentes abordagens filogenéticas, este número pode ser ainda maior (Van den Berg 2008). O gênero compreende plantas epifíticas, encontradas em árvores de florestas úmidas, desde o nível do mar até 1500 m de altitude. *Cattleya violacea* (Figura 1) é uma espécie nativa, embora não endêmica do Brasil, encontrada em Estados das regiões Norte (Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima), Centro-Oeste (Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais) (Barros *et al.* 2011).



Figura 1 - Inflorescência de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe. Barra = 1 cm. Jaboticabal – SP, 2011.

Atualmente, diversas populações naturais de plantas desta família têm sido afetadas por ações antrópicas decorrentes da destruição do habitat ou da coleta predatória (Arditti 1992), estimulada pelo valor que essas espécies adquirem no mercado. A regeneração natural dessas populações é dificultada pelo seu crescimento lento (metabolismo ácido das crassuláceas) e das interações mutualísticas que apresentam com insetos e microrganismos quer para a polinização ou para germinação (Roberts e Dixon 2008).

A micropropagação *in vitro* é reconhecida por ser uma técnica útil para produção, em larga escala, de plantas com elevada qualidade e uniformidade. Através do desenvolvimento de protocolos específicos torna-se possível o cultivo de espécies vulneráveis para comercialização ou para repovoamento (Amo *et al.* 2009). Sob este aspecto, a micropropagação proporcionou resultados expressivos com outras espécies

classificadas “em risco” (Dutra *et al.* 2008; Ávila-Diaz *et al.* 2009; Roy *et al.* 2011).

Estudos morfológicos do desenvolvimento inicial de plantas nativas (em especial naquelas em processo de domesticação) podem fornecer subsídios à interpretação de testes de germinação e auxílio na análise do seu ciclo vegetativo, e são importantes para estudos botânicos, taxonômicos, ecológicos e no desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação (Gentil e Ferreira 2005).

Por outro lado, no cultivo *in vitro*, a sacarose atua como uma fonte de energia e fornece carbonos que serão utilizados durante a respiração e são precursores para a biossíntese de componentes estruturais e funcionais como oligossacarídeos, aminoácidos e outras moléculas necessárias para o crescimento (Caldas *et al.* 1998). O suprimento exógeno de açúcar pode ampliar as reservas de amido e sacarose nas plantas micropropagadas e favorecer a aclimatização *ex vitro* bem como acelerar as adaptações fisiológicas (Hazarika 2003). No entanto, os explantes podem apresentar fotossíntese reduzida, provavelmente devido à presença de suficiente fonte de energia para outras atividades metabólicas (Rolland *et al.* 2002).

Objetivou-se com este estudo analisar (i) o padrão de germinação assimbiótica e o crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya violacea* e (ii) avaliar o efeito das concentrações de sacarose no meio de cultura no crescimento dessa espécie nativa de elevado potencial ornamental.

MATERIAL E MÉTODOS

Desinfestação das cápsulas, viabilidade de sementes e semeadura *in vitro*

Cápsulas de *Cattleya violacea* var. tipo oriundas de autopolinização artificial, fornecidas por um orquidário comercial localizado no município de Itápolis – SP foram coletadas sete meses após a fecundação. Após coletadas, as cápsulas foram levadas ao Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Jaboticabal – SP e armazenadas a 4 °C, na ausência de luz, durante sete dias em sacos de papel contendo sílica.

As cápsulas fechadas foram lavadas externamente com detergente e água corrente e, no interior de câmara de fluxo laminar foram desinfestadas com etanol 70% durante 5 min. e hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo (obtido a partir de alvejante comercial) durante 30 min., seguido de três lavagens consecutivas em 200 mL de água destilada esterilizada em autoclave.

Em seguida as cápsulas foram abertas com o auxílio de bisturi e aproximadamente 1/5 das sementes foram semeadas em frascos de vidro com volume de 480 mL contendo 40 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) previamente

esterilizados em autoclave a 121 °C e 1,1 atmosfera durante 15 minutos (Caldas *et al.* 1998). Outra amostra de 10 mg de sementes foi utilizada para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio, conforme protocolo descrito por Hosomi *et al.* (2011) e, a partir de diluições seriadas, três amostras de aproximadamente 1000 sementes foram observadas. Apenas sementes que apresentaram coloração rosa- avermelhadas foram contabilizadas como viáveis e assim obtido o percentual de viabilidade.

Os frascos contendo os meios de cultura e as sementes foram acondicionados em sala de incubação *in vitro* sob condições controladas (com temperatura de 25 ± 2 °C e iluminação incidente nos frascos de, aproximadamente, 60 µmol.m⁻¹ por meio de lâmpadas fluorescentes branca Phillips* e fotoperíodo de 16 horas luz) para promover a germinação e o crescimento.

Documentação da germinação inicial

A partir do início da germinação foram coletados, quinzenalmente até os 90 dias amostras de protocormos. Os diferentes estádios de crescimento foram visualizados e documentados em estereomicroscópio Leica (MZ12.5, Buffalo, NY, EUA), com aumento de até 50X.

Amostras de sementes e protocormos foram coletadas e prefixadas em solução de glutaraldeído (4%) em tampão K₂HPO₄ 0,1 M, pH 7,2, a 4 °C por no mínimo 72 h. Em seguida foram lavadas três vezes na mesma solução tampão sem glutaraldeído e fixadas em tetróxido de ósmio 1% dissolvido em tampão K₂HPO₄ 0,1 M, pH 7,2, durante 1 h (Santos e Silveira 1999). As amostras foram desidratadas em série gradual de acetona (30-100%) por 30 min. a temperatura ambiente, secas ao ponto crítico em dessecador de CO₂ (Hitachi HCP-2, Tóquio, Japão), montadas em estruturas de alumínio e cobertas com 18 nm de ouro paládio em pulverizador metálico Hitachi E102. Micrografias foram obtidas a partir de um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 500, Tóquio, Japão) operado a 2.500 V. A observação das características dos protocormos procedeu-se conforme Arditti (1992).

Crescimento *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose

Decorridos 90 dias da sementeira, explantes com presença de dois folíolos foram transferidos para frascos de vidro com volume de 480 mL contendo 40 mL de meio de cultura ½ MS, o qual foi composto de metade da concentração de macronutrientes, mas conteve as concentrações originais de micronutrientes, vitaminas, geleificado com 7,0 g L⁻¹ de ágar (Costa *et al.* 2009) e enriquecido com cinco concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e para cada tratamento utilizou-se cinco repetições contendo 12 explantes cada, totalizando 300 plântulas.

Após 240 dias do início do experimento foi avaliado o crescimento inicial *in vitro* das plântulas a partir de medidas biométricas do número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas e comprimento da parte aérea por meio de um paquímetro; massa fresca e seca total obtidas a partir da secagem, em estufa de circulação forçada com renovação de ar (a 60 °C durante 72h, até obtenção de peso constante).

Os dados biométricos do cultivo *in vitro* foram submetidos à análise de variância por meio do programa estatístico Sisvar (Ferreira 2008). Para os efeitos estudados que apresentaram significância a 5% de probabilidade foram ajustadas curvas de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características das sementes e dos protocormos

As sementes de *Cattleya violacea* apresentaram 67 ± 1,09 % de viabilidade aos sete meses após a polinização (Figura 2a).

As sementes das orquídeas apresentam um padrão de germinação e crescimento inicial diferenciado da maioria das angiospermas. No princípio, ocorre o intumescimento do embrião, que provoca o rompimento da testa da semente, e a seguir a sua liberação (Kraus *et al.* 2006). O embrião se desenvolve em uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, chamada protocormo (Arditti 1992). O protocormo é constituído por células parenquimáticas revestidas pela epiderme e, conforme Kraus *et al.* (2006), pode ser considerada sinônimo de plântula por tratar-se de uma estrutura resultante do desenvolvimento do embrião zigótico germinado.

A testa da semente madura de *Cattleya violacea* é reticulada (Figuras 2b e 2c). Segundo Jeeja e Ansari (1994), a testa das sementes desta família é constituída de uma única camada de células, originada da epiderme unisseriada do integumento externo, sendo maior e geralmente aberta na extremidade micropilar e fechada na extremidade calazal, como observado na Figura 2b. De acordo com os mesmos autores, as paredes das células podem ser delgadas ou desenvolver alguns espessamentos lignificados.

Aos 60 dias depois da sementeira em meio de cultura MS, foi observada a completa formação de protocormos de *Cattleya violacea* (Figura 2d). Após algumas semanas do início do desenvolvimento, o protocormo desenvolve, na porção superior, uma região meristemática responsável pela formação do ápice caulinar vegetativo e, na porção inferior, tricomas uni ou pluricelulares, chamados de rizóides, com função principal de absorção (Cribb 1999; Kraus *et al.* 2006).

Na Figura 3a observa-se uma estrutura que provavelmente é o ápice caulinar onde os folíolos serão originados. Nesta região existem grandes quantidades de células meristemáticas que se dividem rapidamente durante a germinação, que levam

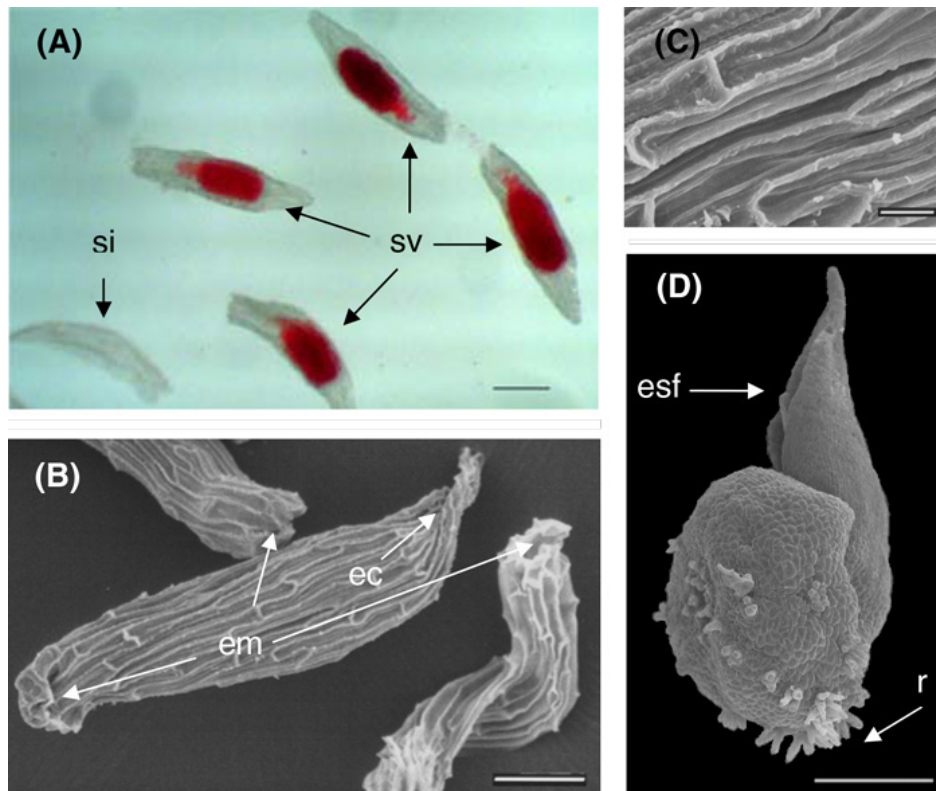


Figura 2 - Aspectos da morfologia externa de sementes e protocormo de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe. (A) Sementes com embriões corados com 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, cuja viabilidade é indicada pela coloração avermelhada, barra = 100 μm ; (B) micrografia eletrônica de varredura da semente, barra = 50 μm ; (C) detalhe da testa reticulada das sementes, barra = 10 μm ; (D) aspecto geral do protocormo com 60 dias após a sementeira, no qual é evidenciado o primeiro folíolo e rizóides, barra = 500 μm . sv – sementes viáveis, si – semente inviável, em – eixo micropilar, ec – eixo calazal, esf – estrutura semelhante a folíolo, r – rizóides. Jaboticabal – SP, 2011.

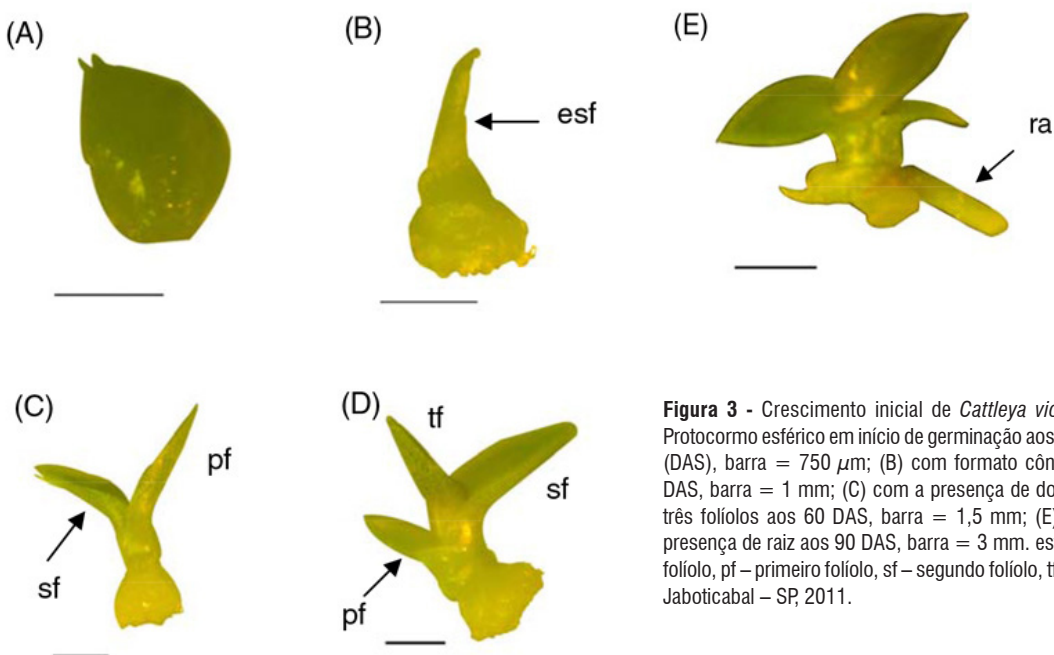


Figura 3 - Crescimento inicial de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe. (A) Protocorm esférico em início de germinação aos 30 dias após a sementeira (DAS), barra = 750 μm ; (B) com formato cônico mais evidente aos 45 DAS, barra = 1 mm; (C) com a presença de dois, barra = 1 mm; (D) ou três folíolos aos 60 DAS, barra = 1,5 mm; (E) plântula formada com a presença de raiz aos 90 DAS, barra = 3 mm. esf – estrutura semelhante a folíolo, pf – primeiro folíolo, sf – segundo folíolo, tf – terceiro folíolo, ra – raiz. Jaboticabal – SP, 2011.

a formação da chamada “estrutura semelhante a folíolo” (Arditti 1992), como observadas nas Figuras 2d e 3b. Por essa razão o maior desenvolvimento da parte caulinar do protocormo é observado até os 60 dias após a semeadura.

Os aspectos da germinação inicial de *Cattleya violacea* neste trabalho foram semelhantes aos descritos em *Cattleya aurantiaca* por Arditti (1992). Nessa fase ocorre o desenvolvimento de dois ou mais folíolos na porção superior (Figuras 3c e 3d), enquanto na inferior forma-se a primeira raiz (Figura 3e), a qual é originada do tecido caulinar, e considerada por alguns autores como raiz adventícia. O tecido parenquimático entra em degeneração. Esse processo e a presença de raiz marcam o término do estágio de protocormo (Alvarez e Sagawa 1965).

Efeito de diferentes concentrações de sacarose em meio de cultura

Os meios de cultura acrescidos de sacarose entre 20 e 30 g L⁻¹ foram mais eficientes (p valor = 0,021) para o crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Figura 4). O número de raízes, comprimento da maior raiz e comprimento da parte aérea apresentaram maiores valores quando as plantas foram

cultivadas com as concentrações de 26,67; 30,49 e 26,84 g L⁻¹ de sacarose (Figuras 4a, 4b e 4d, respectivamente). Quantidades inferiores ou superiores a estas propiciaram redução no crescimento.

Estes resultados diferem dos apresentados por Rego-Oliveira *et al.* (2003), com *Oncidium varicosum* e Sorace *et al.* (2008), com *Oncidium baueri*, nos quais o comprimento e número de raízes foram crescentes e maiores na concentração 40 g L⁻¹. O excesso de açúcares pode ocasionar efeitos deletérios tais como a diminuição da absorção de água, sais minerais, e assim interferir no crescimento da plântula (Fráguas *et al.* 2003; Besson *et al.* 2010), pois maiores concentrações de sacarose altera o potencial hídrico do meio de cultura (Paiva Neto e Otoni 2003).

Os resultados do presente estudo corroboram os de Dignart *et al.* (2009) e Besson *et al.* (2010), observados em *Cattleya walkeriana* e *Miltonia flavescens*, respectivamente, nos quais resultados semelhantes foram observados com a utilização de 30 g L⁻¹ deste carboidrato. Ressalta-se que, em cultura de tecidos de plantas, os trabalhos geralmente utilizam

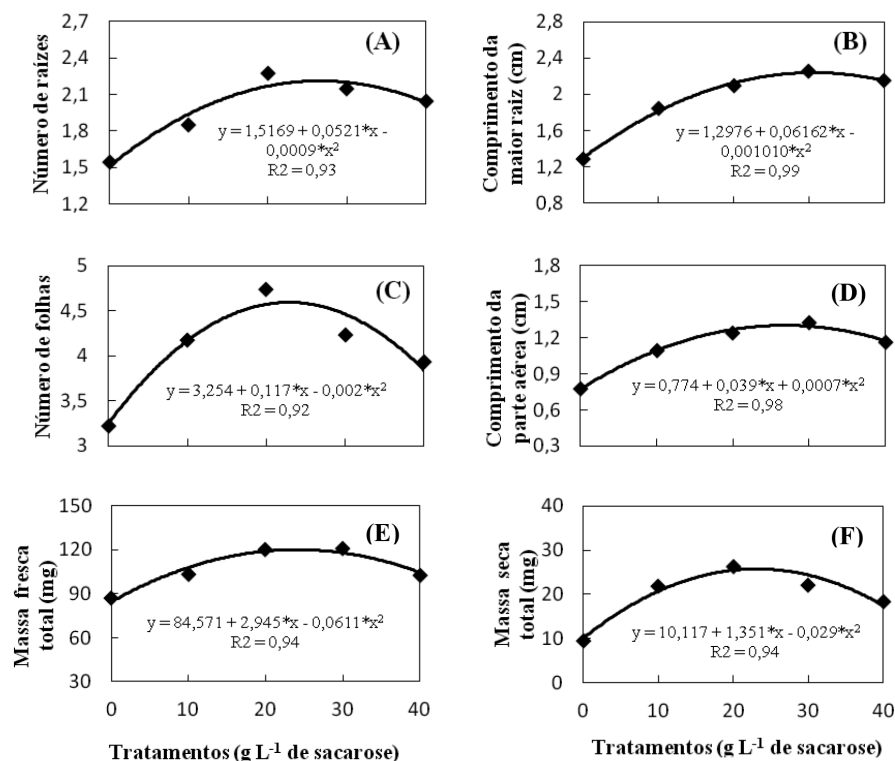


Figura 4 - Crescimento de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe após 240 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de sacarose estudadas. (A) Número de raízes; (B) comprimento da maior raiz; (C) número de folhas, (D) comprimento da parte aérea; (E) massa fresca total; (F) massa seca total. * significativo a 5% de probabilidade. Jaboticabal – SP, 2011.

esta mesma concentração de sacarose conforme proposto por Murashige e Skoog (1962).

Os maiores valores do número de folhas (Figura 4c), da massa fresca (Figura 4e) e massa seca (Figura 4f) das plantas foram registrados com a utilização de 23,56; 24,14 e 23,3 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente. Concentrações semelhantes foram propostas por Fráguas *et al.* (2003) para o híbrido *Cattleya labiata* x *Laelia itambana* e por Pivetta *et al.* (2010) para a orquídea amazônica *Caularthron bicornutum*. Tais resultados indicam que os tecidos de *Cattleya violacea* apresentam exigências de concentrações próximas, mas não respondem de maneira exata a aplicação de sacarose no meio de cultura.

Os resultados observados neste trabalho evidenciam a importância da suplementação do meio de cultura com sacarose. Para *Cattleya violacea* recomenda-se a concentração média estimada de 27 g L⁻¹ de sacarose para propiciar adequado crescimento *in vitro* de suas plântulas objetivando o sucesso da aclimatização.

CONCLUSÕES

A descrição dos principais aspectos morfológicos da germinação inicial de protocormos de *Cattleya violacea* pode ser útil para auxiliar nos estudos do ciclo biológico, da conservação e até mesmo no desenvolvimento de técnicas eficientes para a propagação.

A ausência ou a dose de 40 g L⁻¹ de sacarose foram prejudiciais ao crescimento dessa orquídea amazônica. A concentração média de 27 g L⁻¹ proporcionou maior eficiência para o crescimento *in vitro* de plântulas. Estes aspectos serão úteis para a propagação massal e aclimatização de *C. violacea*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelas bolsas de pesquisa. Ao CEPED/Unifafibe pelo auxílio financeiro e logístico.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Alvarez, M.R.; Sagawa, Y. 1965. A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). *Caryologia*, 18: 251-261.

Amo, S.O.; Finnie J.F.; Van Standen, J. 2009. *In vitro* propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96: 273-278.

APG. 2008. *Angiosperm Phylogeny Group*. (www.mobot.org/MOBOT/Research/Apweb). Acesso em 01/02/2012.

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA. 641 pp.

Ávila-Díaz, I.; Oyama, K.; Gómez-Alonso, C.; Salgado-Garciglia, R. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 99: 335-343.

Barros, F. de; Vinhos, F.; Rodrigues, V.T.; Fraga, C.N.; Pessoa, E.M., 2011. *Orchidaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB031788>). Acesso em 01/02/2012.

Besson, J.C.F.; Oliveira, L.K.; Bonett, L.P.; Stefanello, S. 2010. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. *Revista Brasileira de Biociências*, 8: 9-13.

Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. 1998. Meios Nutritivos, p. 87-132. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S., Buso, J.A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. v.1. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.

Cribb, P.J. 1999. Morphology, p. 13-23. In: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. v.1. Oxford University Press, New York, NY, USA.

Costa, M.A.P.C.; Pereira, M.J.; Rocha, M.A.; Hansen, D.S.; Alves, R.M.O.; Souza, E.H.; Garcia, F.R. 2009. Micropropagação de orquídeas, p. 351-370. In: Junghans, T.G.; Souza, A.S. (Eds.) *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. v.1. Embrapa, Cruz das Almas, Bahia.

Dressler, R.L. 2005. How many orchid species? *Selbyana*, 26: 155-158.

Dignart, S.L.; Castro, E.M.; Pasqual, M.; Ferronato, F.; Braga, F.T.; Paiva, R. 2009. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. *Ciência e Agrotecnologia*, 33: 780-787.

Dutra, D.; Johnson, T.R.; Kauth, P.J.; Stewart, S.L.; Kane, M.E.; Richardson, L. 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 94: 11-21.

Fráguas, C.B.; Villa, F.; Souza, A.V.; Pasqual, M.; Dutra, L.F. 2003. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. *Ceres*, 50: 719-726.

Gentil, D.F.O.; Ferreira, S.A.N. 2005. Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae). *Acta Amazonica*, 35: 337-342.

Jeeja, G.; Ansari, R. 1994. Taxonomic significance of seed surface morphology in Orchidaceae. *Rheedea*, 4: 48-59.

Ferreira, D.F. 2008. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, 6: 36-41. (http://www.fadminas.org.br/symposium/12_edicoes/artigo_5.pdf). Acesso em 5/10/2011.

Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85: 1704-1712.

Hosomi, S.T.; Santos, R.B.; Custódio, C.C.; Seaton, P.T.; Marks, T.R.; Machado-Neto, N.B. 2011. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficiency of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*, 139: 178-189.

Kraus, J.E.; Kerbauf, G.B.; Monteiro, W.R. 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. *Hoehnea*, 33: 177-184.

- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Paiva-Neto, V.B.; Otoni, W.C. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Science Horticulture*, 97: 193-202.
- Pivetta, K.F.L.; Martins, T.A.; Galdiano-Júnior, R.F.; Gimenes, R.; Faria, R.T.; Takane, R.J. 2010. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. *Ciência Rural*, 40: 1897-1902.
- Pridgeon, A. 2006. *The illustrated encyclopedia of orchids*. Timber Press, Portland, OR, USA. 304 pp.
- Rego-Oliveira, L.V.; Faria, R.T.; Fonseca, I.C.B.; Saconato, C.H. 2003. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). *Semina*, 24: 265-272.
- Roberts, D.L.; Dixon, K.W. 2008. Orchids. *Current Biology*, 18: 325-329.
- Rolland, F.; Moore, B.; Sheen, J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, 14: S185-S205.
- Roy, A.R.; Patel, V.V.; Patel, S.; Sajeev, B.C.D. 2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 128: 325-331.
- Santos, J.M. dos; Silveira, A. 1999. A SEM improved technique for studying host-pathogen of *Meloidogyne spp.* *Acta Microscopica*, 6: 562-563.
- Silva, M.F.F.; Silva, J.B.F. 2004. *Native Orchids of the Brazilian Amazon*. v.2. Universidade Federal Rural do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA. 540 pp.
- Sorace, M.; Faria, R.T.; Damasceno-Júnior, C.V.; Gomes, G.P.G.; Barbosa, C.M.; Vieira, F.G.N.; Silva, G.L. da; Takahashi, L.S.A.; Schnitzer, J.A. 2008. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. *Semina*, 29: 775-782.
- Van den Berg, C. 2008. New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity*, 3: 3-12.

Recebido em: 07/02/2012

Aceito em: 02/05/2012