

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA**  
**CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**BRENDA RODRIGUES RAMIRES FERREIRA**

**INDUÇÃO DE PROTOCORMOS A PARTIR DE CALOS CULTIVADOS**  
***IN VITRO* DE *Cattleya nobilior* Rchb.f. (ORCHIDACEAE)**

**DOURADOS – MS**

**2018**

**BRENDA RODRIGUES RAMIRES FERREIRA**

**INDUÇÃO DE PROTOCORMOS A PARTIR DE CALOS CULTIVADOS  
*IN VITRO* DE *Cattleya nobile* Rchb.f. (ORCHIDACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como pré-requisito para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia na Faculdade de Ciências  
Biológicas e Ambientais.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Roberta  
Damiani.

**DOURADOS – MS**

**2018**

FERREIRA, Brenda Rodrigues Ramires

Indução de protocormos a partir de calos cultivados *in vitro* de *Cattleya nobilior* (Orchidaceae) / Brenda Rodrigues Ramires Ferreira – Dourados, 2018.

19 folhas; 30 cm.

Artigo (Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharel em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, 2018.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cláudia Roberta Damiani

Protocorms induction from *in vitro* cultivated calls of *Cattleya nobilior* (Orchidaceae)

1. Orquídeas 2.Cultura de tecidos 3.Micropropagação.

**BRENDA RODRIGUES RAMIRES FERREIRA**

**INDUÇÃO DE PROTOCORMOS A PARTIR DE CALOS CULTIVADOS *IN VITRO*  
DE *Cattleya nobilior* Rhcb.f. (ORCHIDACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do título de Bacharel, no Curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, com Linha de Pesquisa em Biotecnologia Vegetal. Dourados, MS.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Cláudia Roberta Damiani - Doutora -UFGD – Orientadora

---

Profa. Lorena Pastorini Donini - Doutora – UFGD

---

Prof. José Carlos Sorgato – Doutor – UFGD

*Dedico este trabalho primeiramente à minha mãe, Zilda Ramires, que sempre me apoiou; ao meu quarteto que esteve comigo desde o início; aos amigos que criei ao passar dos anos; e, à minha orientadora, sem ela isto não seria possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, pelo apoio, paciência e compreensão nos momentos de estresse e ausência.

À minha orientadora, Cláudia Roberta Damiani, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de usufruir de seu conhecimento.

Ao meu trio favorito, Alex Oliveira, Nathanya Nayla e Otavio Marques, aos quais devo agradecimentos especiais por estarem comigo em todos os momentos dessa fase e sempre me ajudarem e apoiarem.

Aos amigos que estiveram comigo desde antes, como a Mariana Miranda, e àqueles que conheci durante essa jornada e se tornaram especiais.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa decisiva em minha vida.

# INDUÇÃO DE PROTOCORMOS A PARTIR DE CALOS CULTIVADOS *IN VITRO* DE *Cattleya nobile* (ORCHIDACEAE)

Brenda Rodrigues Ramires Ferreira

## RESUMO

A espécie *Cattleya nobile* Rhcb.f (Orchidaceae) é uma planta epífita, encontrada em matas de galeria e matas secas do Cerrado. As plantas desta espécie apresentam grande importância comercial devido à beleza de suas flores. Considerando a importância da produção de mudas em larga escala e homogêneas, o uso de técnicas de cultivo *in vitro* e a produção de mudas a partir de células somáticas tem representado uma técnica e ferramenta para tal finalidade. Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de avaliar a diferenciação de calos em protocormos no cultivo *in vitro*. Para atingir o objetivo proposto, massas de calos (explantes) obtidas da dediferenciação de tecidos somáticos (particularmente folhas) foram cultivados *in vitro* com diferentes reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura. Os tratamentos consistiram da combinação de auxina (ácido indol acético - AIA) e citocinina (thidiazuron - TDZ), em três concentrações (0 = controle; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>), totalizando quatro tratamentos. Aos 60 dias de cultivo foram avaliados as massas fresca e seca total e os diferentes estádios de crescimento dos explantes, sendo eles: Estádio I – calo indiferenciado; Estádio II - protocormo intumescido clorofilado; Estádio III - protocormo com formação de primórdios foliares; e Estádio IV - protocormo com lâminas foliares desenvolvidas. As médias obtidas nos diferentes tratamentos demonstraram que, a diferenciação dos calos em protocormos de *C. nobile* não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados, indicando a necessidade de maior período de cultivo e/ou baixa eficiência dos tipos de reguladores de crescimento e concentrações testados. Em meio suplementado com 3,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA combinado com 3,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, aproximadamente 97% dos calos permaneceram no estágio I. No tratamento com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ observou-se maior número de explantes no estágio II (2,94%), enquanto que, a maior diferenciação dos calos em protocormos em estádios mais avançados (III e IV), bem como as maiores massas fresca e seca foram verificados em explantes cultivados em meio livre de reguladores de crescimento. Considerando os resultados observados conclui-se que para *Cattleya nobile*, o cultivo de calos em meio livre de regulador promove maior diferenciação de calos em protocormos, no entanto, para a obtenção de maior percentual de diferenciação, com microplantas com lâminas foliares desenvolvidas (estádio IV), novos estudos são necessários.

**Palavras-chave:** Orquídea; Diferenciação; Thidiazuron; Ácido Indol Acético.

# PROTOCOLS INDUCTION FROM IN VITRO CULTIVATED CALLUS OF *Cattleya nobilior* Rchb.f. (ORCHIDACEAE)

Brenda Rodrigues Ramires Ferreira

## ABSTRACT

The specie *Cattleya nobilior* Rchb.f (Orchidaceae) is an epiphytic plant, found in gallery forests and dry forest of the Cerrado. The plants of this species have great commercial importance due to the beauty of their flowers. Considering the importance of the production of large scale and homogeneous seedlings, the use of in vitro cultivation techniques and the production of seedlings from somatic cells has been a technique and tool for this purpose. In this sense, this work was developed with the purpose of evaluating the callus differentiation in protocorms in vitro culture. To achieve the proposed goal, callus masses (explants) obtained from the dedifferentiation of somatic tissues (particularly leaves) were cultured in vitro with different growth regulators added to the culture medium. The treatments consisted of a combination of auxin (indole acetic acid - AIA) and cytokinin (thidiazuron - TDZ), in three concentrations (0 = control, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L<sup>-1</sup>), totaling four treatments. At 60 days of culture the fresh and dry masses and the different growth stages of the explants were evaluated: Stage I - undifferentiated callus; Stage II - chlorophyll swollen protocorm; Stage III - protocorm with formation of foliar primordia; and Stage IV - protocorm with developed leaf blades. The means obtained in the different treatments demonstrated that the callus differentiation in *C. nobilior* protocorms did not show significant differences among the treatments tested, indicating the need for a longer cultivation period and/or low efficiency of the types of growth regulators and concentrations tested. In medium supplemented with 3.0 mg L<sup>-1</sup> of AIA combined with 3.0 mg L<sup>-1</sup> of TDZ, approximately 97% of the callus remained in stage I. On treatment with 1.0 mg L<sup>-1</sup> of AIA + 1.0 mg L<sup>-1</sup> of TDZ was observed higher number of explants in stage II (2.94%), whereas, the greater differentiation of callus in protocorms in more advanced stages (III and IV), as well as the largest fresh and dry masses were verified in explants grown in growth regulator-free medium. Considering the observed results, it is concluded that for *Cattleya nobilior*, callus cultivation in regulator-free medium promotes greater callus differentiation in protocorms, however, to obtain a higher percentage of differentiation, with microplants with developed leaf blades (stage IV), further studies are needed.

**Keywords:** Orchid; Differentiation; Thidiazuron; Indole Acetic Acid.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4. CONCLUSÃO .....	18
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

## 1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é considerada uma das maiores e mais diversas em formas e cores, tendo mais de 25 mil espécies distribuídas em aproximadamente 736 gêneros (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016), estando elas presentes em quase todas as partes do mundo, exceto nas regiões polares e desérticas extremamente áridas. Dressler (1981) destacou as orquídeas como as plantas mais estudadas cientificamente, o que continua sendo verdadeiro nos dias atuais.

No Brasil, dentre as espécies catalogadas, encontramos há ocorrência de 220 gêneros de orquídeas e cerca de 2400 espécies, distribuídas em todos os Estados e biomas e em diferentes modos de vida (Flora do Brasil 2020 em construção, 2018).

As orquídeas são conhecidas principalmente pelo seu valor ornamental, o qual se deve a beleza exótica e longa vida útil das flores (CHUGH et al., 2009), tendo conquistado uma legião de fãs durante os anos. Além disso, há gêneros que possuem valor alimentício, como a *Vanilla* sp, e outros que possuem valor medicinal (LAN et al., 2015).

A família Orchidaceae apresenta espécies que predominam no bioma Cerrado, entre elas encontra-se a *Cattleya nobilior* Rchb.f, uma planta epífita nativa encontrada em matas secas deste bioma (MENDONÇA et al., 1998). A espécie apresenta flores de até 15 cm de diâmetro e cores variando de branco a rosa-roxo (WATANABE, 2002).

Segundo a Fundação Biodiversitas (2007), a espécie *Cattleya nobilior* se encontra na lista de espécies vulneráveis à extinção, pois esta vem sofrendo uma redução populacional intensa, a qual pode ser em consequência da coleta predatória e exploração ilegal ou então em razão da substituição do habitat natural por plantio de soja no Cerrado (AUBERTIN; PINTON, 2013). A vulnerabilidade à extinção é acentuada quando associada ao fato de que o hábito epifítico é reconhecido por apresentar um crescimento lento, provavelmente devido ao modo de aquisição de carbono (CHUGH et al., 2009), além de ser um dos hábitos mais

estressantes para as plantas, dificultando o controle efetivo das condições externas para a sobrevivência destas (RODRIGUES et al., 2014).

Em condições naturais, a propagação de orquídeas se dá pela proliferação de gemas adventícias ou laterais, de forma assexuada, ou pela disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas (PEREIRA et al., 2011). De acordo com estes últimos autores, um fator que contribui para a dificuldade da propagação das orquídeas em condições naturais é a baixa ou nula germinação de suas sementes, uma vez que são dependentes da presença de micorrizas.

Considerando as dificuldades de propagação natural das orquídeas e visando reduzir a pressão extrativista sobre as orquídeas, existe a necessidade de sua rápida multiplicação para suprir a demanda comercial, conservar e reintroduzir populações em seu habitat (RAMOS; CARNEIRO, 2007).

A técnica que possibilita o cultivo rápido e em larga escala de novos genótipos, a obtenção de plantas livres de doenças e de mudas de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos é a micropropagação (DAMIANI; SCHUCH, 2008). Dentre as técnicas de micropropagação *in vitro* se encontra o cultivo de protocormos, os quais podem ser utilizados como explantes em trabalhos de embriogênese somática e organogênese direta e indireta (ZHAO et al., 2008).

O protocormo é uma estrutura procedente da germinação das sementes de orquídeas epífitas que produz um ponto vegetativo do qual surge o primeiro ramo da planta (Dicionário Michaelis, 2015). Este evento ocorre tanto em condições naturais como *in vitro* e estas estruturas são frequentemente utilizadas para regenerar plântulas (MAHENDRAN; BAI, 2011; da SILVA et al., 2015).

Os protocormos podem ser obtidos através de diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento, geralmente são utilizadas auxinas e citocininas para induzir

uma resposta organogênica. As auxinas, principalmente o ácido indol-butírico (AIB), são utilizadas para induzir a formação de raízes, no entanto, a auxina natural e mais abundante nas plantas é o ácido indol acético (AIA), enquanto que, as citocininas são reguladoras de crescimento que influenciam diretamente a expansão foliar, a superação da dominância apical e a formação de gemas adventícias, e entre as citocininas mais utilizadas está a 6-benzilaminopurina (BAP) (TAKAHASHI, 2002; POZO et al., 2005). Nos cultivos *in vitro*, as citocininas mais utilizadas são na sua maioria derivadas da adenina, como é o caso do BAP. No entanto, existe um segundo grupo de citocininas derivadas de fêniluréias, como o TDZ ou Thiadizuron (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-uréia). O TDZ apresenta propriedades biológicas similares às das citocininas (MOK et al., 1987).

Sendo assim, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de testar uma combinação de auxina/citocinina (AIA e TDZ) em diferentes concentrações (0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>), na indução da diferenciação de calos de *Cattleya nobilior* em protocormos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS. Foram utilizados explantes de *Cattleya nobilior* Rhcb.f. na forma de massas de calos, obtidas da desdiferenciação dos tecidos somáticos (particularmente folhas).

Para a realização do experimento foram preparadas previamente as soluções nutritivas dos meios de cultura, a lavagem e esterilização em autoclave das vidrarias e então o preparo dos meios de acordo com a metodologia proposta.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos consistiram da combinação dos reguladores de crescimento, AIA (ácido indol

acético) e TDZ (thidiazuron (N-fenil-N-1,2,3-tiadiazol-5-uréia)), nas seguintes concentrações: 0 – tratamento controle; 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de AIA+ 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ; 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de AIA+ 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ; 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de AIA+ 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ, totalizando quatro tratamentos. Cada tratamento foi constituído de três repetições e cada repetição composta por cinco massas de calo (explantes) com aproximadamente 1,0 cm de diâmetro.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com os sais reduzidos para a metade da sua concentração. O meio foi suplementado com os diferentes tratamentos e acrescido 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. O meio (40 mL) foi distribuído em frascos transparente de vidro com capacidade de 250 mL, sendo em seguida esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120°C e 1,5 atm.

Após a inoculação dos explantes, os frascos de cultivo foram transferidos para a sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. Após 60 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas os estádios de crescimento dos protocormos, de acordo com a classificação feita por Zhao et al. (2008), estágio I – calo indiferenciado; estágio II - protocormo intumescido clorofilado; estágio III - protocormo com formação de primórdios foliares e estágio IV - protocormo com lâminas foliares desenvolvidas (Figura 1).



**Figura 1.** Estádios observados dos explantes de *C. nobilior* e utilizados para avaliação: Estádio I – calo indiferenciado; Estádio II - protocormo intumescido clorofilado; Estádio III - protocormo com formação de primórdios foliares; e Estádio IV - protocormo com lâminas foliares desenvolvidas. Dourados-MS, UFGD, 2017.

Para realizar a contagem dos protocormos, os explantes de *C. nobilior* foram distribuídos em papel quadriculado com 1,5 cm<sup>2</sup> e então se procedeu à contagem da quantidade de explantes em cada estágio presente na área definida. O número de protocormos em seus diferentes estádios foi transformado em porcentagem. Ao final avaliou-se a massa fresca e a massa seca total (mg) dos explantes em cada tratamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro, por meio do programa estatístico Winstat (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2002). Os dados obtidos em percentuais foram transformados arco-seno da raiz quadrada de x/100.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

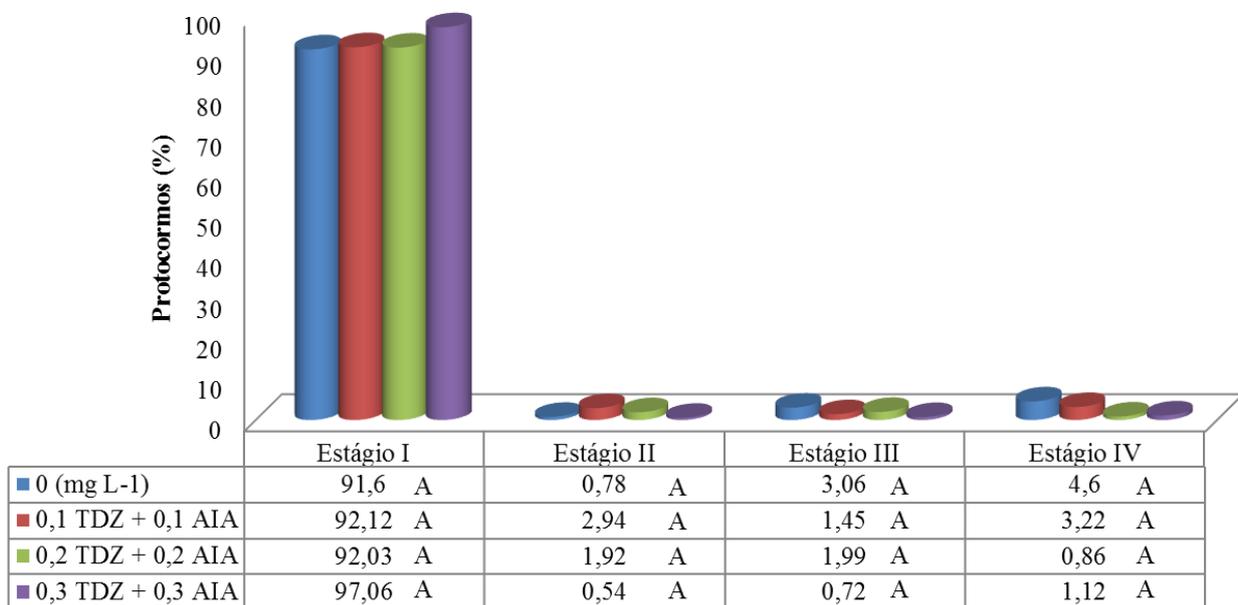
De acordo com a análise de variância, o uso de TDZ e AIA combinados não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes concentrações testadas, nos diferentes estádios de crescimento dos protocormos de *Cattleya nobilior* Rhcb.f. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância durante o cultivo *in vitro* de calos de *Cattleya nobilior* em meio MS1/2 suplementado com AIA e TDZ em diferentes concentrações. GL- Grau de Liberdade; CV – Coeficiente de variação. Dourados-MS, UFGD, 2017.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios			
		Estágio I	Estágio II	Estágio III	Estágio IV
Concentração	3	0.0106 <sup>ns</sup>	0.00797 <sup>ns</sup>	0.0045 <sup>ns</sup>	0.0082 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	0.0131	0.0065	0.0076	0.0037
CV%		8,6	84,7	79,3	42,5
Média Geral		93,3	1,54	1,8	2,46

\*\*, \* e ns, significativos a 1% e 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Por meio do teste de comparação de médias aplicado, não foram observadas diferenças estatísticas significativas para os diferentes estádios de crescimento dos protocormos entre os tratamentos testados (Figura 2), porém foi possível observar que o tratamento controle apresentou uma maior porcentagem de protocormos diferenciados, tanto no estágio III (protocormos com primórdios foliares), bem como no estágio IV (protocormos com lâminas foliares desenvolvidas), quando comparado ao tratamento com maior concentração de TDZ e AIA (0,3 mg L<sup>-1</sup>).



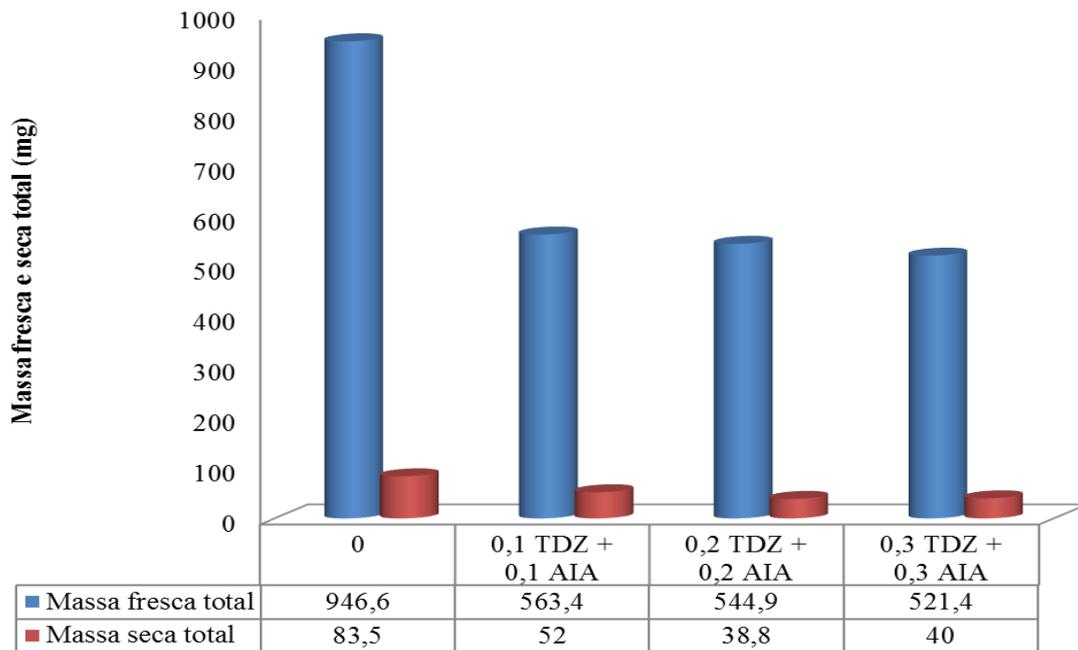
**Figura 2.** Diferenciação *in vitro* de *Cattleya nobilior* em diferentes concentrações (0; 01,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) da combinação de TDZ e AIA. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Dourados-MS, UFGD, 2017.

Neste experimento, o uso de TDZ e AIA combinados em diferentes concentrações, não foi adequado para induzir a diferenciação dos calos em protocormos, sendo os valores obtidos semelhantes aos explantes cultivados em meio livre de regulador. Porém, durante a avaliação pode-se perceber que o tratamento sem reguladores de crescimento apresentaram explantes com melhor aspecto físico, desde a coloração até a consistência deles.

Em orquídeas do gênero *Dendrobium*, Parthibhan et al. (2015) obtiveram 50% de indução de protocormos a partir de calos utilizando a combinação ANA (ácido naftalenoacético) e 2iP (isopenteniladenina). Os reguladores de crescimento na cultura *in vitro* são adicionados para suprir as deficiências dos teores endógenos do próprio explante, estimulando respostas de interesse para diferenciação, crescimento, alongamento e multiplicação celular e neste sentido, o tipo de regulador de crescimento e sua concentração são determinantes no sucesso do desenvolvimento dos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na espécie de orquídea *Oncidium flexuosum* Sims, além da combinação entre concentrações de auxinas e citocininas, Mayer et al. (2010) mantiveram os explantes em condições de escuro em um de seus tratamentos, e obtiveram como resultado uma regeneração de 80% dos protocormos utilizando 1,5  $\mu\text{M}$  de TDZ. Os mesmos autores concluíram que a presença de auxinas inibiu a formação de protocormos.

Ao analisar a massa fresca e massa seca (Figura 3) dos explantes cultivados na ausência de regulador (tratamento controle), também foi possível visualizar valores superiores aos demais tratamentos.



**Figura 3.** Comparação da massa fresca e seca total dos calos/protocormos obtidos nos diferentes tratamentos, durante o cultivo *in vitro* de *C. nobilior* em diferentes concentrações (0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) da combinação de TDZ e AIA. Dourados-MS, UFGD, 2017.

Esse número maior de massa fresca e seca no tratamento controle se dá justamente pela ausência de reguladores de crescimento, pois nesta condição a massa de calos continua a se multiplicar constantemente, já quando há presença de reguladores de crescimento o explante dirige sua energia para a diferenciação celular, a fim de se diferenciar em protocormos.

Segundo Arditti (1992), o desenvolvimento dos protocormos *in vitro* não difere muito dos eventos observados sob condições naturais, entretanto, sob condições apropriadas *in vitro*, o desenvolvimento é mais rápido do que em condições naturais. Neste sentido, além dos reguladores de crescimento, outro aspecto importante no cultivo *in vitro* está relacionado com o tipo de meio de cultivo, sendo imprescindível determinar a concentração ideal de nutrientes para cada espécie ou variedade de orquídea (FRÁGUAS et al., 2003). Considerando essas informações, é necessário conduzir experimentos utilizando outras concentrações do meio de cultivo usado ou então utilizar outros meios de cultivo.

#### 4. CONCLUSÃO

Para o cultivo *in vitro* de *Cattleya nobilior* visando à diferenciação de calos em protocormos, o uso da combinação dos reguladores de crescimento AIA e TDZ apresenta baixa eficiência nas concentrações estudadas. Novos estudos, avaliando diferentes tipos e concentrações de auxinas e citocininas são necessários.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. John Wiley & Sons, New York. 1992.
- AUBERTIN, C.; PINTON, F. A invenção do bioma Cerrado. **Confins**, 2013. Disponível em <<http://journals.openedition.org/confins/8218#quotation>>. Acesso em 07 de março de 2018.
- CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 507-520, 2009.
- Da SILVA, J. A. T.; CARDOSO, J. C.; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S. *Dendrobium* micropropagation: a review. **Plant Cell Reports**, v. 34, p. 671-704, 2015.
- DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.482 - 487, 2008.
- Dicionário Michaelis**. Disponível em: <<https://www.dicionarioweb.com.br/protocormo/>>. Acesso em: 07 de março de 2018.
- DRESSLER, R. L. **The Orchids: Natural History and Classification**. Cambridge: Harvard University Press. 1981.
- FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, v. 50, n. 292, p. 719-726, 2003.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. **Lista das espécies presumivelmente ameaçadas de extinção da flora do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG. 2007. Disponível em: [http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/relatoriolistasmg\\_vol2.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/relatoriolistasmg_vol2.pdf)

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPq, v.1, p. 183-260, 1998.

LAM, Y.; NG, T. B.; YAO, R. M.; SHI, J.; XU, K.; SZE, S. C. W.; ZHANG, K. Y. Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in *Dendrobium* plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015(1), p. 01-25, 2015.

MACHADO, A. A. e CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat, sistema para análise estatística para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel/NIA, 2002.

MAHENDRAN, G.; BAI, V. N. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of *Cymbidium bicolor* Lindl. **Scientia Horticulturae**. v. 135. p. 40-44, 2012.

MAYER, J. L. S.; STANCATO, G. C.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). **Journal of Plant Biotechnology**.v. 103. p. 411-416, 2010.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds), Cerrado: ambiente e flora. **EMBRAPA CPAC**, Planaltina, Brasília, p. 289-556, 1998.

MOK, M.C.; MOK, D. W. S.; TURNER, J. E.; MUJER, C. V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, v.22, n.6, p.1194-7, 1987.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

*Orchidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 07 Mar. 2018

PARTHIBHAN, S.; RAO, M.V.; KUMAR, T.S. *In vitro* regeneration from protocorms in *Dendrobium aequum* Lindley – An imperiled orchid. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, p. 227-233, 2015.

PEREIRA, M.C. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. **Acta Botanica Brasílica**, vol.25, n.3, p.534-541, 2011.

POZO, J.C.; LOPEZ-MATAZ, M. A.; RAMIREZ-PARRA, E.; GUTIERREZ, C. Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, v. 123, p. 173-183, 2005.

RAMOS, T.V.; CARNEIRO, I.F. Multiplicação *in vitro* de *Cattleya x mesquita* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 10-15, 2007.

RODRIGUES, M. A.; FRESCHI, L.; PURGATTO, E.; LIMA, V. F. G. A. P.; KERBAUY, G. B. Ethylene modulates the developmental plasticity and the growth balance between shoot and root systems in the *in vitro* grown epiphytic orchid *Catasetum fimbriatum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 513-525, 2014.

TAKAHASHI, E.K. Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística. 2002. **Tese** (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

WATANABE, D. **Orquídeas: manual de cultivo**. São Paulo: Associação Orquidófila de São Paulo, 2002.

ZHAO, P.; WU, F.; FENG, F-S.; WANG, W-J. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus of *Dendrobium candidum* Wall *ex* Lindl. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 44, p. 178-185, 2008.