

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS

JESSICA LIE TAKAHARA

ORGANOGENESE *IN VITRO* DE *Schomburgkia crisper* LINDL.
(ORCHIDACEAE)

Dourados-MS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS

JESSICA LIE TAKAHARA

**ORGANOGENESE *IN VITRO* DE *Schomburgkia crispa* LINDL.
(ORCHIDACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, sob a orientação da Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani.

Dourados-MS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS

JESSICA LIE TAKAHARA

**ORGANOGENESE *IN VITRO* DE *Schomburgkia crisper* LINDL.
(ORCHIDACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, sob a orientação da Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani (Presidente)

Msc. Jackeline Schultz Soares

Msc. José Carlos Sorgato

Dourados-MS
2014

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani, pela orientação, pela disposição em esclarecer as dúvidas, pelo apoio, pela confiança ao longo do período de pesquisa, pelo exemplo de dedicação como profissional e pelos conselhos amigos dados durante todo o curso que motivaram não só a mim como meus colegas da III turma de Biotecnologia.

À Profa. Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa pela gentileza e concessão do material vegetal necessário para a realização deste trabalho.

A todos os excelentes professores da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais por todo o exemplo, conhecimento passado e auxílio necessário durante o período de graduação.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais por serem solícitos ajudando de forma gentil no dia a dia do laboratório.

À Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realização do curso de graduação em Biotecnologia.

A todos os colegas de laboratório do grupo de pesquisa em Biotecnologia Vegetal, em especial: Ademir, Thamiris, Nathy e Leandro, pela disposição em ajudar e pelo convívio durante este período.

A toda a minha família, em especial meu pai Márcio e minha mãe Celina, por todo incentivo, suporte, apoio e amor, me permitindo buscar meus objetivos e concluir mais esta etapa em minha vida.

Aos grandes amigos que ganhei durante a graduação: Ana Paula, Ândrea, Alisson, Camila e Jessica por estarem sempre por perto para dividir todos os momentos bons ou ruins e dessa forma somar forças para nunca desistir e assim alcançar nosso tão almejado objetivo.

Agradeço a todos aqueles que aqui não foram nomeados, mas que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e foram importantes ao meu desenvolvimento pessoal.

A Deus pela existência de tudo e de todos.

Muito Obrigada

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Família Orchidaceae	9
2.2 Gênero <i>Schomburgkia crisper</i> Lindl.....	10
2.3 Importância ecológica e econômica das orquídeas.....	10
2.4 Cultura de tecidos <i>in vitro</i>	11
2.5 Meio de cultura e reguladores de crescimento.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Schomburgkia crisper</i> a partir de segmentos nodais	15
3.2 Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Schomburgkia crisper</i> a partir de calos	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Schomburgkia crisper</i> a partir de segmentos nodais	18
4.2 Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Schomburgkia crisper</i> a partir de calos	22
5. CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

**ORGANOGENESE *IN VITRO* DE *Schomburgkia crispa* LINDL.
(ORCHIDACEAE)**

RESUMO

A *Schomburgkia crispa* Lindl. é uma espécie de orquídea epífita, encontrada em matas de galeria e matas secas do Cerrado e considerada uma espécie ameaçada de extinção no estado de Minas Gerais. Nas últimas décadas as técnicas de cultivo *in vitro* tem sido uma alternativa importante para o resgate de espécies ameaçadas de extinção e propagação de diversas espécies comerciais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade organogênica de *Schomburgkia crispa* a partir de segmentos nodais e calos e o efeito de diferentes meios de cultura, concentração e reguladores de crescimento durante a multiplicação *in vitro*. Para atingir o objetivo proposto foram realizados dois experimentos distintos. No primeiro experimento avaliou-se a capacidade de multiplicação a partir de segmentos nodais em diferentes meios de cultivo (MS e WPM) e diferentes concentrações (2,5; 5,0 e 7,5 mg L⁻¹) de BAP (6- benzilaminopurina). No segundo experimento avaliou-se a capacidade de multiplicação a partir de calos cultivados em meio MS suplementado com AIA (ácido indol-3-acético) e TDZ (thidiazuron), adicionados ao meio de cultivo combinados nas respectivas concentrações, 0; 0,1 + 0,1; 0,2 + 0,2; 0,3 + 0,3; 0,4 + 0,4 e 0,5 + 0,5 mg L⁻¹. Em ambos os experimentos as avaliações foram realizadas ao final de 30 dias de cultivo *in vitro*, e foram analisados o número e comprimento de brotações, número de folhas, taxa de multiplicação e adicionalmente, no segundo experimento, o diâmetro de calo formado. Na multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* a partir de segmentos nodais, o cultivo em meio WPM suplementado com 5,0 mg L⁻¹ de BAP promove os melhores resultados. Para a multiplicação a partir de calos a utilização do meio MS suplementado com 0,3 mg L⁻¹ de AIA e 0,3 mg L⁻¹ TDZ induz maior número de brotações.

Palavras-chave: Orquídea; cultivo *in vitro*; calos; reguladores de crescimento.

***IN VITRO* ORGANOGENESIS OF *Schomburgkia crispa* LINDL.
(ORCHIDACEAE)**

ABSTRACT

The *Schomburgkia crispa* Lindl. is an epiphytic orchid species found in Cerrado gallery forests and dry forests and considered an endangered species in the state of Minas Gerais. In recent decades the *in vitro* culture techniques are an important alternative to the rescue of endangered species and spread of several commercial species. This study aimed to evaluate the organogenic capacity using nodal segments and callus during *in vitro* multiplication of *Schomburgkia crispa* and the effect of different culture media, concentration and growth regulators. To achieve this purpose two separate experiments were conducted. In the first experiment the multiplication capacity from nodal segments in different culture media (MS and WPM) and different concentrations (2.5, 5.0 and 7.5 mg L⁻¹) of BAP (6-benzylaminopurine) was evaluated. In the second experiment the multiplication capacity from callus grown on a medium supplemented with IAA (indole-3-acetic acid) and TDZ (thidiazuron), added to the culture medium combined in their concentrations 0; 0.1 + 0.1; 0.2 + 0.2; 0.3 + 0.3; 0.4 + 0.4 and 0.5 + 0.5 mg L⁻¹ was evaluated. In both experiments, the evaluations were performed after 30 days of *in vitro* culture, analyzed the number and length of shoots, leaf number, multiplication rate and additionally, in the second experiment, the callus diameter. In the *in vitro* multiplication of *Schomburgkia crispa* from nodal segments, growing in WPM medium supplemented with 5.0 mg L⁻¹ BAP showed the best results. For multiplication from callus using the MS medium supplemented with 0.3 mg L⁻¹ IAA and 0.3 mg L⁻¹ TDZ induces more shoots.

Keywords: Orchid; *in vitro* culture; callus; growth regulators.

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae compreende aproximadamente 780 gêneros e 25.000 espécies, apresentando-se como uma das maiores famílias de angiospermas (PRIDGEON et al., 2009). Atualmente tem sido apontada como uma das cinco famílias mais representativas da flora do Cerrado (STANCATO et al., 2001; MARTINI et al., 2001). De acordo com Barros et al (2014) existem no Brasil 236 gêneros, 2.524 espécies e 8 subespécies de orquídeas.

As orquídeas são plantas herbáceas perenes bastante diversificadas quanto ao tamanho, à forma dos caules e folhas e à cor das flores (TOMBOLATO & COSTA, 1998). A grande diversidade das orquídeas a torna uma das plantas ornamentais mais apreciadas economicamente (SHEEHAN, 1992; COLOMBO et al., 2004).

Dentro da grande família das Orchidaceae encontra-se o gênero *Schomburgkia*. Segundo Jones (1973) este gênero é composto por aproximadamente 18 espécies, geralmente epífitas, encontradas na América Tropical e no Oeste da Índia.

Dentre as 18 espécies conhecidas encontra-se a *Schomburgkia crispa* Lindl., uma epífitas, encontrada em matas de galeria e matas secas do Cerrado (MENDONÇA et al., 1998). Esta orquídea é considerada uma espécie ameaçada de extinção da flora do estado de Minas Gerais de acordo com a Fundação Biodiversitas (2007).

Entretanto, muitos representantes da família, devido ao elevado valor comercial, são extraídos da natureza ilegalmente e irracionalmente, de acordo com Menezes (1985; 1987) e Carneiro et al (2001) vêm dizimando e levando a um empobrecimento gradativo da biodiversidade nacional.

Segundo Ramos & Carneio (2007) em condições naturais, a propagação de orquídeas se dá pela proliferação de gemas adventícias ou laterais (brotações) ou pela disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas. Um fator que

contribui também para a dificuldade da propagação das orquídeas é a baixa ou nula germinação de suas sementes na ausência de micorrizas.

Devido às dificuldades de propagação natural das orquídeas e a necessidade de aumentar a produção de mudas comerciais com qualidade genética e também com o objetivo de conservar espécies consideradas em risco de extinção várias técnicas alternativas de propagação surgiram nas duas últimas décadas (STANCATO et al., 2001; MARTINI et al., 2001).

Dentre as técnicas alternativas utilizadas na propagação de orquídeas destaca-se o cultivo *in vitro*, o qual, além de servir como base de estudo dos aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento, também é um importante método de conservação *ex-situ* para redução do risco de extinção (FERREIRA & SUZUKI, 2008).

Considerando a importância da conservação da espécie de orquídea *Schomburgkia crispa*, o estudo e desenvolvimento de um protocolo eficiente para a propagação da mesma são fundamentais. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de multiplicação durante o processo de organogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais e de calos submetidos à diferentes meios de cultivo, concentrações e reguladores de crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Orchidaceae

A família Orchidaceae, uma das maiores e diversificadas entre as angiospermas, é taxonomicamente uma das mais evoluídas entre as monocotiledôneas, (WATANABE, 2002). As orquídeas estão distribuídas em todas as regiões da terra, bem mais representadas nas regiões tropicais e subtropicais, com uma ampla diversidade no território brasileiro, onde já foram identificadas cerca de 236 gêneros e 2.524 espécies

(BARROS et al., 2014). No Brasil, as orquídeas se desenvolvem em todos os estados, e em maior quantidade na Mata Atlântica, que vai de Pernambuco até o Rio Grande do Sul (REGO & FARIA, 2002).

2.2 Gênero *Schomburgkia*

O gênero *Schomburgkia* é composto por aproximadamente 18 espécies de orquídeas, geralmente epífitas, encontradas na América Tropical e no Oeste da Índia (JONES, 1973). Dentre as 18 espécies encontra-se a *Schomburgkia crispa* Lindl. uma epífita, encontrada em matas de galeria e matas secas do Cerrado (MENDONÇA et al., 1998). De acordo com a Fundação Biodiversitas (2007) a *Schomburgkia crispa* encontra-se na lista de espécies em extinção dentro da família Orchidaceae na flora do estado brasileiro de Minas Gerais.

2.3 Importância ecológica e econômica das orquídeas

A família Orchidaceae apresenta grande importância ecológica já que atuam na manutenção da biodiversidade, indicando o estado de conservação das florestas, pois são sensíveis às interferências antrópicas em áreas de mata primária (MARRARA et al., 2007).

As orquídeas são plantas ornamentais muito apreciadas comercialmente devido à diversidade de tamanho, forma e cor das flores de rara beleza, além da durabilidade e da longevidade mantida por várias semanas (SILVA, 1986). Alguns gêneros possuem elevado valor econômico, como a *Cattleya*, gênero apreciado no mercado brasileiro e internacional (SINGH, 1992).

Nos últimos anos a floricultura brasileira vem se consolidando como uma atividade econômica importantíssima para o agronegócio, fazendo do cultivo de orquídeas um negócio muito promissor (REIS, 2011).

As orquídeas foram as primeiras plantas de importância econômica clonadas pelo método de cultivo *in vitro* em escala comercial. A cultura de meristemas em orquídeas teve início com o trabalho de Morel (1960), que objetivou eliminar doenças e produzir em larga escala mudas geneticamente idênticas de *Cymbidium* (PRAKASH et al., 1996).

Outras espécies são também apreciadas na medicina tradicional e diversos estudos farmacológicos validaram sua utilização etnobotânica (CHEN et al., 2008).

2.4 Cultivo *in vitro*

Em condições naturais, a propagação de orquídeas se dá pela proliferação de mudas laterais ou pela disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas (RAMOS & CARNEIRO, 2007). Devido às dificuldades de propagação natural das orquídeas e a necessidade de aumentar a produção de mudas comerciais com qualidade genética e também com o objetivo de conservar espécies consideradas ameaçadas de extinção várias técnicas de cultivo *in vitro* surgiram (STANCATO et al., 2001; MARTINI et al., 2001).

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida, como um conjunto de técnicas que favorece o crescimento de um grande número de células em condições estéreis e controladas tais como, temperatura, luminosidade, ph do meio de cultura, dentre outras variáveis (RAVEN et al., 2001). Podendo resolver ou minimizar pontos na multiplicação sistematizada de plantas elites pelo processo de micropropagação. (PEREIRA, 2009).

O princípio básico da cultura de tecidos parte da totipotência celular, ou seja, da capacidade de qualquer célula ou organismo vegetal possuir toda a informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa, quando submetida a um tratamento adequado (FERREIRA et al., 1998).

As técnicas de cultivo *in vitro* são amplamente utilizadas para diversas espécies, devido à rápida multiplicação em relação aos métodos convencionais, possibilitando o fornecimento de mudas em maior quantidade, qualidade fitossanitária, de alto valor ornamental, produção em curto espaço de tempo e em pequena área cultivada (BOSA et al., 2003).

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro* destaca-se a micropropagação, devido as inúmeras vantagens que apresenta, tais como, a fixação de ganhos genéticos em populações clonais e a obtenção de grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade, em pequeno espaço físico e em curto período de tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Além disso, o manuseio e o transporte dos materiais obtidos *in vitro* são de custo relativamente reduzido, embora exijam embalagens e cuidados especiais (SEREGEN, 2011).

Segundo Thorpe (1994) qualquer parte separada da planta, denominada explante, pode ser destinada para iniciar o processo de micropropagação. Neste sentido, dependendo do tipo de explante utilizado e da capacidade organogênica do mesmo em reagir a estímulos externos, o explante pode seguir diferentes rotas em um processo denominado organogênese *in vitro*.

A organogênese é um processo em que as células e tecidos são induzidos a sofrerem mudanças (desdiferenciação e rediferenciação), que resultam na formação de

uma estrutura unipolar, podendo ser um primórdio caulinar ou radicular, cujo sistema vascular permanece conectado ao explante original (THORPE, 1994).

O sucesso da regeneração *in vitro* depende do controle da organogênese, que é influenciada por diversos fatores, tais como o tipo e a idade do explante, o genótipo, o estado fisiológico da planta matriz, os componentes do meio de cultura, os reguladores de crescimento e as condições físicas da cultura. A interação entre todos estes fatores leva à indução e expressão de um modo específico de diferenciação e desenvolvimento celular (GAJ, 2004; GIRI et al., 2004).

2.5 Meio de cultura e reguladores de crescimento

Os meios de cultura utilizados na cultura de tecidos podem ser líquidos ou sólidos, sendo que a cultura em meio líquido normalmente exige algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante. Os meios sólidos ou semi-sólidos podem ser solidificados com ágar (um polissacarídeo extraído de algas marinhas), phyta-gel (gomas produzidas por certas bactérias) ou amido (utilizado em cultura de anteras de cevada e explantes de tubérculos). A escolha do agente de solidificação depende da espécie da planta e das condições de cultivo (FERREIRA et al., 1998).

Os tecidos cultivados *in vitro* são mantidos pelos nutrientes orgânicos e minerais do meio de cultura, enquanto a expressão morfológica das células ou de órgãos vegetais pode ser controlada por fatores como variações nas concentrações nutricionais ou reguladores de crescimento nos meios de cultura, que definem respostas específicas para cada espécie (CALDAS et al., 1998).

Os fatores que mais frequentemente determinam o sucesso da cultura de tecidos vegetais são: origem do explante e o meio de cultura utilizado. Vários meios de cultura

têm sido testados em relação à composição de sais minerais, enquanto as vitaminas, e reguladores de crescimento e outros suplementos orgânicos variando em concentração (VENTURA et al., 2002).

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 (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Conforme Taiz e Zeiger (2009), oito grupos de substâncias são consideradas hormônios vegetais: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, brassinoesteróides, jasmonatos e salicilatos, dentre esses as auxinas e citocininas são os mais utilizados no cultivo *in vitro*.

São mais utilizadas no cultivo *in vitro* com o objetivo de promover a multiplicação já que, as citocininas são responsáveis pela citocinese durante o processo de divisão celular. Participam de muitos processos celulares, sendo que o controle da divisão celular é o processo central, possuem grande capacidade de promover a divisão celular, participando assim, do processo de alongamento e diferenciação celular, principalmente quando interagem com as auxinas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As citocininas mais utilizadas em cultivo *in vitro*, são: kinetina (KIN), zeatina (citocinina natural) e a 6-benzilaminopurina (BAP) (CARVALHO et al., 2003).

Segundo Carvalho et al (2003) as auxinas representam um grupo de reguladores de crescimento utilizados para induzir o desenvolvimento de nós, formação de calo e desenvolvimento de raízes adventícias. As auxinas utilizadas com maior frequência em cultivo *in vitro*, são: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido μ -naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D).

De modo geral, as formulações do meio de cultura devem ser adequadas às exigências de gêneros, espécies e clones. Em geral, é difícil compreender os motivos pelos quais certas combinações de meio e condições de cultivo obtêm sucesso e outras fracassam (VENTURA et al., 2002).

Desta forma o meio de cultura desempenha várias funções, servindo de suporte físico para o explante, proporcionando os nutrientes necessários à sua sobrevivência, além disso, tal como se indicou anteriormente, os componentes do meio podem ser utilizados para dirigir o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal (GEORGE, 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Botânica da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS. O material vegetal, *Schomburgkia crispa* Lindl. utilizado para a realização dos experimentos foi obtido de sementes germinadas e cultivadas *in vitro* no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA). Para avaliar a capacidade organogênica realizaram-se dois experimentos de multiplicação, um a partir de explantes nodais e outro a partir de calos indiferenciados, conforme delineamentos descritos a seguir.

3.1 Multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* a partir de segmentos nodais

Para este experimento foram utilizados explantes nodais caulinares de *Schomburgkia crispa*, com duas folhas e duas gemas laterais.

Os fatores estudados consistiram em dois tipos de meio de cultura e três concentrações de um regulador de crescimento, totalizando seis tratamentos. O

delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo realizado para cada tratamento cinco repetições e cada repetição composta por um frasco de cultivo contendo 5 explantes. Os meios de cultura estudados foram o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), e o meio WPM (Wood Plant Medium) de Loyd & McCown (1980), ambos acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8.

Os meios de cultura foram acrescidos de 6-benzilaminopurina (BAP), nas seguintes concentrações (2,5; 5,0; e 7,5 mg L⁻¹). Após a distribuição nos frascos de cultivo, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1,5 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação dos explantes em ambiente estéril, os frascos de cultivo foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura média de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h e radiação fotossinteticamente ativa de 45 μmol m⁻² s⁻¹, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes branco-frias.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados: o número médio de brotações por explante, o comprimento médio das brotações (cm), o número médio de folhas por brotação e a taxa de multiplicação. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro utilizando o programa WinStat 2.0 (MACHADO & CONCEIÇÃO, 2003).

3.2 Multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispata* a partir de calos

Para o experimento foram utilizados calos com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro. Os fatores estudados consistiram na combinação de dois reguladores de crescimento (AIA – ácido indol-3-acético e TDZ – thiadizuron) em seis diferentes concentrações, 0 = controle, sem adição de AIA e TDZ; 0,1 mg L⁻¹ de AIA + 0,1 mg L⁻¹

de TDZ; 0,2 mg L⁻¹ de AIA + 0,2 mg L⁻¹ de TDZ; 0,3 mg L⁻¹ de AIA + 0,3 mg L⁻¹ de TDZ; 0,4 mg L⁻¹ de AIA + 0,4 mg L⁻¹ de TDZ; e 0,5 mg L⁻¹ de AIA + 0,5 mg L⁻¹ de TDZ, totalizando seis tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo realizado para cada tratamento cinco repetições e cada repetição composta por um frasco de cultivo contendo 5 explantes (calos). Os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8. O meio de cultura foi acrescido de AIA e TDZ conforme os tratamentos e esterilizado em autoclave a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a inoculação dos explantes em ambiente estéril, os frascos de cultivo foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura média de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h e radiação fotossinteticamente ativa de 45 μmol m⁻² s⁻¹, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes branco-frias.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados: o diâmetro médio do calo formado (cm), o número médio de brotações por calo inicial, o comprimento médio das brotações (cm) e o número médio de folhas por brotação. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro e por regressão polinomial utilizado o programa WinStat 2.0 (MACHADO & CONCEIÇÃO, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispera* a partir de segmentos nodais

De modo geral, verificou-se uma interação significativa entre a concentração de BAP (6-benzilaminopurina) e o tipo de meio utilizado para a maioria das variáveis estudadas na multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispera*, e apenas para o comprimento médio das brotações esta interação não foi observada (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para características médias de: número médio de brotações por explante (NMB), número médio de folhas por brotação (NMF), taxa de multiplicação (TM) e comprimento médio das brotações (CMB) e respectivos coeficientes de variação. Dourados-MS, UFGD, 2014.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		NMB	NMF	TM	CMB
Meios	1	1,748222*	4,58954 ^{ns}	1,139859 ^{ns}	0,073186 ^{ns}
Concentrações BAP	2	0,346613 ^{ns}	2,348831 ^{ns}	0,586916 ^{ns}	0,042005 ^{ns}
Meio x BAP	2	1,142014**	5,877643**	1,467713**	0,00852 ^{ns}
Resíduo	18	0,208014	1,362654	0,340881	0,031001
CV (%)		17,3	19,1	16,4	13,2

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

Com relação ao número de brotações por explante verificou-se uma interação significativa entre o meio de cultura utilizado e a concentração de BAP adicionada ao mesmo. A partir dos resultados obtidos observou-se que explantes cultivados em meio WPM e com concentrações iguais ou inferiores a 5,0 mg L⁻¹ de BAP apresentam maior emissão de brotos quando comparado ao meio MS nas mesmas concentrações (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da concentração de BAP e do meio de cultura na multiplicação *in vitro* de orquídea (*Schomburgkia crispa*) a partir de segmentos nodais. Dourados-MS, UFGD, 2014.

BAP (mg L ⁻¹)	Número médio de brotações por explante		Número médio de folhas por brotação		Taxa de multiplicação		Comprimento médio das brotações (cm)	
	WPM	MS	WPM	MS	WPM	MS	WPM	MS
2,5	3,25 A a	2,53 B a	6,85 Aab	6,49 A a	3,93 A ab	3,75 A a	1,44 Aa	1,40 A a
5,0	3,12 A a	2,08 B a	7,28 A a	4,76 B b	4,14 A a	2,88 B b	1,40 A a	1,24 A a
7,5	2,61 A b	2,3 A a	5,3 A b	5,93 A ab	3,15 A b	3,47 A ab	1,35 A a	1,23 A a
CV (%)	17,3		19,1		16,4		13,2	

*Médias seguidas por letras distintas (maiúsculas na linha e minúsculas na coluna) diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Observou-se também, que quando os explantes são cultivados em meio contendo 7,5 mg L⁻¹ de BAP não há diferenças entre os meios utilizados, porém, explantes cultivados em meio WPM apresentam uma redução significativa do número de brotações, em aproximadamente 20% quando comparados as concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 2).

Durante a propagação *in vitro* de plântulas híbridas de orquídeas *Brassocattleya* ‘Pastoral’ x *Laeliocattleya* ‘Amber Glow’, Araujo et al (2006) estudando o efeito de diferentes meios de cultura, WPM, MS e Knudson C, combinados com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L⁻¹) verificaram que o meio MS acrescido de 4,0 mg L⁻¹ de BAP favorece a formação de maior número de brotos (3,34), porém, ao comparar os resultados obtidos neste tratamento com os resultados obtidos de explantes cultivados no mesmo meio e na ausência de BAP, o número de brotos (3,04) não diferido mesmo.

Neste sentido, semelhante aos resultados obtidos neste experimento, onde observamos maior número de brotações em explantes cultivados em meio WPM, os mesmos autores concluíram que para a propagação *in vitro* de plântulas de orquídea *Bc*

'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow' os melhores resultados são obtidos também com o meio WPM, diferindo apenas na concentração de BAP utilizada.

Estes resultados corroboram com a afirmativa de Ventura et al. (2002), onde os autores citam que as formulações do meio de cultura devem ser adequadas às exigências de gêneros, espécies e clones e expressam a dificuldade de compreender o motivo pelo qual certas combinações de meio e condições de cultivo obtém sucesso e outras fracassam.

Com relação ao número de folhas por brotação observou-se diferenças significativas entre os tratamentos e semelhante ao resultado anterior (número de brotações), houve interação estatística significativa entre os dois fatores estudados (Tabela 1). Explantes cultivados em meio WPM e com a adição de 5,0 mg L⁻¹ de BAP apresentam maior número de folhas (7,28) se comparado aos explantes cultivados em meio MS na mesma concentração. Porém, explantes cultivados com 2,5 e 7,5 mg L⁻¹ de BAP, não apresentam diferenças significativas no número de folhas quando cultivados em meio WPM ou MS (Tabela 2).

Araujo et al. (2006) estudando os mesmos fatores em plântulas híbridas de orquídeas *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow', não observaram diferenças significativas entre os tratamentos para esta mesma variável.

Para a variável taxa de multiplicação verificou-se também uma interação positiva entre o tipo de meio e a concentração de BAP utilizada. Observou-se maior taxa de multiplicação (4,14) em meio WPM suplementado com 5,0 mg L⁻¹ de BAP, apesar de não haver diferenças significativas entre as concentrações testadas de BAP dentro deste mesmo meio. Por outro lado, explantes cultivados em meio MS suplementado com 5,0 mg L⁻¹ de BAP apresentam um decréscimo significativo da taxa de multiplicação, obtendo-se uma média de 2,88 (Tabela 2).

De acordo com Santos et al. (2006), uma maior taxa de multiplicação *in vitro* é de extrema importância pois resulta na maior velocidade do processo de micropropagação.

Com relação ao comprimento das brotações, os dados obtidos nos diferentes tratamentos não apresentaram significância estatística dos fatores isolados, nem da interação entre eles, observando-se uma média geral de 1,34 cm por brotação (Tabela 2). O aspecto geral das brotações pode ser observado na figura 1.

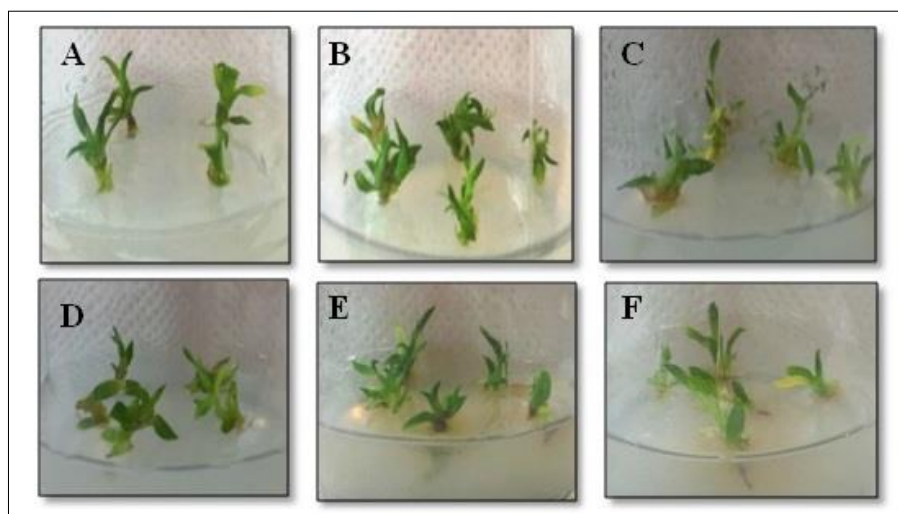


Figura 1. Aspecto geral dos explantes durante a multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* a partir de segmentos nodais, aos 30 dias de cultivo em diferentes tratamentos. (A) Meio MS + 2,5 mg L⁻¹ de BAP. (B) Meio MS + 5,0 mg L⁻¹ de BAP. (C) Meio MS + 7,5 mg L⁻¹ de BAP. (D) Meio WPM + 2,5 mg L⁻¹ de BAP. (E) Meio WPM + 5,0mg L⁻¹ de BAP. (F) Meio WPM + 7,5 mg L⁻¹ de BAP. Dourados-MS, UFGD, 2014.

4.2 Multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* a partir de calos

De modo geral, a análise de variância (Tabela 3) comparando os diferentes tratamentos não foi significativa, com exceção apenas para a variável número de brotações durante a multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* a partir de calos. No entanto, ao aplicar o teste de comparação de médias observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4).

Quanto ao número de brotações emitidas por calo inicial observou-se que explantes cultivados em meio suplementado com 0,3 mg L⁻¹ de AIA + 0,3 mg L⁻¹ de TDZ apresentaram número de brotações superiores aos demais tratamentos (Tabela 4) obtendo-se uma média geral de 12,1 brotações por calo inicial, apesar de não diferir estatisticamente dos dados obtidos em explantes tratados com 0,2 mg L⁻¹ de AIA + 0,2 mg L⁻¹ de TDZ, onde verificou-se 10 brotações por explante.

Tabela 3. Resumo da análise de variância para características médias de Diâmetro médio do calo formado (DMC), Número médio de brotações emitidas por calo inicial (NMBC), Número médio de folhas por brotação (NMF) e comprimento médio das brotações (CMB) e respectivos coeficientes de variação. Dourados-MS, UFGD, 2014.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		DMC	NMBC	NMF	CMB
Concentrações AIA + TDZ	5	0,02673 ^{ns}	22,82732*	12,18113 ^{ns}	0,08808 ^{ns}
Resíduo	19	0,0168	5,06303	5,02529	0,06397
CV (%)		10,7	25,6	46,4	49,2

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

Tabela 4. Efeito da combinação dos reguladores TDZ e AIA em diferentes concentrações na multiplicação *in vitro* de orquídea (*Schomburgkia crispa*) a partir de calos. Dourados-MS, UFGD, 2014.

TDZ + AIA (mg L ⁻¹)	Diâmetro médio do calo formado (cm)	Número médio de brotações emitidas por calo	Comprimento médio das brotações (cm)	Número médio de folhas por brotação
0	1,21 ab	8,0 bc	0,59 a	3,77 ab
0,1+0,1	1,10 b	7,6 bc	0,64 a	2,95 b
0,2+0,2	1,30 a	10,0 ab	0,30 a	5,25 ab
0,3+0,3	1,28 ab	12,1 a	0,67 a	6,77 a
0,4+0,4	1,17 ab	5,6 c	0,50 a	2,55 b
0,5+0,5	1,18 ab	8,8 bc	0,57 a	5,6 ab
CV (%)	10,7	25,6	46,4	49,2

*Médias seguidas por letras distintas (maiúsculas na linha e minúsculas na coluna) diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Por outro lado, o aumento das concentrações dos reguladores para $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ reduziu significativamente o número de brotações, observando uma média geral de 5,6.

De acordo com Takahashi (2002) a proporção da interação auxina/citocinina em meio de cultura é determinante para a resposta organogênica, geralmente, um aumento da relação auxina/citocinina induz à formação de raiz, enquanto uma redução da relação auxina/citocinina induz à formação de brotos. Neste experimento, ao utilizarmos concentrações iguais de TDZ e AIA, aparentemente esta relação tende ao equilíbrio, podendo levar ao aumento de calos e não ao processo de organogênese.

No entanto, é difícil quantificar esta relação, pois cada tipo de regulador dentro das diferentes classes podem apresentar respostas biológicas mais ou menos acentuadas. Neste sentido e de acordo com Ribeiro et al (2010), quando comparamos a atividade biológica do TDZ na multiplicação em relação a outros tipos de citocininas, claramente o TDZ desencadeia respostas mais acentuadas, devido ao fato deste regulador incrementar a atividade de enzimas como a fosfatase ácida, responsável pela interconversão nucleotídeo-nucleosídeo da estrutura de citocininas endógenas, tornando-as biologicamente ativas. Este efeito positivo do uso de TDZ justifica os resultados obtidos neste experimento, que mesmo estando em equilíbrio com o AIA em termos de concentração, observamos respostas positivas com relação ao desenvolvimento das brotações.

Por outro lado, ainda de acordo com Ribeiro et al (2010) concentrações elevadas de TDZ podem atuar como um inibidor de crescimento, afirmativa que corrobora com os resultados verificados também neste experimento, conforme observado em explantes tratados com concentrações iguais ou acima de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Os valores observados com relação ao diâmetro médio de calo formado, comprimento médio das brotações e número médio de folhas não apresentaram

diferenças significativas pelo teste F a 1 % e 5 % de probabilidade, entre os tratamentos obtendo-se uma média geral de 1,20 cm, 0,54 cm e 4,48, respectivamente.

A influência dos diferentes tratamentos pode ser observada no aspecto geral das brotações ao final de 30 dias de cultivo (Figura 2).

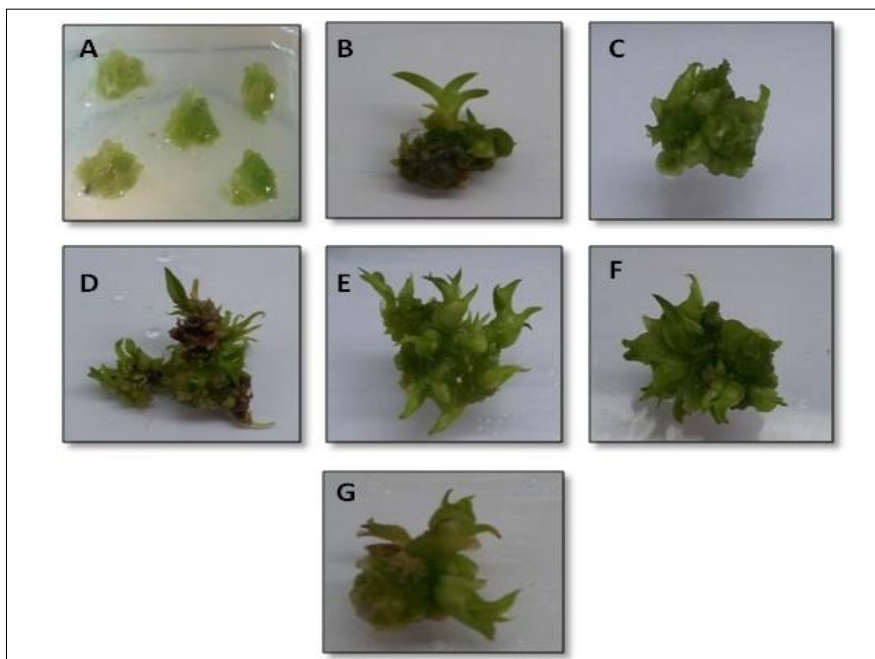


Figura 2. Aspecto geral dos explantes durante a multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispata* a partir de calos, aos 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIA e TDZ. (A) Calo inicial. (B) controle: ausência de AIA e TDZ. (C) 0,1 mgL⁻¹ de AIA + 0,1 mgL⁻¹ de TDZ. (D) 0,2 mg L⁻¹ de AIA + 0,2 mgL⁻¹ de TDZ. (E) 0,3 mg L⁻¹ de AIA + 0,3 mgL⁻¹ de TDZ. (F) 0,4 mg L⁻¹ de AIA + 0,4 mgL⁻¹ de TDZ. (G) 0,5 mg L⁻¹ de AIA + 0,5 mgL⁻¹ de TDZ. Dourados-MS, UFGD, 2014.

5. CONCLUSÕES

Para melhores resultados na multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispata* a partir de segmentos nodais recomenda-se a utilização do meio de cultura WPM suplementado com 5,0 mg L⁻¹ de BAP.

Para a multiplicação a partir de calos de *Schomburgkia crispata* recomenda-se a utilização do meio MS suplementado com 0,3 mg L⁻¹ de AIA combinado com 0,3 mg L⁻¹ TDZ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; SILVA, A.B.; VILLA, F.; ROCHA, H.S.; COSTA, F.C. Propagação *in vitro* de plântulas de orquídea em diferentes meios de cultura e concentrações de citocinina. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.2, n.2, p. 68-73, 2006.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI Neto, L.; FURTADO, S. G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C. O.; GUIMARÃES, L. R. S. *Orchidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 16 Dez. 2014.
- BOSA, N.; CALVETE, E.O.; NIENOW, A.A. & SUZIN, M. 2003. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, 2003.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v. 1, p. 87-132, 1998.
- CARNEIRO, M.F.; CARNEIRO, R.I.F.; OLIVEIRA, S.A.; LEITE JÚNIOR, C.B.; PACHECO, R.A.; SOUZA, M.M.; RAMOS, T.V. 2001. Bromélias e orquídeas na região dos Cerrados – Dados preliminares. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 13. São Paulo. **Anais...** Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais. p. 13, 2001.
- CARVALHO, J. M. F. C.; FURTADO, C. M.; SILVA, H.; CASTRO, J. P de. Metodologia para o superbrotamento de amendoim (*Arachis hypogaea*) através do cultivo "*in vitro*". Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 3, Comunicado Técnico, 196. 2003.
- CHEN, L. G., YANG, L. L., WANG, C. C. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. **Food Chem. Toxicol.** v. 46, p. 688–693, 2008.
- CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 303, 2010.
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M. & FONSECA, C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum Agronomy**, n. 26(2), p. 253 – 258, 2004.

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 MIB, Baseia IG & Lichston JE (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal, Imagem Gráfica, p.67-68, 2008.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1, p.21-43, 1998.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. **Revisão das Listas das Espécies da Flora e da Fauna Ameaçadas de Extinção do Estado de Minas Gerais: Relatório Final**. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 2007.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-42, 2004.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Basingstoke: Edington, 1996.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees and overview. **Tree**, v. 18, n. 2, p. 115-135, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI-CNPq, v. I, p. 183-260, 1998.

JONES, H. G. The Genus *Schomburgkia*: A Study in the History and Bibliography of plant Taxonomy. **Taxon**, v. 22, n. 2/3, p. 229-239, 1973.

LOYD, G.; Mc COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat, sistema para análise estatística para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel/NIA. 2003.

MARTINI, P. C.; WELLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. S. Propagation of orchid *Gongora quinquenervis* *in vitro* germination. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1319 – 1324, 2001.

MARRARA, M. et al. Florística da família Orchidaceae em fragmento florestal semidecidual da fazenda Montevideo, município de Araras, SP, Brasil. **Anais do 8º Congresso de Ecologia do Brasil**, 8, Caxambu, p.1-2, 2007.

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. **EMBRAPAC/PAC**, Planaltina, Brasília. p. 289-556, 1998.

MENEZES, L. C. *Cattleyalabiata* Lindley. Orquídeas Brasileiras. Rio de Janeiro: **Expressão e Cultura**. p. 112, 1987.

MENEZES, L.C. *Laeliapurpurata*. Rio de Janeiro: **Expressão e Cultura**. p. 143, 1985.

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

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

PEREIRA, R. C. A. et al. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 637 - 42, 2009.

PRAKASH, L.; LEE, C. L.; GOH, C. J. *In vitro* propagation of commercial orchids: An assessment of current methodologies and development of a novel approach - Thin section culture. **Journal of Orchid Society India**, New Delhi, v. 10, n. 1/2, p. 3141, 1996.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. A.; RASMUSSEN, F. N. (Eds). **Genera Orchidacearum**. Epidendroideae. Oxford: Oxford University Press. v. 2, p. 585, 2009.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REGO, I. V.; FARIA, R. T. Interação genótipo x meio nutritivo na propagação *in vitro* de orquídeas nativas do Brasil, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2001, Goiânia. **Resumos....**Goiânia: SBMP, v. 1, p. 1- 3, 2002.

REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? **IX Encontro Nacional da ECOECO**, 9. Brasília – DF. Brasília: Encontro, 2011.

RIBEIRO, C. S. N.; SILVA, H.; SANTOS, J. W. dos; CARVALHO, J. M. F. C. Efeito do thidiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 4, p. 366- 371, 2010.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de; SILVA, D. P. C. da; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagation of “pequizeiro” (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

SEREGEN, M. I. Micropropagação *in vitro* de flores e plantas ornamentais. In: GERALD, L. T. S. (Org.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1 ed. São Paulo: Atiqua, cap. 8, p. 134-147, 2011.

SHEEHAN, T.J. Orchids. In: Larson, R.A. (Ed.). Introduction to floriculture. San Diego: **Academic Press**. p. 246 , 1992.

SINGH, F. Micropropagation of orchids *Spaihogloottisplicata* and *Epidendrumradicans*, In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and florestry**: London, Springer – Verlag, v. 20, p. 223 - 450, 1992.

SILVA, W. Cultivo de orquídeas no Brasil. São Paulo: Nobel, 1986.

STANCATO, G.C. et al. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.7 (1), p. 25-33, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 819, 2009.

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.

THORPE, T. A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, Chap. 2, p. 17-36, 1994.

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

VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; TEIXEIRA, L. S.; CARVALHOS, S. V.; MOTOIKE, Y. S.; NOVAIS, F. R.; CECON, R. P. Organogênese *in vitro* a partir de

gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, v. 47, p. 613-628, 2002.

WATANABE, D. Orquídeas: manual de cultivo. **AOSP**, São Paulo, p. 296, 2002.