

## Potencial germinativo de sementes e qualidade de keikis de *Dendrobium nobile* em diferentes fases do desenvolvimento dos frutos

### Germination potential of seeds and keikis quality of *Dendrobium nobile* at different fruit development stages

José Carlos Sorgato<sup>1\*</sup> Jackeline Schultz Soares<sup>11</sup>  
Jannaina Velasques da Costa Pinto<sup>1</sup> Yara Brito Chaim Jardim Rosa<sup>1</sup>

#### RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial germinativo das sementes, formadas por autopolinização manual, em frutos de pseudobulbos de *Dendrobium nobile*, em diferentes estágios de maturação. Aos 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 dias após polinização (DAP), cinco pseudobulbos contendo frutos foram destacados da planta-mãe e plantados em recipiente de polipropileno, permanecendo até 300 DAP. Depois desse período, os pseudobulbos foram avaliados quanto ao número de keikis e os keikis produzidos quanto ao diâmetro e comprimento de pseudobulbo, número de folhas e de raízes. A seguir, os frutos foram destacados dos pseudobulbos e avaliados quanto ao diâmetro da maior porção do ovário, comprimento e massa fresca do fruto, massa fresca das sementes e do pericarpo. Para cada época de coleta de frutos, as sementes foram submetidas ao teste de tetrazólio e ao teste de germinação. Quanto maior o diâmetro do fruto, a porcentagem de sementes viáveis e a porcentagem de germinação de *D. nobile* também aumentaram, e essa relação foi crescente à medida que aumentam os dias de permanência dos frutos na planta-mãe. Além disso, pseudobulbos que permaneceram menos tempo na planta-mãe apresentaram maiores números de keikis e, para que a porcentagem de germinação in vitro de *D. nobile* seja superior a 75% os pseudobulbos, contendo fruto, devem ser coletados a partir dos 166 DAP.

**Palavras-chave:** frutos de orquídeas, germinação in vitro, propagação.

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the germination potential of seeds formed by manual self pollination in fruits of pseudobulbs of *Dendrobium nobile* in different maturation stages. At 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 and 300 days after pollination (DAP), five pseudobulbs containing fruits, were detached from the mother plant and planted in a

polypropylene container, where they remained until 300 DAP. After this period, the pseudobulbs were evaluated on the number of keikis and all keikis produced as the diameter and length of pseudobulb, number of leaves and roots. After, the fruits were detached from pseudobulbs, and evaluated as the diameter of the largest portion of the ovary, length and fresh weight of fruit, fresh weight of seed and pericarp. For each collecting period of fruits, seeds were tested with tetrazolium test and germination test. The larger the diameter of the fruit, the percentage of viable seeds and the germination percentage of *D. nobile* also increased, and this relationship was growing as they increase the length of fruit stay on the mother plant. Moreover, the pseudobulbs remained shortest time in the mother plant showed higher numbers of keikis and so that the percentage of germination in vitro of *D. nobile* is above 75%, the pseudobulbs, containing fruit, should be collected from the 166 DAP.

**Key words:** orchids fruit, germination in vitro, propagation.

#### INTRODUÇÃO

A multiplicação em larga escala de orquídeas ocorre, *in vitro*, de forma sexuada ou assexuada. A reprodução assexuada é mais utilizada para a produção de clones de plantas melhoradas e que apresentam um apelo ornamental e comercial mais pronunciado (MINAMIGUCHI & MACHADO NETO, 2007; NASCIMENTO, 2007; PARAB & KRISHNAN, 2012; RODRIGUES et al., 2013). Por outro lado, a reprodução sexuada é mais utilizada quando se deseja produzir indivíduos geneticamente diferentes, que podem ser adaptados às variações ambientais ocorridas ao longo do tempo, viabilizando

<sup>1</sup>Faculdade de Ciência Agrárias (FCA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-970, Dourados, MS, Brasil. E-mail: [jc\\_sorgato@hotmail.com](mailto:jc_sorgato@hotmail.com). \*Autor para correspondência.

<sup>11</sup>Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados, MS, Brasil.

o processo de reintrodução (SUZUKI et al., 2009; SCHNEIDERS et al., 2012; SUZUKI et al., 2012).

Embora a reprodução sexuada permita a variabilidade genética e a produção *in vitro* de um grande número de plantas em tempo relativamente curto e com alta qualidade fitossanitária, contribuindo para a diminuição do risco de extinção (FERREIRA & SUZUKI, 2008; SCHNEIDERS et al., 2012), algumas espécies apresentam barreiras pós-zigóticas à autofecundação, limitando esse processo à polinização cruzada.

Entretanto, independente do tipo de polinização, os frutos produzidos demoram de meses a anos para ficar maduros (ARAUJO, 2012) e, em alguns casos, quando se pensa em espécies nativas, o monitoramento destes no habitat, muitas vezes, é inviável. Em função disso, plantas inteiras e providas de frutos são removidas do habitat e, na maioria dos casos, não sobrevivem a esse processo.

Como os frutos produzidos dependem das reservas nutricionais da planta para o seu desenvolvimento e, como a maioria deles é diretamente formada em um pseudobulbo, a remoção, apenas dessa estrutura, além de não comprometer a planta e a biodiversidade, ainda poderia fornecer condições à maturação fisiológica das sementes formadas.

O gênero *Dendrobium* constitui-se de plantas de fácil cultivo, florescendo também em grande escala. Esse gênero tem grande quantidade de espécies e de híbridos, adaptáveis a todos os tipos de clima e, segundo MATTIUZ et al. (2006), juntamente com os gêneros *Oncidium*, *Cimbidium*, *Phalaenopsis* e *Cattleya*, é um gênero promissor para material de corte.

Dentre suas espécies, *Dendrobium nobile* Lindl. é uma planta herbácea, epífita, perene, entouceirada, originária da China e Himalaia, muito utilizada na tradicional medicina chinesa (LORENZI & SOUZA, 2008; LAM et al., 2015), sendo amplamente cultivada e comercializada no Brasil, com mais de 15 cultivares que apresentam flores de cores e tamanho variáveis e tolerantes ao frio. A floração, que ocorre preferencialmente no fim do inverno e início da primavera, caracteriza-se pela presença de uma a três flores dispostas nos nós, com sépalas e pétalas brancas, róseas ou amareladas e labelo com manchas roxo-escuras ou claras na garganta (LORENZI & SOUZA, 2008) não havendo relatos científicos quanto a barreiras pós-zigóticas a sua autopolinização.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial germinativo de *Dendrobium nobile* Lindl. (*Orchidaceae*), cujos pseudobulbos, providos

de frutos, foram coletados em diferentes fases do desenvolvimento fisiológico das sementes.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Área de Jardinocultura e no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados – MS, de novembro de 2012 a setembro de 2013. Foram utilizadas matrizes de *Dendrobium nobile*, com dez anos de idade, oriundas de multiplicação vegetativa, acondicionadas em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50% ( $162,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e provido de irrigação por microaspersão.

Quando da floração, cada planta teve uma flor autopolinizada manualmente. Decorridos 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 dias após polinização (DAP), cinco pseudobulbos de cada época de coleta, providos de um fruto cada, foram destacados, com auxílio de tesoura de poda manual, na inserção da base da planta-mãe. Cada pseudobulbo coletado, até os 270 DAP, foi plantado em recipiente de polipropileno, com volume de 500mL, provido de furos para drenagem e tutores, contendo como substrato areia esterilizada em autoclave ( $120^\circ\text{C}$  e  $1,05 \text{kg cm}^{-2}$ ), por 20 minutos, permanecendo nas mesmas condições das matrizes, até completarem 300 dias.

Aos 300 DAP, os pseudobulbos foram removidos do recipiente e transferidos para laboratório, onde foram avaliados quanto ao número de brotações das gemas laterais, conhecidos como keikis. Os keikis produzidos foram avaliados quanto ao diâmetro e comprimento de pseudobulbo e quanto ao número de folhas e de raízes. Nessa ocasião, também foram coletados cinco pseudobulbos contendo frutos das plantas matrizes, que foram submetidos às mesmas avaliações.

A seguir, os frutos foram destacados dos pseudobulbos e avaliados quanto ao diâmetro da maior porção do ovário, comprimento e massa fresca do fruto (MFF). Na sequência, os frutos foram lavados com água e detergente neutro, desinfestados com álcool (70%), abertos, com auxílio de estilete e as sementes foram removidas das cápsulas, homogeneizadas, respeitando-se cada tempo de coleta.

Após este procedimento, as sementes foram pesadas (MFS), sendo posteriormente calculada a massa fresca do pericarpo ( $\text{MFP} = \text{MFF} - \text{MFS}$ ) e a porcentagem de MFP e MFS em relação à MFF.

Para cada época de coleta de frutos, 0,005g de sementes foram submetidas ao teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade, conforme metodologia

descrita por SOARES et al. (2012), sendo calculada a porcentagem de sementes viáveis, conforme metodologia descrita por ROSA et al. (2013).

Após a confirmação da viabilidade, 0,005g de sementes de cada época de coleta foram transferidas para Becker de 100mL, sendo utilizado um Becker para cada tratamento. As suspensões de sementes foram desinfestadas por 15 minutos, com uma solução composta por 3mL de hipoclorito de sódio (2,5%) e 6mL de água destilada estéril (CAMPOS, 2002). Decorrido esse tempo, a solução de sementes foi diluída para 50mL com água estéril para a realização da semeadura.

Utilizou-se o meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$ , suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,5g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico e o pH 5,8±0,1 (ajustado com KOH - 1M). Foram utilizados como frascos de cultivo, recipientes de polipropileno transparentes, com capacidade para 50mL, providos de tampa rosqueável que, após receberem 20mL do meio nutritivo, foram esterilizados em autoclave a 120°C e à pressão de 1,05kg cm<sup>-2</sup> por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios de cultura, os frascos foram transferidos para ambiente asséptico, e cada um deles recebeu 1000µL da suspensão de sementes, sendo utilizados quatro frascos por tratamento. Na sequência, os frascos foram tampados e as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento, com temperatura média de 25±2°C, fotoperíodo de 12h e luminosidade de 20µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> produzida por duas lâmpadas brancas fluorescentes com 40W cada.

Decorridos 45 dias da semeadura, os frascos foram abertos, sendo contabilizado o número de sementes (NS) e o número de protocormos clorofilados

(NPC). A porcentagem de germinação foi calculada pela seguinte expressão:

$$\%G = [NPC / (NS + NPC)] \times 100.$$

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e cinco repetições. Para análise estatística, utilizou-se o aplicativo computacional SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG), as variáveis foram submetidas à análise de variância e, posteriormente às médias, foram ajustadas equações de regressão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo do tempo de coleta dos pseudobulbos após a polinização (DAP) ( $P < 0,05$ ) sobre o número de keikis por pseudobulbo (NKP), número de folhas (NFK) e de raízes (NRK) por keiki, diâmetro (DPK) e do comprimento (CPK) dos pseudobulbos dos keikis e do diâmetro da maior porção do fruto (DMF), além das porcentagens de sementes viáveis (%SV) e de germinação (%G) (Tabela 1).

O comprimento do fruto (CF), as massas frescas do fruto (MFF), das sementes (MFS) e do pericarpo (MFP) e a proporção de massa fresca das sementes (%MFS) e do pericarpo (%MFP) não foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) pelo DAP, apresentando os seguintes valores médios: CF = 60,7mm; MFF = 8,06g; MFS = 8,0g; MFP = 0,6g; %MFS = 93,4% e %MFP = 6,6% (Tabela 1).

Embora a proporção entre massa fresca de sementes e do pericarpo, assim como o comprimento

Tabela 1 - Resumo das análises de variância do número de keikis por pseudobulbo (NKP), do número de folhas (NFK) e de raízes (NRK) por keiki, do diâmetro (DPK) e do comprimento (CPK) do pseudobulbo dos keikis, do diâmetro da maior porção (DMF) e do comprimento (CF) do fruto, da massa fresca do fruto (MFF), das sementes (MFS) e do pericarpo (MFP), porcentagens de massa fresca do pericarpo (%MFP) e das sementes (%MFS), porcentagem de sementes viáveis (%SV) e porcentagem de germinação (%G) de *Dendrobium nobile* Lindl. Dourados – MS, UFGD, 2013.

F.V.	G.L.	-----Quadrados médios-----						
		NKP	NFK	NRK	DPK	CPK	DMF	CF
DAP	7	0,75**	0,33**	1,90**	1,83**	30,53**	0,11*	0,09 <sup>ns</sup>
Erro	32	0,07	0,06	0,17	0,12	2,14	0,04	0,06
CV(%)		17,5	21,4	26,1	18,4	39,7	4,7	3,1
M. geral		1,5	0,6	2,1	3,1mm	19,6mm	19,3mm	60,7mm
F.V.	G.L.	MFF	MFS	MFP	%MFP	%MFS	%SV	%G
DAP	7	0,13 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,44**	3,74**
Erro	32	0,09	0,09	0,01	0,24	0,03	0,04	0,52
CV(%)		9,8	10,1	8,0	18,3	1,9	2,21	15,9
M. geral		8,6g	8,0g	0,6g	6,6%	93,4%	84,1%	20,7%

\* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não significativo.

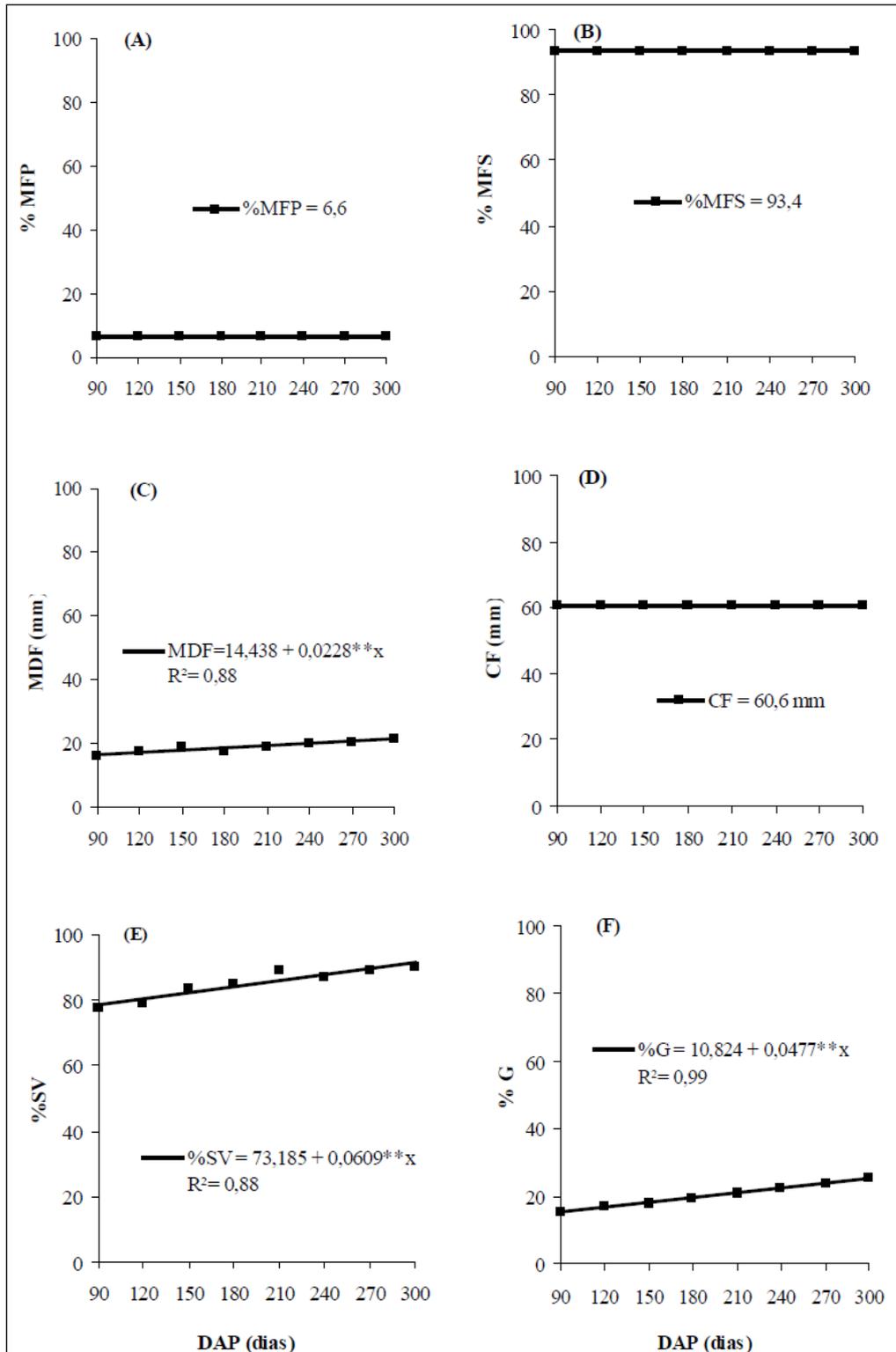


Figura 1 - Frutos de *Dendrobium nobile* Lindl. (A) porcentagem de massa fresca do pericarpo (%MFP); (B) porcentagem de massa fresca das sementes (%MFS); (C) maior diâmetro do fruto (MDF); (D) comprimento do fruto (CF); (E) porcentagem de sementes viáveis (%SV); (F) porcentagem de germinação (%G), observados em função do tempo de coleta dos pseudobulbos após a polinização (DAP= dias após a polinização). Dourados - MS, UFGD, 2013.

dos frutos de *Dendrobium nobile*, não tenham sido influenciados pelo tempo de coleta dos pseudobulbos (Figura 1A, B, D), à medida que os pseudobulbos foram colhidos mais tarde, houve aumento no diâmetro dos frutos, assim como na porcentagem de sementes viáveis e de germinação (Figura 1C, E, F). Isso provavelmente ocorreu em função dos frutos coletados precocemente só terem disponíveis os fotossintatos contidos no pseudobulbo, enquanto que aqueles coletados aos 300 dias após a polinização DAP, além de não passarem pelo estresse físico, ainda dispuseram de fotossintatos da planta toda.

Frutos colhidos aos 90 DAP apresentaram diâmetro de 16,5mm, enquanto que aqueles colhidos aos 300 DAP apresentaram diâmetro de 21,3mm. Vale salientar que, mesmo os pseudobulbos colhidos aos 90 DAP apresentaram frutos com cerca de 79% de sementes viáveis que, ao serem germinadas *in vitro*, apresentaram 15% de germinação aos 30 dias de cultivo, correspondendo a 66 plantas por frasco de cultivo.

ROSA et al. (2013), estudando a viabilidade de sementes de *Brassavola tuberculata*, observaram baixa correlação do teste de tetrazólio com o de germinação, inferindo que o método amostral desse teste pode ser utilizado apenas para prever a viabilidade das sementes e não a provável porcentagem de germinação, uma vez que o teste de tetrazólio reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração, tornando possível distinguir as partes vivas daquelas mortas que não colorem (OLIVEIRA et al., 2005).

Pseudobulbos coletados aos 300 DAP apresentaram 91% de sementes viáveis, com porcentagem de germinação de 25%, correspondendo a 110 plântulas por frasco. Embora o número de sementes viáveis seja apenas 12% maior em pseudobulbos coletados aos 300 DAP, a porcentagem de germinação dessas sementes foi o dobro daquelas coletadas aos 90 DAP, evidenciando novamente a baixa correlação entre o teste tetrazólio amostral e a germinação *in vitro*.

Esses resultados podem estar relacionados com o teor de ácido abscísico (ABA) encontrado nas plantas estudadas. Sabe-se que o ABA regula a maturação e a dormência de sementes e seu transporte é mais abundante na seiva floemática e atinge níveis máximos nas sementes durante a embriogênese (VICENTE-CARBAJOSA & CARBONERO, 2005; CUTLER et al., 2010). Em frutos colhidos aos 90 DAP, os teores de ABA provavelmente não foram suficientes para finalizar a maturação das sementes potencialmente viáveis.

Os resultados observados permitem inferir a existência de uma relação entre o diâmetro do fruto, a porcentagem de sementes viáveis e a porcentagem de germinação de *D. nobile*, que

é crescente à medida que aumentam os dias de permanência dos frutos na planta-mãe.

Em relação à figura 2, à medida que o tempo de coleta dos pseudobulbos aumentou, houve uma redução no número de keikis. Além disso, os keikis produzidos apresentaram menor número de folhas e de raízes e menor diâmetro e comprimento de pseudobulbos (Figura 2A, B, C, D, E). Esses resultados permitem inferir que, pseudobulbos coletados aos 90 DAP responderam ao estresse físico emitindo keikis (MENGARDA et al., 2013) e os frutos produzidos nessa condição foram de menor tamanho e com menor porcentagem de sementes viáveis, uma vez que houve partição das reservas nutricionais dos pseudobulbos.

A emissão de keikis é uma resposta fisiológica da planta que, em condições de estresse, emite novas estruturas vegetativas como forma de perpetuação da espécie, sendo menos acentuada em pseudobulbos coletados posteriormente, e nulo nos coletados aos 300 DAP, uma vez que os últimos já não passaram por situação estressora e investiram suas reservas na formação de sementes.

Porcentagem de germinação igual ou superior a 50% daquela observada em frutos fisiologicamente maduros foi considerada satisfatória por SOUSA (2013), para *Brassavola tuberculata* Hook. Entretanto, em cultivos comerciais de *D. nobile*, independente do tipo de polinização utilizada, considera-se satisfatória a porcentagem de germinação em torno de 75% (SORGATO et al., 2015), daquela observada em frutos fisiologicamente maduros (que nesse estudo, apresentaram porcentagem de germinação calculada de 25% (Figura 1F)). Em vista disso, a coleta de pseudobulbos de *D. nobile* contendo um fruto, a partir de 166 dias da polinização, é viável para a sua reprodução sexuada *in vitro*. De maneira análoga, pode-se inferir que outras espécies que apresentem pseudobulbos com boas reservas nutricionais também viabilizem esse procedimento.

## CONCLUSÃO

Existe uma relação entre o diâmetro do fruto, a porcentagem de sementes viáveis e a porcentagem de germinação de *D. nobile*, que é crescente à medida que aumentam os dias de permanência dos frutos na planta-mãe. O número de keikis é maior em pseudobulbos providos de frutos coletados em menores períodos após a polinização. Para que a porcentagem de germinação *in vitro* de *D. nobile* seja superior a 75%, os pseudobulbos providos de um fruto devem ser colhidos a partir dos 166 dias após a polinização.

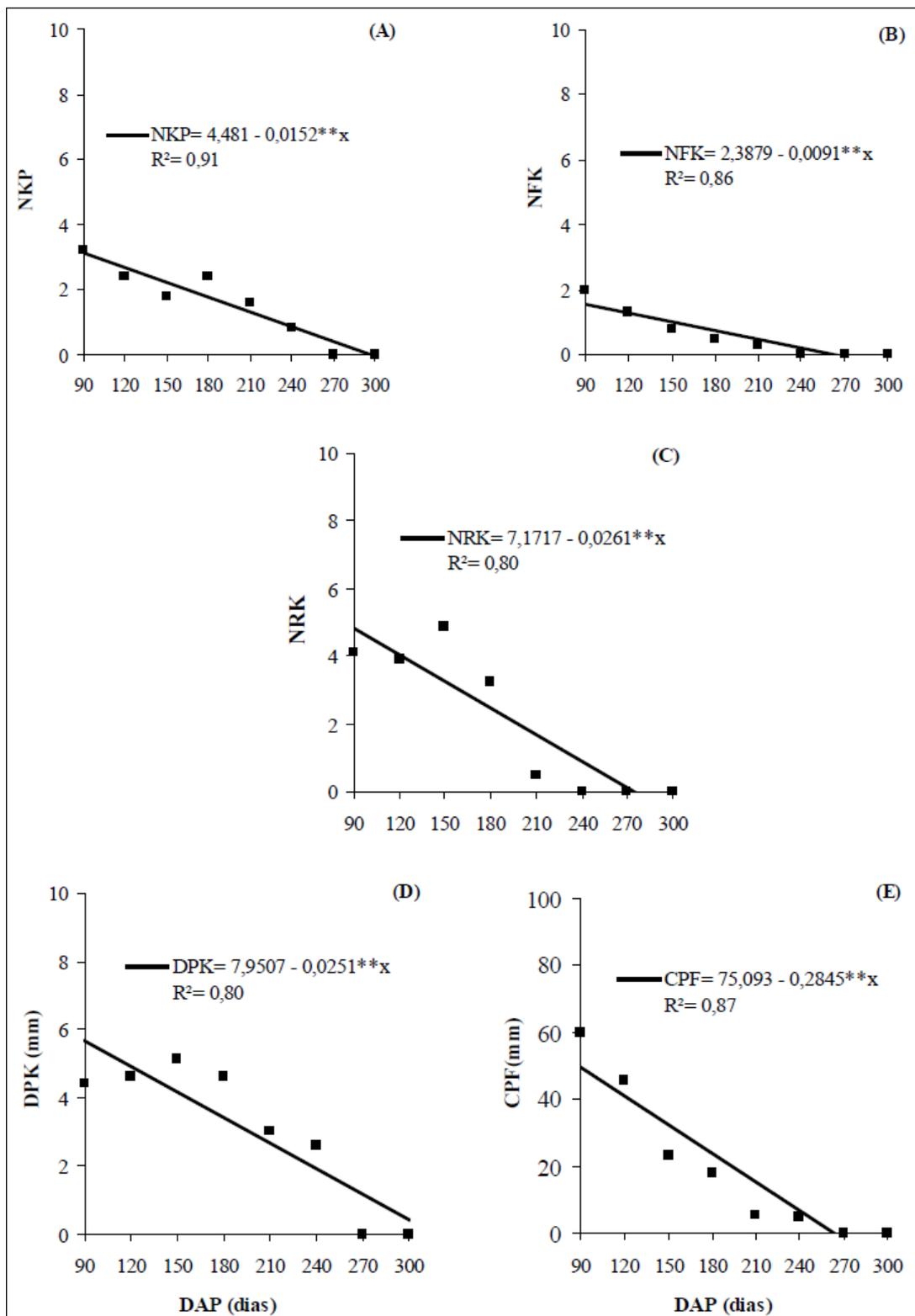


Figura 2 - Keikis de *Dendrobium nobile* Lindl. (A) número de keikis por pseudobulbo (NKP); (B) número de folhas por keiki (NFK); (C) número de raízes por keiki (NRK); (D) diâmetro do pseudobulbo do keiki (DPK); (E) comprimento do pseudobulbo do keiki (CPF), observados em função do tempo de coleta dos pseudobulbos após a polinização (DAP = dias após a polinização). Dourados - MS, UFGD, 2013.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelas bolsas de estudos concedidas e assistência.

## REFERÊNCIAS

- ARAUJO, A.G. Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CULTIVO *in vitro* DE PLANTAS, 3., 2012. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2012. 156p.
- CAMPOS, D.M. **Orquídea**: manual prático de reprodução. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.
- CUTLER, S.R. et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Reviews Plant Biology**, v.61, p.651-679, 2010. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>>. Acesso em 04 maio 2015. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112122.
- FERREIRA, W.M.; SUZUKI, R.M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M.I.B. et al. (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Imagem Gráfica, 2008, p. 68-68. Acesso em: 22 mar. 2014.
- LAM, Y. et al. Evaluation of Chemical Constituents and Important Mechanism of Pharmacological Biology in Dendrobium Plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/841752/>>. Acesso em 04 maio 2015. doi:10.1155/2015/841752.
- LORENZI, H; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Instituto Plantarum, 2008. 1088p.
- MATTIUZ, C.F.M. et al. Aspectos fisiológicos de orquídeas cortadas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.12, n.1 p.21-30, 2006. Disponível em: <<http://rbho.emnuvens.com.br/rbho/article/view/79/72>>. Acesso em: 18 mar. 2014.
- MENGARDA, L.H.G. et al. Efeito do AIB e do ácido bórico na formação e enraizamento de brotos laterais em estacas de orquídeas. **Revista Nucleus**, v.10, n.2, p.139-149, 2013. Disponível em: <<http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/923>>. Acesso em: 15 jul. 2014. doi:10.3738/1982.2278.923.
- MINAMIGUCHI, J.; MACHADO NETO, N.B. Embriogênese somática direta em folhas de *Phalaenopsis: Orquidaceae*. **Colloquium Agrariae**, v.3, n.1, p.7-13, 2007. Disponível em: <<http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/view/111/524>>. Acesso em: 20 mar. 2014. doi:10.5747/ca.2007.v03.n1.a22.
- NASCIMENTO, M.A. de A. **Morfogênese in vitro do híbrido de orquídea *Brassavola flageralis* x *Cattleya harrisioriana***. 2007. 42f. Dissertação (Mestrado em fitotecnia) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
- OLIVEIRA, L.M. et al. Teste de tetrazólio para avaliação de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert *leguminosae caesalpinioideae*. **Cerne**, v.11, n.2, p.159-166, 2005. Disponível em: <[http://www.dcf.ufla.br/cerne/artigos/11-02-20097975v11\\_n2\\_artigo%2006.pdf](http://www.dcf.ufla.br/cerne/artigos/11-02-20097975v11_n2_artigo%2006.pdf)>. Acesso em: 15 jul. 2014.
- PARAB, G.V.; KRISHNAN, S. Rapid *in vitro* mass multiplication of orchids *Aerides maculosa* Lindl. and *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. from immature seeds. **Indian Journal of Biotechnology**, v.11, p.288-294, 2012. Disponível em: <[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/14568/1/IJBT%2011\(3\)%20288-294.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/14568/1/IJBT%2011(3)%20288-294.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2014.
- RODRIGUES, D.T. et al. Chemical sterilization in *in vitro* propagation of *Arundina bambusifolia* Lindl. and *Epidendrum ibaguense* Kunth. **Revista Ceres**, v.60, n.4, p.447-451, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rceres/v60n4/01.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2014. doi:10.1590/S0034-737X2013000400001.
- ROSA, Y.B.C.J. et al. Estudo da viabilidade de sementes de *Brassavola tuberculata* Hook. em função do período de armazenamento, tempo de cultivo e tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.19, n.2, p.155-160, 2013. Disponível em: <<http://rbho.emnuvens.com.br/rbho/article/viewFile/655/465>>. Acesso em: 18 mar. 2014.
- SCHNEIDERS, D. et al. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., *Orchidaceae*). **Revista Ceres**, v.59, n.2, p.185-191, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rceres/v59n2/06.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2014.
- SOARES, J.S. et al. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (*Orchidaceae*) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, v.24, n.3, p.226-233, 2012. Disponível em: <<http://www.ufrb.edu.br/magistra/2000-actual/volume-24-ano-2012/numero-3-jul-a-set/686cultivo-in-vitro-de-brassavola-tuberculata-orchidaceae-em-meio-de-cultura-alternativosuplementado-com-diferentes-concentracoes-de-acucar-e-carvao-ativado>>. Acesso em: 25 jun. 2014.
- SORGATO, J.C. et al. Light in intermediate acclimatization of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phalaenopsis* Deang Sreee. **Ciência Rural**, v.45, n.2, p.231-237, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v45n2/0103-8478-cr-00-00-cr20131619.pdf>>. Acesso em: 4 de maio 2015. doi:10.1590/0103-8478CR20131619.
- SOUSA, G.G. **Germinação e crescimento in vitro de *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae)**. 2013. 91f. Tese (Doutorado em produção vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados.
- SUZUKI, R.M. et al. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (*Orchidaceae*), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v.36, n.4, p.657-666, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hoehnea/v36n4/v36n4a06.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2014. doi:10.1590/S2236-89062009000400006.
- SUZUKI, R.M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. **Plant**, v.48, p.500-511, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11627-012-9460-1#page-1>>. Acesso em: 21 mar. 2014. doi:10.1007/s11627-012-9460-1.
- VICENTE-CARBAJOSA, J.; CARNONERO, P. Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. **International Journal of Developmental Biology**, v.49, p.645-651, 2005. Disponível em: <<http://www.ijdb.ehu.es/web/paper/052046jc/seed-maturation-developing-an-intrusive-phase-to-accomplish-a-quiescent-state>>. Acesso em: 10 dez. 2014. doi:10.1387/ijdb.052046jc.