

Hilaire Moura Rodrigues Martins

MORFO-HISTOGÊNESE PÓS-SEMINAL *IN VITRO* DE *Epidendrum fulgens* Brongn. (ORCHIDACEAE)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção de Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Dra. Marisa Santos

Coorientador: Dr. Gilmar Roberto Zaffari

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

MARTINS, Hilaire Moura Rodrigues
Morfo-histogênese pós-seminal in vitro de *Epidendrum fulgens* BRONGN. (ORCHIDACEAE) / Hilaire Moura Rodrigues MARTINS ; orientadora, Marisa SANTOS ; coorientadora, Gilmar Roberto ZAFFARI. - Florianópolis, SC, 2015.
78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. cultivo in vitro. 3. germinabilidade. 4. morfogênese e histogênese. 5. *E. fulgens*. I. SANTOS, Marisa . II. ZAFFARI, Gilmar Roberto . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

**“Morfo-histogênese pós-seminal *in vitro* de
Epidendrum fulgens Brongn. (Orchidaceae)”**

por

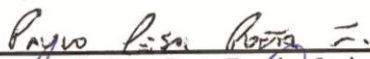
**Hilaire Moura Rodrigues
Martins**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 06/PPGFAP/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

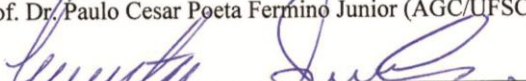
Banca Examinadora:



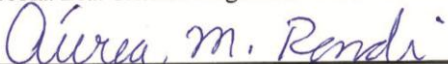
Prof.a. Dra. Marisa Santos (Presidente/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior (AGC/UFSC)



Prof.a. Dra. Cristina Magalhães Ribas dos Santos (CCA/UFSC)



Prof.a. Dra. Aurea Maria Randi (CCB/UFSC)



Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,
Algas e Plantas

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2015.

Dedico a minha filha Luiza Helena Rodrigues Martins todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais Luiz Rodrigues Ribeiro e Beticleia Moura Gonçalves Rodrigues pelo carinho, amor e virtudes que me transmitiram até hoje. E a meu marido Edson Marcos Martins, pelo companheirismo de todos os momentos.

São muitas as pessoas que passam em nossa vida e de certa forma deixam suas marcas, agradeço a todos que positivamente colaboraram de alguma forma na construção do conhecimento, tanto acadêmico quanto na formação pessoal.

Agradeço a professora Dr.^a. Marisa Santos pela orientação, paciência e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Gilmar Roberto Zaffari pelo apoio, assistência e inspiração ao decorrer da minha vida acadêmica e por fazer me fascinar pelo Cultivo *in vitro* de plantas, desde a época que cursei o curso Técnico em Agropecuária, no atual Instituto Federal Catarinense, e também por me inspirar na escolha do curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia, que cursei na Universidade do Vale do Itajaí e agora como coorientador, muito obrigado.

Aos meus orientadores saibam que me sinto muito honrada por ter tido a oportunidade de tê-los ao meu lado.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, pela formação acadêmica, pela estrutura física e humana para o desenvolvimento deste trabalho, e pelo acesso aos laboratórios e equipamentos utilizados durante as pesquisas. Aos professores do Programa pelas disciplinas ministradas e saídas a campo, que muito contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG), em especial à Márcia R. Wolfart, por realizar parcerias indispensáveis.

Também agradeço a equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina, pela disponibilidade na utilização do laboratório, que realizaram e me orientaram nas etapas técnicas do LCME, para obtenção das eletromicrografias em microscopia eletrônica.

Com muito carinho agradeço a equipe do Herbário “Barbosa Rodrigues”, em especial a Zilda Helena Deschamps Bernardes e Jurandir de Souza Bernardes, “Dona Zilda” e “Seu Jurandir, pelo apoio e incentivo, que me encorajou nesta caminhada”.

Agradeço a equipe da Escola Municipal Prof.^a Maria Hostim da Costa, pelo apoio e incentivo nesta dupla jornada. Em especial, as amigas Zilda Almeida de Lira e Cintia Cardoso, pela descontração em momentos de tensão e fortalecimento.

Á vida agradeço a força de vontade, a fé e a opinião! Levo comigo o pensamento de que se quisermos realizar algo, temos que ter opinião, para realizarmos escolhas, planejarmos e executarmos aquilo que queremos (ensinamentos de minha mãe).

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência”. (O vendedor de Sonhos)

Augusto Cury

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
atm	atmosfera
Ca ⁺⁺	Cálcio
Cl ⁻	Cloro
CO ₂	Dióxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E.</i>	<i>Epidendrum</i>
ESPs	Estrutura semelhante à protocormo
g	grama
HCl	Ácido clorídrico
K	Potássio
KC	Knudson 1946
LAVEG	Laboratório de Anatomia Vegetal
LCCV	Laboratório de Cultivo Celular Vegetal
LCME-UFSC	Laboratório Central de Microscopia da Universidade Federal de Santa Catarina
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
Mg ⁺⁺	Magnésio
min	minuto

ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MO	Microscópio Óptico
MS	Meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962)
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ ⁺	Amônia
Nº	número
NO ₃ ⁻	Nitrato
°C	graus Celsius
°GL	graus Gay Lussac
pH	Potencial de Hidrogênio
PLB	<i>Protocorm-like bodies</i>
PO ₄ ⁻	Fosfato
SC	Santa Catarina
SO ₄ ⁻	Sulfato
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
µL	microlitro
µmol	micromol

μm	micrômetro
%	por cento
\pm	Mais ou menos
2iP	2-isopenteniladenina

RESUMO

Epidendrum fulgens, conhecida como orquídea-da-praia, é uma orquídea ornamental não-explorada, nativa de ecossistemas costeiros do Brasil, sujeita às ações antropogênicas que promovem desgaste dos recursos naturais. A espécie possui grande plasticidade por habitar ambientes epifíticos, rupícolas e terrestres. O objetivo do estudo foi analisar aspectos morfológicos e histológicos do desenvolvimento pós-seminal até plântula, a partir da germinação assimbiótica, em meio Knudson C (KC) e Murashige e Skoog (MS). Sementes foram submetidas à desinfestação em solução de hipoclorito de sódio. Após inoculação em KC e MS, as amostras foram mantidas em sala de crescimento por 14 semanas, com temperatura, fotoperíodo e intensidade de luz controlada. Para histogênese em microscopia óptica (MO), as amostras foram fixadas em Gluteraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, desidratadas em etanol, infiltradas em hidroxietilmetacrilato e coradas com azul de toluidina. Para análise da morfogênese foram usados microscópio estereoscópico e eletrônico de varredura (MEV). Para MEV, amostras fixadas foram submetidas a ponto crítico de CO₂. Os resultados de germinabilidade de *E. fulgens* revelaram que o percentual de germinação no meio KC (65,6%) foi maior do que em meio MS (40,3%). Análises morfo-histológicas revelaram que as sementes de *E. fulgens* são constituídas por testa e proembrião. O proembrião, formado por túnica e corpo, mostrou-se ligado ao suspensor na região basal. Após a inoculação *in vitro*, observou-se o intumescimento do proembrião na 1ª semana em meio KC e em 2ª semana em meio MS. A germinação efetivou-se com o rompimento da testa liberando assim o proembrião, onde a estrutura passou a constituir o protocormo, tal estágio ocorreu na 2ª semana após inoculação em meio KC e na 3ª semana em meio MS. O protocormo apresentou bipolaridade, com domo que deu origem o ápice caulinar e em oposto, o centro de quiescência e hipófise que degeneraram, não resultando em formação de radícula, porém na região basal do protocormo desenvolveram-se rizóides. Na 4ª semana, após a inoculação em meio MS, observou-se intensa atividade mitótica no domo, com início de diferenciação dos primórdios foliares, levando o protocormo a apresentar a forma cônica. Nas semanas seguintes, em ambos os tratamentos, ocorreu gradual diferenciação a partir do domo, com desenvolvimento dos primórdios foliares, seguindo-se com alongamento da região intermediária do protocormo. Em meio MS, na 10ª semana, foram evidenciadas bainha foliar envolvendo folhas e no centro do protocormo surgiu o tecido provascular. Em meio KC, na 13ª semana surgiram raízes

adventícias, passando a constituir plântula; no meio MS, isto foi registrado na 14ª semana. Verificou-se, nesta pesquisa, que o desenvolvimento inicial de *E. fulgens* segue um padrão similar, aos modelos postulados para outras espécies de Orchidaceae. Entretanto, os resultados definem com maior detalhamento a morfogênese e histogênese desde a fase de semente, passando por protocormo e chegando a plântula, o que sucedeu com uma semana de retardo amostras inoculada no meio MS, em relação ao meio KC.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, germinabilidade, morfogênese, histogênese, *E. fulgens*.

ABSTRACT

Epidendrum fulgens, also known as beach orchid, is an unknown ornamental unexplored orchid, native of Brazilian coastal ecosystems, subject to anthropogenic actions which promote depletion of natural resources. The species has great plasticity for inhabiting epiphytic, rupicolous and terrestrial environments. The subject of the study was analyzing morphological and histological aspects of the post-seedling development, starting assymbiotical germination, in Knudson C (KC) and, Murashige and Skoog (MS) substract. The seeds were submitted to disinfection in sodium hypochlorite solution. After inoculation in KC and MS, the samples were maintained under room growth for 14 weeks, with controlled temperature, photoperiod and light intensity. For histogenesis in light microscopy (LM), the samples were fixed in glutaraldehyde 2,5%, in sodium phosphate tampon 0,1M, 7,2 pH, dehydrated in ethanol, infiltrated in hydroxyethylmethacrylate and died with toluidine blue. For the morphogenesis analysis were used an Scanning Electron Microscopy (SEM). Thus for the SEM the fixed samples were submitted to CO₂ breakdown point. The *E. Fulgens* germination results revealed that the percentual on germination in the KC substract (65,6%) was higher than in the MS substract (40,3%). Morpho-histological analysis revealed *E. fulgens* seeds to be set up by testa and proembryo. The proembryo formed by tunica-carpus, has shown connected to a riser at the basal region. After *in vitro* inoculation, there was a swelling of the proembryo in the first week in KC substract and in the second week in MS substract. The germination was carried out with the breaking of the testa thus releasing the proembryo, where the structure became the protocorm, such stage occurred in the second week after inoculation in KC substract and in the third week in MS substract. The protocorm presented bipolarity, with the dome that originated the stem apex and in opposite, the quiescent center and hypophysis which degenerated, not resulting in radicle formation, however they have developed rhizoids in the protocorm basal region. In the fourth week, after inoculation in MS substract, there has been intense mitotic activity in the dome, with beginning of differentiation of prime leafing leading the protocorm to present a conical shape. In the following weeks, in

both treatments, there was gradual differentiation from the dome, with the development of primary leafing followed with the extension of the protocorm mid-region. In MS substrate, in the tenth week, were observed leaf hemispheres surrounding leaves and in the protocorm center appeared the provascular tissue. In the KC substrate, in the thirteenth week adventitious roots appeared, becoming seedling, in the MS substrate, it was recorded in the fourteenth week. It was found in the research that the initial development of *E. fulgens* follows a similar pattern, to the postulated models for other Orchidaceae species. However, the results define in a higher detail the morphogenesis and histogenesis since seed stage going through protocorm and reaching seedling, which happened with a week delay for samples inoculated in MS substrate, compared to KC substrate.

Keywords: culture *in vitro*, germination, morphogenesis, histogenesis, *E. fulgens*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfoanatomia de sementes de *Epidendrum fulgens* Brong., observada em microscopias óptica (MO) e eletrônica de varredura (MEV). **A.** Aspecto geral da semente, em MEV. **B.** Vista frontal das células da testa, em MEV. **C.** Aspecto geral da semente, em MO, com testa translúcida; proembrião com forma ovalada. **D.** Secção longitudinal da semente, em MO, com testa envolvendo o proembrião formado por túnica e corpo, ligado a região basal pelo suspensor. **E.** Proembrião, em MEV. **Legenda:** co= corpo; pe=proembrião; su=suspensor; te=testa; tu=túnica. **Barras:** A=500mm; B=10mm; C=50mm; D,E=100mm.....40

Figura 2. Morfogênese do desenvolvimento pós-seminal de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Protocormos, da 1^a a 4^a semana após inoculação, observados em microscopias estereoscópica (ME) e eletrônica de varredura (MEV). **A.** Semente com aspecto intumescido, iniciando desestruturação das células da testa devido à pressão interna (KC, 1^a sem.; **A** em MEV e **B** em ME). **C.** Semente ainda sem evidências de intumescimento (MS, 1^a sem.). **D.** Rupturas na testa da semente decorrente do intumescimento do proembrião (KC, 2^a sem.; em MEV), iniciando a fase de protocormo. **E.** Proembrião com formado um pouco mais alongado (KC, 2^a sem.; em ME). **F.** Proembrião começa a mostrar entumescimento, mas sem romper testa (MS, 1^a sem.; em ME). **G.** Testa rompida expondo o protocormo (KC, 3^a sem.; em MEV). **H.** Protocormo, propositalmente sem testa, expondo o início do desenvolvimento do rizóides (KC, 3^a sem.; em MEV). **I.** Protocormo com ápice pontiagudo, início do desenvolvimento primórdio foliar (MS, 3^a sem.; em MEV). **J-K.** Protocormos com primórdios foliares no ápice (KC, 4^a sem.; **J** em ME e **K** em MEV). **L.** Protocormo com primórdio foliar pontiagudo (MS, 4^a sem.; em ME). **Legenda:** ri=rizóide; pf=primórdio foliar; sem.=semana. **Barras:** A,D,G,J-L=500mm; B,C,E,F=50mm; H,I=100mm.....49

Figura 3. Morfogênese do desenvolvimento pós-seminal de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo distintos, Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Protocormos, da 5^a a 14^a semana após inoculação, observados em microscopias estereoscópica (ME) e eletrônica de varredura (MEV). **A-B.** Alongamento da parte aérea com

primórdio foliar e região basal com rizóides (KC, 5^a sem.; **A** em MEV e **B** em ME). **C-E**. Alongamento do ápice do protocormo e o surgimento da primeira folha, base com rizóides (MS, 5^a sem.; **A**, **E** em MEV e **D** em ME). **F-G**. Em meio KC, na 8^a semana, registradas em MEV e ME, respectivamente; apresenta protocormo mais desenvolvido com primórdio foliar e folha (KC, 8^a sem.; **F** em MEV e **G** em ME). **H-I**. Início da fase de plântula, estrutura constituída por folhas e raízes adventícias, revelando uma bainha envolvendo a base da radícula, a coleorriza e outra envolvendo a plúmula, o coleóptilo (KC, 13^a sem.; **H** em MEV e **I** em ME). **J-K**. Plântula devido ao surgimento de folhas e raiz adventícia (KC, 14^a sem.; **J** em MEV e **K** em ME). **Legenda:** pf=primórdio foliar; ri=rizóide; fo=primeira folha; d=domo; ra=raiz adventícia; sem.=semana; cr=coleorriza; ce=coleóptilo. **Barras:** A-D, F-H, J=500µm; E=100µm; I,K=1mm.....51

Figura 4. Histogênese de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Secções longitudinais de semente (**A**) e protocormos (**B-G**), da 1^a a 4^a semana após inoculação, observados em microscopias óptica (MO). **A**. Semente, envolta por testa, contendo o proembrião constituído por túnica e corpo, conectado a região basal o suspensor. Indicando a região onde originará o domo (seta branca) e ápice radicular (seta preta). **B**. Após 1^a semana de inoculação, em meio MS, proembrião apresenta bipolaridade distinta; junto ao suspensor, a hipófise e centro de quiescência. **C**. Protocormo cordiforme apresentando o domo com evidências de intensa divisão celular, em oposto o centro de quiescência, hipófise e suspensor (KC em **C** e MS em **D**, 2^a sem.). **E**. Secção longitudinal do protocormo, em meio KC na 3^o semana após inoculação, rompe-se a testa, o protocormo ainda cordiforme e no domo inicia-se a formação de saliência pontiaguda no épice caulinar (KC em **E** e MS em **F**, 3^a sem.). **G**. Protocormo com formato cônico resultantes do desenvolvimento do ápice caulinar, com a projeção do primórdio foliar, e na base opositora presença de rizóides (MS, 4^a sem.). **Legenda:** te=testa; tu=túnica; c=corpo; su=suspensor; cq=centro de quiescência; hi=hipófise; ri=rizóides; sem.=semana; mf=meristema fundamental; pf=primórdio foliar. **Barras:** A=50µm; B-G=100µm.....59

Figura 5. Histogênese de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Secções longitudinais de protocormos, da 5^a a 10^a semana após inoculação, observados em microscopias óptica (MO). **A-B**. Primórdios foliares

evidentes e intensa divisão celular no domo; rizóides na base (KC em **A** e MS em **B**, 5^a sem.). **C**. Protocormo mais alongado com células parenquimáticas preenchendo a região central (KC, 8^a sem.). **D**. Surgimento da primeirafolha envolvida por uma bainha; tecido provascular conspícuo (MS, 10^a sem.). **Legenda:**pa=parênquima; ri=rizóides; sem.=semana; tpv=tecido provascular; pf=primórdio foliar, fo=folha. **Barras:** 100 µm.....61

Figura 6. Histogênese de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Secções longitudinais (**A-C**) e transversal (**D**) de protocormos, da 13^a a 14^a semana após inoculação, observados em microscopias óptica (MO). **A-B**. Raiz adventícia iniciando formação, tecido provascular conspícuo (KC, 13^a sem.). **C-D**. Primórdio foliar formado e tecido provascular evidente (MS, 14^a sem.). **Legenda:** pf=primórdio foliar; tpv=tecido provascular; sem.=semana; ra=raiz adventícia; pa=parênquima; ri=rizóides. **Barras:** =100µm.....63

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	11
RESUMO	17
ABSTRACT	27
LISTA DE FIGURAS	29
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
1.SEMENTES.....	35
2. PROCEDIMENTOS PARA O CULTIVO <i>IN VITRO</i>	35
3.GERMINABILIDADE DE SEMENTES	37
4.PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE MORFO-HISTOLÓGICA ...	37
5.ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
1. MORFOANATOMIA DE SEMENTES	39
2. GERMINABILIDADE.....	41
3. MORFOGÊNESE.....	44
4. HISTOGÊNESE.....	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, ocorreu o mais rápido crescimento populacional e desgaste de recursos naturais, consequentemente, isto foi mais acentuado onde a diversidade biológica é mais alta (Kennedy 2006). Devido ao grande impacto causado pelas ações antropogênicas, na Mata Atlântica, apenas 7 a 8% da área original desse bioma agora permanece intacto (Ribeiro *et al.* 2009). Neste bioma, a ocupação urbana é de aproximadamente 70% (IBGE 2010). A flora epífita encontrada neste ambiente possui papel fundamental para a manutenção do equilíbrio ecológico. Segundo Hietz (1998), a importância das epífitas, para a biodiversidade das florestas tropicais, é ainda mais multiplicadora por seu substrato fornecer comida aos animais e nutrientes às plantas. De forma integrada e dinâmica, as comunidades nas florestas tropicais são influenciadas pela flora epífita, que, assim como as herbáceas, rapidamente captam e reintegram energia e matéria ao ecossistema (Kersten 2010). Estudos demonstram que as epífitas tem o potencial de serem utilizadas como bioindicadores das mudanças climáticas, poluição e danos aos ecossistemas (Lugo & Scatena 1992).

As epífitas vasculares que, por definição, crescem em árvores ou arbustos estão restritas às florestas tropicais e estão desaparecendo automaticamente com o aumento da perda das florestas (Hietz 1998). A perturbação das florestas originais, acrescenta o autor, ou qualquer operação que leve a uma completa remoção da cobertura vegetal, afetam algumas ou todas as espécies em causa. Como elas são bastante sensíveis às condições climáticas e são de crescimento lento, parecem ser, em muitos casos, ainda mais vulneráveis do que outras plantas (Lugo & Scatena 1992). Consequentemente, há uma necessidade urgente de expandir as pesquisas para a conservação de um maior número de espécies nativas (Pilatti *et al.* 2011).

Orchidaceae é uma das maiores famílias do Reino Vegetal e possui uma enorme diversidade de espécies (Barros 1990, Dressler 2005). Barros (1990) menciona que são cerca de 20.000 espécies naturais, distribuídas em todas as regiões do globo, predominando nos trópicos e sub-trópicos. Dressler (2005) refere que a família possui cerca de 24.500 espécies e cerca de 800 gêneros, sendo a maioria epífita. Entre as epífitas vasculares, conforme Benzing (1990), Orchidaceae corresponde à família que teve o maior sucesso em colonizar as copas das árvores, pois constituem cerca de 10% das plantas vasculares que são epífitas ou ancoram-se acidentalmente

em troncos. Barros *et al.* (2010) registram que o Brasil detém uma das maiores diversidades de orquídeas do continente americano e do mundo, com cerca de 2.419 espécies, das quais 1.620 são endêmicas deste país. Waechter (1996) ressalta que a diversidade e a riqueza de espécies de Orchidaceae são fortemente influenciadas pela geografia (relevo) e pelas condições climáticas, sendo clara, no Brasil, uma redução no número de espécies em regiões ao Sul do paralelo 30°. De acordo com o autor, o relevo e a umidade são fatores que possibilitam o sucesso de muitas orquídeas epífitas. A dependência da umidade atmosférica faz com que a flora epifítica tenha seus centros de diversidade localizados nas regiões ou florestas úmidas do globo (Kersten 2010). Também há outros fatores ambientais que determinam a distribuição espacial da flora epífita que são os gradientes microclimáticos e as diferenças de substrato (Kersten 2010).

Dentre as subfamílias de Orchidaceae, Epidendroideae é a maior das cinco, com um número de gêneros e espécies superior ao de todas as outras subfamílias juntas, e tem como principal característica a antera geralmente incumbente (Dressler 1993). O gênero *Epidendrum* L., com aproximadamente 1.000 espécies, ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina (Rasmussen 1985). Pabst & Dungs (1975) descreveram 107 ocorrências do gênero no Brasil. Dados de 2009, após revisões da família e subfamílias, citaram em torno de 100 espécies para este gênero, distribuídos por todo o país, em regiões com os mais diversos tipos climáticos e vegetacionais (Stancik *et al.* 2009).

A espécie objeto de estudo, *Epidendrum fulgens* Brongn., também conhecida como orquídea-da-praia ou orquídea-de-restinga, é comum em dunas e campos arenosos do litoral norte do Rio Grande do Sul, sendo encontrada também em butiazais, às vezes como epífita, e na borda das florestas de restinga arenosa (Rocha 2004, *apud* Moreira *et al.* 2008). Pabst & Dungs (1975) descreveram a espécie como possuindo flores de um a dois centímetros de diâmetro, pétalas e sépalas lanceoladas, amarelas ou alaranjadas, variando de amarelo-claro até vermelho-escuro. Os autores acrescentam que o tamanho das flores também varia muito e a espécie floresce principalmente na primavera e no verão.

O Ministério do Meio Ambiente, junto com colaboradores, vem conduzindo uma série de iniciativas para a conservação, ampliação do conhecimento e promoção do uso sustentável dos recursos genéticos. Uma dessas ações refere-se à iniciativa: “Espécies nativas da flora brasileira de

Valor econômico atual ou Potencial, de uso local e Regional – Plantas para o futuro”, executado em parceria com diversas instituições governamentais e não-governamentais. *Epidendrum fulgens* encontra-se entre as plantas listadas e, como refere Müller (2011), seu uso como planta ornamental ainda é incipiente, mas apresenta grande potencial devido à sua rusticidade e florescimento de longa duração e frequência durante o ano. Afirma, ainda, o autor, que quase a totalidade das plantas produzidas destina-se a colecionadores de orquídeas e, geralmente, entre os colecionadores é uma planta de baixo valor devido à sua abundância no ambiente natural e fácil propagação; é também interessante ao mercado externo devido à sua exotividade, característica esta bastante apreciada pelos consumidores estrangeiros. Cabe ressaltar, entretanto, que provavelmente esta fácil propagação no ambiente ocorra muito mais na forma vegetativa, pois há elevada percentagem de sementes estéreis nos frutos maduros (constatação pessoal).

As sementes resultam da reprodução sexuada, que permitem a variabilidade genética nas populações (Borghetti 2000). A dispersão de sementes, refere o autor, propicia o estabelecimento de novos indivíduos em novos ambientes, na medida do sucesso da germinação da semente. Os requisitos essenciais, para uma semente viável germinar, são água e oxigênio suficientes e temperatura apropriada (Bewley & Black 1994). Quando a semente, favorecida por esses três fatores do ambiente, germina dentro de um determinado espaço de tempo, ela é considerada quiescente; no entanto, quando viável e exposta às tais condições não germina, ela é considerada uma semente dormente (Kelly *et al.* 1992, Borghetti 2000). A dormência em sementes tem sido definida como o bloqueio da germinação de uma semente intacta e viável, sob condições favoráveis à germinação (Bewley 1997). Diversos tipos de bloqueio da germinação (mecanismos de dormência) evoluíram de acordo com a diversidade de climas e habitats prevaletentes para determinada espécie (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006). Baskin & Baskin (2004) consideram que uma semente dormente é aquela que não tem a capacidade de germinar dentro de um período específico de tempo, mesmo se há combinação de fatores ambientais físicos favoráveis para sua germinação. A dormência que se instala durante a fase de desenvolvimento e/ou maturação da semente, sendo dispersa da planta-mãe já em estado dormente, é denominada dormência primária; secundária é aquela que se instala numa semente após a dispersão, quando esta se encontra em ambiente desfavorável ou estressante para a germinação (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006). Há uma variedade de fatores que

podem atuar isolada ou conjuntamente no bloqueio da germinação da semente. De acordo com os fatores hoje conhecidos, Baskin & Baskin (2001) reconhecem cinco tipos de dormência: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e dormência física e fisiológica, ou dormência combinada. A dormência morfológica e a dormência física são também denominadas, respectivamente, dormência por imaturidade do embrião e dormência tegumentar (Bewley & Black 1994). Segundo Baskin & Baskin (2004), dormência fisiológica é aquela em que a presença de substâncias inibidoras ou ausência de substâncias promotoras da germinação impedem que a germinação ocorra. Dormência morfológica é aquela em que o embrião da semente é subdesenvolvido em termos de tamanho, mas é diferenciado em cotilédones e eixo hipocótilo-radícula (Baskin & Baskin 2004). Nesta classe de dormência o embrião não é fisiologicamente dormente, simplesmente necessita de tempo para crescer e germinar (Baskin & Baskin 2004). Para Zaidan & Barbedo (2004), a importância de diferentes graus de dormência está em evitar uma germinação rápida e uniforme de todas as sementes produzidas em um determinado momento, podendo ocorrer competição entre plântulas ou a morte de todas elas imediatamente após sua emergência, em caso de mudança drástica das condições ambientais. A dormência em sementes tem sido vista como uma característica evolutiva controlada geneticamente, que proporciona um importante mecanismo de sobrevivência para certas espécies (Medeiros 2001). Para Fenner & Thompson (2005), a função primordial da dormência é prevenir a germinação quando as condições ambientais são favoráveis à germinação, mas desfavoráveis à sobrevivência e ao crescimento da plântula. Na natureza, a dormência em sementes é superada pela influência de fatores ambientais, como luz, temperatura, presença do fogo, ingestão dos frutos por animais, ação de microrganismos, ou simplesmente pela ação do tempo, de acordo com o tipo de dormência (Arteca 1996). A germinação tem início com a embebição da semente, a qual leva à ativação de processos metabólicos que culminam com o aparecimento da radícula (Arteca 1996). Pelo fato das sementes de orquídeas germinarem muito lentamente, vários reguladores de crescimento como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno, têm sido adicionados aos meios de cultura para acelerar a germinação e o desenvolvimento das plântulas (Hew & Clifford 1993). Essas substâncias, entre suas várias funções, controlam o metabolismo e as respostas das sementes ao meio ambiente, isto é, constituem os fatores intrínsecos que controlam a germinação, mediando os processos fisiológicos da germinação e transformando sinais ambientais específicos em respostas bioquímicas (Hew & Clifford 1993). Isso produz modificações no estado fisiológico da

semente, através da transcrição diferencial, repressão ou depressão gênica ou ativação do RNA mensageiro, ou ainda por alteração da permeabilidade da membrana (Hew & Clifford 1993). Modificações nas propriedades da membrana afetam a taxa de hidratação, liberação de enzimas, transporte iônico, pH e conteúdo de inibidores, situações estas que interferem na germinação das sementes (Davies 1994). Entre os reguladores de crescimento estão as giberelinas, que controlam a germinação, o crescimento por alongamento, além de outras funções (Arteca 1996). Existem vários tipos de giberelinas, entre os quais o ácido giberélico (GA_3), amplamente utilizado em sistemas biológicos (Arteca 1996). Segundo Yamaguchi & Kamiya (2002), substâncias bioativas, como o GA_3 , promovem a germinação de sementes em várias espécies de plantas. Hooley (1994) sugeriu que essa giberelina pudesse promover a germinação da semente estimulando o crescimento do embrião por induzir a produção de hidrolases para a quebra e enfraquecimento das estruturas ao redor do embrião. Esse grupo de fitoreguladores possui efeito sobre a quebra de dormência de muitas sementes e sobre a hidrólise de reservas em sementes de cereais (Hew & Clifford 1993). Em plantas não dormentes a aplicação de giberelinas pode acelerar a germinação, como também possui a capacidade de induzir o florescimento em plantas que se encontram em condições não indutivas (Wachowics & Carvalho 2002). Durante a germinação de grãos de cereais, a camada de aleurona (uma camada de células que recobre o endosperma) secreta hidrolases (geralmente α -amilases) no endosperma, fornecendo então nutrientes que alimentam a plântula em crescimento (Taiz & Zeiger). Esse processo é controlado pela giberelina que regula a transcrição dos genes da α -amilase e a secreção dessa enzima pelas células da camada de aleurona (Richards *et al.* 2001). Segundo o autor, estudos sobre a resposta da α -amilase pela camada de aleurona têm indicado que a giberelina é percebida por receptores localizados externamente na membrana plasmática. Seguindo esse evento inicial de percepção da giberelina, vários outros processos adicionais são ativados (Richards *et al.* 2001). Conforme Hew & Clifford (1993), o uso das giberelinas no desenvolvimento de plântulas de orquídeas apresentam resultados negativos, pois durante a germinação, as sementes sintetizam a quantidade necessária de giberelinas, de modo que qualquer adição altera a concentração para supraótima. Porém, mais estudos são necessários para compreender a biossíntese e ação das giberelinas na germinação de sementes de orquídeas (Hew & Clifford 1993). As giberelinas estimulam a germinação de sementes não dormentes, além de favorecer a quebra da dormência. Esse hormônio promove a germinação atuando como mediador

entre fatores ambientais e fatores internos restritivos da germinação; pode induzir genes que codificam enzimas que reduzem a resistência mecânica dos envoltórios da semente ou ter efeito direto sobre o potencial de crescimento do embrião (Kerbauy 2008). De acordo com Miyoshi & Mii (1995), os reguladores de crescimento são produzidos por fungos micorrízicos, fornecidos na germinação simbiótica de sementes de orquídeas.

Orchidaceae diferencia-se da maioria das famílias botânicas pelas sementes, com embrião rudimentar, não possuem endosperma, necessário para promover a germinação (Ramos 1969, Dressler 1993, Clements 1999). As sementes são diminutas, com 0,005 a 6 mm de comprimento (Arditti 1992). O processo de germinação das orquídeas permaneceu desconhecido até o início do século passado, quando Noel Bernard (1909) publicou o primeiro trabalho científico que demonstrou serem fungos micorrízicos os responsáveis pela germinação das sementes de Orchidaceae, o chamado processo simbiótico (Arditti 1992). Lewis Knudson (1922) desenvolveu pela primeira vez o chamado meio de cultura para germinação assimbiótica, ou seja, que não depende dos fungos micorrízicos (Yam & Arditti 2009). Um dos mais utilizados para propagação *in vitro* de Orchidaceae é a fórmula de Murashig-Skoog (1962). A partir desses estudos, muitos autores têm sugerido diferentes formulações com a adição de sais minerais, hormônios e vitaminas, além da introdução de compostos orgânicos, visando otimizar o desenvolvimento *in vitro* dessas plantas (Campos 2004). A obtenção de orquídeas, a partir da semeadura *in vitro*, é, atualmente, um processo rotineiro. No entanto, os conhecimentos sobre a melhor formulação do meio de cultura para cada espécie ainda são limitados (Pasqual *et al.* 2009).

A cultura assimbiótica, ou semeadura *in vitro*, de orquídeas constitui técnica relevante do ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas desta forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental (Unemoto *et al.* 2007). A cultura assimbiótica *in vitro* resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes (Martini *et al.* 2001). Cribb (1999) utilizou o termo “protocormo” para descrever o estágio inicial do desenvolvimento de orquídeas apresentando-se como um tubérculo efêmero que se desenvolve após a germinação das sementes de orquídeas associado de um fungo

micorrízico apropriado, antes do primórdio foliar e raiz da plântula. Pridgeon *et al.* (2005) mencionam o protocormo como uma estrutura efêmera resultante da germinação de sementes de orquídeas, a partir da qual se formariam os primórdios dos sistemas caulinar e radicular. Em seus experimentos, Arditti (1992) e Kraus *et al.* (2006) adotaram a fase de protocormo como efetiva germinação de sementes de orquídeas. Conforme estes últimos autores, a respeito da importância insofismável do protocormo, na reprodução sexuada de orquídeas, levando à formação de uma nova planta, ainda não está claro a partir de que momento inicia-se seu estabelecimento no processo germinativo. As sementes de orquídeas acrescentam estes autores, contem um embrião relativamente pouco diferenciado, apresentando, durante a germinação, um padrão de desenvolvimento inicial bastante distinto do das demais angiospermas e são específicas para cada grupo taxonômico. As orquídeas apresentam um desenvolvimento vegetativo lento, assim como a multiplicação por sementes (Kraus *et al.* 2006). Numa cápsula, são produzidas milhares de sementes, aproximadamente 5% germinam. O cultivo de sementes em meio de cultura permite acelerar esse processo e elevar a taxa de germinação, tornando a multiplicação de orquídeas comercialmente viável (Stancato & Faria 1996)

Os avanços biotecnológicos possibilitaram, ao mundo científico, criar ferramentas para desvendar lacunas existentes no desenvolvimento vegetal, porém ainda há muito para ser desbravado. A descrição dos processos ontogenéticos das plantas, conseguiu agregar maior conhecimento sobre o desenvolvimento vegetal e a importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de Fisiologia, Bioquímica e Genética de plantas (Kerbaudy 1999). É preciso compreender as fases do desenvolvimento vegetativo, que se inicia na embriogênese e continua durante toda a vida da planta. Enquanto os seres unicelulares crescem e reproduzem-se, interagindo diretamente com o meio circundante, organismos pluricelulares utilizam diferentes tipos de estratégias para garantir o crescimento integrado e harmonioso de suas diversas partes (Peres 1998). Na embriogênese, até atingirem o estágio de plântula, os embriões assumem aspectos morfológicos característicos, como o globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Pasqual & Pinto 1988). De modo diferente dos animais, a maior parte do desenvolvimento dos vegetais ocorre após a embriogênese (Fosket 1994), através das atividades de células que mantêm certas características do tecido embrionário, ou seja, os meristemas.

Durante a embriogênese, nas plantas, podem ser distintas estruturas como epicótilo, hipocótilo, cotilédones e radícula (Rodrigues & Kerbauy 2009). Esta fase limita-se a formação de um eixo contendo os meristemas caulinar e radicular em polos opostos (Peres 2002, Rodrigues & Kerbauy 2009). O crescimento integrado envolve os processos pós-embriônários; o corpo vegetal é gerado a partir de regiões meristemáticas através de divisões celulares, expansões e diferenciações (Esau 1974, Wareing 1992, Salisbury & Ross 1992). O desenvolvimento pós-embriogênico dos vegetais resulta da contínua atividade do meristema caulinar formando folhas, ramos e verticilos florais e do meristema radicular formando raízes, num processo denominado organogênese (Peres 1998). Dentro do ciclo de vida de plantas com semente, o recrutamento, o desenvolvimento e a sobrevivência das plântulas são eventos cruciais para o crescimento e/ou manutenção das populações (Melo *et al.* 2004).

É importante destacar que há uma imensa lacuna na origem e no desenvolvimento das plantas pertencentes à Orchidaceae. Num levantamento histórico, a respeito da propagação de orquídeas, Yam & Arditti (2009) verificaram que quase 400 anos separam as primeiras descrições de sementes de orquídeas e o desenvolvimento de métodos para germinação assimbiótica. Investigações sobre o desenvolvimento vegetativo de espécies de Orchidaceae vêm sendo foco de estudos, pois, fogem das características padrão ocorrentes com outras monocotiledôneas, por apresentarem embriões indiferenciados, caracterizando o estágio globular (Yam & Arditti 2009). Além disto, também há dificuldades no cultivo destas plantas *in natura*. Soma-se a isto, ainda, que a propagação vegetativa tem uma capacidade reprodutiva limitada, conforme afirma Campos (1998). O autor diz que a propagação vegetativa, apresenta desenvolvimento vegetativo lento, processo que leva de dois até 8 anos, além de mais 3 a 4 anos para florescer.

Na biotecnologia, o uso de técnicas de cultivo *in vitro*, apresenta vantagens únicas sobre os métodos convencionais de propagação, como a fixação de ganhos genéticos em populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas sadias e de alta qualidade, em pequeno espaço físico e curto período de tempo, independente de fatores climáticos limitantes (Costa *et al.* 2009). Isso compensa a necessidade de plantas serem tiradas diretamente da natureza, uma prática que tem causado a exploração de muitas espécies nativas do Brasil, levando a erosão genética, perda de biodiversidade e extinção (Pilatti *et al.* 2011). Hossain (2008) aponta como

uma das dificuldades encontradas na técnica de propagação *in vitro* de orquídeas, a indisponibilidade de protocolos eficientes e o claro entendimento dos processos germinativos e desenvolvimento pós-seminal, de protocormo até plântula. As técnicas do cultivo *in vitro* têm sido usadas para a propagação em larga escala de um número de espécies de orquídeas e seus híbridos (Arditti & Ernst 1984, Buyun et al. 2004, Shimura & Koda 2005, Yamazaki & Miyoshi 2006), mas muito poucos estudos investigaram de forma crítica as peculiaridades da germinação de sementes e desenvolvimento dos protocormos.

Embora os estudos sobre germinação *in vitro*, excisão do embrião zigótico, micropropagação e embriogênese somática de espécies ameaçadas têm aumentado consideravelmente, as lacunas de conhecimento ainda permanecem (Pilatti *et al.* 2011). As respostas às condições do cultivo *in vitro* variam fortemente entre gêneros, espécies, cultivares e até mesmo plantas de um mesmo genótipo cultivadas sob diferentes condições ambientais (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009). A possibilidade de manipulação deste sistema experimental, para fins tecnológicos, depende do domínio preciso de princípios de fisiologia do desenvolvimento. Desta maneira, a morfogênese é a integração entre os processos decorrentes da divisão e diferenciação celular (Guerra *et al.* 1999). O sucesso na tecnologia e aplicação dos métodos de cultura *in vitro* deve-se à melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e dos tecidos em cultura (Schneiders *et al.* 2012).

Sendo assim, o cultivo *in vitro* de *E. fulgens* poderá servir de modelo para o entendimento dos processos de desenvolvimento característico de Orchidaceae. O estudo com *E. fulgens* a partir de sementes cultivadas *in vitro*, em dois meios de cultura, Knudson C e Murashige & Skoog, objetivou comparar a diferenciação morfológica e histológica do desenvolvimento pós-seminal, de protocormo até plântula.

MATERIAL E MÉTODOS

1. SEMENTES

Para os ensaios de germinação assimbiótica foram utilizadas sementes de *Epidendrum fulgens* Brongn. (Orchidaceae), que foram cedidas pelo orquidófilo Sr. Carlos Gomes, provenientes do Orquidário Carlos Gomes, situado no Ribeirão da Ilha, Florianópolis, SC. As sementes foram coletadas de cápsulas maduras que estavam iniciando sua abertura. Realizou-se o processo de assepsia e posteriores procedimentos de cultivo que possibilitaram a germinação e a coleta de protocormos de diversas fases do desenvolvimento para análise morfológica e histológica.

2. PROCEDIMENTOS PARA O CULTIVO *IN VITRO*

A desinfestação e inoculação das sementes foram realizadas em câmara de fluxo laminar, na qual as sementes foram retiradas das cápsulas para aferir a massa (0,05 g) em balança de precisão. As sementes maduras de *E. fulgens* foram submetidas a desinfestação com solução de hipoclorito de sódio comercial a 0,5 %, conforme Alvarez-Pardo *et al.* (2006), durante 10 minutos em um tubo de ensaio estéril. Após este procedimento, as sementes foram filtradas em um funil estéril e lavadas por cinco vezes com água destilada estéril. As sementes foram transferidas para um béquer, com adição de 100ml de água destilada estéril, com agitação constante em agitador magnético, a fim de manter as sementes em suspensão, pipetando 1mL da solução, de acordo com Stenberg & Kane (1998), procedimento modificado. As sementes foram inoculadas em frascos de vidro de 300 ml de capacidade, contendo 30 ml de meio de cultura.

Os meios de cultura usados foram Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog 1962) e Knudson C (KC) (Knudson 1946), com pH ajustado para 5,5 ($\pm 0,1$) utilizando HCl (0,5N) e NaOH (0,5N), acrescidos de 7mg.L^{-1} de ágar (Acros®), antes da esterilização, por 20 min, a 121 °C e 1,3 atm de pressão. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em frascos de vidro, em sala de crescimento aclimatizada, com temperatura média de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após a inoculação no meio de cultura, realizaram-se

avaliações semanais, até 20 semanas, acompanhando-se a germinação edesenvolvimento do embrião, da fase de protocormo, até o estágio de plântula. As amostras foram coletadas semanalmente por 14 semanas.

Tabela 1 . Composição mineral dos meios de cultura utilizados para a germinação assimbiótica de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Epidendrum fulgens*.

Nutrientes	Murashige &Skoog(1962)	Knudson C (1946)
	(MS) mg.L ⁻¹	(KC) mg.L ⁻¹
Ácido Bórico – H ₃ BO ₃	6,2	–
Cloreto de cálcio – CaCl ₂ .2H ₂ O	440	–
Cloreto de Cobalto – CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	–
Fosfato de Potássio Monobásico – KH ₂ PO ₄	170	250
Iodeto de Potássio - KI	0,83	–
Molibdato de Sódio – Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	0,25	–
Nitrato de Amônia – NH ₄ NO ₃	1650	–
Nitrato de Cálcio – Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	–	1000
Nitrato de Potássio – KNO ₃	1900	–
Sulfato de Amônia – (NH ₄) ₂ SO ₄	–	500
Sulfato de Cobre – CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	–
Sulfato de Ferro – FeSO ₄ .7H ₂ O	–	25
Sulfato de Magnésio – MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7400
Sulfato de Manganês – MnSO ₄ .H ₂ O	22,3	7,5
Sulfato de Zinco – ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	–
Ácido Nicotínico	0,5	–
Piridoxina HCl	0,5	–
Tiamina	0,1	–
Glicina	2,0	–
E.D.T.A. Bissódico – Na EDTA	37,3	–
Sulfato de Ferro – FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	–
Inositol	100	–
Sacarose	30000	20000
Ágar (Acros®)	7000	7000

*Todos os meios de cultura foram suplementados com sacarose 30 g L⁻¹ e o seu pH foi ajustado para 5,5 (\pm 0,1).

3.GERMINABILIDADE DE SEMENTES

Depois de duas semanas após a inoculação, foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram embrião intumescido e clorofilado, característico do estágio de protocormo nas orquídeas. Realizou-se amostragens para contagem das esférulas esverdeadas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constando de dois tratamentos (meios de cultura MS e KC), amostrados em três repetições contendo vinte frascos de cultivo em cada (n=60) tendo sido avaliadas um total de 13353.

Os resultados foram expressos em percentagem de germinação, sendo empregando a seguinte fórmula: Germinação (%) = (Número de sementes germinadas X 100) / Total N° de sementes inoculadas, conforme as Regras para Análises de Sementes - RAS (Brasil 1992). Foi inoculado no meio de cultura 1 mL de solução de suspensão, contendo as sementes, baseado no método utilizado por Stenberg & Kane (1998).

Os dados referentes à percentagem foram submetidos teste “t” Student em nível de 5% de significância.

4. PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE MORFO-HISTOLÓGICA

As amostras foram coletadas semanalmente e fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, lavadas no mesmo tampão, e desidratadas em série etílica gradual, sendo conservadas em etanol 70°GL (Ruzin 1999).

Os registros relativos à morfologia foram obtidos através de observações feitas em microscópio estereoscópio Leica, modelo EZ4D e em microscópio óptico Leica MPS 30 DMLS e as imagens das estruturas foram capturadas com câmara digital Sony.

Para confecção de lâminas permanentes, as amostras foram desidratadas até etanol 96°GL, mantidas em solução de pré-infiltração, por

pelo menos 12 horas, e em solução de infiltração - hidroxietilmetacrilato (Leica® Historesin, Heidelberg, Alemanha), por mais de três horas. Posteriormente, montaram-se blocos utilizando a solução endurecedora, conforme instruções do fabricante. Os blocos, contendo o material, foram seccionados com 5 μ m de espessura, em micrótomo de rotação Leica — RM 2125 RT. As secções foram distendidas sobre lâminas contendo água, em chapa aquecedora (a 42°C). Depois da secagem das lâminas, o material foi corado com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2M e pH 6,8 (O'Brien *et al.* 1965).

5. ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Após a fixação e a desidratação, algumas amostras, foram secas, conforme Horridge & Tamm (1969), em ponto crítico de CO₂EM-CDP-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). As amostras secas foram aderidas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face, e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador EM SCD 500 (Leica, Viena, Áustria), para estudo ultraestrutural em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol XL30 (Tokio, Japão), do Laboratório Central de Microscopia da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. MORFOANATOMIA DE SEMENTES

As sementes de *E. fulgens* podem atingir o comprimento de 2 a 3 mm, apresentaram-se fusiformes (Fig. 1A), delimitadas por testa (Fig. 1B-C) e contendo um proembrião (Fig. 1C). A testa estava formada por uma camada de células (Fig. 1D), as quais, em vista frontal, mostraram-se com forma aproximadamente retangular (Fig. 1B). Estas sementes não apresentaram endosperma.

As sementes de orquídeas podem medir aproximadamente entre 0,005 a 6 mm de comprimento, são produzidas em cápsulas em grande número e são constituídas por testa e embrião (Arditti & Ghani 2000; Dressler 1993; Clements 1999). Os embriões de orquídeas constituem-se de pequenos corpos elipsoidais, cujas células são relativamente indiferenciadas, destituídas de endosperma e cotilédone, caracterizando o estágio globular (Nishimura 1981; Harrison 1977; Arditti 1992).

As plantas adultas de *E. fulgens* formam cápsulas que produzem um elevado número de sementes. A estrutura e tamanho das sementes estão entre as características mais marcantes das Orchidaceae, e das milhares de sementes produzidas em uma cápsula, aproximadamente apenas 5% germinam (Arditti 1967).

O proembrião mostrou forma ovalada e suspensor bem evidente (Fig. 1C-1E), histologicamente constituído apenas por túnica envolvendo células do corpo (Fig. 1D). A túnica constitui-se de células da protoderme que recobre a plúmula, que dá origem a formas foliares juvenis, antes do aparecimento das folhas típicas da planta adulta (Alonso & Moraes-Dallaqua 2004).

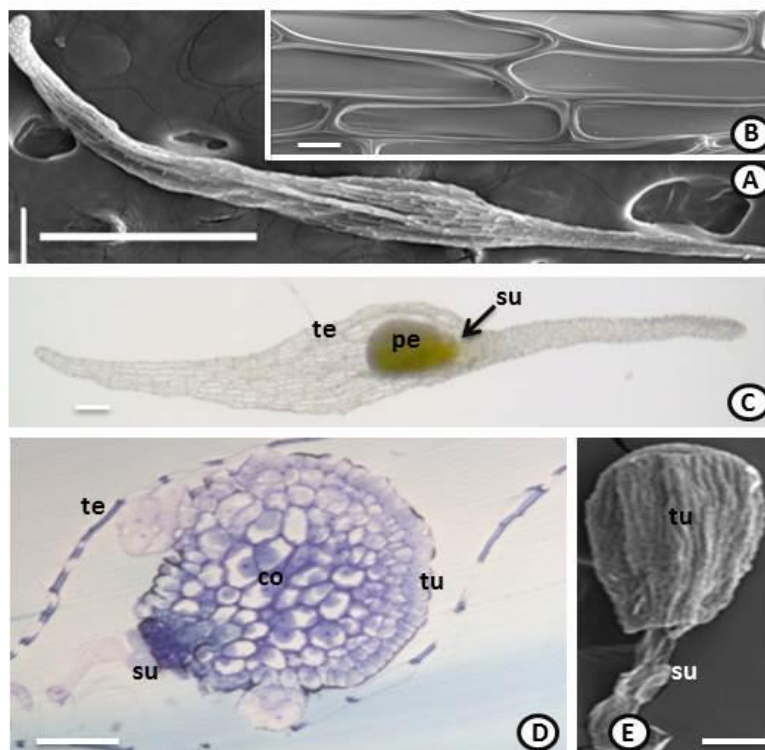


Figura 1. Morfoanatomia de sementes de *Epidendrum fulgens* Brong., observada em microscopias óptica (MO) e eletrônica de varredura (MEV). **A.** Aspecto geral da semente, em MEV. **B.** Vista frontal das células da testa, em MEV. **C.** Aspecto geral da semente, em MO, com testa translúcida; proembrião com forma ovalada. **D.** Secção longitudinal da semente, em MO, com testa envolvendo o proembrião formado por túnica e corpo, ligado a região basal pelo suspensor. **E.** Proembrião, em MEV. **Legenda:** co= corpo; pe=proembrião; su=suspensor; te=testa; tu=túnica. **Barras:** A=500 μ m; B=10 μ m; C=50 μ m; D,E=100 μ m.

2. GERMINABILIDADE

Diversos tipos de meios de cultura foram desenvolvidos e estudos atuais continuam propondo novos meios para melhorar o processo de propagação *in vitro*. A dificuldade apresentada pelo cultivo *in vitro*, sem a associação simbiótica com fungos, está nas diferentes necessidades nutricionais de cada espécie, sendo fundamental verificar nos meios de cultivo clássicos aqueles que atendem adequadamente os requerimentos para cada espécie de orquídea (Grattapaglia & Machado 1998; Abrão *et al.* 2014; Faria *et al.* 2012). A composição do meio de cultura varia de espécie para espécie e um dos meios mais utilizados para germinação e crescimento de orquídeas é o meio Knudson C (Faria *et al.* 2012).

Os resultados de germinabilidade de *E. fulgens* revelaram que o percentual de germinação no meio KC foi maior do que em meio MS (Tab.2).

Tab. 2. Germinabilidade de sementes de *Epidendrum fulgens* inoculadas em meios distintos, Knudson C (1946) e Murashige & Skoog (1962). Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste “t” Student ($P < 0,05$) ($n=60$) ($P=1,478 \times 10^{-18}$).

Meios de cultura	Germinabilidade (%)
KC	60,59 ^a
MS	40,74 ^b

Tais resultados corroboram com aqueles encontrados por Suzuki *et al.* (2009), para *Hadrolaelia tenebrosa*, e Kohl (1962), para diferentes espécies de *Cymbidium*, que observaram maior germinação no meio KC. Por outro lado, Dutra *et al.* (2009), submetendo *Cyrtopodium punctatum* ao meio KC, obtiveram o menor percentual (10%). Suzuki *et al.* (2010), trabalharam com *Cattleya bicolor* e verificaram o maior percentual de germinação em meio MS (60,8%). Em estudos realizados por Voges *et al.* (2014), que objetivaram testar diferentes consistências de meio de cultura,

formulações salinas e condições de cultivo na porcentagem de germinação e velocidade de desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum fulgens* mostraram que as diferentes consistências ou condições de cultivo não influenciaram na porcentagem de germinação, exceto para o meio Knudson, resultando em maior percentual.

Certas espécies de orquídeas possuem preferência por um meio de cultivo determinado, podendo variar amplamente de um genótipo para outro quanto às exigências nutricionais, sendo este o motivo pelo qual a mesma espécie, por vezes, é capaz de proliferar muito bem em meios simples de cultura, enquanto outras necessitam de meios mais complexos para a germinação (McKendrick 2000). O nitrogênio é um dos principais nutrientes essenciais e ativos, sendo absorvido, principalmente, na forma de nitrato (NO_3^-) e amônia (NH_4^+) (Sakuta *et al.* 1987). O efeito destas diferentes formas inorgânicas, sobre o crescimento e desenvolvimento das plântulas, é marcante: o nitrato, como fonte de nitrogênio, sustenta boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo, também, a melhor forma de nitrogênio para algumas culturas de orquídea (Reinert & Mohr 1967; Araújo *et al.* 2009). Mercier & Kerbauy (1991) relataram que diferentes fontes de N influenciaram a síntese de algumas substâncias, tais como citocininas e clorofila e, conseqüentemente, o desenvolvimento de protocormos de *E. fulgens*. Kauth *et al.* (2006), por exemplo, observaram em *Calopogon tuberosus* que o uso de meios de cultura com maior concentração de amônia, em relação ao nitrato, proporciona melhor germinação das sementes de orquídeas, quando comparado aos meios contendo maior concentração de nitrato. Além disso, diversos autores afirmam que as fontes de nitrogênio, em meios nutritivos, influenciam positivamente o desenvolvimento de orquídeas *in vitro* (Araujo *et al.* 2009; Kanashiro *et al.* 2007). Pouco se sabe sobre o papel dos hormônios vegetais na mobilização de reservas em sementes de orquídeas (Manning & Van Staden, 1987). Nas Orchidaceae, essas reservas são basicamente representadas por gotículas de lipídios armazenadas diretamente nas células de embriões (Arditti 1967). É possível que citocininas endógenas de sementes de *E. fulgens* influenciem a mobilização de lipídios. Sementes de *Pecan*, que são ricas em reservas lipídicas, dependem de citocininas endógenas do embrião para fornecer a energia necessária para a germinação (Dimalla & Van Staden 1977). A presença destas citocininas nas sementes explica a ocorrência de germinação assimbiótica na ausência de citocininas exógenas no meio de cultura e está em contraste com a hipótese de que uma das funções de micorrizas, durante germinação simbiótica de sementes de

orquídeas, é fornecer citocinina para o embrião (Arditti 1980). Há relatos de que os reguladores de crescimento são produzidos por fungos micorrízicos. Assim, é possível postular que essas substâncias podem ser fornecidas pelo fungo durante a germinação simbiótica de sementes de orquídeas (Miyoshi & Mii 1995).

No entanto, há reguladores vegetais envolvidos no processo da germinação, como as citocininas, que têm a capacidade de promover a germinação em algumas espécies, porém os efeitos do hormônio nesse processo ainda são pouco conhecidos (Kerbauy 2008). Para as orquídeas, informações sobre a capacidade das citocininas promoverem a germinação são escassas. Hadley & Harvais (1968) descrevem que combinações de quinolina (citocinina) e ácido indolacético (auxina) permitem um bom desenvolvimento de orquídeas e que fatores externos, como luz e temperatura, podem antecipar o estágio de desenvolvimento e que o uso de reguladores hormonais, como tratamento pré-germinativo, pode auxiliar no processo de germinação e desenvolvimento de plântulas.

As giberelinas estimulam a germinação de sementes não dormentes, além de favorecer a quebra da dormência. Esse hormônio promove a germinação atuando como mediador entre fatores ambientais e fatores internos restritivos da germinação; pode induzir genes que codificam enzimas que reduzem a resistência mecânica dos envoltórios da semente ou ter efeito direto sobre o potencial de crescimento do embrião (Kerbauy 2008).

As orquídeas que respondem à germinação *in vitro* podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com suas necessidades nutricionais básicas (Stewart 1989). Existem orquídeas cujas sementes germinam em meios de cultura menos complexos como o KC (Suzuki *et al.* 2009) e outras espécies que necessitam de meios com maior quantidade de macronutrientes como o MS. Os resultados mostraram que *E. fulgens* pertence ao primeiro grupo, uma vez que os melhores resultados foram obtidos no meio KC. Além disso, ela é uma espécie que apresenta grande plasticidade por ter distintas formas de vida como epifíticas, rupícolas e terrestres, sendo estes ambientes geralmente oligotróficos, o que pode ser relacionado com um meio de cultura menos rico em nutrientes.

Isso mostra que as respostas germinativas podem variar consideravelmente entre diferentes gêneros e até mesmo entre espécies de

um mesmo gênero, verificando a necessidade de estudar a melhor composição mineral para cada espécie.

3. MORFOGÊNESE

As estruturas morfológicas oriundas dos processos germinativos e desenvolvimento pós-seminal de *E. fulgens*, semeadas *in vitro*, a partir da inoculação das sementes em meios distintos, Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS), até a formação de plântula, podem ser observadas nas Figuras 2 e 3.

O conhecimento da morfologia das sementes e do desenvolvimento pós-seminal podem contribuir para a diferenciação de grupos taxonômicos (Batygina *et al.* 2003), nas análises de germinação e conservação de sementes (Andrade *et al.* 2003) e, sobretudo, nos estudos sobre regeneração em ecossistemas naturais (Oliveira 2001; Melo & Varela 2006). Melo *et al.* (2004) ressaltam que a emergência e o estabelecimento das plântulas são estágios críticos no ciclo de vida das plantas.

As sementes da maioria das angiospermas são caracterizadas pela presença de um embrião que se diferencia em cotilédono(s), radícula, plúmula e hipocótilo (Leroux *et al.* 1997). Entretanto, as sementes de orquídeas, por possuírem embriões relativamente pouco diferenciados, podem apresentar, durante a germinação, um padrão de desenvolvimento inicial bastante distinto das demais angiospermas, além de ser específicas para cada grupo (Kraus *et al.* 2006).

Amostras coletadas semanalmente de cada tratamento (KC e MS) foram avaliadas quanto às diferentes fases do desenvolvimento inicial. Esse método foi modificado a partir do Stewart & Kane (2006). Assim, foram considerados cinco estádios distintos de desenvolvimento: estágio 1 = semente intumescida; estágio 2 = rompimento da testa e protocormo clorofilado; estágio 3 = protocormo com formação de primórdio foliar e rizóides; estágio 4 = plântula com duas ou mais folhas; estágio 5 = plântula com folhas e raiz adventícia.

Enfatiza-se, entretanto, que o desenvolvimento dos protocormos de *E. fulgens* não ocorre de forma uniforme e alguns eventos não são perceptíveis, necessitando uma maior persuasão na investigação.

O desenvolvimento pós-seminal de *E. fulgens* *in vitro* mostrou similaridade morfológica nas sementes cultivadas em KC e MS, porém com distinção temporal. Em meio KC, na 1ª semana após a inoculação, as sementes mostraram-se como porção central mais globosa em decorrência do intumescimento do proembrião (Fig. 2A,B), mantendo-se estável em MS (Fig. 2C). As sementes em KC, na 2ª semana, já mostravam rompimento da testa (Fig. 2D), enquanto as do meio MS evidenciaram o intumescimento (Fig. 2F) entre a 1ª e 2ª semanas, sem ocorrer o rompimento da testa. Assim, na 2ª semana, no meio KC já se evidenciava o estágio 2, enquanto no meio MS ainda permanecia no estágio 1.

Na 3ª semana, o desenvolvimento pós-seminal assemelhou-se morfológicamente entre os dois tratamentos, com rompimento da testa (Fig. 2G) e protocormo com região basal apresentando rizóides (Fig. 2H) e região apical com ápice pontiagudo (Fig. 2I). Esta forma pontiaguda apical corresponde ao primórdio foliar. Subsequentemente, na 4ª semana após a inoculação, observou-se um alongamento do primórdio foliar, constatado em ambos os tratamentos (Fig. 2J-L), ainda mais evidente e com novos primórdios foliares na 5ª semana após a inoculação (Fig. 3A-E). Entretanto, destaca-se que em KC, os protocormos ainda evidenciavam apenas um primórdio foliar (Fig. 3A-B), constituindo estágio 3, enquanto no meio MS, alguns protocormos já exibiam dois primórdios foliares (Fig. 3C-D), caracterizando o estágio 4. Os protocormos de *E. fulgens* na 8ª semana em KC, apresentaram tardiamente o mesmo comportamento (Figura 3F-G), chegando ao estágio 4. Em *E. fulgens*, na 13ª semana após a inoculação, em meio KC (Fig. 3H-I), já eram observadas estruturas que caracterizavam o estágio 5, ou seja, primórdios foliares bem desenvolvidos e raízes adventícias. Porém, tardiamente na 14ª semana, os protocormos inoculados em meio MS, exibiam raízes adventícias e primórdios foliares (Fig. 3J-K), caracterizando o término do protocormo, estabelecendo-se plântulas.

As sementes de orquídeas apresentam, em geral, um padrão bastante uniforme de germinação e desenvolvimento, iniciando-se pela embebição e intumescimento da semente que acarreta o rompimento do tegumento seminal e a liberação do embrião (Kraus *et al.* 2006; Castro *et al.* 2004). Observou-se em *E. fulgens* que a embebição proporcionou a

hidratação do conteúdo (pró-embrião) produzindo um aumento no volume interno com subsequente rompimento do envoltório (testa). A embebição das sementes de angiospermas, inicia-se com a fase de absorção de água, seguida pela fase de preparação e ativação do metabolismo na semente, onde são ativados os processos requeridos para o crescimento do embrião, como a respiração, síntese e duplicação de DNA, início da degradação de reservas e alongamento das células da radícula (Castro *et al.* 2004). Em orquídeas, as sementes apresentam, em geral, um padrão nos estádios germinativos e desenvolvimento, iniciando-se pelo intumescimento da semente, que rompe o tegumento seminal e ocorre a liberação do embrião, o qual se desenvolve numa estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada protocormo (Arditti 1992). A espécie *E. fulgens* também apresentou esses estádios de desenvolvimento. Em meios de cultura a qual foram submetidas às sementes de *E. fulgens* apresentaram disparidade no período de rompimento da testa e inicialização da fase de protocormo.

Conforme o critério fisiológico, a germinação é completa quando uma parte do embrião, em geral a radícula, penetra e transpassa os tecidos que o envolvem (Labouriau 1983). Em *Cattleya amethystoglossa*, o embrião rompeu a testa entre a quarta e quinta semana (Liz 2013) e em *Catasetumpileatum* Rchb. f., foram constatados o rompimento do tegumento seminal e rizóides, no 10º dia após a inoculação *in vitro* das sementes quando puderam ser visualizados os protocormos de formato cônico e coloração verde (Kraus *et al.* 2006). Segundo Pridgeon *et al.* (1999), o protocormo seria uma estrutura efêmera resultante da germinação de sementes de orquídeas, a partir da qual se formariam os primórdios dos sistemas caulinar e radicular. Estudos com *Catasetum pileatum*, evidenciaram que no 30º dia após a inoculação assimiótica, as maiores modificações ocorreram na parte superior do protocormo, evidenciando um intenso desenvolvimento dos dois primórdios foliares. Várias interpretações têm sido dadas quanto à natureza do primórdio foliar em protocormos (Leroux *et al.* 1997).

Gutierre (2001) refere que a fase na qual são formadas as folhas e raízes nos protocormos é designada como plântula. De acordo com Velenowsky (1907, *apud* Nishimura 1981), o primeiro dos órgãos foliáceos formados deve ser considerado como um cotilédone e, somente o segundo, como a folha propriamente dita. Em contraposto Veyret (1974) relatou que a primeira estrutura formada corresponderia à folha. Para Batygina *et al.*

(2003), o termo "cotilédone" ainda é discutível, sendo que consideram inadequado usar o termo cotilédone para os órgãos de natureza foliar formados durante o desenvolvimento pós-seminal. Os autores, baseando-se no conceito de que o cotilédone é uma folha embrionária ou seminal, afirmam que no protocormo são formadas folhas propriamente ditas.

Kraus *et al.* (2006) registraram que na 15ª semana, após a inoculação de *Catasetum pileatum* Rchb., havia sistema caulinar e radicular bem desenvolvidos, caracterizando a estrutura plântula. Segundo Alvarez & Sagawa (1965), o estágio de protocormo terminaria com o aparecimento da primeira raiz, evento esse acompanhado por necrose e desaparecimento das células parenquimáticas da região basal. O término do estágio de protocormo também não apresenta muita concordância entre os autores; para alguns, esse estágio se encerraria com o desenvolvimento das primeiras folhas (Mariat 1952), ou se estende até estádios posteriores, com a formação da raiz (Veyret 1974). Adotou-se nesta pesquisa para estudos morfológicos de *E. fulgens*, que o término do estágio de protocormo se dá quando ocorre o surgimento de folhas e raiz adventícia, tornando-se efetivamente plântula.

Figura 2. Morfogênese do desenvolvimento pós-seminal de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Protocormos, da 1ª a 4ª semana após inoculação, observados em microscopias estereoscópica (ME) e eletrônica de varredura (MEV). **A.** Semente com aspecto intumescido, iniciando desestruturação das células da testa devido à pressão interna (KC, 1ª sem.; **A** em MEV e **B** em ME). **C.** Semente ainda sem evidências de intumescimento (MS, 1ª sem.). **D.** Rupturas na testa da semente decorrente do intumescimento do proembrião (KC, 2ª sem.; em MEV), iniciando a fase de protocormo. **E.** Proembrião com formado um pouco mais alongado (KC, 2ª sem.; em ME). **F.** Proembrião começa a mostrar entumescimento, mas sem romper testa (MS, 1ª sem.; em ME). **G.** Testa rompida expondo o protocormo (KC, 3ª sem.; em MEV). **H.** Protocormo, propositalmente sem testa, expondo o início do desenvolvimento do rizóides (KC, 3ª sem.; em MEV). **I.** Protocormo com ápice pontiagudo, início do desenvolvimento primórdio foliar (MS, 3ª sem.; em MEV). **J-K.** Protocormos com primórdios foliares no ápice (KC, 4ª sem.; **J** em ME e **K** em MEV). **L.** Protocormo com primórdio foliar pontiagudo (MS, 4ª sem.; em ME). **Legenda:** ri=rizóide; pf=primórdio foliar; sem.=semana. **Barras:** A,D,G,J,L=500mm; B,C,E,F=50mm; H,I=100mm.

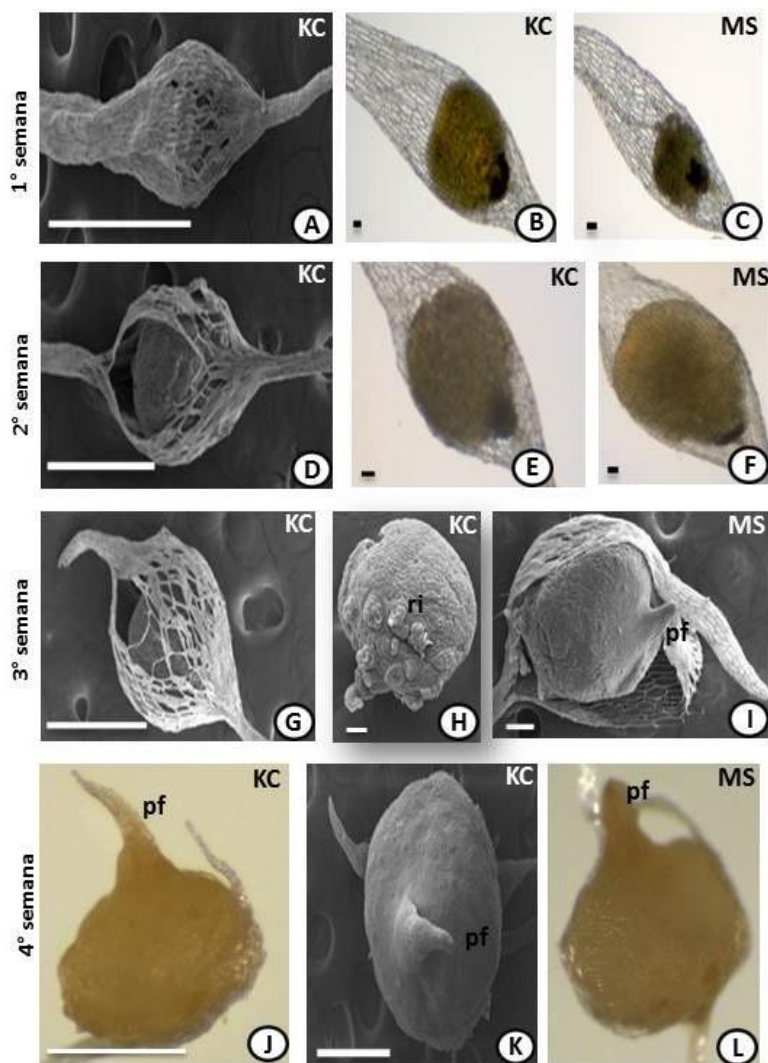
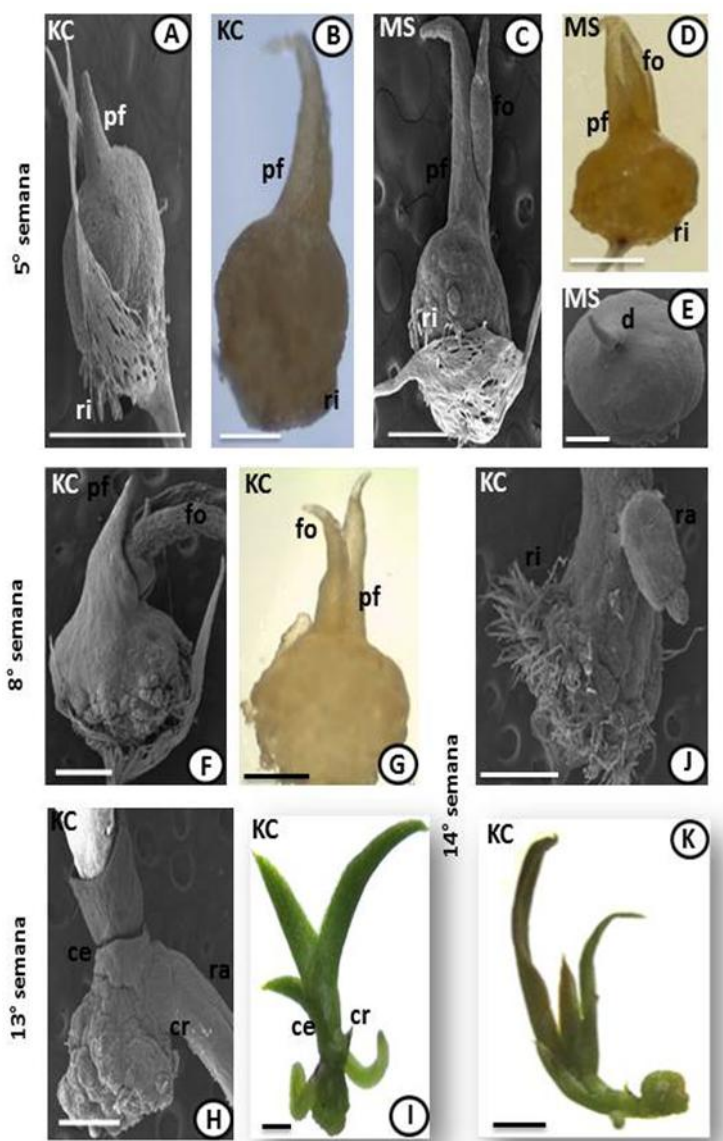


Figura 3. Morfogênese do desenvolvimento pós-seminal de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo distintos, Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Protocormos, da 5ª a 14ª semana após inoculação, observados em microscopias estereoscópica (ME) e eletrônica de varredura (MEV). **A-B.** Alongamento da parte aérea com primórdio foliar e região basal com rizóides (KC, 5ª sem.; **A** em MEV e **B** em ME). **C-E.** Alongamento do ápice do protocormo e o surgimento da primeira folha, base com rizóides (MS, 5ª sem.; **A,E** em MEV e **D** em ME). **F-G.** Em meio KC, na 8ª semana, registradas em MEV e ME, respectivamente; apresenta protocormo mais desenvolvido com primórdio foliar e folha (KC, 8ª sem.; **F** em MEV e **G** em ME). **H-I.** Início da fase de plântula, estrutura constituída por folhas e raízes adventícias, revelando uma bainha envolvendo a base da radícula, a coleorriza e outra envolvendo a plúmula, o coleóptilo (KC, 13ª sem.; **H** em MEV e **I** em ME). **J-K.** Plântula devido ao surgimento de folhas e raiz adventícia (KC, 14ª sem.; **J** em MEV e **K** em ME). **Legenda:** pf=primórdio foliar; ri=rizóide; fo=primeira folha; d=domo; ra=raiz adventícia; sem.=semana; cr=coleorriza; ce=coleóptilo. **Barras:** A-D,F-H,J=500µm; E=100µm; I,K=1mm.



4.HISTOGÊNESE

Histologicamente, na semente madura de *E. fulgens*, o proembrião, em fase globular, no estágio pré-inoculação (tempo zero) mostrou-se constituído de túnica delimitando células meristemáticas, o corpo (Fig. 4A). A túnica, ou protoderme, apresentou-se como uma única camada, decorrente de divisões anticlinais; estas células meristemáticas apresentavam núcleos conspícuos e citoplasma denso. As células do corpo, ou promeristema, apresentaram estas mesmas características de constituição citológica, exceto pela frequente vacuolização, porém as formas e tamanhos das células denotavam grande variação, assim como os planos de divisão. Na região basal do proembrião destacou-se a presença do suspensor e células adjacentes, hipófise e centro de quiscência, já indicando início de formação do ápice radicular (Fig. 4A – seta preta). Na região oposta também já ocorriam evidências do início de formação do domo (Fig. 4A – seta branca). Esta bipolaridade está relacionada a expressão da organização do corpo vegetal. O suspensor estava constituído por fileira de células unisseriadas no extremo distal do proembrião e bisseriadas na região de conexão com o proembrião.

Após iniciado o cultivo *in vitro*, na 1ª semana após a inoculação, em meio MS, observou-se gradualmente o intumescimento do proembrião, iniciando protusões laterais (Fig. 4B). A evolução destas projeções originou a forma cordiforme, em MS na 2ª semana (Fig. 4D) e em KC na 3ª semana (Fig. 4E). Nesta fase tornaram-se mais evidentes as células da hipófise e do centro de quiscência (Fig. 4B-C). No extremo oposto, também a partir da 2ª semana, o domo (região do meristema apical caulinar) mostrou-se bem diferenciado (Fig. 4C-D), em meio KC e MS, respectivamente. Entretanto, a estrutura embrionária ainda não estava morfo-histologicamente totalmente formada para caracterizar um embrião, constituindo ainda um proembrião. Com a expansão do proembrião, a testa foi rompida, caracterizando a germinação e assim, a estrutura passou a constituir um protocormo. Tal estágio ocorreu depois da 2ª semana após a inoculação, em meio KC (Fig. 4C) e na 3ª semana em meio MS (Fig. 4F). Na base do protocormo perceberam-se indícios de degeneração do suspensor e células pré-radulares (Fig. 4D-F).

Na 4ª semana, após a inoculação em meio MS, observou-se intensa atividade mitótica no domo, com início de diferenciação dos primórdios foliares, levando o protocormo a apresentar a forma cônica (Fig. 4G). As

células do meristema fundamental mostravam intensa proliferação e, na base do protocormo, a presença de rizóides tornou-se frequente (Fig. 4G), alguns destes já observados na semana anterior. Nas semanas seguintes, em ambos os tratamentos, o que se observou foi gradual diferenciação na região apical caulinar, a partir do domo, com desenvolvimento dos primórdios foliares (Fig. 5A-B), seguindo-se com alongamento da região intermediária do protocormo e das células parenquimáticas (Fig. 5C). Em meio MS, na 10^a semana, foram evidenciadas bainha foliar envolvendo folhas e no centro do protocormo surgiu o tecido provascular (Fig. 5D). Neste estágio o protocormo mostrou-se menos volumoso.

Em meio KC, na 13^a semana após inoculação, notou-se o início do desenvolvimento da raiz adventícia (Fig. 6A-B), sendo que no meio MS, isto ocorreu somente na 14^a semana, quando o processo de diferenciação dos primórdios foliares e do tecido provascular (Fig. 6C-D) estavam avançados.

O embrião de Orchidaceae geralmente é pequeno, indiferenciado e raramente envolvido por endosperma (Cameron & Chase 1998, Gell 2002). Leroux *et al.* (1997) adotam o termo proembrião nestes casos, termo adotado no presente estudo. Nos representantes desta família, é discutível definir o momento da germinação; o proembrião germina e completa a formação da estrutura embrionária externamente ao tegumento da semente, o que leva ao uso do termo protocormo, em lugar de denominar plântula (Gell 2002). Barabé *et al.* (1993) referem que o protocormo pode ser considerado uma extensão do estágio embrionário. Logo, trata-se de estrutura embrionária que se desenvolve fora da semente.

Na natureza, as sementes de orquídeas dependem de vários fatores para germinarem, pois segundo Arditti (1967), na sua maioria não possuem endosperma e o embrião não possui cotilédone. As sementes germinam e desenvolvem-se mediante uma relação simbiótica com fungos micorrízicos específicos, os quais vão fornecer os nutrientes necessários até que a planta possa realizar fotossíntese (Stancato *et al.* 2001, Martini 2001). As sementes de orquídeas apresentam, em geral, um padrão bastante uniforme de germinação e desenvolvimento, iniciando-se por intumescimento da semente que acarreta o rompimento do tegumento seminal e a liberação do embrião (Treub 1890, Bernard 1909, Champagnat 1977, Leroux *et al.* 1997, Kraus *et al.* 2006). Este se desenvolve numa estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, o chamado protocormo (Arditti 1992). A formação

do protocormo é considerada uma peculiaridade no desenvolvimento pós-seminal em orquídeas (Batygina *et al.* 2003). Philip & Nainar(1988) descrevem a germinação do embrião, em *Vanilla planifolia* Andrews, acompanhada por um aumento no tamanho das células descendentes da camada basal do embrião e, conseqüentemente, as sementes rompem o revestimento e o embrião emerge, iniciando a fase de protocormo. As sementes de *E. fulgens*, como as demais na família são destituídas de endosperma e seu embrião não possui o desenvolvimento de cotilédone. Ainda não há estudos específicos que indiquem a associação da espécie *E. fulgens* com algum fungo, para que suas sementes germinem. No entanto, estudos apontam tal relação simbiótica como necessária para desencadear os processos germinativos nas orquídeas. Em sementes de *E. fulgens*, ocorreu intumescimento do proembrião e rompimento da testa caracterizando a germinação, que se mostra como padrão que tem sido descrito para as Orchidaceae. Após o rompimento da testa, inicia-se o desenvolvimento pós-seminal e a fase de protocormo.

Após um exame aprofundado do embrião de *E. fulgens*, duas regiões distintas podem ser discernidas, a túnica e o corpo. Em *E. fulgens*, A túnica constituiu-se de células com citoplasma denso, formando uma única camada decorrente de divisões somente anticlinais. O corpo apresentou células de vários formatos e tamanho, com diferentes graus de vacuolização e planos de divisão celular. Isto corresponde ao descrito por Arditti (1967), para espécies de Orchidaceae.

Na maioria das espécies vegetais, as sementes exibem diferenciação histológica no embrião, distinguindo-os em três tecidos – protoderme, meristema fundamental e procâmbio (Esau 1974, Batygina *et al.* 2003); que, a partir de processos pós-seminalis, darão origem ao corpo vegetal. Orchidaceae mostra uma rota de desenvolvimento incomum às demais plantas com sementes, ou seja, uma massa de células indiferenciadas que pode ser comparada com a fase globular dos embriões de dicotiledóneas (Mayer *et al.* 2011). Nas sementes de *E. fulgens*, as células constituintes do embrião, não são diferenciadas, podendo ser adotado o termo proembrião, sendo distinta uma camada de células (túnica) que delimitam células meristemáticas (corpo), caracterizando a fase globular.

A estrutura do suspensor pode ser característica para determinado gênero das Orchidaceae (Mayer *et al.* 2011). As sementes de *E. fulgens*

possuem, na região basal, a presença de um suspensor. O suspensor de *E. fulgens* apresenta células bisseriadas, na região de conexão com o embrião, e unisseriadas na extremidade oposta.

As células localizadas na extremidade da região basal são provavelmente derivadas do suspensor, conferindo uma bipolaridade (Leroux *et al.* 1997), que começa antes mesmo do processo germinativo. Em *E. fulgens*, constatou-se a presença de um pólo apical (caulinar), na extremidade superior, e um pólo basal (radicular), na extremidade inferior, onde liga-se ao suspensor.

Tem-se observado, em várias espécies de orquídeas, protocormos com células parenquimáticas de tamanho menor na região superior e maiores, nas demais partes (Alvarez & Sagawa 1965, Harrison 1977, Nishimura 1981). Kraus *et al.* (2006) descreveram o protocormo de *C. pileatum*. Conforme os autores, este é constituído por um conjunto de células parenquimáticas, revestidas pela epiderme, sendo que, as células parenquimáticas da região superior são de tamanho menor quando comparadas às demais células do protocormo. Segundo Cribb (1999), o protocormo típico seria constituído por uma região meristemática na porção superior (calazal), uma região central e uma região basal (micropilar), além da epiderme com rizóides uni ou pluricelulares. Na base do protocormo, complementa o autor, os rizóides proporcionam a absorção de nutrientes e água, função que mais tardiamente é assumida por raízes adventícias. A presença de rizóides é uma característica comum nos protocormos de muitas espécies, tanto *in vitro* quanto *in natura* (Harrison 1977, Nishimura 1981). Kraus *et al.* (2006) também observaram rizóides na epiderme da porção basal do protocormo de *Catasetum pileatum* com 3 semanas de cultivo. Em *E. fulgens*, o protocormo apresentou formato cônico, na região do domo que se constituiu por pequenas células, com evidências de intensa divisão, que conduziram a formação do ápice caulinar. Na região central grandes células apresentando vacuolização formavam o meristema fundamental. Em posição oposta ao domo, ou seja, na base do protocormo, o centro de quiescência mostrou-se com características celulares que indicavam processo de degeneração. Porém, foi justamente na região basal, onde deveria ter surgido a radícula, que ocorreu a formação dos rizóides, resultando em estruturação similar ao observado por Cribb (1999).

Kraus *et al.* (2006) mostraram que, em protocormo de *Catasetum pileatum*, a formação da primeira raiz é endógena e de natureza adventícia.

Deve ser mencionado que alguns autores (Groff & Kaplan 1988) preferem não empregar o termo adventício e fazem uso da expressão raiz originada no caule, a qual é mais explícita e evita a conotação de que essa condição é anormal no desenvolvimento da estrutura avaliada. Em protocormos de várias espécies de orquídeas, comenta Nishimura (1981), foi observado que a primeira raiz forma-se adjacente ao caule. Kraus *et al.* (2006) sugerem que isto se deve como decorrência da síntese de auxinas nesta região. Mercier (2004) ressalta que a importância das auxinas na formação de raízes é bem conhecida. Os protocormos de *E. fulgens* tiveram sua raiz de origem endógena, formada a partir da região caulinar e de natureza adventícia.

As células meristemáticas apresentaram características que indicavam intensa atividade mitótica. As citocininas estão envolvidas no processo de formação de meristemas de diversas plantas e participam ativamente do controle da divisão e da diferenciação celular (Peres & Kerbauy 2004). Mercier & Kerbauy (1991) verificaram concentrações de citocininas muito alta em sementes de *E. fulgens* (espécie abordada no atual estudo), sendo 2iP (2-isopenteniladenina) a forma mais abundante, seguida pela zeatina. Ambos os tipos de hormônio, esclareceram os autores, variaram quantitativamente nos protocormos desenvolvidos *in vitro*, dependendo da fonte nitrogenada adicionada ao meio de cultura.

A presença de raiz e do agregado celular em degeneração indicariam o término do estágio de protocormo ou plântula, segundo a interpretação de Alvarez & Sagawa (1965). Para Mariat (1952), o término do estágio de protocormo, se encerraria com o desenvolvimento das primeiras folhas, mas de acordo com Veyret (1974) se estende até estágios posteriores, com a formação da raiz, após o surgimento de várias folhas. Kraus *et al.* (2006) registraram, para *Caseatum pileatum*, o desenvolvimento de sistemas caulinar e radicular com 15 semanas de cultivo, considerando que estas fase já constituía plântula. Em estudos com *C. amethystoglossa*, a formação das raízes ocorreu com 21 semanas após a inoculação; neste período a estrutura basal já não se mostrou mais tuberiforme e a folhas também se apresentaram mais desenvolvidas, fase considerada plântula e não mais protocormo (Liz 2013). As características pós-seminais de *E. fulgens* indicaram o término do estágio de protocormo e início de plântula, quando estavam formadas as folhas e a raiz adventícia, na 13^o semana após inoculação em meio KC e mais tardiamente em MS.

O padrão de desenvolvimento dos protocormos *in vitro*, sugeriu Arditti (1992), deve ser similar ao dos protocormos desenvolvidos *in natura*, exceto pelo crescimento e rapidez no desenvolvimento *in vitro*. Kraus *et al.* (2006) confirmaram isto para o desenvolvimento do protocormo de *Catasetum pileatum*, acrescentando que o fato é similar ao apresentado por outras espécies de orquídeas já estudadas.

Verificou-se nesta pesquisa que o desenvolvimento inicial de *E. fulgens* segue um padrão similar aos modelos postulados para outras espécies de Orchidaceae. O embrião imaturo foi definido como proembrião na fase globular. A germinação decorreu do intumescimento do proembrião que rompeu a testa, originando um protocormo. O protocormo mostrou-se bipolar, com domo, originando ápice caulinar, e centro de quiescência, que não resulta em ápice radicular por sofrer degeneração, mas formaram-se rizóides na base do protocormo. O surgimento de raízes adventícias determinou a transformação do protocormo em plântula. Histologicamente, o protocormo desenvolve-se gradativamente em ambos os meios KC e MS, embora em KC seja mais precoce o término do estágio de protocormo e início de plântula, em comparação ao meio MS.

Figura 4. Histogênese de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Secções longitudinais de semente (**A**) e protocormos (**B-G**), da 1ª a 4ª semana após inoculação, observados em microscopias óptica (MO). **A.** Semente, envolta por testa, contendo o proembrião constituído por túnica e corpo, conectado a região basal o suspensor. Indicando a região onde originará o domo (seta branca) e ápice radicular (seta preta). **B.** Após 1ª semana de inoculação, em meio MS, proembrião apresenta bipolaridade distinta; junto ao suspensor, a hipófise e centro de quiescência. **C.** Protocormo cordiforme apresentando o domo com evidências de intensa divisão celular, em oposto o centro de quiescência, hipófise e suspensor (KC em **C** e MS em **D**, 2ª sem.). **E.** Secção longitudinal do protocormo, em meio KC na 3ª semana após inoculação, rompe-se a testa, o protocormo ainda cordiforme e no domo inicia-se a formação de saliência pontiaguda no ápice caulinar (KC em **E** e MS em **F**, 3ª sem.). **G.** Protocormo com formato cônico resultantes do desenvolvimento do ápice caulinar, com a projeção do primórdio foliar, e na base opositora presença de rizóides (MS, 4ª sem.). **Legenda:** te=testa; tu=túnica; c=corpo; su=suspensor; cq=centro de quiescência; hi=hipófise; ri=rizóides; sem=semana; mf=meristema fundamental; pf=primórdio foliar. **Barras:** A=50µm; B-G=100µm.

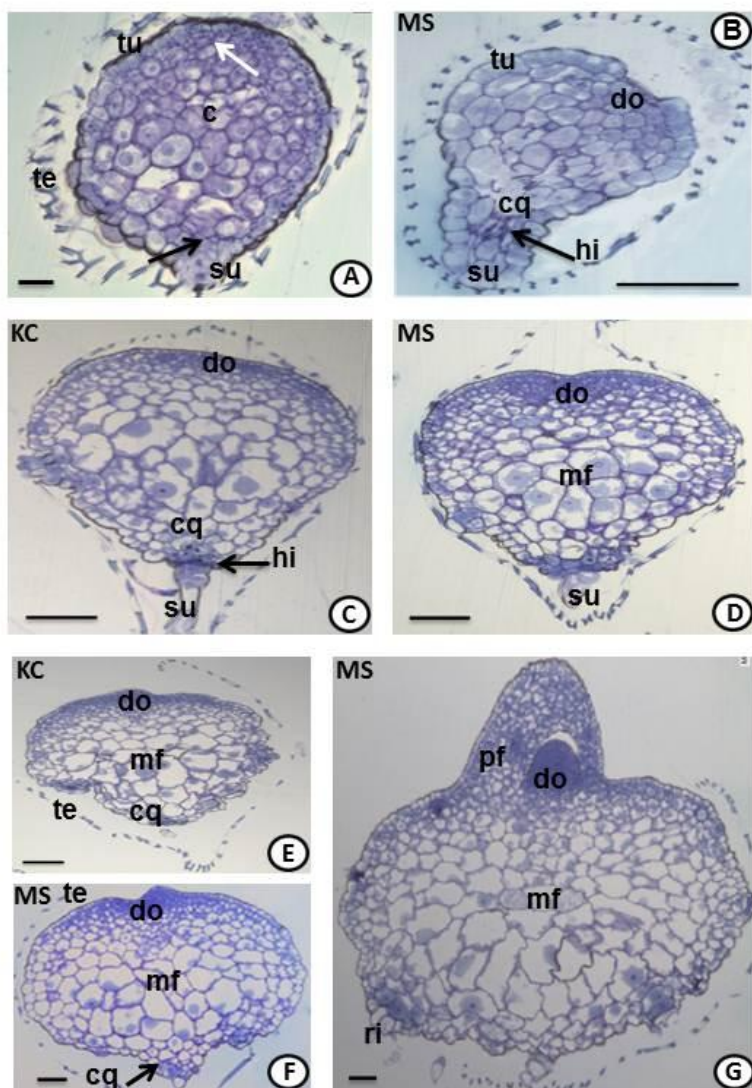


Figura 5. Histogênese de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Secções longitudinais de protocormos, da 5ª a 10ª semana após inoculação, observados em microscopias óptica (MO). **A-B.** Primórdios foliares evidentes e intensa divisão celular no domo; rizóides na base (KC em **A** e MS em **B**, 5ª sem.). **C.** Protocormo mais alongado com células parenquimáticas preenchendo a região central (KC, 8ª sem.). **D.** Surgimento da primeira folha envolvida por uma bainha; tecido provascular conspicuo (MS, 10ª sem.). **Legenda:** pa=parênquima; ri=rizóides; sem.=semana; tpv=tecido provascular; pf=primórdio foliar, fo=folha. **Barras:** 100 µm.

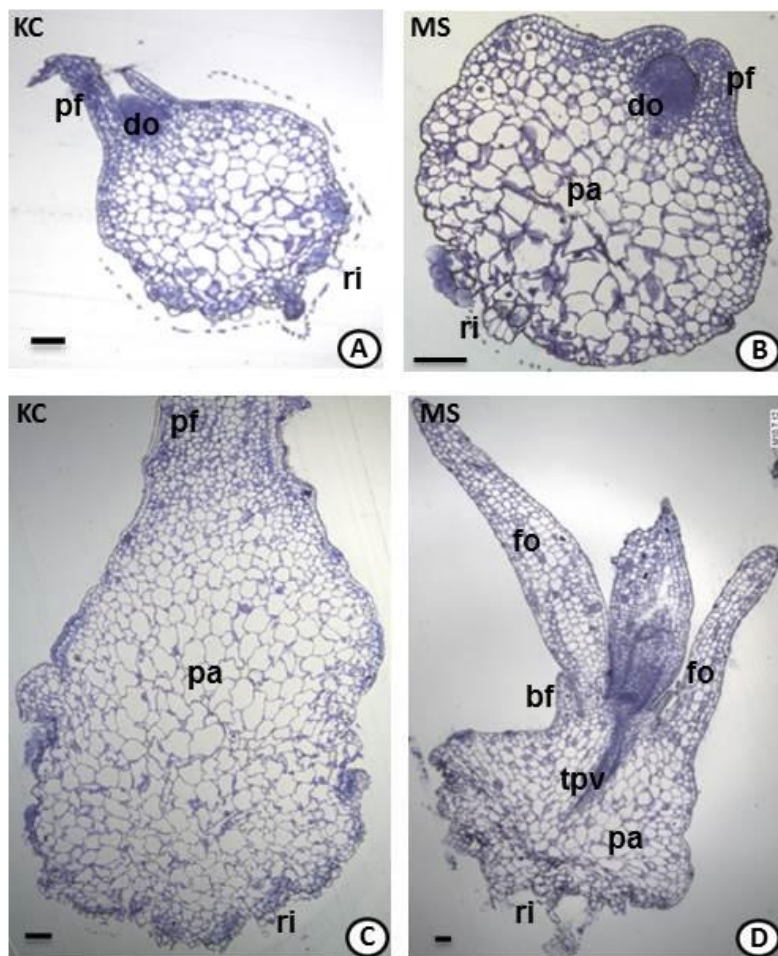
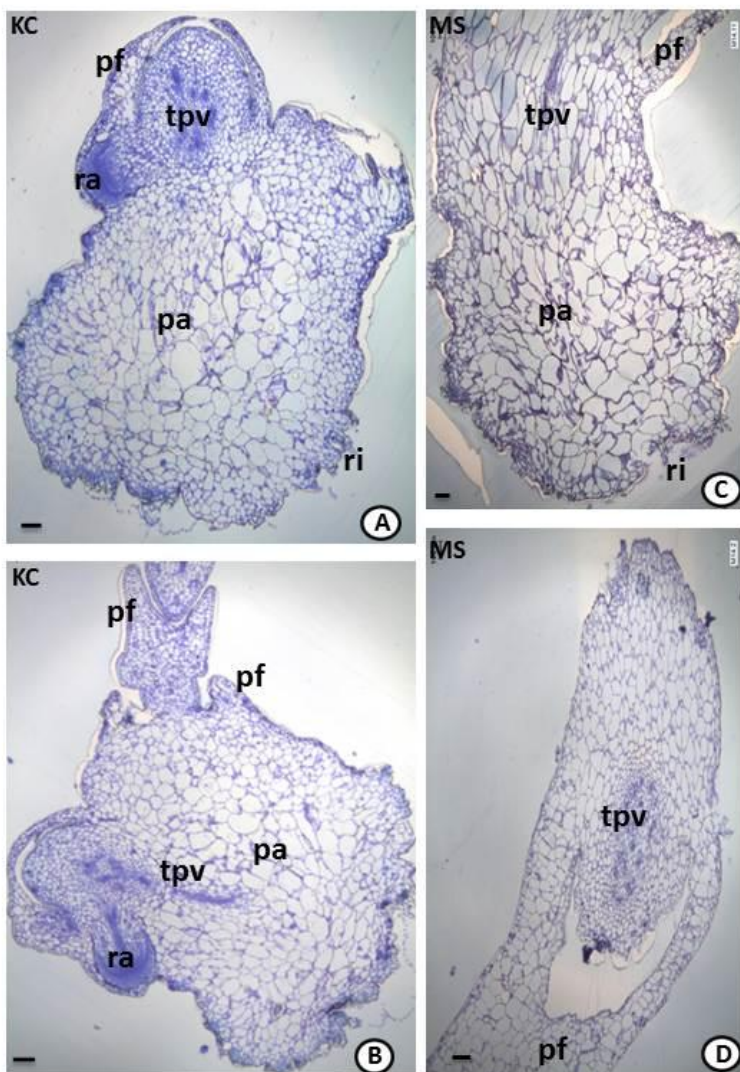


Figura 6. Histogênese de *Epidendrum fulgens* Brong., cultivado *in vitro*, em meios de cultivo Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS). Secções longitudinais (A-C) e transversal (D) de protocormos, da 13^a a 14^a semana após inoculação, observados em microscopias óptica (MO). A-B. Raiz adventícia iniciando formação, tecido provascular conspícuo (KC, 13^a sem.). C-D. Primórdio foliar formado e tecido provascular evidente (MS, 14^a sem.). **Legenda:** pf=primórdio foliar; tpv=tecido provascular; sem.=semana; ra=raiz adventícia; pa=parênquima; ri=rizóides. **Barras:** =100µm.



CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos, do cultivo *in vitro* de *E. fulgens* servem de modelo para o entendimento dos processos de desenvolvimento característico de Orchidaceae.

Estruturas morfológicas e histológicas oriundas dos processos germinativos e desenvolvimento pós-seminal de *E. fulgens*, *in vitro*, a partir da inoculação das sementes em meios distintos, Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS), até a formação de plântula, foram evidenciadas nesta pesquisa.

Os dados obtidos referentes à morfologia e histologia de sementes de *E. fulgens* corroboram com as demais orquídeas. A semente apresenta um proembrião, ou seja, um embrião imaturo na fase globular, que se caracteriza por células meristemáticas que constituem a túnica unisseriada delimitando o corpo.

A germinação em *E. fulgens*, morfo-histologicamente inicia-se pela embebição e intumescimento da semente que acarreta o rompimento do tegumento seminal e a liberação do proembrião.

O proembrião de *E. fulgens* germina, originando o protocormo, até caracterizar-se estruturalmente como uma plântula.

Os resultados de germinabilidade de *E. fulgens* revelaram que o percentual de germinação no meio KC (60,59%) foi maior do que em meio MS (40,74%). Os meios de cultivo com fontes de nitrogênio adequadas podem influenciar a germinação e desenvolvimento vegetal. O meio MS apresenta maior concentração de amônia e nitrato que o meio KC. *Epidendrum fulgens* habita ambientes geralmente oligotróficos, devido ao fato de apresentar-se na forma epifítica, rupícola ou terrestre, o que pode ser relacionado ao meio pouco nutritivo. Isto remete à necessidade de estudar a melhor composição nutricional para cada espécie.

O desenvolvimento dos protocormos de *E. fulgens* não ocorre de forma homogenia nos diferentes tratamentos (KC e MS), ou seja, há distinção temporal, porém mostram similaridade morfológica nas sucessivas fases do desenvolvimento. As sementes de *E. fulgens* apresentaram disparidade entre os tratamento no período de rompimento da

testa, início da fase de protocormo e da fase de plântula. Sementes inoculadas em meio KC, na 2^o semana, apresentaram o rompimento da testa e a liberação do proembrião caracterizando a fase de protocormo, enquanto que o mesmo ocorreu em MS na 3^o semana após inoculação. Em *E. fulgens*, morfológicamente, na 13^o semana após a inoculação, em meio KC foram observadas primórdios foliares bem desenvolvidos e raízes adventícias. Porém, os protocormos na 14^o semana, em meio MS, também exibiram raízes adventícias e primórdios foliares, caracterizando o término do protocormo.

Enfatiza-se a necessidade de pesquisas do âmbito fisiológico, visando o desenvolvimento de protocolos para cultivo *in vitro* e a comparação da influência da composição do meio e atuação deste no desenvolvimento ao nível histológico. O desenvolvimento de técnicas *in vitro*, depara-se com a necessidade de realizar pesquisas relacionadas à germinação, morfologia e histologia de orquídeas, a fim de promover o aperfeiçoamento de biotecnologias que visem à preservação e conservação da biodiversidade. A pesquisa é a base da inovação, essencial ao desenvolvimento econômico e a geração de riqueza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrão, M.C.R.; Jorge, J.; Pescador, R.; Ferreira, W.M. & Suzuki, R. M. 2014. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, **12**: 141-147.
- Alonso, A.A. & Moraes-Dallaqua, M.A. 2004. Morfoanatomia do sistema caulinar de *Canna edulis* Kerr-Gawler (Cannaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, **27**: 229-239.
- Alvarez, M.R. & Sagawa, Y. 1965. A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). **Caryologia**, **18**: 251-261.
- Alvarez-Pardo, V.M.; Ferreira, A.G. & Nunes, V.F. 2006. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira**, **24**: 217-220.
- Andrade, A.C.S.; Cunha, R.; Souza, A.F.; Reis, R.B. & Almeida, K.J. 2003. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. **Seed Science & Technology**, **31**: 125-137.
- Araújo, A.G.; Pasqual, M.; Rodrigues, F.A.; Carvalho, J.G. & Zarraga, D.Z.A. 2009. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, **31**: 35-39.
- Arditti, J. & Ernest, R. 1993. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons: 640p.
- Arditti, J. & Ernst, R. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti, J. **Orchid biology reviews and perspectives**. University Press, **3**: 179-222.
- Arditti, J. & Ghani A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, **145**: 367-421.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review**, **33**: 1-97.

- Arditti, J. 1980. Aspects of the Physiology of Orchids Aspects of the physiology of orchids. **Advances in botanical research**, **7**: 421-655.
- Arditti, J. 1992. **Fundamentals of orchid biology**. New York, John Wiley & Sons: 898 p.
- Arteca, R.D. 1996. **Plant growth substances: principles and applications**. New York; Chapman & Hall: 332 p.
- Barabé, D.; Saint-Arnaud, M. & Lauzer, D. 1993. Sur la natureza des protocormes d'Orchidées (Orchidaceae). **Comptes rendus de l'Académie des sciences**, **316**: 139-144.
- Barros, F. 1990. Diversidade Taxonômica e Distribuição Geográfica das Orchidaceae Brasileiras. **Acta Botânica Brasílica**, **4**: 177-187.
- Barros, F.; Vinhos, F.; Rodrigues, V.T.; Barberena, F.F.V.A. & Fraga, C.N. 2010. Orchidaceae. In: R.C. Forzza, *et al.* (org.). **Catálogo de plantas e Fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, **2**: 1344-1426.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 2001. Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic Press: 598.
- Baskin, J.M. & Baskin, C.C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, **14**: 1-16.
- Batygina, T.B.; Bragina, E.A. & Vasilyeva, V.E. 2003. The reproductive System and Germination in Orchids. **Acta Biologica Cracoviensia**, **45**: 21-34.
- Benzing, D. H. 1990. **Vascular epiphytes: general biology and related biota**. New York: Cambridge University: 354 p.
- Bernard, N. 1903. La germination des orchidées. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, **137**: 483-485.
- Bernard, N. 1909. L'évolution dans la symbiose, les orchidées et leur champignons commensaux. **Annales des Sciences Naturelles, Botanique**, **9**: 1-196.

- Bewley, J.D. & Black, M. 1994. Seeds: physiology of development and germination. **Plenum Press**: 445 p.
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, **9**:1055-1066.
- Borghetti, F. 2000. **Ecofisiologia da germinação das sementes**. Universa, 8:149- 180.
- Brasil. 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: 365 p.
- Buyun, L.; Lavrentyva, A.; Kovalska, L. & Ivannikov, R. 2004. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. **Acta Universitatis Latviensis, Biology**, **676**: 159-162.
- Cabral, A. 2004. **Produção de mudas de *Epidendrum mosenii* Rchb. F. (Orchidaceae) a partir de organogênese *in vitro***. Trabalho de conclusão de Curso de Ciências Biológicas. Centro de Ciências da Terra e do Mar Universidade do vale do Itajaí, Itajaí.
- Cameron, K. & Chase, M. 1998. Seed morphology of *Vanilloid* Orchids (Vanilloideae: Orchidaceae). **Lindleyana**, **13**: 148-169.
- Campos, D.M. de. 1998. **Orquídeas: manual prático de cultura**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura: 143 p.
- Campos, D.M. de. 2004. Cultura *in vitro* simplificada. **O Mundo das Orquídeas**, **36**: 52-53.
- Castro, R.D.; Bradford, K.J. & Hilhorts, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. *In*: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. **Germinação: do Básico ao Aplicado**. Artmed: 149-162.
- Champagnat, M., 1977. Recherches sur la multiplication vegetative de *Neottia nidus-avis*. **Annales des sciences naturelles: Botanique et biologie végétale**, **12**: 209-248.
- Clements, M.A. 1999. Embryology. *In*: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. **Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae**. Oxford: Oxford University Press: 38-58.

- Costa, M.A.P.; Pereira, M.J.; Rocha, M.A.; Hansen, D.S.; Alves, R.M.O.; Souza, E.H. & Garcia, F.R. 2009. Micropropagação de Orquídeas. *In: Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: 351-370.
- Cribb, P.J. 1999. Morphology. *In: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J. & Chase, M.W. Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae*. Oxford: Oxford University Press: 13-23.
- Davies, P.J. 1994. **Plant hormones: their role in plant growth and development**. New York: Nijhoff Publishers: 678p.
- Dimalla, G.G. & Van Staden, J. 1977. The effect of temperature on the germination and endogenous cytokinin and gibberellin levels of *Pecan nuts*. *Z. Pflanzenphysiol*, **82**: 274-280
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge, Cambridge University Press. 341p.
- Dressler, R.L. 2005. How many orchid species? *Selbyana*, **26**: 155-158.
- Dutra, D.; Kane, M.E. & Richardson, L. 2009. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **96**: 235-243.
- Esau, K. 1974. **Anatomia das plantas com sementes**. Tradução: Berta Lange Morretes: 6-22.
- Faria, R.T.; Assis, A.M.; Unemoto, L.K. & Carvalho, J.F.R.P. 2012. **Produção de orquídeas em laboratório**. Editora Mecnas: 216 p.
- Fenner, M. & Thompson, K. 2005. **The ecology of seeds**. Cambridge University Press: 260 p.
- Ferreira, W.M. & Suzuki, R.M. 2008. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. *In: Loiola, M.I.B.; Baseia, I.G. & Lichston, J.E. Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*: 67-68.

- Finch-Savage, W.E. & Leubner-Metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501-523.
- Fosket, D.E. 1994. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego, Academic Press: 580 p.
- Gell, J. A. 2002. **Desenvolvimento inicial de três espécies amazônicas de Orchidaceae em diferentes condições de cultivo: aspectos morfo-anatômicos**. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A. 1998. Micropropagação. *In*: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, Embrapa-CBAB**, 1: 183-260.
- Groff, P.A. & Kaplan, D.R. 1988. The relation of root systems to shoot systems in vascular plants. **The Botanical Review**, 54: 387-422.
- Guerra, M.P.; Torres, A.C.; Teixeira, J.B. 1999. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. *In*: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, Embrapa-CBAB**, 2: 533-568.
- Gutierrez, M.A.M. 2001. O cultivo de orquídeas *in vitro* a partir de sementes. **Arquivos da Associação Paranaense para o Desenvolvimento do Ensino da Ciência**, 5: 12-13.
- Hadley, G. & Harvais, G. 1968. The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of Orchids pupurella. **New Phytologist**, 67: 44.
- Harrison, C. R. 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette**, 138: 41-45.
- Hew, C.S. & Clifford, P.E. 1993. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. **Plant Growth Regulation**, 13: 231-239.
- Hietz, P. 1998. Diversity and conservation of epiphytes in a changing environment. **International Union of Pure Applied**

- Chemistry. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, **70**: 2114
- Hooley, R. (1994) Gibberellins: perception, transduction and responses. **Plant Molecular Biology**, **26**: 1529-1555.
- Horrige, G.A. & Tamm, S.L. 1969. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science**, **163**: 817-818.
- Hossain, M.M. 2008. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, **7**: 3614-3619.
- IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acessado em 01.jan.2015.
- Kanashiro, S.; Ribeiro, R.C.S.; Gonçalves, A.N.; Dias, C.T.S. & Jocys, T. 2007. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, **34**: 59-66.
- Kauth, P.J., Vendrame, W.A. & Kane, M.E. 2006. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogontuberosus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **85**: 91-102.
- Kelly, K.M.; Van Staden, J. & Bell, W.E. 1992. Seed coat structure and dormancy. **Plant Growth Regulation**, **11**: 201-209.
- Kennedy, D. 2006. **Life on a human dominated planet. State of the planet 2006–2007**. Washington: The American Association for the Advancement of Science: 216 p.
- Kerbaudy, G. B. 2004. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kerbaudy, G. B. 2008. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 431 p.
- Kerbaudy, G.B. 1999. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. & Buso, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, **2**: 519-531.

- Kersten, R.A. 2010. Epífitas vasculares – Histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. **Hoehnea**, **37**: 9-38..
- Knudson, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, **73**: 1-25.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, **15**: 214-217.
- Kohl, H.C. 1962. Notes on the development of *Cymbidium* from seed to plantlet. **American Orchid Society Bulletin**, **31**: 117-120.
- Kraus, J.E.; Kerbauy, G.B. & Monteiro, W.R. 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. F. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, **33**: 177-184.
- Labouriau, L.G. 1983. **A germinação de sementes**. Washington: Organização dos Estados Americanos. Monografias Cientificas: 170p.
- Leroux, G.; Barabé, D. & Vieth, J. 1997. Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, **205**: 53-72
- Liz, R.D.D. 2013. **Elucidação da morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de espécies de *Cattleya* Lindl. Micropropagadas**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Lugo, A.E. & Scatena, F.N. 1992. Epiphytes and climate change research in the Caribbean: a proposal. **Selbyana**, **13**: 123-130.
- Manning, J.C. & Van Staden, J. 1987. The development and mobilisation of seed reserves in some African orchids. **Australian Journal of Botany**, **35**: 343–353.
- Mariat, M.F. 1952. Rêchêrches sur la physiologie des embryons d'orchidées. **Revue Générale de Botanique**, **59**: 324-377.

- Martini, P.C.; Willadino, L.; Alves, G.D. & Donato, V.M.T.S. 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **36**: 1319-1324.
- Mayer, J.L.S.; Carmello-Guerreiro, S.M. & Appezzato-da-Glória, B. 2011. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, **206**: 601-609.
- Mayer, J.L.S.; Carmello-Guerreiro, S.M. & Appezzato-da-Glória, B. 2011. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, **206**: 601-609.
- McKendrick, S. 2000. Manual para la germinación *in vitro* de Orquídeas. Quito: **Ceiba Fundación para la Conservación Tropical**, 143p.
- Medeiros, A.C. de S. 2001. **Aspectos de dormência em sementes de espécies arbóreas**. Circular Técnica EMBRAPA, **55**: 12p.
- Melo, F.P.L.; Aguiar-Neto, A.V.D.; Simabukuro, E.A. & Tabarelli, M. 2004. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. *In*: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed: 238-250.
- Melo, M.F.F. & Varela, V.P. 2006. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, germinação e plântulas de duas espécies florestais da Amazônia *Dinizia excelsa* Ducke (Angelim Pedra) e *Cedrelinga catenaeformis* Ducke (Cedrorana) Leguminosae: Mimosoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, **28**: 54-62.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B. 1991. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, **138**: 195-199.
- Mercier, H. 2004. Auxinas. *In*: G.B. Kerbauy. **Fisiologia vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 217-249.
- Miyoshi, K. & Mii, M. 1995. Phytohormone pré- treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the

- terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, **63**: 263-267.
- Miyoshi, K. & Mii, M. 1995. Phytohormone pré- treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, **63**: 263-267.
- Moreira, A.S.F.P.; Fuhro, D. & Isaias, R.M.dos.S. 2008. Anatomia floral de *Epidendrum fulgens* Brongn. (Orchidaceae-Epidendroideae) com ênfase no nectário e sua funcionalidade. **Revista Biology Neotropical**, **5**: 23-29.
- Müller, C. 2011. *Epidendrum fulgens* – Orquídea-da-praia. In: Coradin, L.; Siminski, A. & Reis, A. 2011. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul**, Ministério do Meio Ambiente: 934p.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, **15**: 473-497.
- Nishimura, G. 1981. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. **Botanical Gazette**, **142**: 306-365.
- O'Brien, T. P.; Feder, N. & McCully, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, **59**: 368-373.
- Oliveira, D.M.T. 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de *Phaseoleae*, *Sophoreae*, *Swartzieae* e *Tephrosieae*. **Revista Brasileira de Botânica**, **24**: 85-97.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasilienses**. Hilde -sheim: Brücke-Verlag, Kurt Schmersonw, **1**: 408p.
- Pasqual, M.; Figueiredo, M.A.; Rezende, J.C.; Araújo, A.G.; Santos, F.C.; Ferreira, E.A. & Junqueira, K.P. 2009. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Horticultura Brasileira**, **27**: 211-216.

- Pasqual, M. & Pinto, J.E.B.P. 1988. **Cultura de embriões**. Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas: 2-12.
- Pedroso-de-Moraes, C.; Santos, N.S.; Massaro, R.& Leal, T.de.S. 2009. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio de Ciência, Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, **13**: 57-65.
- Pereira, M.C.; Torres, D.P.; Guimarães, F.A.R.; Pereira, O.L. & Kasuya, M.C.M. 2011. Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de **Epidendrum secundum** Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero Epulorhiza. **Acta Botânica Brasilica**, **25**: 534-541.
- Peres, L.E.P. & Kerbauy, G.B. 2004. Citocininas. *In*: G.B. Kerbauy. **Fisiologia vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 250-278.
- Peres, L.E.P. 1998. **Relações hormonais endógenas envolvidas na conversão direta de ápices radiculares isolados de *Catasetum fibriatum* Lindl. (Orchidaceae) em protocormóides**. Tese (Doutorado em Ciências na Área da Botânica). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Peres, L.E.P. 2002. Bases Fisiológicas e Genéticas da Regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, **25**: 44-48.
- Philip, V. J.; Nainar, S. A. Z. 1988. Structural Changes During the *in vitro* Germanation of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, **61**: 139-145.
- Pilatti, F.K.; Aguiar, T.; Simões, T.; Benson, E.E. & Viana, A.M. 2011. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, **47**: 82-98.
- Pridgeon, A.M. Cribb, P.J. Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. 2005. **Genera Orchidacearum, v. 4.Epidendroideae (part 1)**. Oxford University Press, New York: 696p.

- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J. & Chase, M.W. 1999. **Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae**. Oxford University Press, Oxford: 197p.
- Ramos, M.S.S. 1969. **A orquídea e sua reprodução por semente**. São Paulo: Saraiva: 163p.
- Rasmussen, F.N. 1985. Orchids. In: R.M.T. Dahlgren; H.T. Clifford & P.F. Yeo (eds.). **The families of the Monocotyledons**. Berlin, Springer-Verlag: 249-274.
- Reinert, R. A. & Mohr, H. C. 1967. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, **91**: 664-671.
- Ribeiro, M.C.; Metzger, J.P.; Martensen, A.C.; Ponzoni, F. & Hirota, M.M., 2009. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, **142**: 1141-1153.
- Richards, D.E. *et al.* 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic of gibberellin signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, **52**: 67-88.
- Rodrigues, M.A. & Kerbauy, G.B. 2009. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, **36**: 525-549.
- Ruzin, S.E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. New York: Oxford University Press: 334p.
- Sakuta, M.; Takagi, T. & Komamine, A. 1987. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiologia Plantarum**, **71**: 459-463.
- Salisbury, F.B., & Ross, C.W. 1992. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth, 682 p.
- Sarasan, V.; Cripps, R.; Ramsay, M.M.; Atherton, C.; McMichen, M.; Predergast, G. & Rowntree, J. K. 2006. Conservation *in vitro*

- threatened plants-progress in the past decade. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***, **42**: 206-214.
- Schneiders, D.; Pescador, R.; Booz, M. R. & Suzuki, R. M. 2012. Germinação, Crescimento e Desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp, Orchidaceae) . **Revista Ceres**, **59**: 185-191.
- Shimura, H. & Koda, Y. 2005. Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* following inoculation after cold treatment. **Physiologia Plantarum**, **123**: 281-287.
- Stancato, G. C. & Faria, R.T. 1996. *In vitro* Growth and Mineral nutrition of the Lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem.(Orchidaceae). **Lindleyana** , **11**: 41-43.
- Stancato, G.C.; Bemelmans, P.F & Vegro, C.L.R. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, **7**: 25-33.
- Stancik, J.F.; Goldenberg, R. & Barros F. de. 2009. The genus *Epidendrum* L. (Orchidaceae) in Paraná State, Brazil. **Acta Botânica Brasilica**, **23**: 864-880.
- Stenberg, M.L. & Kane, M.E. 1998. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, and endangered Florida orchid. **Lindleyana**, **13**: 101-112.
- Stewart, J. 1989. Orchid propagation by tissue culture techniques - past, present and future. *In*: H.W. Pritchard (ed.). **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press, Cambridge: 147-183.
- Stewart, S.L. & Kane, M.E. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **PlantCell Tissue Organ Culture**, **86**: 147-158
- Suzuki, R.M.; Almeida, V.; Pescador, R. & Ferreira, W.DE M. 2010. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, **37**: 731-742.

- Suzuki, R.M.; Moreira, V.C.; Nakabashi, M. & Ferreira, W.M. 2009. 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**, **36**: 657-666.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre; Artmed: 782 p.
- Treub, M. 1890. Études sur les Lycopodiacees. **Annales du Jardin botanique de Buitenzorg**, **8**: 1-37.
- Unemoto, L. K.; Faria, R. T.; Vieira, A. O. S. & Dalio, R. J. D. 2007. *In vitro* propagation of Brazilian orchids on a simplified culture medium. **Revista Brasileira Agrocência**, **13**: 267-269.
- Veyret, Y. 1974. Development of the embryo and young seedling stages of orchids. *In*: Withner, C. L. (ed.). **The orchids: scientific studies**. New York: John Wiley & Sons: 223-265.
- Voges, J.G.; Benevenuto, R.F.; Fritsche, Y. & Guerra, M.P. 2014. Protocorm development of *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae) in response to different saline formulations and culture conditions. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, **36** : 287-292.
- Wachowicz, C.M. & Carvalho, R.I.N. 2002. **Fisiologia vegetal. Produção e pós- colheita**. Curitiba: 423 p.
- Waechter, J. L. 1996. Epiphytic orchids in eastern subtropical South America. *In*: **15th World Orchid Conference**, 1998, Rio de Janeiro. Proceedings. Turriers. Naturalia: 332-341.
- Wareing, P.F. 1992. Determination and related aspects of plant development. *In*: Smith, H. & Grienson, D. The molecular biology of plant development. **Botanical monographs, Oxford: Bachwell Scientific**, **18**: 517-541.
- Yam, T.W. & Arditti, J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reports**, **3**: 1-56.
- Yamaguchi, S. & Kamiya, Y. 2002. Gibberellins and lightstimulated seed germination. **Journal of Plant Growth Regulation**. New York: 369-376.

- Yamazaki, J. & Miyoshi, K. 2006. *In vitro* Asymbiotic Germination of Immature Seed and Formation of Protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). **Annals of botany**, **98**: 1197-1206.
- Zaidan, L.B.P. & Barbedo, C.J. 2004. Quebra da dormência em sementes. In: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. **Germinação: do Básico ao Aplicado**. Artmed: 135-146.