

Maria Inajal Rodrigues da Silva das Neves

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS NATIVAS DE ALAGOAS
Prosthechea fragrans e Maxillaria splendens

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias
Curso de Graduação em Agronomia
Rio Largo, Estado de Alagoas
2010

Maria Inajal Rodrigues da Silva das Neves

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUIDEAS NATIVAS DE ALAGOAS
Prosthechea fragrans e Maxillaria splendens

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Alagoas, como parte
dos requisitos para obtenção do Título de
Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Leila de Paula Rezende

Rio Largo, Estado de Alagoas
Fevereiro de 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE
CURSO



ATA DE REUNIÃO DE BANCA EXAINADORA DE DEFESA DE TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 11 (onze) dias do mês de Fevereiro do ano de 2011, às 14h00min (quatorze) horas, sob a Presidência do (a) Professor (a) Profª Drª Leila de Paula Rezende, em sessão pública na sala do BIOVEG, do Centro de Ciências Agrárias, km 85 da BR 104 Norte, Rio Largo-AL, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “**PROPAGAÇÃO IN VITRO DE ORQUIDEAS NATIVAS DE ALAGOAS *Prosthechea fragrans e Maxillaria splendens***” do (a) aluno (a) **MARIA INAJAL RODRIGUES DA SILVA DAS NEVES**, sob matrícula **2007G0121**, requisito obrigatório para conclusão do Curso de Agronomia, assim constituída: Profª Drª Leila de Paula Rezende, CECA/UFAL (orientador); Profº. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos, CECA/UFAL e Esp. Amanda Pereira Silva, CECA/UFAL. Iniciados os trabalhos, foi dado a cada examinador um período máximo de 30 (trinta) minutos para a argüição ao candidato. Terminada a defesa do trabalho, procedeu-se o julgamento final, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de argüição: Profª Drª Leila de Paula Rezende, nota ____ (_____), Profº. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos, nota ____ (_____) e Profº MSc., nota ____ (_____). Apuradas as notas, o candidato foi considerado **APROVADO**, com média geral ____ (_____). Na oportunidade o candidato foi notificado do prazo de máximo de 30 (trinta) dias, a partir desta data, para entregar a Coordenação do Trabalho de Conclusão de Curso, devidamente protocolada, da versão definitiva do trabalho defendido, em 4 (quatro) vias, impressas e encadernadas e uma cópia digitalizada em CD com as correções sugeridas pela Banca, sem o que está avaliação se tornará sem efeito, passando o aluno a ser considerado reprovado. Nada mais havendo a tratar, os trabalhos foram encerrados para a lavratura da presente ATA, que depois de lida e achada conforme, vai assinada por todos os membros da Banca Examinadora, pelo coordenador (a) do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) e pelo coordenador (a) do Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo/AL, 11 de Fevereiro de 2011.

1º _____ Examinador

. Profª Drª Leila de Paula Rezende (Orientador)

2º _____ Examinador

Profº. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos

3º _____ Examinador

Esp. Amanda Pereira Silva

Coordenador do TCC

Profª Drª Roseane Cristina Prêdes Trindade

Coordenador do Curso de Agronomia

Profª Drª Leila de Paula Rezende

Ofereço

*Aos meus pais, José Edson Rodrigues das
Neves e Marlene Rodrigues da Silva das Neves;
Aos meus amigos, em especial à Lívia Oliveira
de França e Sérís Darlley dos Santos;
Ao meu tio Everaldo de Oliveira Messias;*

Dedico

A Deus pelo dom da vida, por sempre me proporcionar força para lutar pelos meus ideais;

*Aos meus pais, José Edson Rodrigues das Neves e Marlene Rodrigues da Silva das Neves;
pelos ensinamentos durante minha vida;*

*Às minhas irmãs, Danúbia Malvina da Silva das Neves, Camila Rodrigues da Silva das
Neves e Maria Joaquina do Nascimento Rocha; pela amizade e amor dividido em todas as
etapas de minha vida;*

*Às minhas amigas, Sérís Darlley dos Santos, Lívia de Oliveira de França e Marylia Gabriella
Silva Costa; pessoas especiais em minha vida;*

*A todos que fizeram parte da minha vida e que me apoiaram de maneira singular para esta
realização;*

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Federal de Alagoas pela oportunidade de me acolher durante esses anos;

Ao Prof. Dr^a. Leila de Paula Rezende, pela orientação, amizade e dedicação durante todos esses anos;

A todos os professores da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias que diretamente proporcionaram conhecimento para minha formação;

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BIOVEG): Taciana de Lima Salvador, Tatiana de Lima Salvador, Amanda Pereira Silva, Lamartine Ferreira Júnior, Luiz Sérgio Costa Duarte Filho, Marcondes Inácio da Silva e Maria Quitéria Cardoso dos Santos pela amizade e momentos felizes;

Aos amigos de sala, Daniel Gonçalves da Silva Borges, Leonardo da Silva, Thiago Alexandre, Djison Silvestre e Marylia Gabriella Silva Costa, pelos momentos divididos, pela luta cotidiana, por nossa grande amizade;

A todos os demais que dividi momentos inesquecíveis e que me ajudaram diretamente e indiretamente, pela amizade e companhia, e aos que nos deixaram no meio do caminho, Deus abençoe vocês!

A Lívia Oliveira de França, por todos os momentos inesquecíveis e pela amizade sincera, que DEUS te guarde junto a ele amiga;

A todos que contribuíram de alguma forma para execução deste trabalho: obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	04
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	06
2.1 Família Orchidaceae.....	06
2.2 Classificação por habitat.....	07
2.3 Utilização comercial.....	07
2.4 Importância da cultura de Tecidos.....	08
2.5 Propagação <i>in vitro</i>	08
2.6 Meios de cultura.....	09
2.7 Aclimação de orquídeas.....	09
3 CAPÍTULO 1.....	11
Metodologia.....	11
Resultados.....	13
Conclusões.....	17
4 CAPÍTULO 2.....	18
Metodologia.....	18
Resultados.....	20
Conclusões.....	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Orquídea *Prosthechea fragrans*, flores com segmentos brancos com veios púrpuras no labelo (A) e orquídea *Maxillaria splendens* (B). 7
- Figura 2.** Cápsulas maduras de orquídea *Prosthechea fragrans* 12
- Figura 3.** Efeito das concentrações de BAP no comprimento dos brotos (A) e no número de brotos (B) dos explantes de *Prosthechea fragrans*, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). 15
- Figura 4.** Efeito das concentrações de IBA no número de raízes de *Prosthechea fragrans* nos explantes provenientes dos meios Knudson C e MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). 16
- Figura 5.** Efeito das concentrações de IBA no comprimento médio das raízes de *Prosthechea fragrans*, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). 17
- Figura 6.** Cápsulas maduras de orquídea *Maxillaria splendens* 19
- Figura 7.** Efeito das concentrações de BAP no comprimento dos explantes (A), no número de brotos (B) e no comprimento dos brotos (C) dos explantes de *Maxillaria splendens*, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). 22
- Figura 8.** Efeito das concentrações de IBA no número de raízes de *Maxillaria splendens* nos explantes cultivados nos meios Knudson C e MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). 23
- Figura 9.** Efeito das concentrações de IBA no comprimento médio das raízes de *Maxillaria splendens*, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). 23
- Figura 10:** Interação entre os meios de cultura e a concentração de IBA no comprimento de raízes. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo da análise de variância das características comprimento dos explantes, número e comprimento médio de brotos de <i>Prosthechea fragrans</i> produzidos, aos 30 e 60 dias após a instalação do experimento.	14
Tabela 2. Resumo da análise de variância para número e comprimento médio das raízes dos explantes de <i>Prosthechea fragrans</i> cultivados nos meios Knudson C e MS, aos 30 e 60 dias.	15
Tabela 3. Número e comprimento médio das raízes dos explantes de <i>Prosthechea fragrans</i> cultivados nos meios Knudson C e MS, aos 30 e 60 dias.	16
Tabela 4. Resumo da análise de variância das características comprimento dos explantes de número e comprimento médio de brotos de <i>Maxillaria splendens</i> produzidos, aos 30 e 60 dias após a instalação do experimento.	20
Tabela 5. Resumo da análise de variância para número e comprimento médio das raízes dos explantes de <i>Maxillaria splendens</i> cultivados nos meios Knudson C e MS, aos 30 e 60 dias após a instalação do experimento.	22
Tabela 6. Número e comprimento médio das raízes dos explantes de <i>Maxillaria splendens</i> cultivados nos meios Knudson C e MS, aos 30 e 60 dias.	23

NEVES, Maria Inajal Rodrigues da Silva, Universidade Federal de Alagoas, Fevereiro de 2011. **Propagação *in vitro* de orquídeas nativas de Alagoas – *Prosthechea fragrans* e *Maxillaria splendens*.**

Orientadora: Leila de Paula Rezende

RESUMO

Em Alagoas existem aproximadamente 140 espécies de orquídeas nativas e híbridas naturais. Dentre estas, as espécies *Prosthechea fragrans* e *Maxillaria splendens* têm atraído à atenção do extrativismo predatório no estado. A micropropagação utilizada na produção de mudas tem contribuído para salvar muitas espécies de extinção. Para compor o banco de matrizes e germoplasma de orquídeas nativas alagoanas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal BIOVEG/CECA/UFAL, estudos têm sido realizados visando estabelecer o protocolo de propagação *in vitro* de cada espécie. Este trabalho teve como objetivo estabelecer o meio de cultura adequado para germinação, multiplicação e enraizamento dos explantes de *P. fragrans* e *M. splendens*. As cápsulas destas espécies foram desinfestadas, abertas e as sementes introduzidas em meio de cultura MS, ½ MS ou Knudson C. As sementes apresentaram uma boa germinação. Após estabelecimento e crescimento, os protocormos foram submetidos a experimentos de multiplicação em meio MS, ½ MS ou Knudson C com adição de 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0, 1, 2 ou 3 mg L⁻¹. Após a multiplicação, os explantes de *P. fragrans* e *M. splendens* foram submetidos a experimentos de enraizamento nos meios MS e Knudson C adicionado com ácido 3-indol butírico (AIB) nas concentrações 0,0; 0,25; 0,5; 0,75 ou 1,0 mg L⁻¹. É viável a germinação de *P. fragrans* e *M. splendens* nos meios de cultura MS, ½ MS ou Knudson C. Quanto ao experimento de multiplicação, a adição de 1,0 mg L⁻¹ de BAP aos meio de cultura aumenta o número de brotos por explantes de *P. fragrans*. Para a espécie *M. splendens*, os maiores comprimento de explantes são observados no meio de cultura MS. No experimento de enraizamento, o meio Knudson C proporciona maiores números e comprimentos de raízes de explantes de *P. fragrans*. A concentração de 0,5 mg L⁻¹ favorece o desenvolvimento das raízes de *P. fragrans*. A espécie *M. splendens* apresenta maior comprimento médio das raízes na concentração 1 mg L⁻¹ de AIB.

Palavras chave: Orchidaceae, Multiplicação, Enraizamento.

1. INTRODUÇÃO

O mercado de orquídeas tem aumentado progressivamente, devido à beleza, exotismo e fragrância de suas flores. Mas, infelizmente no Brasil assim como em outros países o comércio, especialmente de orquídeas nativas, têm como prática a exploração predatória (extrativismo). As espécies nativas são alvo de colecionadores e comerciantes, que as coletam até mesmo em área de reserva. Aliado à degradação ou destruição do seu habitat, principalmente pela expansão da ocupação com áreas agrícolas, este extrativismo ameaça de extinção muitas espécies de orquídeas.

O extrativismo predatório em Alagoas é crescente e agravante, visto que é praticado de forma devastadora. Se nenhuma medida for tomada, ocorrerá a extinção de algumas destas espécies nativas.

Alguns estados brasileiros, visando mudar este cenário, têm se dedicado à conservação de suas espécies de orquídeas nativas, com estudos de conservação de sementes e de plantas *in vitro* e *in vivo*, com implantação de matrizeiros, etc. Muitos orquidófilos têm feito o caminho contrário, devolvendo a natureza espécies cultivadas em sementeiras.

Técnicas de propagação e multiplicação *in vitro* têm possibilitado ampla comercialização e a reintrodução de orquídeas em seu habitat. As orquídeas são reproduzidas massivamente em laboratório a partir de sementes, geralmente atingindo a maturidade em dois a quatro anos. Espécies raras e ameaçadas vêm sendo reproduzidas com sucesso por alguns estabelecimentos, o que tem contribuído para salvar espécies de orquídeas da extinção (BELO, 2007; ALTAFIN et al., 2002; STANCATO et al., 2001; MARTINI et al., 2001).

As orquídeas micropropagadas são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. Segundo Menezes et al. (2004), Alagoas possui cerca de 601.429 ha de unidades de conservação federais, estaduais e municipais distribuídas em APAs, reservas e parques.

Em 2006, foi proposto a Implantação do Banco Germoplasma *in vitro* e *in vivo* de orquídeas nativas alagoanas, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Este Banco Germoplasma

visa abrigar e conservar o maior número possível de espécies de orquídeas nativas, podendo se tornar uma referência para a região Nordeste e se constituir em um matrizeiro destinado ao fornecimento de material propagativo.

A micropropagação de orquídeas sempre exige um ajuste da técnica em função das peculiaridades de cada espécie e/ou híbridos existente (STANCATO et al., 2001). Diversas formulações de meios básicos, assim como diferentes concentrações e/ou combinações de fitorreguladores, fungicidas e antibióticos têm sido utilizadas nos meios de cultura, visando a adequá-los às necessidades de cada espécie vegetal para seu cultivo *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Os meios de Murashige & Skoog, Vacin & Went e Knudson C modificados ou não são os mais utilizados para as orquídeas. Experimentos realizados ao longo de anos vêm evidenciando que, dentro da família Orchidaceae, as condições de cultivo são específicas para os gêneros e algumas vezes para espécies pertencentes ao mesmo gênero (MARTINI et al., 2001).

A produção massal de mudas de orquídeas nativas alagoanas não apenas permitirá a reintrodução e o repovoamento das áreas de preservação pública ou privada, mas contribuirá para a redução do extrativismo que ocorre em diferentes regiões do Estado de Alagoas.

As orquídeas *Prosthechea fragrans* e *Maxillaria splendens* encontram-se entre as espécies nativas de Alagoas que estão sendo introduzidas no banco germoplasma *in vitro* de orquídeas nativas do Laboratório de Biotecnologia do CECA/UFAL. Estas orquídeas têm atraído à atenção do extrativismo predatório no Estado, justificando a importância da multiplicação *in vitro* destas espécies para manutenção no banco germoplasma e a reintrodução nas áreas de preservação.

Este trabalho teve como objetivo a introdução, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *P. fragrans* e *M. splendens* para compor o banco germoplasma de espécies de orquídeas nativas da Mata Atlântica alagoana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Orchidaceae

As orquídeas são classificadas como plantas vasculares herbáceas e perenes, pertencentes à família Orchidaceae, sendo provavelmente a maior entre as plantas superiores. Estão descritas aproximadamente 35.000 espécies distribuídas em 2.500 gêneros (DOCHA NETO, 2005). Mas, essa classificação vem sofrendo mudanças constantes devido às pesquisas de filogenia.

Em Alagoas estão listadas no Brazilian Orchids (ARAÚJO e ARAUJO, 2006) cerca de 140 entre espécies nativas e híbridas naturais dos gêneros: *Aspásia*; *Aspidogyne*; *Barbosella*; *Brassavola*; *Bulbophyllum*; *Campylocentrum*; *Capanemia*; *Catasetum*; *Cattleya*; *Cochleanthes*; *Coryanthes*; *Cyrtopodium*; *Dichaea*; *Dimerandra*; *Dipteranthus*; *Eltroplectris*; *Encyclia*; *Epidendrum*; *Galeandra*; *Gomesa*; *Gongora*; *Huntleya*; *Ionopsis*; *Isochilus*; *Jacquinilla*; *Leochilus*; *Lygyophila*; *Lockarthia*; ***Maxillaria***; *Mesadanella*; *Miltônia*; *Notylia*; *Octomeria*; *Oeceoclades*; *Oncidium*; *Orleanesia*; *Phargmipedium*; *Pleurothallis*; *Polystachya*; *Prescottia*; ***Prosthechea***; *Psygmorchis*; *Reichenbachantus*; *Rodriguezia*; *Sacoila*; *Sandarella*; *Sarcoglottis*; *Scaphyglottis*; *Schomburgkia*; *Sobralia*; *Sophronitis*; *Stanhopea*; *Stellis*; *Stenorrhynchus*; *Trichocentrum*; *Trigonidium*; *Vanilla*; *Xylobium* e *Zygostates*.

De acordo com PEREIRA (2000), as flores de *Prosthechea fragrans* (Figura 1A) são graciosas e de porte atraente e exalam agradabilíssimo perfume, confirmando a denominação, pois a fragrância é sua marca característica.

O gênero *Maxillaria* é de extensa dispersão no território alagoano, desde regiões limítrofes com Pernambuco até a Serra do Ouro, em Murici-AL (PEREIRA, 2000). A espécie *Maxillaria splendens* Poepp. & Endl. 1836 (Figura 1B) é uma planta de fácil cultivo em substratos diversos e constitui um apreciável ornamento, mesmo não estando florida.

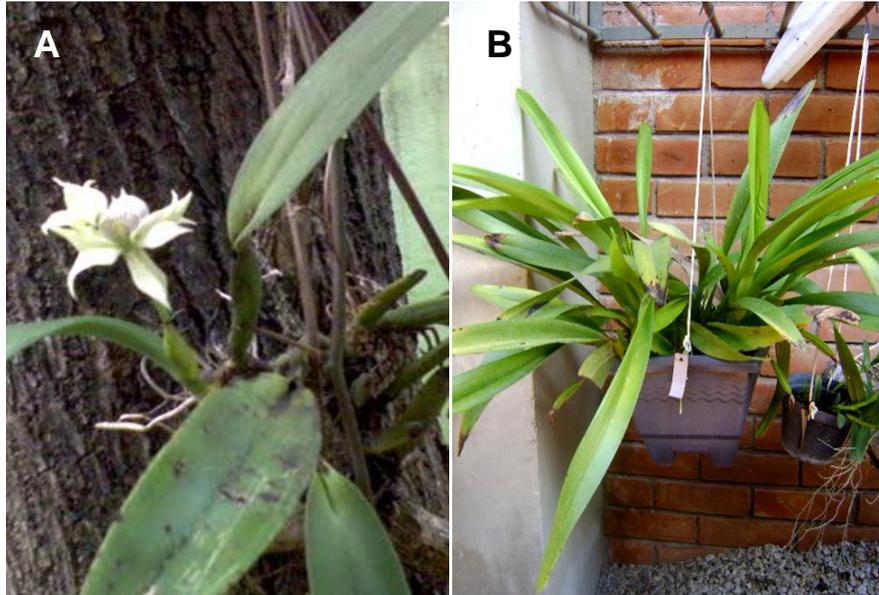


Figura 1. Orquídea *Prosthechea fragrans*, flores com segmentos brancos com veios púrpuras no labelo (A) e orquídea *Maxillaria splendens* (B).

2.2. Classificação por habitat

A família Orchidaceae é composta de plantas monocotiledôneas, com cerca de 35 mil espécies naturais e aproximadamente 65 mil híbridos. As orquídeas vegetam em diversos ecossistemas, sendo encontradas em florestas, campos, cerrados, caatingas, dunas, restingas, tundras e até mesmo em margens de desertos. De acordo com seu hábitat podem ser: epífitas, as que vivem sobre troncos, galhos e gravetos das árvores; terrestres, as encontradas nos solos das matas, campos e até mesmo na areia pura das dunas e restingas; rupícolas e saxícolas, as que vegetam sobre ou entre as rochas; e as orquídeas subterrâneas (saprófitas), são mais raras, plantas aclorofiladas que se alimentam de matéria orgânica em decomposição (TOSCANO e MORAES, 2002).

As orquídeas possuem grande variação quanto ao hábito de crescimento e ao habitat de ocorrência. Conforme Toscano e Moraes (2002), as orquídeas vegetam em diversos ecossistemas, sendo encontradas em florestas, campos, cerrados, caatingas, dunas, restingas, tundras e até mesmo em margens de desertos.

2.3. Utilização comercial

No Brasil, o comércio de orquídeas para flores de corte e plantas de vaso e jardins tem aumentado progressivamente, devido sua beleza e durabilidade. Infelizmente, no Brasil

assim como em outros países, o cultivo e comércio de orquídeas nativas tem como prática a exploração predatória (extrativismo).

Algumas orquídeas são comercializadas não apenas por sua beleza, mas devido ao uso na alimentação humana. A mais importante é a baunilha, como são conhecidas algumas espécies do gênero *Vanilla*, largamente utilizadas na aromatização de bolos, sorvetes, balas e doces. Outro exemplo é o Salepo, um líquido turvo, rico em mucilagem e de sabor adocicado, extraído das raízes tuberosas de algumas espécies, sendo utilizado, na Pérsia e Turquia, no preparo de uma saborosa bebida quente e também como espessante para sorvetes. Alguns atribuem propriedades medicinais ao Salepo, que usualmente é empregado no tratamento da diarreia e como afrodisíaco (TOSCANO e MORAES, 2002).

2.4. Importância da cultura de Tecidos

No estágio atual da biotecnologia vegetal o domínio das técnicas de cultura de tecidos teve uma importância crucial, contribuindo não apenas sob o ponto de vista de aplicações práticas, mas também na elucidação de muitas questões básicas relacionadas com a biologia, fisiologia, bioquímica e genética de plantas (WITHERS, 1982). Apesar do muito que já foi realizado na cultura de tecidos vegetais, existem muitos desafios a serem superados com conhecimento e idéias engenhosas que possam efetivamente encontrar soluções para muitos problemas que ocorram na agricultura (GAMBORG, 1982)

Mediante o emprego racional de suas técnicas, a cultura de tecidos pode tanto propiciar a produção comercial contínua de milhares e milhares de mudas de alta qualidade e com a fidelidade genética mantida, aspectos também fundamentais para a conservação *in vitro* de germoplasma, como gerar variabilidade, tão importante para o melhoramento genético. E, assim, em interação essencial no atendimento à crescente demanda de alimentos que ocorre no mundo.

2.5. Propagação *in vitro*

A cultura de tecidos é freqüentemente utilizada para a propagação clonal em massa de híbridos e espécies de orquídeas, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária em curto período de tempo (ARDITTI e ERNST, 1993).

Atualmente, técnicas de propagação e multiplicação têm possibilitado ampla comercialização e a reintrodução de espécies em seu habitat. As orquídeas são facilmente reproduzidas artificialmente em laboratório a partir de sementes, geralmente atingindo a maturidade em dois a quatro anos. Espécies raras e ameaçadas vêm sendo reproduzidas com sucesso por alguns estabelecimentos (BELO, 2007).

A propagação *in vitro* tem como vantagens, a produção de um grande número de mudas em curto espaço de tempo quando comparado com métodos tradicionais, sendo estas com alta qualidade fitossanitária. A diminuição do tempo de produção destas mudas se torna de grande importância, pois algumas espécies que atingem maturidade apresentando o primeiro florescimento com 5-7 anos podem chegar a florescer com 3-4 anos de idade. Uma produção massal de mudas também é muito interessante, uma vez que naturalmente as sementes de orquídeas apenas germinam quando ocorre a interação simbiótica com certos gêneros de fungos. Na propagação *in vitro* as sementes são colocadas em condições ideais para germinarem e não se faz necessário a simbiose com o fungo. A produção de mudas isenta de doenças é uma das vantagens mais expressivas da micropropagação, pois as plantas sadias produzidas possuem maior vigor fisiológico apresentando uma maior capacidade de desenvolver melhor florescimento (ALTAFIN et al., 2002).

A semeadura *in vitro* de orquídeas ou cultura assimbiótica, constitui técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e também ecológico, visto que proporciona maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos, simbiontes muitas vezes espécie-específicos (MARTINI et al., 2001).

2.6. Meios de cultura

A micropropagação de orquídeas sempre exige um ajuste da técnica em função das peculiaridades de cada espécie e/ou híbridos existente (STANCATO et al., 2001). Diversas formulações de meios básicos, assim como diferentes concentrações e/ou combinações de fitorreguladores, fungicidas e antibióticos têm sido utilizadas nos meios de cultura, visando a adequá-los às necessidades de cada espécie vegetal para seu cultivo *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Os meios de Murashige & Skoog, Vacin & Went e Knudson C modificados ou não são os mais utilizados para orquídeas. Experimentos realizados ao longo de anos vêm evidenciando que, dentro da família Orchidaceae, as condições de cultivo são específicas para os gêneros e algumas vezes para espécies pertencentes ao mesmo gênero (MARTINI et al., 2001).

2.7. Aclimação de orquídeas

O processo de aclimatização consiste em retirar as plântulas da condição *in vitro* e transferi-las para a condição *ex vitro* (casa de vegetação), controlando os fatores que possam limitar o seu desenvolvimento, como temperatura, luminosidade, umidade, substrato

e nutrientes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Geralmente, plântulas cultivadas *in vitro* geralmente apresentam características morfofisiológicas diferentes quando comparadas àquelas que cresceram diretamente no campo ou em casa de vegetação, fator responsável pela sua baixa taxa de sobrevivência *ex vitro* (COLOMBO et al., 2005).

No processo de aclimatação, o número de raízes nas plantas propagadas *in vitro* é de grande importância, pois possibilita uma maior porcentagem de sobrevivência dos explantes (plântulas) na fase *ex vitro* (ORI, 2006). O substrato utilizado neste processo também pode influenciar de forma decisiva no pegamento e qualidade das mudas. Existe uma diversidade de substratos, mas seu sucesso depende da espécie e do tipo de ambiente onde se pretende cultivá-la (COOKE, 1999). Além dos substratos de origem vegetal, tais como esfagno, casca de pinus, piaçava e xaxim, dos substratos de origem mineral, como pedra brita, argila expandida rígida, vermiculita, tijolo, carvão vegetal e dos sintéticos, como isopor (poliestireno expansível) e espuma fenólica, os quais são utilizados apenas como suporte para as plantas, a fibra de coco (desfibrada ou prensada) e o pó de coco são considerados os substratos alternativos mais promissores (COLOMBO et al., 2005). A fibra de coco é um material disponível no Estado de Alagoas.

CAPITULO 1

MICROPROPAGAÇÃO DE *Prosthechea fragrans* (Sw.) W. E. HIGGINS (1997 publ. 1998)

METODOLOGIA

1. Localização

O presente trabalho foi realizado no período de agosto de 2008 a julho de 2009, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal – BIOVEG do Centro de Ciências Agrárias – CECA/UFAL, localizado em Rio Largo-AL, a 9° 27' 57" latitude S, 34° 50' 1" longitude W e 127m de altitude.

2. Coleta, preparo e inoculação do material vegetal

Cápsulas maduras de *Prosthechea fragrans* (Figura 2) foram coletadas em orquídea cultivada no BIOVEG em Maceió – AL, posteriormente, foram desinfestadas de acordo com a seguinte sequência:

- Lavagem por 2 minutos em água destilada com 3 gotas de detergente Tween 80;
- Lavagem por 1 minuto em solução de 100 mL de álcool;
- Imersão por 30 minutos em solução de 50 mL de água sanitária comercial (2,5% de hipoclorito de sódio) e 50 mL de água estéril;
- Imersão por 20 minutos em solução de 60 mL de água sanitária comercial (2,5% de hipoclorito de sódio) e 40 mL de água estéril;
- E lavagem em água estéril por três vezes.

Após desinfestação, dentro da câmara de fluxo laminar, as cápsulas foram abertas e as sementes inoculadas em frascos de vidro transparente contendo o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), ½ MS (metade das concentrações dos macro e micronutrientes do MS) ou Knudson C modificado (Morel, 1965).

O meio MS foi enriquecido com 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo o meio Knudson C com 20 g L⁻¹ de sacarose. Todos os meios de cultura foram gelificados com 11 g L⁻¹ de Ágar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos.



Figura 2. Cápsulas maduras de orquídea *Prosthechea fragrans*.

Os explantes introduzidos nos frascos de vidro contendo meio de cultura foram cultivados em câmara de crescimento a temperatura de 25^o±2^oC e intensidade luminosa de 20 µmol/m²/s.

3. Crescimento e multiplicação dos explantes

Utilizou-se um explante por frasco contendo meios MS, ½ MS ou Knudson C para a orquídea *P. fragrans* adicionados de 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações 0,0; 1,0; 2,0 ou 3,0 mg L⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 3 x 4 (três meios de cultivo e quatro concentrações de BAP), com doze tratamentos e cinco repetições.

As avaliações foram feitas aos 30 e 60 dias após a instalação, sendo avaliado o comprimento dos explantes originais, o número de brotos por explante e o comprimento médio dos brotos. Com a verificação de enraizamento, analisou-se também o número e o comprimento médio de raízes por explante.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a comparação de médias, realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o programa ESTAT¹.

4. Enraizamento dos explantes

Após experimentos de multiplicação, os explantes de *P. fragrans* foram submetidos a experimentos de enraizamento nos meios MS (Murashige & Skoog, 1962) ou Knudson C modificado (Morel, 1965) adicionado com ácido 3-indol butírico (IBA) nas concentrações 0,0; 0,25; 0,5; 0,75 ou 1,0 mg L⁻¹.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 5 (dois meios de cultivo e cinco concentrações de AIB), totalizando dez tratamentos com seis repetições.

As avaliações foram realizadas após 30 e 60 dias da instalação do experimento, sendo avaliados o número e o comprimento médio de raízes por explante.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a comparação de médias, realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o programa ESTAT.

RESULTADOS

1. Germinação das sementes

Após três meses da introdução em meio MS, ½ MS e Knudson C, observou-se, em todos os frascos, a germinação das sementes as quais apresentavam minúsculos pseudobulbos, ou seja, protocormos. O tempo de germinação varia de acordo com o gênero ou espécie e até mesmo de acordo com o meio de cultura analisado. Enquanto que, plântulas de *Gongora quinquenervis*, no mesmo período apresentavam aproximadamente 50 mm de altura (MARTINI et al., 2001).

¹ Sistema para Análises Estatísticas: v. 2.0 do Pólo Computacional/Depto. Ciências Exatas – UNESP/FCAV – Campus de Jaboticabal.

2. Crescimento e multiplicação dos explantes

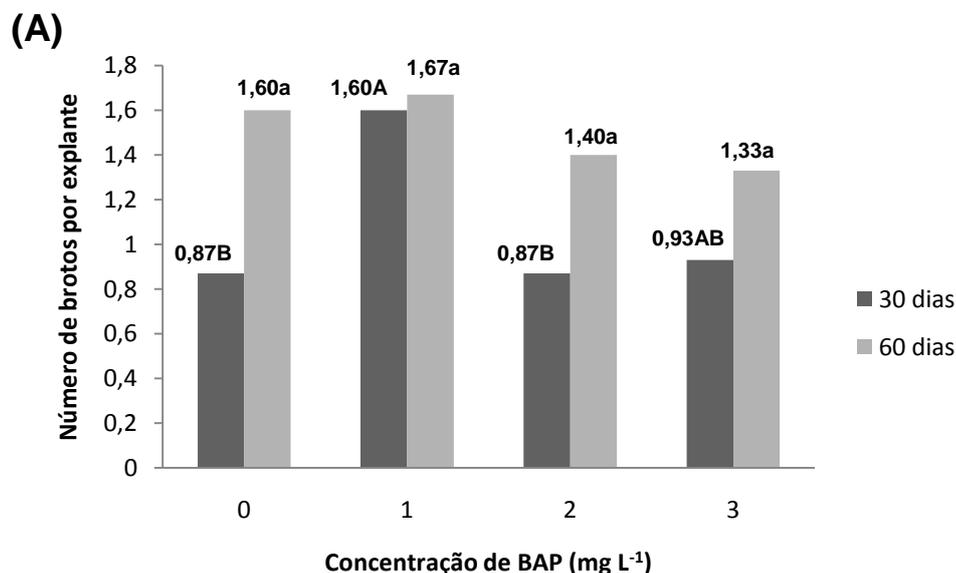
Aos 30 e 60 dias, observou-se que não houve efeito da interação entre os meios de cultura e as concentrações de BAP no comprimento dos explantes originais e no número e comprimento dos brotos emitidos. Contudo, a concentração de BAP afetou o número de brotos aos 30 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância das características comprimento dos explantes, número e comprimento médio de brotos de *Prosthechea fragrans* produzidos, aos 30 e 60 dias após a instalação do experimento.

Causas de Variação	G.L.	Teste de F					
		Comprimento dos explantes originais (cm)		Nº de brotos por explante		Comprimento médio dos brotos (cm)	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Meio de cultura (M)	2	1,75 ^{ns}	2,06 ^{ns}	0,06 ^{ns}	2,87 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,95 ^{ns}
Concentração de BAP	3	1,41 ^{ns}	0,28 ^{ns}	3,20*	0,89 ^{ns}	2,74 ^{ns}	2,98 ^{ns}
M x BAP	6	1,23 ^{ns}	1,52 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,93 ^{ns}	1,42 ^{ns}	0,82 ^{ns}
Resíduo	48						
C.V. (%)		5,47	7,77	18,84	21,67	1,00	2,82

** significativo ao nível de 1% de probabilidade; * significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo. Os dados foram transformados em raiz quadrada ($x + 1$).

O maior número de brotos por explante foi observado nos meios de cultura com adição de 1,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 30 dias (Figura 3A). De acordo com RAMOS e CARNEIRO (2007), a adição de 0,5 mg L⁻¹ de BAP em meio MS proporcionou um acréscimo de 73% na produção de novas brotações, havendo redução pela metade quando suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP.



(B)

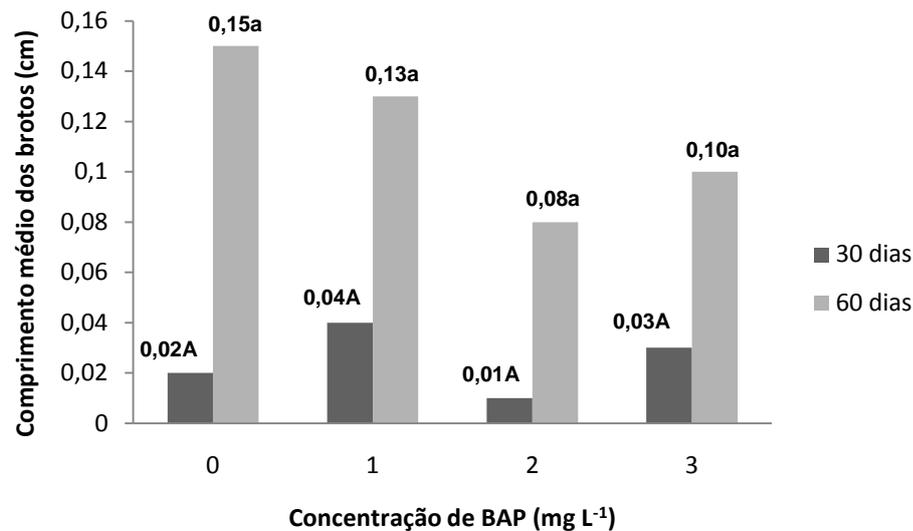


Figura 3. Efeito das concentrações de BAP no comprimento dos brotos (A) e no número de brotos (B) dos explantes de *Prosthechea fragrans*, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

3. Enraizamento dos explantes

Não houve diferença significativa na adição de AIB aos meios de cultura em relação ao número e comprimento de raízes (Tabela 2). Contudo, observaram-se respostas diferentes para os meios de cultura, sendo o meio Knudson C o que proporcionou maiores números e comprimentos de raízes aos 30 e 60 dias (Tabela 3).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para número e comprimento médio das raízes dos explantes de *Prosthechea fragrans* cultivados nos meios Knudson C e MS, aos 30 e 60 dias.

Causas de Variação	G.L.	Q.M.			
		Nº de raiz por explante		Comprimento médio de raiz (cm)	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Meio de Cultura (M)	1	1.37**	1.03*	0.21**	0.03 ^{ns}
Concentração de AIB	4	0.10 ^{ns}	0.40 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.09*
M x AIB	4	0.063 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.019 ^{ns}	0.04 ^{ns}
Resíduo	50				
C.V. (%)		23,30	30,01	11,99	14,77

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ^{ns} não significativo. Os dados foram transformados em raiz quadrada (x + 1).

Com relação às concentrações de AIB (Tabela 2), não houve diferenças para o número de raízes (Figura 4), aos 30 e 60 dias de cultivo. Observaram-se diferenças apenas aos 60 dias, onde obteve maior comprimento de raízes na concentração de 0,5 mg L⁻¹

(Figura 5). O AIB é umas das auxinas mais utilizadas para induzir enraizamento (ORI, 2006). Contudo, pode promover maior número de raízes em associação com outras auxinas (HARTMANN e KESTER, 1983).

Tabela 3. Número e comprimento médio das raízes dos explantes de *Prosthechea fragrans* cultivados nos meios Knudson C e MS, aos 30 e 60 dias.

Meios	Nº de raízes		Comprimento das raízes	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Knudson C	1.53A	1.62A	1.23A	1.22A
MS	1.23B	1.36B	1.10B	1.17A

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

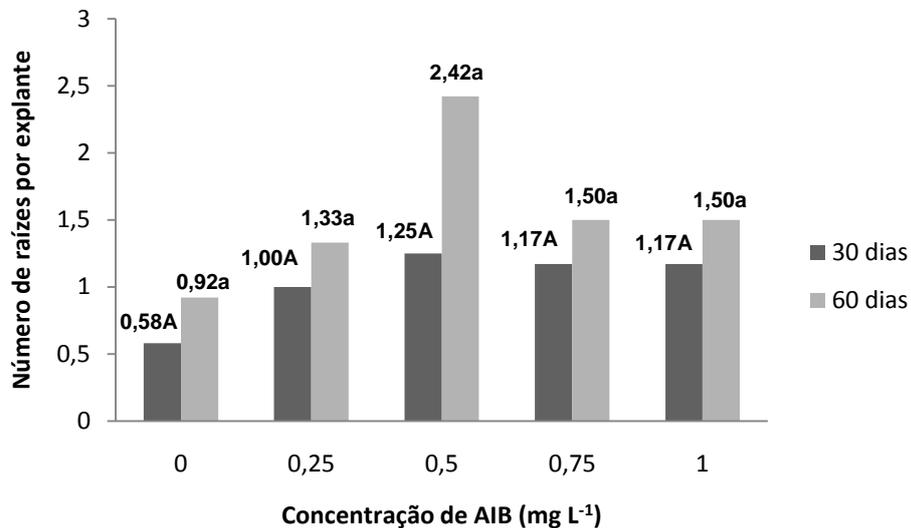


Figura 4. Efeito das concentrações de AIB no número de raízes de *Prosthechea fragrans* nos explantes provenientes dos meios Knudson C e MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

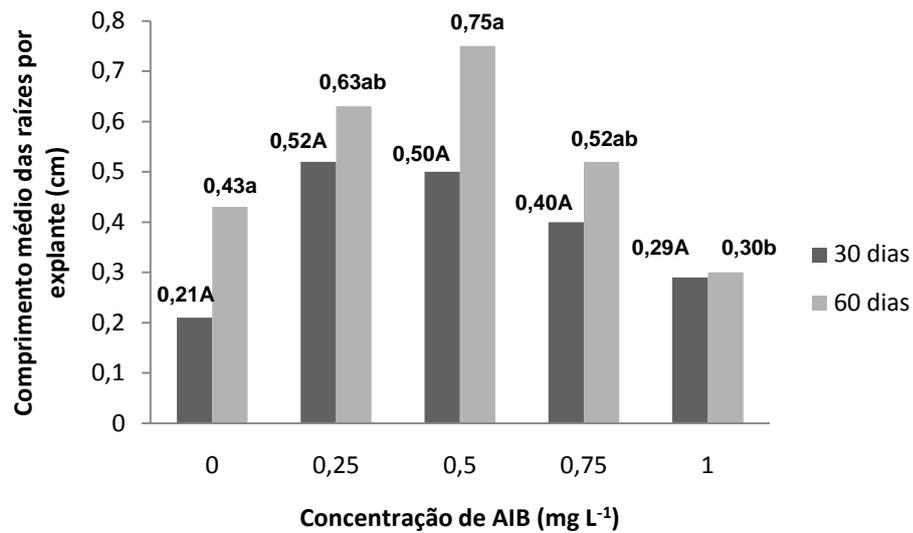


Figura 5. Efeito das concentrações de AIB no comprimento médio das raízes de *Prosthechea fragrans*, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Segundo PERES et al. (1999), o tratamento de explantes de *Catasetum fimbriatum* com AIB favoreceu no comprimento da raiz, retardando a formação de brotos. De acordo com ORI (2006), o número de raízes nos explantes de *Phalaenopsis amabilis* foi estatisticamente igual entre os tratamentos dentro dos períodos de 30, 60 e 90 dias, apenas apresentando diferença significativa aos 120 dias com maior número de raízes sem adição de AIB e na concentração 0,2 mg L⁻¹ de AIB, com menores valores significativos para 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB.

CONCLUSÕES

- É viável a germinação de *Prosthechea fragrans* nos meios de cultura MS, ½ MS e Knudson C.
- Meios de cultura com adição de 1,0 mg L⁻¹ de BAP proporcionam maior número de brotos por explantes de *Prosthechea fragrans*.
- O meio Knudson C proporciona maiores números e comprimentos de raízes de *Prosthechea fragrans*.
- Maiores comprimentos de raízes são obtidos na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de AIB.

CAPITULO 2

MICROPROPAGAÇÃO DE *Maxillaria splendens* POEPP. & ENDL. 1836

METODOLOGIA

1. Localização

O presente trabalho foi realizado no período de agosto de 2008 a julho de 2009, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal – BIOVEG do Centro de Ciências Agrárias – CECA/UFAL, localizado em Rio Largo-AL, a 9° 27' 57" latitude S, 34° 50' 1" longitude W e 127m de altitude.

2. Coleta, preparo e inoculação do material vegetal

Cápsulas maduras de *Maxillaria splendens* (Figura 3) foram coletadas em orquídea cultivada no BIOVEG em Maceió – AL, posteriormente, foram desinfestadas de acordo com a seguinte sequência:

- Lavagem por 2 minutos em água destilada com 3 gotas de detergente Tween 80;
- Lavagem por 1 minuto em solução de 100 mL de álcool;
- Imersão por 30 minutos em solução de 50 mL de água sanitária comercial (2,5% de hipoclorito de sódio) e 50 mL de água estéril;
- Imersão por 20 minutos em solução de 60 mL de água sanitária comercial (2,5% de hipoclorito de sódio) e 40 mL de água estéril;
- E lavagem em água estéril por três vezes.

Após desinfestação, dentro da câmara de fluxo laminar, as cápsulas de *M. splendens* foram abertas no sentido de sua deiscência, utilizando-se pinça e bisturi e as sementes inoculadas em frascos de vidro transparente contendo o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), ½ MS (metade das concentrações dos macro e micronutrientes do MS) ou Knudson C modificado (Morel, 1965).

O meio MS foi enriquecido com 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo o meio Knudson C com 20 g L⁻¹ de sacarose. Todos os meios de cultura foram gelificados com 11 g L⁻¹ de Ágar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos.



Figura 6. Cápsulas maduras de orquídea *Maxillaria splendens*.

Os explantes introduzidos nos frascos de vidro contendo meio de cultura foram cultivados em câmara de crescimento a temperatura de 25⁰±2⁰C e intensidade luminosa de 20 μmol/m²/s.

3. Crescimento e multiplicação dos explantes

Após estabelecimento *in vitro* da espécie, foram instalados os experimentos de multiplicação.

No experimento foi introduzido um explante por frasco contendo meios MS ou ½ MS para a orquídea *M. splendens* adicionados de 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações 0,0; 1,0; 2,0 ou 3,0 mg L⁻¹.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 4 (dois meios de cultivo e quatro concentrações de BAP), com oito tratamentos e cinco repetições.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a comparação de médias, realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o programa ESTAT.

4. Enraizamento dos explantes

Explantes de *M. splendens* com 1,0 ± 0,2 cm de comprimento, obtidos do experimento de multiplicação foram submetidos a experimentos de enraizamento nos meios MS (Murashige & Skoog, 1962) ou Knudson C modificado (Morel, 1965) adicionado com ácido 3-indol butírico (AIB) nas concentrações 0,0; 0,25; 0,5; 0,75 ou 1,0 mg L⁻¹.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 5 (dois meios de cultivo e cinco concentrações de AIB) com dez tratamentos e seis repetições.

As avaliações foram realizadas após 30 e 60 dias da instalação do experimento, sendo avaliados o número e o comprimento médio de raízes por explante.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a comparação de médias, realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o programa ESTAT.

RESULTADOS

1. Germinação das sementes

Após três meses da introdução em meio MS, ½ MS e Knudson C, observou-se, em todos os frascos, a germinação das sementes, apresentando minúsculos protocormos. BACH e CASTRO (2004), observou a germinação de *Cattleya* sp em 30 dias. Segundo KALIMUTHU et al. (2007), existem orquídeas que germinam mais rápido como observado em *Oncidium* sp que germinam dentro de duas semanas.

2. Crescimento e multiplicação dos explantes

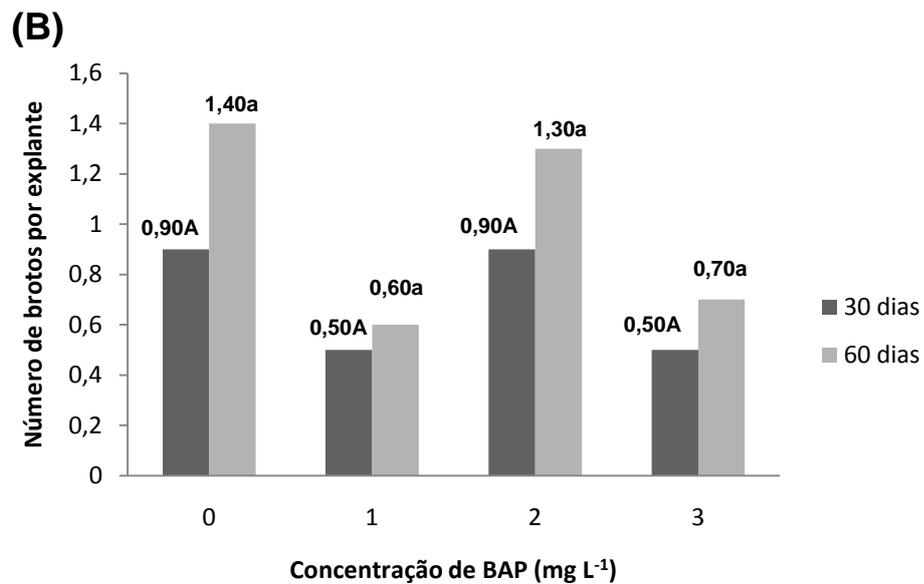
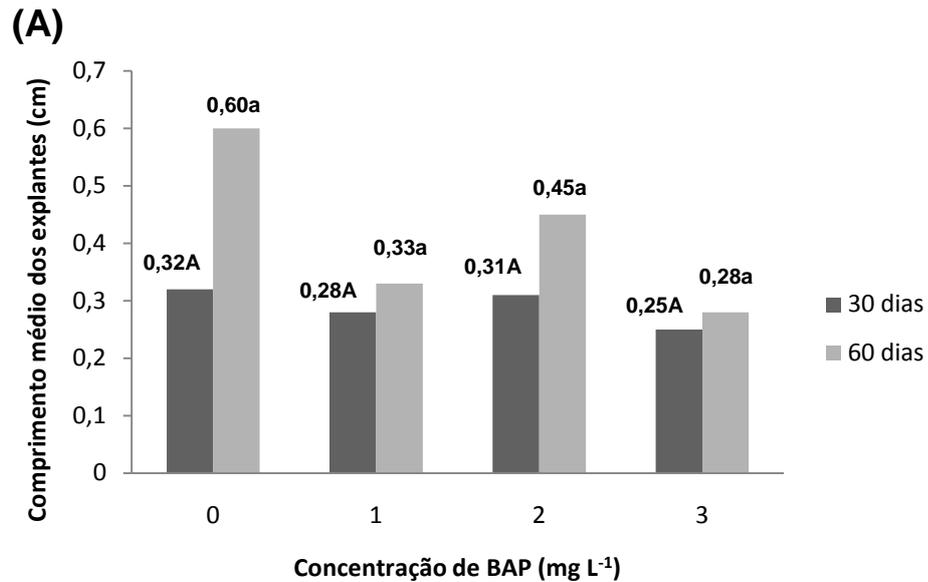
Não houve efeito da interação entre os meios de cultura e as concentrações de BAP no comprimento dos explantes e no número e comprimento dos brotos emitidos, aos 30 e 60 dias (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância das características comprimento dos explantes de número e comprimento médio de brotos de *Maxillaria splendens* produzidos, aos 30 e 60 dias após a instalação do experimento.

Causas de Variação	G.L.	Teste de F					
		Comprimento do explantes originais (cm)		Nº de brotos por explante		Comprimento médio dos brotos (cm)	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Meio de cultura (M)	1	2,36 ^{ns}	2,25 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,26 ^{ns}	1,78 ^{ns}	0,32 ^{ns}
Concentração de BAP (BAP)	3	0,26 ^{ns}	1,01 ^{ns}	0,95 ^{ns}	1,24 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,58 ^{ns}
M x BAP	3	0,37 ^{ns}	0,34 ^{ns}	1,11 ^{ns}	2,72 ^{ns}	0,94 ^{ns}	1,16 ^{ns}
Resíduo	32						
C.V. (%)		7,44	14,03	23,00	25,61	1,08	2,07

** significativo ao nível de 1% de probabilidade; * significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo. Os dados foram transformados em raiz quadrada (x + 1).

Nem os meios e nem as concentrações de BAP tiveram efeito significativo no comprimento dos explantes, número e comprimento de brotos por explante. As concentrações de BAP também não apresentaram efeito no cultivo *in vitro* de orquídea *Cattleya x mesquitae* cuja maior concentração de BAP no meio de cultura, 2,0 mg L⁻¹, mostrou-se prejudicial, promovendo uma redução de 50% na produção de novas brotações (RAMOS e CARNEIRO, 2007).



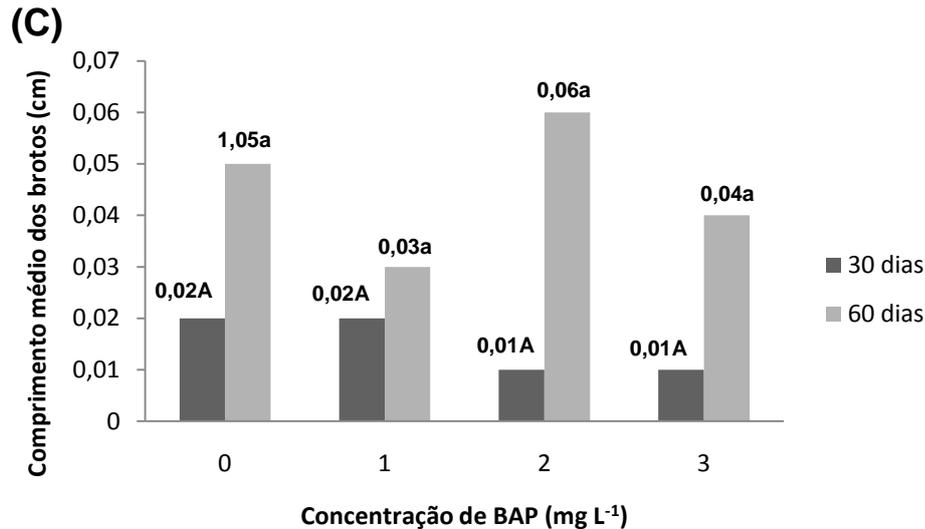


Figura 7. Efeito das concentrações de BAP no comprimento dos explantes (A), no número de brotos (B) e no comprimento dos brotos (C) dos explantes de *Maxillaria splendens*, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

3. Enraizamento dos explantes

Não houve diferença significativa entre os meios de cultura, aos 30 e 60 dias, para o número e comprimento médio das raízes (Tabela 5 e 6). A concentração de AIB não apresentou efeito significativo sobre o número de raízes (Tabela 5 e Figura 8). Quanto ao comprimento médio das raízes observou-se aos 60 dias que a melhor concentração foi de 1 mg L⁻¹ de AIB ao meio MS (Figura 9). Contudo, em híbrido de *Cattleya*, para promover o comprimento médio do sistema radicular, o meio Knudson é inibitório e as vitaminas do meio MS são benéficas (SILVA, 2003).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para número e comprimento médio das raízes dos explantes de *Maxillaria splendens* cultivados nos meios Knudson C e MS, aos 30 e 60 dias após a instalação do experimento.

Causas de Variação	G.L.	Teste de F			
		Nº de raiz por explante		Comprimento médio de raiz (cm)	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Meio de Cultura (M)	1	0,10 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,04 ^{ns}
Concentração de AIB	4	0,04 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,30*
M x AIB	4	0,39 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,09*	0,14 ^{ns}
Resíduo	50				
C.V. (%)		31,68	35,93	15,59	25,93

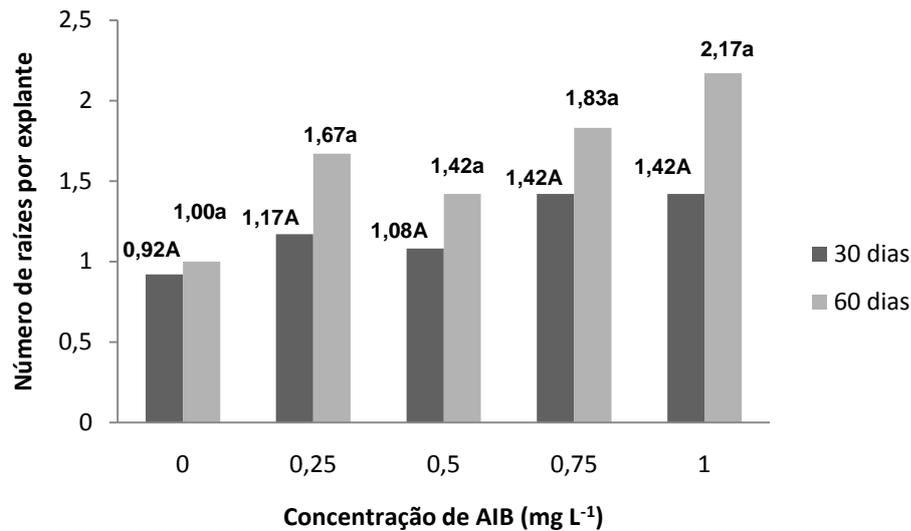
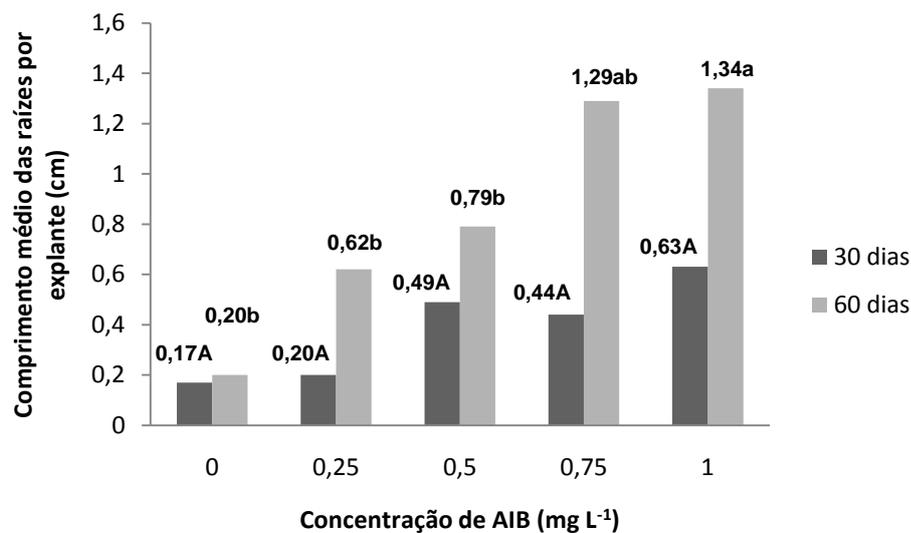
** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ^{ns} não significativo.

Os dados foram transformados em raiz quadrada (x + 1).

Tabela 6. Número e comprimento médio das raízes dos explantes de *Maxillaria splendens* cultivados nos meios Knudson C e MS, aos 30 e 60 dias.

Meios	N° de raízes		Comprimento das raízes	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Knudson C	1.46A	1.56A	1.18A	1.34A
MS	1.37A	1.50A	1.14A	1.29A

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

**Figura 8.** Efeito das concentrações de AIB no número de raízes de *Maxillaria splendens* nos explantes cultivados nos meios Knudson C e MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).**Figura 9.** Efeito das concentrações de AIB no comprimento médio das raízes de *Maxillaria splendens*, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

As auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam consistentemente a formação de primórdios radiculares, pelo menos em tecidos que naturalmente apresentam certa predisposição ao enraizamento (HAISSIG, 1972), contudo as respostas às auxinas não são universais (HARTMANN e KESTER, 1983), ou seja, algumas espécies enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo com a utilização deste tipo de regulador (ORI, 2006).

Houve interação entre os meios de cultura e a concentração de AIB para comprimento de raízes aos 30 dias (Tabela 5 e Figura 10). O comprimento de raízes foi afetado pelo aumento da concentração de AIB no meio MS, sendo o maior comprimento obtido com a adição de 1,0 mg L⁻¹.

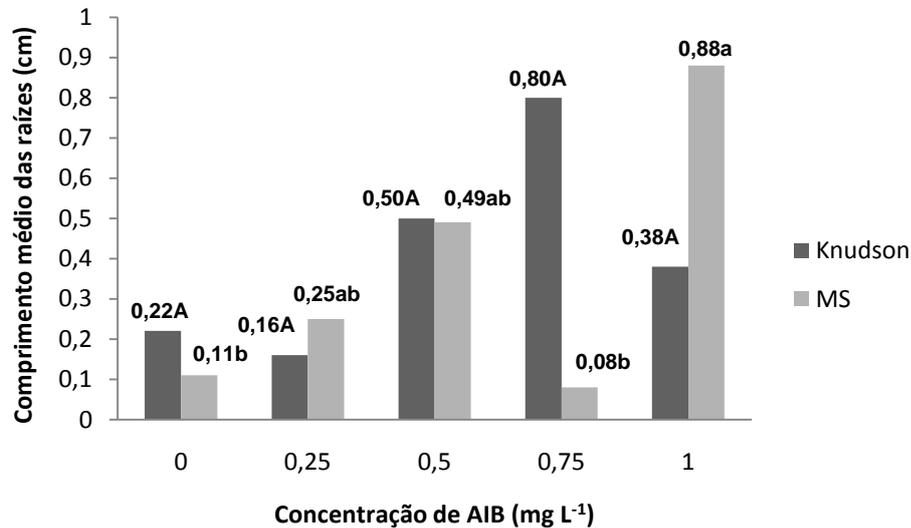


Figura 10. Interação entre os meios de cultura e a concentração de AIB no comprimento de raízes. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

CONCLUSÕES

- É viável a germinação de *Maxillaria splendens* nos meios de cultura MS, ½ MS e Knudson C.
- O meio MS resulta em maiores comprimentos para os explantes de *Maxillaria splendens*.
- A adição de 1 mg L⁻¹ de AIB ao meio MS proporciona maior comprimento médio das raízes de *Maxillaria splendens*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTAFIN, V. L. et al. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal**. Espírito Santo do Pinhal: CREUPI, 2002. 14 p.

ARAÚJO, D.; ARAÚJO, S. História, época de floração, orquídeas por Estado, banco de dados. **Brazilian Orchids**, Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.delfinadearaujo.com/page2br.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2010.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993. 682 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR-10520**: apresentação de citações em documentos. Rio de Janeiro, 1990. 2p.

_____. **NBR-6023**: referências bibliográficas. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

BACH, E. E.; CASTRO, O. L. Germinação de sementes de *Cattleya* sp. (orchidaceae) em cultura de tecido visando produção de mudas. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo. v. 7 (supl.), p.1-749, 2004.

BELO, E. Flor & Cultura. **Barbacena on line**, Barbacena, set 2007. Disponível em: <<http://www.barbacenaonline.com.br/articuliastas/eltonbelo/130907.htm>>. Acesso em: 13 out. 2010.

COLOMBO, L. A. et al. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-150, jan/mar 2005.

COOKE, R. B. Estufas e telados. **Revista Oficial do Orquidário**. Rio de Janeiro, v. 13, n. 3/4, p. 94-101, 1999.

DOCHA NETO, A. Orquídeas: introdução e história. **Mombu The Orquideas Forum**, set 2005. Disponível em: <<http://www.mombu.com/orquideas/attachment.php?attachmentid=8691&d=1146061502>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

GAMBORG, O. L. Callus and cell culture. In: WETTER, L. R.; CONSTABEL, F. (Ed.). **Plant tissue culture methods**. Saskatoon: National Research Council of Canada, 1982. P. 1-9.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. C. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecido de plantas**, Brasília: ABCTP, 1990. p. 99-169.

HAISSIG, B. E. Meristematic activity during adventitious root primordium development. **Influences acid. Plant Physiology**, Bethesda, v.49, p.886-892, 1972.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. 1983. **Plant propagation**: principles and practices, 4 ed., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, 727 p.

MARTINI, P. C. et al. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 36, n. 10, p. 1319-1324, out 2001.

MENEZES, A. F.; CAVALCANTE, A. T.; AUTO, P. C. C. A reserva da biosfera da Mata Atlântica no Estado de Alagoas. **Caderno da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica**, São Paulo, n. 29. 56 p., 2004. Disponível em: <http://www.rbma.org.br/rbma/pdf/Caderno_29.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2010.

ORI, S. S. **Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* (Lineu) Blume (Orchidaceae) cultivada *in vitro***. 2006. 133 f. Mestrado em Biodiversidade Vegetal (Área de concentração – Plantas Vasculares em Análises Ambientais). Instituto de Botânica, São Paulo.

PEREIRA, L. A. **Álbum das Orquídeas de Alagoas**. Maceió: IMA-AL/PETROBRÁS/TRIKEM/GRUPO JOÃO LYRA, 2000. 315p.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. **Revista Universa**, v. 8, n. 1, p. 181-195, mar 1999.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação *in vitro* de *Cattleya x mesquittae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 37, n. 1, p. 10-15, mar 2007.

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya PATORAL x Laeliocattleya AMBER GLOW***. 2003. 62 f. Mestrado em Agronomia (Área de concentração Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2003.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. Campinas, v.7, n.1, p.25-33, 2001.

TOSCANO, L. A. B.; MORAES, M. M. Hábitat, fruto e semente, importância econômica. **Saiba mais sobre as orquídeas**, Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: <<http://www.jbrj.gov.br/saibamais/orquideas>>. Acesso em: 03 jun. 2010.

WITHERS, L. A. Questionare circulated to workers and institutes. In: WITHERS, L. A. (Ed.). **Institutes working on thissue for genetic conservation**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1982. P. 41-43.