



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

JANAINA ALMEIDA GELL

**DESENVOLVIMENTO INICIAL DE TRÊS
ESPÉCIES AMAZÔNICAS DE ORCHIDACEAE
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO:
ASPECTOS MORFO-ANATÔMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de **MESTRE EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**.

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis – SC

Outubro - 2002

Dedico este trabalho:

*A meus pais José (in memoriam)
e Iracilma Gell.*

AGRADECIMENTOS

“A DEUS SOBERANO SOBRE TODAS AS COISAS”

À Profa. Dra. Marisa Santos pela orientação, ensinamentos e dedicação ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pela co - orientação, apoio e disponibilidade de uso do laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal;

À Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, pelo período de afastamento concedido para realização do mestrado;

Aos Senhores Aarão José Borba Pereira e Kátia Chagas, do Setor de Meio Ambiente da Petrobrás -SMA/PA e AM, pelo apoio logístico na Base Petrolífera Pedro Moura/AM e aporte financeiro;

À CAPES pela concessão da bolsa PICDT;

Ao CNPq pelo apoio através do Programa do Trópico Úmido;

Ao Sr. José Torres (Castanhal –PA) pelas informações, e fornecimento do material biológico utilizado neste trabalho;

À Profa. Dra. Clarice L. Leite (Micologia/CCB-UFSC) pelas sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho;

Aos amigos Edilene Góes e Mauro Renan (UFPA), pela amizade incondicional e verdadeira. A vocês meu muito obrigada!

À Andressa Machado pela amizade e auxílio na confecção das pranchas;

À Márcia Stefani (Anatomia/CCB-UFSC) por disponibilizar a câmara fotográfica digital;

À técnica do laboratório de Fisiologia Vegetal / CCA, Maria Luisa Peixoto;

À minha mãe Iracilma, irmãos Karolina, Júlio e Charles, e sobrinha Ana Júlia Gell, pelo amor que nos une.

**DESENVOLVIMENTO INICIAL DE TRÊS
ESPÉCIES AMAZÔNICAS DE *ORCHIDACEAE* EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO:
ASPECTOS MORFO-ANATÔMICOS**

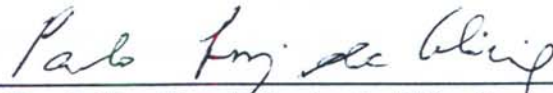
JANAINA ALMEIDA GELL

Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e Membros
da Comissão Examinadora.

Comissão Examinadora:



**Prof.ª Dr.ª. Marisa Santos
BOT/CCB/UFSC**



**Prof. Dr. Paulo Luiz de Oliveira
UFRGS/RS**



**Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato
ENR/CCA/UFSC**

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
ABREVIATURAS USADAS	viii
INTRODUÇÃO.....	1
Revisão bibliográfica.....	6
Morfologia e anatomia das sementes de orquídeas	6
Germinação das sementes e desenvolvimento inicial de plântulas em orquídeas	8
OBJETIVOS.....	16
Objetivo geral	16
Objetivos específicos.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
1. Material botânico	17
2. Caracterização das espécies.....	17
3. Condições para germinação e cultivo	18
3.1. Condição asséptica (cultivo <i>in vitro</i>) – Meio MS ½ e Meio KC	18
3.2. Condição não-asséptica (cultivo <i>ex vitro</i>) –Substrato SA	19
4. Análise quantitativa	19
4.1. Dimensões da semente e do embrião.....	19
4.2. Dimensões da plântula.....	20
4.3. Taxa de germinação.....	20
5. Análise qualitativa	21
5.1. Estrutura macro e microscópica das sementes e das plântulas	21
5.2. Ultra-estrutura das sementes e das plântulas	21
RESULTADOS	26
<i>Cattleya eldorado</i> Linden.....	26
Semente	26
Características morfo-anatômicas.....	26
Germinação.....	26
Plântula	26
14 dias após a germinação	27
28 dias após a germinação	28
42 dias após a germinação	29
56 dias após a germinação	30
70 dias após a germinação	30
<i>Epidendrum imatophyllum</i> Lindle	45
Semente	45
Características morfo-anatômicas.....	45
Germinação.....	46
Plântula	46
14 dias após a germinação	47
28 dias após a germinação	47
42 dias após a germinação	48
56 dias após a germinação	48
70 dias após a germinação	49
Semente	57
Características morfo-anatômicas.....	57

Germinação.....	57
Plântula.....	57
14 dias após a germinação.....	58
28 dias após a germinação.....	59
42 dias após a germinação.....	59
56 dias após a germinação.....	60
70 dias após a germinação.....	60
DISCUSSÃO.....	71
Sementes.....	71
Germinação e desenvolvimento nas diferentes condições de cultivo.....	73
Presença de micorrizas.....	75
Histogênese e Organogênese das espécies a partir da germinação.....	77
CONCLUSÕES.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXO.....	95

RESUMO

Orchidaceae representa uma das maiores famílias dentre as monocotiledôneas. Na região Amazônica, vegetam em vários ecossistemas, apresentando alta diversidade de formas e adaptações, além de acentuado endemismo. Devido à beleza de suas flores e alto valor comercial, destacam-se como componentes florísticos, o que as torna vulneráveis à forte pressão antrópica e predatória. No presente trabalho objetivou-se acompanhar o desenvolvimento morfo-anatômico, em diferentes condições de cultivo (assépticas e não-asséptica), de sementes de orquídeas, desde a germinação até 70 dias de desenvolvimento. Foram utilizadas sementes provenientes de frutos maduros das espécies *Cattleya eldorado* Lindl., *Epidendrum imatophyllum* Lindl. e *Epidendrum schomburgkii* Lindl. cultivadas em meios de cultura assépticos, KC e MS ½, sob condições de sala de crescimento, e em substrato não-asséptico, constituído por sementes de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.), em casa de vegetação. As análises morfo-anatômicas e das dimensões (comprimento e diâmetro) da semente, do embrião e das plântulas (protocormos) desenvolvidas após germinação, foram realizadas com o auxílio de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura. As dimensões das sementes, comprimento e diâmetro, foram de $509\mu\text{m}\pm 71/101\mu\text{m}\pm 20$ (*C. eldorado*); $3369\mu\text{m}\pm 441/278\mu\text{m}\pm 41$ (*E. imatophyllum*) e $6281\mu\text{m}\pm 802/305\mu\text{m}\pm 50$ (*E. schomburgkii*). As espécies apresentaram semente destituída de endosperma. A testa das sementes mostra distinções ultra-estruturais entre as espécies e os embriões são constituídos por uma massa de células indiferenciadas. Os valores médios de comprimento e diâmetro desde a germinação até 70 dias de desenvolvimento revelaram que no substrato não-asséptico, *C. eldorado* e *E. imatophyllum* apresentaram os melhores resultados, com $2857\mu\text{m}/1496\mu\text{m}$ e $2473\mu\text{m}/1368\mu\text{m}$, respectivamente. Para *E. schomburgkii*, quanto ao comprimento médio, o melhor resultado ocorreu no meio asséptico KC ($54920\mu\text{m}$) e o diâmetro médio no substrato não-asséptico ($2039\mu\text{m}$). Independente das condições de cultivo observou-se a diferenciação de procâmbio, variando o período de ocorrência com a espécie. Nas três espécies observou-se a presença de micorrizas, mas apenas nas plântulas crescendo no substrato constituído por sementes de açaí. Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam a eficiência do substrato não-asséptico usado e abrem perspectivas para novos estudos enfocando o desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* da germinação de Orchidaceae, conduzindo a várias questões específicas que merecem ser investigadas.

ABSTRACT

Orchidaceae represents one of the largest families among the monocotyledons. In the Amazonic region, they vegetate in several ecosystems, presenting a great diversity of forms and adaptations, in addition to strong endemism. Due to the beauty of their flowers and their high commercial value, they are known for their floristic components, which make them vulnerable to high antropic and predatory pressure. The goal of the present study was to follow the morpho-anatomic development of orchids seeds from the germination up to 70 days of development, sowing under aseptic and non-aseptic conditions. Ripe fruit seeds of the species *Cattleya eldorado* Lindl., *Epidendrum imatophyllum* Lindl., and *Epidendrum schomburgkii* Lindl., grown in aseptic substratum, were used (KC and MS ½) under growing room conditions, and in non-aseptic, substratum consisting of *açaí* seeds (*Euterpe oleraceae* Mart), in vegetation housing. The morpho-anatomic and dimension analyses (average length and diameter) of the seeds, the embryos, and the plantules (protocorms) carried out after the germination, were determined with the assistance of light and scanning electron microscopy. The seeds and the embryos dimensions (length and diameter) were 509/101µm; 164/81µm (*C. eldorado*); 3369/278µm; 91/182µm (*E. imatophyllum*) and 6281/305µm (*E. schomburgkii*), respectively. No species presented seeds with endosperm. The seed coat showed ultrastructural distinctions and embryos are composed by undifferentiated cells. The average values of length and diameter from germination up to 70-day-development showed that, in the non-aseptic substratum, *C. eldorado* and *E. imatophyllum* presented the best results with 2857µm/1496µm and 2473µm/1368µm, respectively. For *E. schomburgkii*, regarding length, the best result was achieved in the aseptic medium KC (54920µm), and the average diameter in the non-aseptic substratum (2.039µm). Regardless the growing conditions, it was found the differentiation of procambium, with the occurrence time varying according to the species. Mycorrhizal fungi were observed in the three species, but only in the plantules grown in the substratum consisting of *açaí* seeds. The results of the present research attest the efficiency of the non-aseptic substratum utilized, and it make way to further news studies focusing on the development *in vitro* and *ex vitro* of the Orchidaceae germination, leading to several specific questions that require investigation.

ABREVIATURAS USADAS

AM: Estado do Amazonas

CCA: Centro de Ciências Agrárias

CFD: Câmara fotográfica digital

CV: Coeficiente de variação

%G: Porcentagem de germinação

HMDS: Hexametildesilazane

KC: Meio de cultura C de Knudson, 1946.

KCl: Cloreto de potássio

LFDGV: Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal

M: Molar

ME: Microscópio estereoscópio

MEV: Microscópio eletrônico de varredura

MO: Microscópio óptico

MS ½ : Meio de cultura Murashige&Skoog, 1962.

NaOH: Hidróxido de sódio

SA: Substrato constituído por sementes de açaí

TSU: Número médio total de sementes utilizadas

TSG: Número total de sementes germinadas

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae representa um dos grandes grupamentos taxonômicos, entre as Monocotiledôneas, apresentando características especializadas e singulares (Dressler, 1981). É considerada por muitos botânicos a família mais derivada entre as Liliopsidas, incluindo cerca de 25.000 espécies, distribuídas em 725 gêneros (Dressler, *op cit.*). A família está constituída por 198 gêneros, com 2.350 espécies, ocorrentes no Brasil, representando uma riqueza, a qual é explicada, principalmente, pela grande extensão territorial e localização (Pabst & Dungs, 1975; 1977). A maioria das espécies é cosmopolita, encontrando-se em regiões tropicais e subtropicais (Sanford, 1974; Barros, 1990; Ribeiro, 1999).

Cerca de 67% das espécies de orquídeas são epífitas, hábito predominante em 460 gêneros (Gentry & Dodson, 1987). De acordo com Benzing (1987), duas de cada três espécies de epífitas vasculares são orquídeas. Na região neotropical a família agrupa, juntamente com as Bromeliaceae, a maioria das espécies de Magnoliófitas epífitas (Janzen, 1980). Segundo Dressler (1981), em espécies de orquídeas, ocorrem inúmeras adaptações morfológicas e funcionais relacionadas ao epifitismo. Por exemplo, a epiderme multisseriada nas raízes, o velame, é capaz de absorver água e sais minerais, reduzir a transpiração e oferecer proteção mecânica (Priedgeon, 1986; Benzing, 1987). Segundo Braga (1987), muitas espécies de orquídeas tornaram-se epífitas, isto é, sobrevivem apoiadas em outras plantas para, dessa forma, conseguir mais luz.

As espécies não-epífitas caracterizam-se por sobreviver em condição: rupícola, sobre pedras com quantidades restritas de detritos e sedimentos; húmícola, sob o dossel das florestas, mantendo suas espessas raízes entre as camadas de serapilheira; terrícola, aprofundando-se no solo, com sistema radicular distinto das epífitas; ou saprófita, plantas aclorofiladas que se desenvolvem sobre matéria orgânica em decomposição (Blossfeld, 1999; Englert, 2000).

Em oposição a estas variações nas condições de sobrevivência e à ampla variedade de formas, cores e tamanhos, as flores de orquídeas mantêm-se constantes em sua organização e adaptações relacionadas com a polinização por insetos e pássaros (Garay, 1972; Dressler, 1981). As flores são constituídas de três sépalas, alternadas por três pétalas, sendo uma delas maior e de coloração distinta das demais, correspondendo ao labelo, o qual é capaz de atrair os polinizadores; internamente a esses verticilos, há uma coluna formada por órgãos

reprodutores, dispostos assimetricamente, pistilos e estames, total ou parcialmente unidos, os quais contêm os grãos de pólen, sob forma de políneas (Garay, *op cit.*).

Assim como as flores, as características das sementes em Orchidaceae mostram peculiaridades, tais como a grande quantidade por fruto e as suas pequenas dimensões, conforme referem Arditti (1967, 1979) e Dressler (1981).

Os caracteres anatômicos de Orchidaceae, inicialmente de cunho descritivo, envolvendo estruturas reprodutivas de indivíduos adultos, têm sido analisados sob o ponto de vista ecológico e evolutivo, com intuito de reconhecer o poder adaptativo dos seus representantes (Winther *et al.*, 1974).

O fato de todos os membros da família Orchidaceae apresentarem associação micorrízica em alguma fase de seu ciclo de vida é uma característica marcante (Dressler, 1981). Essa associação é necessária para a germinação, sob condições naturais, considerando que todas as orquídeas têm um estágio heterotrófico relativamente prolongado durante a germinação e o crescimento inicial; algumas espécies são heterotróficas durante todo o ciclo de vida (Smith & Read, 1997). A germinação das pequenas sementes de orquídeas não ocorre de modo usual, uma vez que a plântula emerge da semente em condições de relativa indiferenciação e seu desenvolvimento subsequente é muito lento (Alvarez & King, 1969). Desde os estudos iniciais de Bernard, em 1909, tem sido aceita a hipótese de que se houver a infecção do fungo compatível nas sementes de orquídeas, estas são estimuladas a germinar (Hadley & Pegg, 1989).

Com o advento do processo artificial para a germinação de sementes de orquídeas, proposto por Lewis Knudson, em 1922, usando um método em condições assépticas, sem a presença de micorrizas, a produção e a comercialização dessas plantas difundiu-se amplamente. O cultivo de espécies de orquídeas ornamentais, tanto por semente, quanto por meristemas, tem sido ampliado e tem alcançado elevados níveis nas exportações em países como Estados Unidos, Austrália, França, Indonésia, Nova Zelândia e Portugal (Rao, 1977). Segundo Arditti (1982), os gêneros mais cultivados são de origem tropical, tais como *Cattleya*, *Cymbidium*, *Vanda*, *Laelia*, *Dendrobium*.

Várias são as pesquisas em outros países objetivando a manutenção das espécies de orquídeas nativas, frente à devastação acelerada dos ambientes naturais. Para isso, muitos estudos foram realizados visando à obtenção das melhores condições para a germinação das sementes e a produção de plântulas. Entre eles estão os trabalhos de: Curtis (1943), para diversas espécies norte-americanas; Stoutamine (1963, 1964), para as espécies nativas do

Canadá; Clements (1982), para as espécies australianas; e Arditti *et al.* (1982), também para espécies norte-americanas, porém especificamente para algumas da Califórnia.

Kerbaux (1988) destaca o Brasil, no mercado internacional de orquídeas, como um dos grandes centros produtores de espécies e flores de corte. Apesar de Silva (1979) salientar as facilidades para o cultivo de orquídeas no Brasil, em função das condições climáticas favoráveis, poucas investigações tem envolvido espécies nacionais. Dentre essas estão as pesquisas de: Marin-Morales (1982), analisando viabilidade de sementes de híbridos de *Cattleya* e *Laelia*; Pavanelli (1982), investigando fertilidade de sementes em frutos de *Epidendrum nocturnum*; Iannotti *et al.* (1987), sobre sistema reprodutivo de *Epidendrum rigidum* Jack; Stort (1983), sobre cruzamentos artificiais envolvendo espécies de *Cattleya*. Inúmeros trabalhos concentram-se na cultura de tecidos meristemáticos, tais como os de Kerbaux (1991) e de Handro & Kerbaux (1980). Poucos estudos têm sido desenvolvidos com relação aos fatores que afetam a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas, podendo ser destacados, entre esses: Mercier & Kerbaux (1991), avaliando a influência dos fatores nutricionais no cultivo assimbiótico de *Epidendrum fulgens*; Milaneze (1997), investigando a germinação em espécies da Mata Atlântica; e Mello (2000), testando a conservação de sementes e percentagem de germinação de algumas espécies de orquídeas do Cerrado.

Pabst & Dungs (1975, 1977) mencionaram que a Bacia Amazônica possui cerca de 94 gêneros de orquídeas, com 352 espécies. Braga (1988) cita que, assim como as florestas de várzea e igapó, as Campinas Amazônicas são muito mais ricas em espécies de orquídeas, em número de indivíduos e biomassa, em comparação aos demais tipos de vegetação. Refere ainda que, o igapó tem maior importância como via de migração e a vegetação serrana baixa como centro de evolução e dispersão das orquídeas da Amazônia. Já a mata de terra firme freqüentemente é citada como pobre em orquidáceas (Lacerda, 1981). Conforme Cruz & Braga (1997), a Floresta Tropical Úmida da Amazônia, denominada "Hiléia" por Humboldt & Bonpland, é uma região muito heterogênea do ponto de vista dos tipos de comunidades vegetacionais presentes. Assim, essa floresta constitui-se num dos maiores repositórios genéticos de orquídeas. Entretanto, inúmeras espécies de ocorrência na Amazônia ainda não foram identificadas pela taxonomia moderna e são pouco conhecidas do ponto de vista morfo-anatômico, especialmente no que se refere à estrutura morfo-anatômica das sementes e dos estádios iniciais de desenvolvimento da plântula. Entre essas espécies estão *Cattleya eldorado* Lind. (com flores vistosas e de alto valor comercial), *Epidendrum schomburgkii* Lindl. e *E. imatophyllum* Lindl. (ambos com belas flores e de interesse comercial). Sobre essas espécies

não foi encontrada nenhuma publicação envolvendo germinação e desenvolvimento, bem como acerca das características estruturais de suas sementes, de seus embriões ou de suas plântulas.

A reprodução de orquídeas por sementes pode ser realizada por processos simbióticos ou assimbióticos.

O método simbiótico é o processo natural de reprodução das orquídeas na natureza. As sementes de orquídeas, ao contrário de todas as demais sementes, não possuem reservas nutritivas, e, por isso, necessitam da ação de um fungo micorrízico (Arditti, 1967). O fungo desdobra a matéria orgânica do substrato em produtos solúveis e assimiláveis pelo embrião e assim as sementes podem germinar (Arditti, *op cit.*). Entre os métodos simbióticos, o mais usado é a germinação sobre placa xaxim (*Dicksonia sellowiana*). Entretanto, essa espécie de samambaia arbórea, de ocorrência no Sul e no Sudeste do Brasil, encontra-se em processo de extinção, por ser muito explorada para confecção de substratos vegetais (Campos, 2000). Outros métodos simbióticos, com substratos naturais têm sido usados, como por exemplo: no Estado do Rio Grande do Sul, a casca de coco sem polpa e triturada (Englert, 2000); no Nordeste, o coxim, produto semi-industrializado, que utiliza o tecido parenquimático da casca de coco e não a fibra (Ferreira, 1991); e no Estado do Pará, sementes de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart. - Arecaceae). Esse último método, descoberto por um orquidófilo amador (José Torres – Castanhal, PA), tem mostrado resultados eficientes e com germinação exuberante (Campos, 1999). A semente de açaí tem sido usada, no Estado do Pará, como substrato para plantio de orquídeas adultas (Campos, 2000).

O método assimbiótico é um processo artificial de reprodução, que utiliza meios de cultura, em condições assépticas (sem micorrizas), para obter a germinação de sementes de orquídeas, é um método *in vitro*, inicialmente constituído apenas por sais minerais e açúcares (Snow, 1985). Outros métodos de germinação *in vitro*, objetivando melhorias nos meios de cultura, baseados no método de Knudson, surgiram posteriormente, de modo a oferecer, em condições controladas, os nutrientes e os hormônios que as sementes e as plântulas precisam para germinar e desenvolver-se. Esses métodos assimbióticos permitem uma multiplicação rápida e eficiente, diminuindo o ciclo de vida, substituindo a simbiose com micorrizas e excluindo a competição com outros microorganismos. Os métodos *in vitro*, embora geralmente de custo elevado, proporcionam elevada produtividade, com resultados mais seguros, tendo assim a preferência por parte dos produtores. Inúmeros protocolos para germinação eficiente de orquídeas, *in vitro*, estão disponíveis na literatura. Os meios de cultura mais freqüentemente utilizados são: Knudson C ou KC (Knudson, 1946), Vacin e

Went (Vacin & Went, 1949) e MS (Murashige & Skoog, 1962). O meio MS, com a metade das concentrações de sais da fórmula original, tal como usado por Kerbauy (1988), também vem sendo usado com sucesso por diversos laboratórios.

Dessa forma, conhecimentos sobre a morfo-anatomia das sementes e das plântulas de espécies endêmicas e das que ocorrem na Amazônia, tais como *Cattleya eldorado* Lindl., *Epidendrum schomburgkii* Lindl. e *E. imatophyllum* Lindl., germinando e desenvolvendo-se em diferentes substratos de semeadura, comparando três protocolos, dois bem estabelecidos (meios de cultura KC e MS, assimbióticos) e um simplificado e alternativo (semente de açaí como substrato, possibilitando a condição simbiótica), poderão otimizar a propagação e a conservação de tais espécies de Orchidaceae.

Revisão bibliográfica

Morfologia e anatomia das sementes de orquídeas

As sementes de Orchidaceae estão entre as fanerógamas que apresentam menores tamanhos (Benzing, 1981). Suas dimensões variam de 1,0-2,0 mm de comprimento e de 0,5-1,0 mm de largura, sendo produzidas em quantidades elevadas, cerca de 1.300 a 4.000.000 sementes por cápsula (Pierik, 1990). De acordo com Eames (1977), sementes tão pequenas caracterizam espécies vegetais com associações micorrízicas e altamente especializadas, como no caso das orquídeas, embora Teryokhin & Nikiticheva (1982) também considerem esses tamanhos reduzidos das sementes como característica de plantas parasitas.

Ackerman (1983) refere que a capacidade das Orchidaceae em produzir sementes pequenas e numerosas pode ser uma resposta às várias pressões seletivas, tanto no caso de espécies terrestres, quanto no caso de espécies epífitas. Sob este aspecto, tais sementes podem significar uma economia de água e de minerais para a planta-mãe (Benzing *et al.*, 1983).

A dispersão das sementes de Orchidaceae ocorre pelo vento (Dressler, 1981, Robinson & Burns-Balogh, 1982), sendo exceções as espécies de *Apostasia*, *Selenipedium* e *Vanilla*, as quais possuem sementes relativamente mais pesadas (Dressler, 1981). A forma e o tamanho das sementes de orquídeas, bem como a presença de espaços vazios relativamente grandes em seu interior (nunca inferior a 63% e podendo alcançar 96% do volume total da semente) conferem uma adaptação à dispersão anemocórica, permitindo longos períodos de flutuação no ar (Arditti *et al.*, 1979). A possibilidade de haver dispersão através da água é ressaltada por Stoutamire (1963), Lindén (1980) e Kurzweil (1993), para espécies de orquídeas terrestres.

As sementes de orquídeas apresentam um padrão estrutural constante (Arditti *et al.*, 1979), podendo variar em suas características, tais como tamanho, forma, cor, largura, número e estrutura das células da testa (Thoda, 1985). Um embrião indiferenciado está contido no interior de um tegumento transparente (testa), constituído de células mortas (Veyret, 1974; Arditti *et al.*, 1979). Fredrikson (1990), investigando a embriologia de *Herminium monorchis* (Orchidaceae), constata que ocorre dupla fertilização, porém o núcleo endospermático não se divide, permanece vivo até o embrião estar constituído por três células e então degenera.

As dimensões e o formato das células do tegumento das sementes de orquídeas são consideradas características taxonômicas e filogenéticas importantes para níveis taxonômicos elevados, mas proporcionam poucas e limitadas informações para os níveis genéricos e infragenéricos (Dressler, 1981; Chase & Pippen, 1988; Kurzweil, 1993), entretanto, por vezes, podem explicar alguns aspectos da biologia dessas sementes (Healey *et al.*, 1980).

As análises ultra-estruturais do tegumento das sementes de orquídeas têm revelado variações na ornamentação das paredes celulares que o constituem, podendo servir como subsídios taxonômicos. Assim, os vários padrões de esculturas reticuladas (complexas, difusas, dicotômicas e transversais em maior ou menor grau), nas paredes periclinais, ou a ausência de esculturas, nas células do tegumento das sementes têm sido considerados de valor taxonômico, a nível genérico e específico, por Arditti *et al.* (1980), para espécies nativas da África do Sul, e por Healey *et al.* (1980), para espécies terrestres norte-americanas. A escultura das paredes anticlinais foi observada por Chase & Pippen (1988), mostrando características distintas nos membros da subtribo Oncidiinae.

Nas sementes de Orchidaceae, conforme Harrison & Arditti (1978), não existe endosperma e nem cotilédones presentes. As variações morfológicas, embora não muito pronunciadas, nos pequenos embriões, têm propiciado discussões relativas à presença ou não de cotilédone. Veyret (1974) ressalta que a maioria das espécies de orquídeas são acotilédones, apresentando um ápice sem projeções laterais, porém raras espécies mostram um cotilédone diferenciado, projetado lateralmente ao ápice vegetativo. Nishimura (1991) registra a presença de cotilédone nos embriões de *Bletia purpurea*. Os embriões de Orchidaceae estão presos à semente através do suspensor e em função da presença ou ausência desse, Swamy (1979) reconhece duas categorias, A (com suspensor) e B (sem suspensor).

Os embriões de orquídeas, de acordo com Veyret (1974), podem ser comparados à fase globular dos embriões das dicotiledôneas, por serem constituídos de uma massa de células indiferenciadas. Entretanto, diversos pesquisadores têm identificado, nos embriões de orquídeas, dois tipos celulares: um, no pólo meristemático, formado por células pequenas e de conteúdo denso; outro, no pólo micropilar, onde podem ser vistos grandes núcleos e vacúolos (Spoel, 1948; Knudson, 1950; Veyret, 1974; Harrison & Arditti, 1978). As substâncias de reserva, nas células dos embriões maduros de Orchidaceae, são basicamente compostas por lipídios (Harrison, 1977; Milaneze, 1992). Na porção meristemática superior desses embriões ocorrem também corpos protéicos (Harrison, 1977; Manning & Van Staden, 1987; Philip &

Nainar, 1988). Em espécies de orquídeas terrestres africanas, Manning & Van Staden (1987) verificaram a presença de açúcares, como a arabinose, ramnose, sacarose e maltose, dentre outros, embora em quantidades relativamente pequenas. Em estudos mais recentes, Richardson *et al.* (1992) ao analisarem a ultra-estrutura dos embriões de *Platanthera hyperborea* registraram a presença de magnésio, potássio e cristais de cálcio.

Germinação das sementes e desenvolvimento inicial de plântulas em orquídeas

No início da germinação das sementes de orquídeas, os embriões expandem-se tanto no número quanto no tamanho de suas células (Shushan, 1974; Rao, 1964; Mitra, 1971), originando uma estrutura cônica (Arditti, 1967; Rasmussen *et al.*, 1990a).

A conceituação referente à germinação, em sementes de orquídeas, varia entre os autores. Assim, por exemplo, alguns consideram que a semente germinou quando o embrião demonstra qualquer indício de atividade (Harvais, 1973), outros entendem que isso ocorre quando o embrião mostra-se intumescido e capaz de romper o tegumento da semente (Henrich *et al.*, 1981; Rasmussen *et al.*, 1990a e 1990b), mas outros consideram-na germinada somente após a gema caulinar estar diferenciada (Curtis & Nichol, 1948; Ichihashi, 1990).

No processo de germinação das sementes de orquídeas, como descrevem Rasmussen *et al.* (1990b) e Leroux *et al.* (1997), o embrião desenvolve-se formando uma estrutura denominada protocormo. O termo protocormo foi adotado pelo botânico francês Bernard, no início do século XX, para designar, em Orchidaceae, os embriões intumescidos e em fase inicial de germinação e desenvolvimento, sendo, posteriormente, bem aceito e adotado por pesquisadores dessa família (Morel, 1974). De acordo com Dressler (1981), a estrutura dos protocormos, em orquídeas, é única entre as fanerógamas. Barabé *et al.* (1993) salienta que essa estrutura pode ser considerada como uma extensão do estágio embrionário que, ao contrário das demais espécies fanerógamas, ocorre fora das sementes.

Na maioria dos trabalhos mais antigos, referentes à histologia dos protocormos, tais como Alvarez & Sagawa (1965) e Alvarez & King (1969), o protocormo é referido como sendo uma estrutura tuberculiforme constituída por parênquima. Já em estudos mais recentes, como em Milaneze (1992) e Leroux *et al.* (1995, 1997), há uma descrição mais aprofundada sobre estrutura do protocormo, sendo referida a distinção de duas porções, uma basal e outra apical ou meristemática. Esses mesmos autores ainda referem que a porção basal é formada por células maiores e mais vacuoladas, constituindo tecido parenquimático, enquanto a porção apical, em posição oposta, é formada por células menores, constituindo um promeristema e mostrando indícios de ativa divisão mitótica. Os primeiros cordões de células procambiais são

observados na região central do protocormo, em direção ao meristema apical (Curtis & Nichol, 1948; Arekal & Karanth, 1980; Milaneze, 1992; Leroux *et al.*, 1995 e 1997). Algumas células da epiderme dos protocormos diferenciam-se em estruturas denominadas de: pêlos absorventes, por Hadley & Harvais (1968), Arditti *et al.* (1981) e Milaneze (1992); ou tricomas, por Alvarez & King (1969); ou rizóides, por Curtis & Nichol (1948), Knudson (1950), Van Waes & Degeegh (1986a), Rasmussen *et al.* (1990a) e Nagashima (1994).

Harrison (1977), investigando a germinação e desenvolvimento de *Cattleya aurantiaca*, crescendo em meio de cultura, suplementado ou não com carboidrato, constatou grande quantidade de reservas de lipídios e proteínas, mas ausência de reservas de carboidratos. Esse autor refere ainda a presença de proplastídeos e mitocôndrias, essas associadas à degeneração dos corpos de lipídios; os glicosomos, dictiosomos e retículo endoplasmático não foram evidenciados. Arditti *et al.* (1981, 1982) e Nagashima (1994) constataam que grande parte dos protocormos, em espécies terrícolas, não apresentam clorofila nas primeiras fases de seu desenvolvimento, mesmo sob iluminação.

Após a germinação das sementes, em orquídeas, o protocormo passa por fases relativamente lentas de diferenciação de tecidos e de órgãos (Alvarez & King, 1969). Na seqüência do desenvolvimento, o protocormo aumenta de volume e ocorre a diferenciação dos tecidos, originando as folhas e as raízes adventícias, passando então a ser designado de plântula (Shushan, 1974; Mitra, 1971; Arekal & Karanth, 1980; Barabé *et al.*, 1993).

O intervalo de tempo entre a sementeira, os primeiros sinais de germinação e a diferenciação de folhas e de raízes nos protocormos de orquídeas podem variar dependendo da espécie e das condições de cultivo (Barroso & Chaves-Neves, 1990), especialmente com relação à quantidade e à natureza dos nutrientes disponíveis (Barabé *et al.*, 1993). Por exemplo, os primeiros indícios de germinação das sementes de orquídeas podem ocorrer em uma semana, como em *Encyclia phoenicia* (Grillo-Mensa *et al.*, 1985) e *Pseudolaelia vellozicola* (Milaneze, 1992), ou em aproximadamente três meses após a sementeira, como em espécies de *Cypripedium* e *Platanthera* (Henrich *et al.*, 1981), ou mesmo após um ano de cultivo, como em algumas espécies nativas dos Estados Unidos (Arditti *et al.*, 1981).

Sob condições naturais, as sementes das orquídeas germinam e alcançam a fase da plântula somente após sua associação com um fungo micorrízico (Lindén, 1980; Hadley, 1983; Arditti & Ernst, 1984). A especificidade entre as espécies de fungos e de orquídeas, para a ocorrência da associação micorrízica, pode variar, como sugerem Hadley (1970) e Warcup (1971, 1973). Os estudos sobre a associação simbiótica têm comprovado a utilização, pelo fungo, de carboidratos insolúveis do meio, tais como a celulose (Smith, 1966; Hadley,

1969) e o amido (Ernst *et al.*, 1970), e a translocação dos produtos para os embriões (Smith, 1966). De acordo com Smith *et al.* (1994), o relacionamento entre as espécies de orquídeas e os fungos simbiotes tem caráter unidirecional, quanto à transferência de nutrientes em favor das plantas. O endófito desenvolve-se apenas nas células da porção basal do protocormo (Rasmussen *et al.*, 1990a). A presença do fungo simbiote também estimula a mobilização das reservas contidas nos embriões das orquídeas (Manning & Van Staden, 1987; Uetake *et al.*, 1992), de modo que este possa alcançar a fase de plântula fotossintetizante, atingindo, assim, a condição autotrófica (Alvarez & King, 1969; Stoutamire, 1964).

Rao (1977) estima que apenas cerca de 5% das sementes de orquídeas possam germinar sob condições naturais. Sob condições de cultivo em laboratório, Hadley (1983) refere que a associação micorrízica pode ser dificultada por modificações na capacidade simbiótica dos fungos (Hadley, 1983) e Rasmussen *et al.* (1990b) acrescentam que os fungos podem ter uma estreita faixa de temperatura ótima para que se estabeleça a associação. Wilkinson & Williams (1994) constatam que algumas espécies de bactérias associadas aos tecidos micorrizados de orquídeas promoveram a germinação simbiótica das sementes de *Pterostylis vittata*, espécie de orquídea terrestre australiana.

Rasmussen & Rasmussen (1991) ressaltam que estudos referentes à germinação de sementes de orquídeas e desenvolvimento de plântulas, sob condições naturais, são dificultados, devido ao reduzido tamanho das sementes, e sugerem comparações com ensaios realizados em laboratórios, de modo a identificar os fatores que regulam o estabelecimento dessas espécies na natureza. Segundo Dunlap *et al.* (1986), o nível de complexidade nos procedimentos *in vivo* oferece alto grau de variabilidade. Stasinopoulos & Hangarter (1990) salientam que, nos procedimentos *in vitro*, as células e os tecidos vegetais são normalmente cultivados sobre meio nutritivo definido, no qual as concentrações de todos componentes são previamente conhecidas. Os fatores que afetam o crescimento das plantas *in vitro* são similares àqueles que limitam o crescimento *in vivo* (Leifert & Lin, 1992). Rasmussen *et al.* (1990a) constataram que, cultivando *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) em meio simbiótico, a taxa de germinação foi mais elevada, assim como o crescimento das plântulas foi maior, quando comparado com cultivos assimióticos, desde que mantidas temperaturas ótimas (23 a 25°C). Conforme os autores, quando as temperaturas são mais elevadas pode ocorrer proliferação de hifas, externamente ao protocormo, trazendo prejuízo ao crescimento das plântulas. Além disso, é necessário um cuidadoso balanço nutricional entre o hospedeiro (orquídea) e o endófito para o estabelecimento da simbiose (Harvais & Hadley, 1967; Clements, 1988).

O cultivo assimbiótico das sementes de orquídeas (*in vitro*), desenvolvido por Knudson (Knudson, 1922 e 1946), tornou-se vantajoso, em relação ao simbiótico, pois é tecnicamente mais fácil e proporciona resultados favoráveis decorrentes da adição de carboidratos ao meio de cultura contendo nutrientes minerais. Marschner (1993) salienta que as principais funções dos nutrientes minerais no corpo vegetal, tais como nitrogênio, enxofre e fósforo relacionam-se à constituição de proteínas e de ácidos nucleicos, enquanto os demais macronutrientes, com exceção do potássio, e os micronutrientes fazem parte de estruturas orgânicas, principalmente moléculas enzimáticas, as quais podem estar direta ou indiretamente envolvidas em funções catalíticas de enzimas. O potássio atua na osmorregulação e principalmente na manutenção do equilíbrio eletroquímico das células e de seus compartimentos, tendo, ainda, a função de regular a atividade enzimática.

Segundo Raghavan & Torrey (1964), os estudos relativos à nutrição mineral dos embriões vegetais *in vitro* são importantes para a compreensão dos processos bioquímicos e de ontogênese. Além disso, conforme esses autores, a habilidade em utilizar o nitrato presente no meio de cultura, pelas plântulas, ocorre paralelamente ao surgimento da enzima redutase de nitrato em seus tecidos. Arditti (1967), Harrison & Arditti (1978), Arditti *et al.* (1982) e Oliva & Arditti (1984) salientam que os requisitos, para que a germinação assimbiótica das sementes de orquídeas ocorra variam quanto à utilização dos componentes nutritivos disponíveis e quanto ao aproveitamento das condições de iluminação e de temperatura aplicadas. Acrescente-se a isso que as condições mais adequadas para a germinação das sementes e o crescimento das plântulas de orquídeas podem variar com o gênero e, algumas vezes, com a espécie (Henrich *et al.*, 1981; Arditti & Ernst, 1984).

A importância da nutrição nitrogenada, especialmente o balanço entre os íons nitrato e amônio, para os tecidos vegetais em meio de cultura tem sido amplamente analisada, porém está vinculada à espécie vegetal, ao estágio de desenvolvimento, à concentração de íons (nitrato e amônio) e ao pH do meio (Dhillon *et al.*, 1987; Schimitz & Lorz, 1990 e Redinbaugh & Campbel, 1991). Os compostos de nitrogênio disponíveis no meio de cultura podem afetar a germinação das sementes das orquídeas (Van Waes & Debergh, 1986b; Hinnen *et al.*; 1989). Por exemplo, as culturas de *Cattleya* (Raghavan & Torrey, 1964), de *Cypripedium reginae* (Harvais, 1973) e *Orchis laxiflora* (Mead & Bulard, 1979) são influenciadas positivamente pela presença de íons amônio (NH_4^+) no meio nutritivo. A presença de nitrato de amônia é fundamental para o crescimento assimbiótico das plântulas de *Arundina bambusifolia* (Mitra, 1971) e de híbridos de *Cattleya* (Raghavan, 1964), favorecendo, também, o crescimento dos protocormos de *Epidendrum fulgens* (Mercier &

Kerbaux, 1991) e de espécies de *Dendrobium* (Lin, 1992), e a organogênese de plântulas de *Phalaenopsis* (Hinnen *et al.*, 1989). Kumaria & Tandor (1991), entretanto, não obtiveram bons resultados, quanto à germinação das sementes de *Dendrobium fimbriatum*, na presença de nitrato de cálcio ou sulfato de amônia, mas com sulfato de magnésio ou fosfato monobásico de sódio constataram aumento do peso fresco das plântulas de ambas espécies.

Quanto aos demais componentes inorgânicos do meio de cultura, Vacin & Went (1949) e Raghavan & Torrey (1964) esclarecem que pequenas proporções de íons cálcio no meio de cultura podem ser favoráveis às culturas assimióticas de orquídeas. Arditti & Ernst (1984) referem que a redução dos níveis de fosfatos aumenta a germinação das sementes de orquídeas, pois evita a formação de compostos insolúveis com íons de ferro, durante o processo de autoclavagem.

Estudos bioquímicos de Alvarez & King (1969) demonstram que os protocormos e as plântulas de *Vanda sanderiana* foram capazes de produzir e eliminar peroxidases para o meio de cultura. Hinnen *et al.* (1989) verificaram que plântulas de *Phalaenopsis* geralmente exsudam compostos fenólicos para o meio, os quais estão aparentemente relacionados a um mecanismo de modificação imediata do ambiente para sua instalação. A ocorrência de enzimas capazes de hidrolizar compostos, adicionados ao meio de cultura, especialmente carboidratos, foi verificada em *Phalaenopsis*, por Ernst *et al.* (1971) e por Ernst & Arditti (1990), e em *Dendrobium*, por Hew & Mah (1989). Conforme esses autores, a presença de enzimas proporciona, nas culturas assimióticas, a utilização de moléculas grandes, tais como os oligossacarídeos, como fonte de carboidrato.

Harvais (1973) considerou que as plantas fotossintetizantes possam sintetizar vitaminas e, portanto, a adição destes compostos ao meio de cultura poderia ser útil durante a fase heterotrófica do ciclo de vida das orquídeas. Desta forma, Noggle & Wynd (1943) puderam concluir que a niacina promoveu a germinação e o crescimento mais rápido das plântulas de *Cattleya*, como também verificou Arditti (1967) para *Laeliocattleya*, enquanto que Prasad & Mitra (1975) verificaram efeitos contrários àquelas para *Cymbidium*. Com base em estudos anteriores, Arditti & Ernst (1984) concluíram que a niacina tem maior importância que as demais vitaminas na promoção da germinação e do desenvolvimento das plântulas de orquídeas.

A utilização de complexos vitamínicos nas culturas assimióticas de orquídeas, em geral, incluem tiamina (vitamina B1), ácido pantotênico, piridoxina (vitamina B6) e ácido nicotínico (niacina), entre outras (Arditti *et al.*, 1982). Esses compostos, segundo Oertli (1987), ao serem aplicados exogenamente, podem agir como co-fatores ou fazer parte de

moléculas envolvidas em reações enzimáticas, levando à captação de nutrientes minerais. O mesmo autor ainda salienta que a utilização de vitaminas, no meio de cultura, estimula o crescimento de plântulas de orquídeas, como consequência do efeito de sinergismo entre os compostos, mas sempre diferenciado de acordo com a espécie analisada. Desta forma, ao utilizarem vários compostos vitamínicos simultaneamente, Pierik (1988), não constata efeitos significativos na germinação de *Paphiopedium ciliolare*, enquanto Kumaria & Tandor (1991) verificam efeitos favoráveis à germinação de sementes de *Dendrobium fimbriatum*.

Quando a piridoxina é adicionada às culturas assimbióticas de orquídeas, ela favorece a germinação de sementes, mas inibe o desenvolvimento e causa deformação nas plântulas de *Cattleya* (Noggle & Wind, 1943). A piridoxina constitui um importante fator no metabolismo de aminoácidos (Harrison & Arditti, 1978) e seu efeito varia conforme a espécie (Arditti & Ernst, 1984). A tiamina, segundo Bonner (1942), pode ser transportada para as raízes, onde atua como fator de crescimento. De acordo com Goodwin (1963, *apud* Harrison & Arditti, 1978), a tiamina é produzida principalmente nas folhas das plantas. Mead & Bulard (1975), referem que, em culturas assimbióticas de orquídeas, a tiamina é essencial para a sobrevivência dos protocormos de *Orchis laxiflora* e *Ophrys sphegodes*, e os mesmos autores, em 1979, constatam que, somente na presença dessa substância, os protocormos de *O. laxiflora* apresentam clorofila e alcançam a fase de plântulas. Hagen & Stasinopolous (1991) investigando a instabilidade de vários compostos vitamínicos adicionados ao meio de cultura MS observam que, mesmo na ausência de tecidos vegetais, mas em presença de luz e temperaturas acima de 25°C, a piridoxina é totalmente degradada em uma semana, enquanto que o nível original de tiamina decresceu em 56% em seis semanas.

Como as vitaminas, vários tipos de reguladores de crescimento vegetal são normalmente adicionados às formulações básicas dos meios de cultura utilizados para germinação assimbiótica de orquídeas, procurando simular as condições oferecidas pelo fungo micorrízico (Hadley & Harvais, 1968). Entretanto, estes autores, ao adicionarem AIA, no meio de cultura, verificaram que ocorreu inibição da germinação, aumentando nas taxas de mortalidade e retardo no crescimento das plântulas de *Dactylorhiza purpurella*. Hadley (1970), além dos resultados acima, verificou o aumento na produção de pêlos absorventes nos protocormos da mesma espécie. A presença de ANA favoreceu a germinação das sementes e o crescimento das plântulas em espécies de *Paphiopedilum* (Flamée, 1978), enquanto que o 2,4-D, mesmo em concentração baixas, foi tóxico para espécies de *Ophrys* (Barroso & Chaves-Neves, 1990). Segundo Arditti (1979) e Arditti & Ernst (1984), há várias razões para os resultados pouco conclusivos dos ensaios de germinação e desenvolvimento das orquídeas,

quanto ao uso de reguladores de crescimento, no meio nutritivo, destacando-se as possibilidades de interações entre os compostos usados e entre eles e os demais constituintes do meio, bem como as dosagens, as condições de cultivo aplicadas e as particularidades fisiológicas e nutricionais de cada fase do ciclo de vida das espécies. Dunlap & Robacker (1988) constatam que a luz contínua foi mais efetiva que os sais, no meio de cultura MS, na degradação de AIA. Stasinopoulos & Hangarter (1990) afirmam que a degradação das auxinas naturais e demais componentes do meio de cultura está relacionada ao comprimento de ondas, azul e ultravioleta, presentes nas lâmpadas fluorescentes usadas para a iluminação das culturas.

Quanto às metodologias utilizadas durante o preparo dos meios de cultura e as conseqüentes modificações em sua composição, destacam-se os estudos de Sarma (1990) e Owen & Arditti (1991) sobre o tipo de agente geleificante usado, os de Wetzstein *et al.* (1994) sobre o volume das soluções preparadas, como também os de Murai *et al.* (1992) relativos à quantidade de meio por frasco de cultura e os de Skirvin (1986) sobre os processos de esterilização empregados. Sobre este último aspecto, as altas temperaturas promovidas pela autoclavagem ocasionam quedas do pH inicial do meio de cultura (Skirvin, 1986; Singha *et al.*, 1987; Sarma, 1990; Mezzetti *et al.*, 1991) e estão diretamente relacionadas a constituição química do meio (Owen & Arditti, 1991; Wetzstein *et al.*, 1994). Em adição, a autoclavagem também encontra-se vinculado a quebra das moléculas de sacarose, contida no meio de cultura (Ball, 1953; Ernst *et al.*, 1971; Singha *et al.*, 1987, Hagen & Stasinopolous, 1991), como também da glicose e da frutose, dela derivadas, gerando produtos tóxicos para as plantas (Weatherhead *et al.*, 1978).

Assim como os constituintes do meio nutritivo, as condições sob quais as culturas de orquídeas são mantidas podem influenciar a germinação de suas sementes e crescimento das plântulas. Em ambas fases, as orquídeas variam em suas necessidades e respostas ao tipo de iluminação ou aos fotoperíodos aplicados (Arditti, 1967, 1979; Harvais, 1973), mas em geral as sementes das espécies epífitas mostram-se indiferentes à luz (Arditti & Ernst, 1984), enquanto que as terrestres podem responder de modo similar (Ueda & Torikata, 1972; Stoutamire, 1964; Arditti *et al.*, 1981, 1982; Arditti, 1982; Oliva & Arditti, 1984; Ichihashi, 1990). Em geral, as espécies de orquídeas terrestres apresentam maior porcentagem de germinação na ausência de luz (Harvais, 1973, 1982; Mead & Bulard, 1979; Lindén, 1980; Arditti *et al.*, 1981; VanWaes & Degergh, 1986b; Grillo-Mensa *et al.*, 1985) ou somente germinam na total ausência de iluminação, como verificado por Mead & Bulard (1975) para *Ophrys sphegodes*.

Nas primeiras fases do desenvolvimento dos protocormos, a luz pode provocar aumento nas taxas de mortalidade de espécies terrestres (Harvais, 1973, Lindén, 1980) ou retardar seu crescimento (Mead & Bulard, 1975). Van Waes & Debergh (1986b) e Rasmussen *et al.* (1990a) salientam que pouco se conhece sobre qual etapa do desenvolvimento, os embriões e as plântulas de orquídeas demonstram sensibilidade à luz, ou sobre suas necessidades quanto à quantidade e à qualidade do espectro luminoso. Mas, de modo geral, os estudos com orquídeas têm demonstrado que a luz torna-se necessária para a indução e crescimento de gemas e raízes (Homés & Vanséveren-van Espen, 1973; Arditti & Ernst, 1984), havendo relação direta entre a organogênese das plântulas e a intensidade luminosa (Ueda & Torikata, 1972; Milaneze, 1992). Também a qualidade do espectro luminoso, aplicado às culturas, é importante (Ichihashi, 1990). Segundo Lin (1992), a capacidade das plântulas em captar íons nitrato contidos no meio de cultura encontra-se vinculada ao tipo de iluminação utilizada. Em geral, o fotoperíodo utilizado para a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas nas culturas de orquídeas varia de 10 a 18 horas, podendo também ser utilizada a iluminação contínua (Alvarez & King, 1969; Yam & Weatherhead, 1988; Ichihashi, 1990; Milaneze, 1992). Adicionalmente ao fotoperíodo, a intensidade da iluminação sobre as culturas de orquídeas pode variar do escuro total (Mead & Bulard, 1975; Henrich *et al.*, 1981, Zettler & Hofer, 1997) até 7000 a 8000 lux (Ueda & Torikata, 1972; Phillip & Nainar, 1988).

Shushan (1974), e Frei & Dodson (1972) observaram grandes variações no desenvolvimento inicial das plântulas de uma mesma cultura assimbiótica de orquídeas, como, em geral, ocorre entre os indivíduos de uma população, fato que, segundo Batchelor (1982) encontra-se vinculado à complexidade genética da família Orchidaceae. A avaliação do crescimento das culturas de orquídeas pode ter por base o diâmetro dos protocormos (Knudson, 1922; Vacin & Went, 1949), seu peso fresco (Ernst, 1975) ou a diferenciação de folhas e de raízes (Spoel, 1948; Arditti, 1967; Harrison & Arditti, 1978; Milaneze, 1992).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar aspectos morfo-anatômicos das sementes e das plântulas de três espécies de Orchidaceae – *Cattleya eldorado* Linden. ; *Epidendrum schomburgkii* Lindl. e *Epidendrum. imatophyllum* Lindl. – com germinação e desenvolvimento em três condições de cultivo, duas assépticas e uma não-asséptica.

Objetivos específicos

- a) Determinar as dimensões (comprimento e diâmetro) e caracterizar os aspectos morfo-anatômicos das sementes e dos embriões, das três espécies.
- b) Avaliar a taxa de germinação das sementes, das três espécies, na condição asséptica (meios de cultura MS ½ e KC) e na condição não-asséptica (substrato constituído por sementes de açaí).
- c) Avaliar as dimensões e caracterizar os aspectos morfo-anatômicos das estruturas (protocormos e plântulas), das três espécies, nas três diferentes condições de cultivo, nos primeiros estádios de desenvolvimento, a cada 14 dias após a germinação (14 até 70 dias).
- d) Registrar a presença ou não de micorrizas nos protocormos e/ou plântulas, das três espécies, nas três condições de cultivo, assépticas e não-assépticas.
- e) Comparar os resultados obtidos para as diferentes condições de cultivo, para cada uma das três espécies, visando definir as vantagens e desvantagens de cada condição de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material botânico

Foram utilizadas sementes retiradas de frutos (cápsulas) de três espécies de Orchidaceae: *Cattleya eldorado* Lindl., cujos frutos foram provenientes do Orquidário da Base Petrolífera Pedro Moura (PETROBRAS), localizada na Região de Urucu/Município de Coari/Amazonas, próximo à cidade de Manaus (Fig. 1); *Epidendrum schomburgkii* Lindl. e *Epidendrum imatophyllum* Lindl., com frutos provenientes do Orquidário Torres, localizado na cidade de Castanhal/Pará, próximo à cidade de Belém (Fig. 2).

2. Caracterização das espécies

***Cattleya eldorado* Lindl.:** Espécie epífita, endêmica da região Amazônica, com registros em herbários (INPA-AM), por exemplo, de ampla ocorrência nessa região e hoje restrita ao médio e baixo Rio Negro/AM. A floração ocorre nos meses de dezembro a fevereiro. Suas flores (Fig. 3) são vistosas e de alto valor comercial. Devido à coleta indiscriminada e a forte pressão antrópica, nas áreas de sua ocorrência (Campinas Amazônicas), a espécie encontra-se enquadrada na categoria de vulneráveis à extinção (Braga, 2002). Os frutos (Fig. 4) foram coletados do único exemplar existente no orquidário, com determinação taxonômica confirmada.

***Epidendrum imatophyllum* Lindl. :** Espécie epífita, de ocorrência na região Amazônica, nos Estados do Pará e do Amazonas. A floração ocorre nos meses de março, abril e setembro. A inflorescência apresenta flores vistosas (Fig.5). Os frutos (Fig. 6) foram coletados de duas plantas, as quais originaram-se da germinação de sementes de uma única matriz.

***Epidendrum schomburgkii* Lindl.:** Espécie epífita, de ocorrência na região Amazônica. A floração ocorre nos meses de junho a dezembro, cujas flores (Fig. 7) constituem uma inflorescência terminal. Os frutos (Fig. 8) foram coletados de duas plantas, as quais originaram-se da germinação de sementes de uma única matriz.

Os frutos (cápsulas), das três espécies, foram coletados ainda verdes e transportados para o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, em Florianópolis (SC).

À medida que as cápsulas foram abrindo-se, suas sementes foram retiradas e colocadas em envelopes de papel de seda, sendo identificados com o nome da espécie e a data de abertura da cápsula. Os envelopes contendo as sementes foram acondicionados em recipientes, com sílica gel para absorção da umidade do ar, permanecendo sob refrigeração, a 5°C, até serem utilizadas no experimento.

3. Condições para germinação e cultivo

As sementes das três espécies de Orchidaceae (*Cattleya eldorado* Lindl.; *Epidendrum schomburgkii* Lindl. e *E. imatophyllum* Lindl.) foram colocadas para germinar em condição asséptica (Meios de cultura KC e MS $\frac{1}{2}$) e não-asséptica (substrato constituído por semente de açaí).

3.1. Condição asséptica (cultivo *in vitro*) – Meio MS $\frac{1}{2}$ e Meio KC

As sementes foram embebidas durante duas horas em água destilada e solução Novapal. Após, as sementes foram lavadas, por três vezes, em água destilada e a seguir transferidas para pequenos frascos de vidro, com tampa de borracha. Depois de retirado o excesso de água, as sementes foram submetidas a um tratamento de desinfestação em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 10 minutos. Com auxílio de agulhas e seringas esterilizadas, a solução desinfestante foi retirada, perfurando-se a tampa de borracha. O processo de desinfestação das sementes completou-se após serem lavadas, por três vezes, em água destilada e autoclavada.

Foram utilizados dois meios de cultura: Meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ (Murashige & Skoog, 1962) e Meio de cultura KC (Knudson, 1946). Composição dos meios (mais detalhes no Anexo 1):

Meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (10%), vitamina de Morel (Morel & Wetmore, 1951), 30 g/l de banana madura (como fonte de nutrientes) e gelificado com ágar (0,6%).

Meio de cultura KC (Knudson, 1946) suplementado com sacarose (10%), vitamina de Morel (Morel & Wetmore, 1951), 30 g/l de banana madura (como fonte de nutrientes) e gelificado com ágar (0,6%).

O pH dos meios foi ajustado com NaOH e HCl para 5,8 e foi adicionado o ágar. Após, os meios de cultura foram autoclavados, sob 1,5 ATM de pressão, a 121°C, por 15 minutos. A seguir, 30 ml do meio de cultura preparado foi colocado em recipiente de vidro

(60x60mm). Foi utilizado um esponsorfe para medir a quantidade de sementes desinfestadas, correspondentes ao volume de 1,5ml, sendo estas misturadas com 10 ml de água destilada. Da suspensão sementes + água foi inoculado 1 ml em cada repetição. Para cada espécie foram preparadas nove repetições para cada um dos tratamentos (Meios KC e MS ½), sendo três dessas repetições usadas exclusivamente para determinar a taxa de germinação. O processo de germinação das sementes e cultivo de plântulas foi conduzido na sala de crescimento do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal/CCA/UFSC com temperatura de 25°C±2, UR de 60%±5, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 100 μmol. m⁻².s⁻¹, com uso de lâmpadas fluorescentes de 18W.

3.2. Condição não-asséptica (cultivo *ex vitro*) –Substrato SA

Para obtenção de germinação de sementes e de cultivo de plântulas, em substrato que possibilitasse a ocorrência de micorrizas, ou seja, simbiose devido à condição não-asséptica, foi utilizada sementes de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart).

As sementes de açaí (SA) foram previamente secas ao ar, por 30 dias, para que perdessem o poder germinativo. Posteriormente, as sementes de açaí foram acomodadas em 4 bandejas plásticas, perfuradas, de 25 x 45 x 7 cm, formando uma camada de cerca de 3 cm de altura. Nas bandejas foram delimitados círculos (repetições), cada um com área de 6 cm de diâmetro. Todas as sementes da bandeja foram umedecidas, diariamente, por mais 30 dias. Quarenta e oito horas antes da semeadura, as sementes de açaí, não foram umedecidas (orientação fornecida pelo Sr. Torres, 2001 – Comunicação pessoal). Após esse período, foi usado 1 ml da suspensão, contendo semente de orquídea + água, conforme descrito para a condição simbiótica, porém sem qualquer tratamento prévio de desinfestação, para semeadura de cada área demarcada. Para cada espécie de orquídea foram preparadas nove repetições (círculos delimitados nas bandejas), sendo três dessas usadas exclusivamente para determinar a taxa de germinação. As bandejas foram mantidas em temperatura média de 29°C±2, em Casa de Vegetação/CCA/UFSC.

4. Análise quantitativa

4.1. Dimensões da semente e do embrião

Para determinar o comprimento e o diâmetro da semente e do embrião *in natura*, foram utilizadas 25 sementes de cada uma das três espécies. As medidas das

dimensões foram efetuadas com base em imagens projetadas com câmara clara, acoplada em microscópio óptico (MO), marca Carl Zeiss-Jena, modelo Loboval 4, no Laboratório de Anatomia Vegetal/CCB/UFSC. As medidas foram aferidas com escala micrometrada, igualmente projetada.

O número mínimo amostral foi calculado pela equação $n=(t^2 \cdot s^2) \cdot d^{-2}$, onde "t" é dado pela tabela de Student (considerando n-1, para significância de 0,05), "s" é o desvio padrão e "d" é igual a E/100. média, onde E=10 para 10% de probabilidade, valor considerado satisfatório (Sokal & Rohlf, 1969).

4.2. Dimensões da plântula

No presente estudo, o protocormo, sem emissão de primórdios foliares, foi considerado como plântula, por ser já uma estrutura resultante do processo de germinação. Para avaliar as dimensões da plântula foram considerados dois eixos: um transversal, na região média do protocormo, nesse estudo denominado diâmetro da base da plântula; e um longitudinal, estendendo-se da extremidade basal do protocormo até a extremidade apical do protocormo (em fases iniciais do desenvolvimento), ou até a extremidade apical de folhas jovens (em fases mais avançadas do desenvolvimento).

Para essa análise foram coletadas 25 plântulas, representativas de cada uma das três espécies, de cada um dos três tratamentos, durante 70 dias, em intervalos regulares de 14 dias, totalizando cinco períodos de avaliação. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com seis repetições por tratamento.

Os valores correspondentes ao comprimento e ao diâmetro da plântula foram obtidos usando o mesmo procedimento descrito para determinação das dimensões da semente e do embrião.

O número mínimo amostral foi determinado conforme descrito no item anterior (4.1). Os dados médios totais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), quando necessário foi feita a transformação logarítmica, e teste de separação de médias de Tukey (T a 5%). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa STATIGRAPH-Windows Versão 7.0.

4.3. Taxa de germinação

As sementes foram consideradas germinadas quando os embriões tornaram-se intumescidos e romperam a testa.

Dividiu-se cada uma das três repetições (frascos das culturas assépticas e círculos da cultura não-asséptica) em quadrantes. Para contagem das sementes germinadas, foram considerados apenas dois quadrantes, sendo os valores somados e depois multiplicados por dois, de modo a considerar o número total de sementes germinadas em uma repetição.

Como para cada repetição foi utilizada uma alíquota de 1 ml de solução, contendo água+sementes, procedeu-se a contagem do número de sementes em dez alíquotas, obtendo-se no final o número médio de sementes usadas para semeadura em cada repetição.

A percentagem de germinação (%G) foi obtida pela fórmula $\%G = (TSG / 100) \cdot TSU^{-1}$, onde TSG é o número total de sementes germinadas em uma repetição e TSU é o número médio total de sementes usadas para uma repetição.

5. Análise qualitativa

5.1. Estrutura macro e microscópica das sementes e das plântulas

Para análise das características estruturais das sementes e plântulas foram feitas observações *in vivo* e em material fixado.

Os registros de imagens das características macroscópicas das estruturas, *in vivo*, foram feitos utilizando câmara fotográfica digital (CFD), marca Sony 92, modelo Mavica-MVCFD92 (Depto. Botânica-UFSC). Para algumas imagens *in vivo* de algumas estruturas, usou-se microscópio estereoscópico (ME), com equipamento fotográfico (LFGV/UFSC).

Para estudos microscópicos o material foi fixado em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2, sendo, posteriormente desidratado em série gradual etílica e infiltrado em hidroxietilmetacrilato (*Jung's Historesin*). As secções, de 8 µm de espessura, foram feitas em micrótomo de rotação, marca E.Zimmermann-Leipzig, para a confecção das lâminas permanentes. O material foi corado com azul de toluidina 1% e observado em microscópio óptico (MO), marca Carl-Zeiss-Jena, modelo Loboval4 (Lab. Anatomia Vegetal/UFSC) e fotomicrografado em Fotomicroscópio Olympus B12 (LFGV/UFSC).

5.2. Ultra-estrutura das sementes e das plântulas

Para análise ultra-estrutural, as sementes e as plântulas foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2. Após desidratação em série gradual etílica, as amostras foram imersas em Hexametildesilazane (HMDS) durante 30

minutos, em capela com exaustão. A seguir o HMDS foi pipetado e as amostras mantidas em capela até a total secagem. Esse procedimento evita o colapso das estruturas, desta forma substituindo o ponto crítico de CO₂ (Bossola & Russel, 1991). Em seguida, as amostras foram montadas em suporte de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face e cobertas com 20nm de ouro, em metalizador da marca Baltec, modelo SCD005. A análise e o registro de imagens foram realizados em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca Philips, modelo XL 30, do Laboratório de Materiais da UFSC.

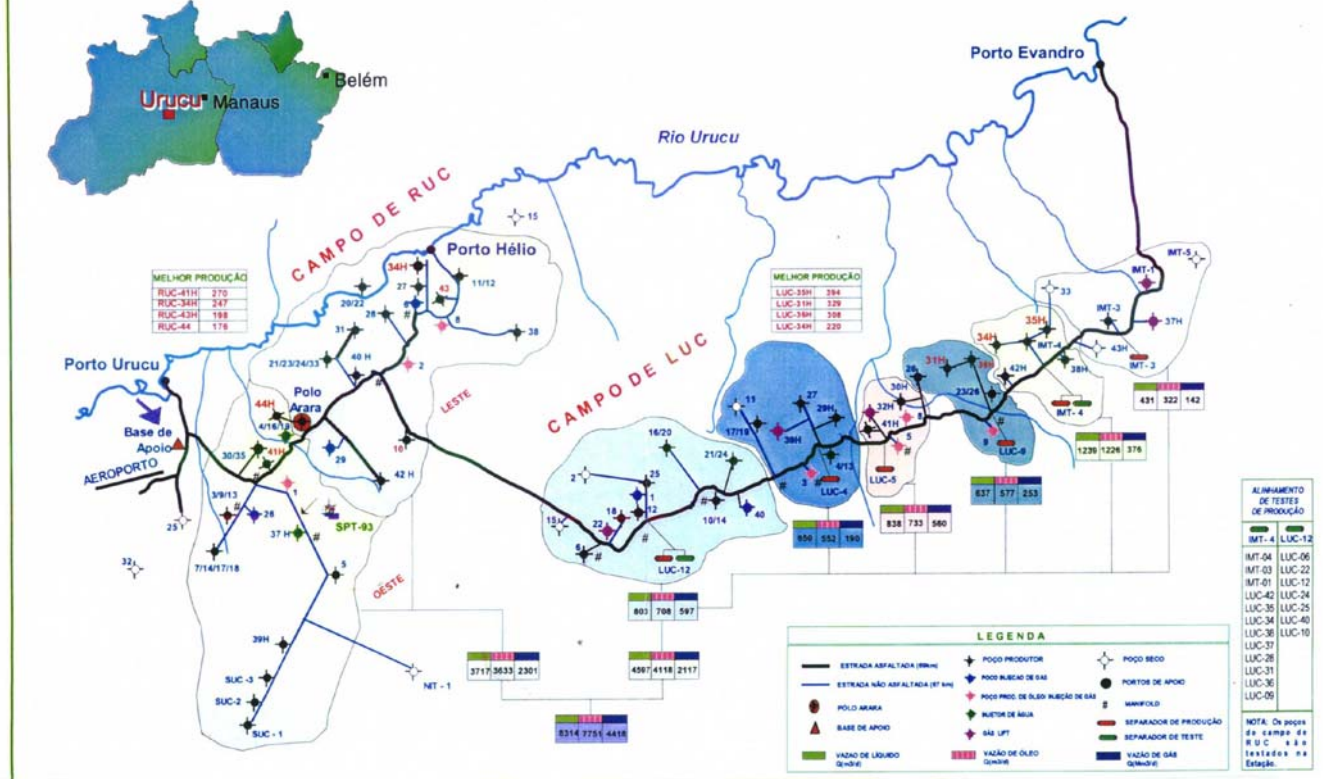
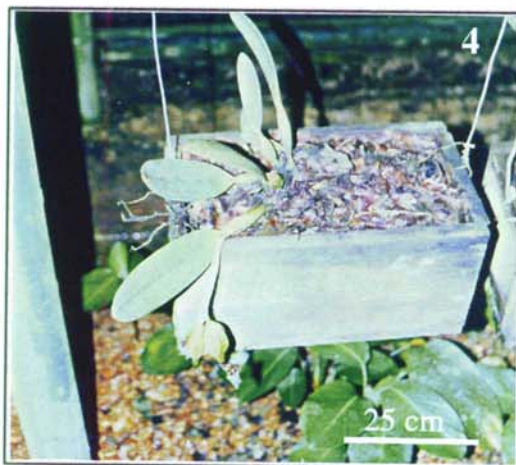


Figura 1. Localização da área de coleta na Região de Urucu/AM (seta).
(Fonte: Petrobrás, com adaptações)



Figura 2: Mapa do Estado do Pará. A seta aponta para a cidade de Castanhal, onde localiza-se o Orquidário Torres. (Fonte: <http://www.guianet.com.br>, com adaptações)



Figuras 3-8. Flores e frutos de Orchidaceae. **3-4.** Flor e fruto de *Cattleya eldorado* Lindl. **5-6.** Flor e fruto de *Epidendrum imatophyllum* Lindl. **7-8.** Flor e fruto de *Epidendrum schomburgkii* Lindl. Fonte da imagem da flor de *E. imatophyllum* . www.missouribotanicalgarden.

RESULTADOS

Cattleya eldorado Linden

Semente

Características morfo-anatômicas

As sementes de *Cattleya eldorado* (Fig. 9) apresentam comprimento médio de 509 ± 71 μm e diâmetro médio de 101 ± 20 μm . A forma é alongada (Fig. 10 e 11), sendo afilada nas extremidades e globosa na porção central. As células da testa (Fig. 12) são alongadas, com paredes anticlinais onduladas e paredes periclinais sem ornamentações, embora essas se apresentem aparentemente um pouco colapsadas, o que pode ser resultante do processo de desidratação. O embrião, evidenciado, em microscopia óptica, por transparência da testa, tem forma elíptica e encontra-se em posição centralizada na semente (Fig. 10). Em média, o embrião apresenta 164 ± 33 μm de comprimento e 81 ± 13 μm de diâmetro. Visto em secção longitudinal, constata-se que é formado por células indiferenciadas, com um estrato de células menores delimitando a estrutura, correspondendo a protoderme. Em uma das extremidades do embrião ocorre a presença de um suspensor formado por duas fileiras de células, na porção proximal, e por uma fileira celular, na porção distal.

Germinação

Como referido na metodologia, considerou-se, como parâmetro de germinação da semente, o intumescimento do embrião e o rompimento da testa, formando um corpo globular esverdeado, indicando a presença de clorofila. Este processo ocorreu dez dias após a semeadura no substrato não-asséptico (sementes de açaí – SA) e em torno de vinte dias nos meios de cultura assépticos (meio KC e meio MS $\frac{1}{2}$). No substrato composto por sementes de açaí, a taxa de germinação foi de 93,0%, no meio MS $\frac{1}{2}$ foi de 85,3% e no meio KC foi de 78,2%.

Plântula

As características morfo-anatômicas e as dimensões das plântulas foram analisadas a cada 14 dias após a germinação. Ao longo do desenvolvimento, perceberam-se

variações morfo-anatômicas, porém, geralmente de modo similar nas três condições de cultivo.

Nas figuras 13 e 14, observa-se que nas fases iniciais do crescimento, principalmente com relação ao comprimento, houve pouca variação entre os três tratamentos, porém 70 dias após a germinação ficou evidente o maior desenvolvimento de plântulas crescendo no substrato não-asséptico, o qual possibilitou a ocorrência de micorrizas.

Com relação às dimensões, no comprimento (Tab. 1), a análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$), entre as médias obtidas ao longo do desenvolvimento, nas três condições de cultivo. As diferenças ocorreram nos primeiros estádios de desenvolvimento (14, 28 e 42 dias), nos três tratamentos. O mesmo ocorreu também nos estádios seguintes (56 e 70 dias), para plântulas desenvolvendo-se no substrato não-asséptico (sementes de açaí), porém não para as plântulas cujo meio era asséptico (MS ½ e KC). A comparação entre as médias obtidas nos três tratamentos é tratada nos itens correspondentes a cada período avaliado (14 a 70 dias).

A análise de variância, com relação ao diâmetro (Tab. 2), também detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$). As diferenças entre as médias foram mais acentuadas somente após períodos mais longos, por exemplo, no substrato SA não houve diferenças entre 14 e 28 dias, bem como entre 42 e 56 dias, mas os dois primeiros diferiram dos dois últimos, bem como, esses diferem do último período avaliado (70 dias). A comparação entre as médias obtidas nos três tratamentos é tratada nos itens correspondentes a cada período avaliado (14 a 70 dias).

14 dias após a germinação

A plântula, nessa fase, apresenta-se como uma estrutura, de aspecto esverdeado, na qual a região apical, mais afilada, e basal, mais globosa, tuberculiforme, já podem ser claramente reconhecidas, caracterizando o protocormo (Fig. 15 e 16). Frequentemente, restos da testa ainda mantêm-se aderidos a essa estrutura cônica (Fig. 16). Na região basal, geralmente observa-se grande quantidade de rizóides (Fig. 17), unicelulares e translúcidos. Em plântulas que germinaram no substrato não-asséptico (sementes de açaí), sobre os rizóides, evidenciam-se artrosporos (Fig. 18), indicando a possibilidade de simbiose entre fungos micorrízicos. No ápice do protocormo e sobre o primórdio foliar (ou folha cotiledonar), podem ser vistos os estômatos (Fig. 19), em fases iniciais de desenvolvimento, ainda sem abertura do poro estomático (Fig. 20) e com a cutícula já rompida para formação do

mesmo (Fig. 21). O protocormo visto em secção longitudinal (Fig. 22), está constituído na porção central por células parenquimáticas, com núcleos evidentes, com paredes delgadas e com lume amplo, esse provavelmente com grandes vacúolos. Frequentemente observam-se, no centro da região apical, algumas células menores com protoplasto mais denso, correspondendo ao promeristema (Fig. 22). Periféricamente toda estrutura é revestida por uma protoderme, constituída por pequenas células com protoplasto denso, da qual originam-se os rizóides por expansão celular.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 1 e 2. Foram constatadas dimensões um pouco maiores nas plântulas crescendo no substrato não-asséptico, em relação àquelas dos meios assépticos, porém apenas no caso do comprimento tais diferenças foram significativas. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, para o comprimento da plântula, porém para o diâmetro não ocorreram diferenças significativas.

28 dias após a germinação

Os protocormos (Fig. 23 e 24) apresentam-se mais desenvolvidos, com estrutura tuberculiforme mais definida, tendo o ápice mais proeminente, devido ao desenvolvimento dos primórdios foliares (folha cotiledonar e primeiras folhas), e com densa cobertura basal por rizóides longos. Nas plântulas desenvolvendo-se no meio MS $\frac{1}{2}$, em relação àquelas do meio KC, constatou-se que o ápice geralmente era menos evidente, havendo assim um maior retardo no desenvolvimento dos primórdios foliares. Em secção longitudinal do protocormo, pode ser evidenciada, no ápice, a presença de promeristema (Fig. 25) e por vezes algumas células meristemáticas centrais, provavelmente precursoras do procâmbio (Fig. 26). Contornando toda a estrutura, encontra-se a protoderme, algumas células desse tecido, na região basal, proliferam formando projeções (Fig. 26), constituídas por células com características meristemáticas (pequenas, com núcleos grandes e protoplasto denso), das quais originam-se tufo de pêlos absorventes (rizóides).

Nas plântulas desenvolvendo-se sobre as sementes de açaí (Fig. 27), registrou-se a presença de micorrizas, caracterizadas pelas hifas e estruturas de reprodução dos fungos, denominadas de corpos esporoquiais, na região basal do protocormo (Fig. 28). Não foi encontrada nenhuma evidência de micorrizas nas plântulas desenvolvendo-se nos meios assépticos (MS $\frac{1}{2}$ e KC).

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 1 e 2. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. As plântulas crescendo no meio KC mostraram-se maiores, sendo as menores aquelas do meio MS $\frac{1}{2}$. Com relação ao diâmetro, as maiores dimensões foram observadas também nas plântulas do meio KC, porém as menores foram as do substrato com sementes de açaí. Tanto no comprimento, quanto no diâmetro as diferenças entre todos tratamentos são estatisticamente significativas.

42 dias após a germinação

Nessa fase foi ainda mais evidente a forma de tubérculo da base do protocormo (Fig. 29 e 30), assumindo um aspecto mais discóide, pela mais acentuada ampliação do diâmetro, e a forma bem mais definida do ápice, com cor esverdeada mais intensa, pela presença de clorofila nos primórdios foliares (folha cotiledonar e primeiras folhas). Os rizóides ou pêlos absorventes (Fig. 31) tornam-se mais numerosos e longos, especialmente no substrato constituído por sementes de açaí (comparar, por exemplo, quantidade de rizóides nas Figs. 30 – SA e 29 – MS $\frac{1}{2}$). No meio KC geralmente a quantidade de rizóides é maior que no meio MS $\frac{1}{2}$, porém menor que no substrato SA. Em secção longitudinal do protocormo (Fig. 32), não se evidenciam muitas alterações histológicas em relação ao descrito para o período anterior de desenvolvimento. A protoderme delimita a estrutura, destacando-se uma projeção lateral no ápice do protocormo (Fig. 32), e rizóides originam-se da base de contorno irregular do protocormo (Fig. 33).

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 1 e 2., As plântulas crescendo no meio KC mostraram-se um pouco maiores, sendo um pouco menores aquelas do meio MS $\frac{1}{2}$, porém a análise de variância não detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as médias obtidas para as plântulas dos três tratamentos. Com relação ao diâmetro, a análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as médias. Os maiores diâmetros foram observados nas plântulas do substrato constituído por sementes de açaí e os menores no meio MS $\frac{1}{2}$, porém as diferenças só foram estatisticamente significativas entre as médias obtidas para os tratamentos SA e KC com relação ao tratamento MS $\frac{1}{2}$, mas não entre SA e KC.

56 dias após a germinação

Nesse período a plântula, nas três condições de cultivo, (Fig. 34 a 36), já apresenta, na maioria das vezes, a emissão do segundo primórdio foliar. Na base do protocormo, os rizóides (Fig. 37) são numerosos, caracterizados por estruturas unicelulares, originadas da protoderme. A base do protocormo apresenta contorno bastante irregular, devido às projeções que portam os rizóides (Fig. 38 e 39). Em secção longitudinal, na região central do protocormo, visualiza-se a formação do procâmbio (Fig. 38, 40 e 41), responsável pela origem dos primeiros elementos condutores. As células da folha cotiledonar parecem ter dimensões maiores que as células das primeiras folhas (Fig. 42), o que pode estar relacionado com maior quantidade de vacúolos contendo reservas nutritivas, entretanto é uma evidência que ainda necessitaria ser melhor investigada.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três diferentes condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 1 e 2. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os comprimentos médios obtidos nos três tratamentos. As plântulas crescendo no meio KC mostraram-se maiores, seguidas do substrato SA, sendo que as menores foram as do meio MS $\frac{1}{2}$, porém as diferenças só foram significativas quando comparados os comprimentos de plântulas dos tratamentos KC e SA com àquelas do tratamento MS $\frac{1}{2}$. Com relação ao diâmetro, a análise de variância não detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as médias obtidas para os três tratamentos.

70 dias após a germinação

Nesse período os primórdios foliares já se encontram bastante desenvolvidos, fato observado nos três tratamentos (Fig. 43, 44 e 45). No substrato com sementes de açaí, a plântula apresenta-se com aspecto mais vigoroso e com quantidade de rizóides visivelmente maior (comparar Fig. 45 com as Figs. 43 e 44). Em secções longitudinais do protocormo, pode ser evidenciada a protoderme delimitando toda estrutura (Fig. 46) e rizóides concentrados na região central da base (Fig. 46 e 47).

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 1 e 2. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os comprimentos médios obtidos para as plântulas dos três tratamentos. As plântulas crescendo no substrato com sementes de açaí apresentaram comprimentos maiores, seguidas daquelas dos meios

assépticos, KC e MS ½, sendo as diferenças significativas em todos os casos. Com relação ao diâmetro, a análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as médias, sendo essas diferenças presentes apenas quando comparados os diâmetros de plântulas dos meios assépticos (KC e MS ½) com os de plântulas do substrato não-asséptico (SA), portanto não sendo significativas as diferenças entre os diâmetros de plântulas dos dois meios assépticos.

Tabela 1. Comprimento (μm) dos protocormos de *Cattleya eldorado* Lind., originados da germinação das sementes da espécie, sob diferentes condições de cultivo, em meios de cultura assépticos MS $\frac{1}{2}$ e KC e em substrato não-asséptico constituído por sementes de açaí (SA).

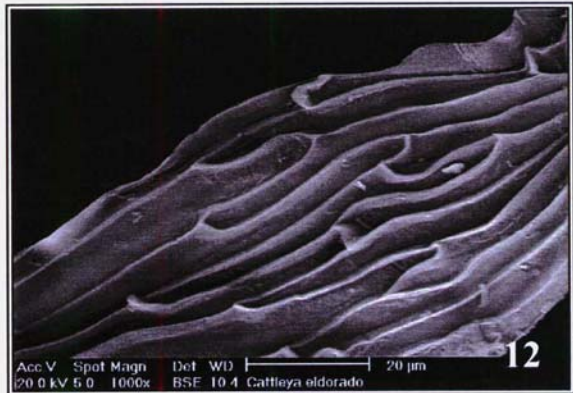
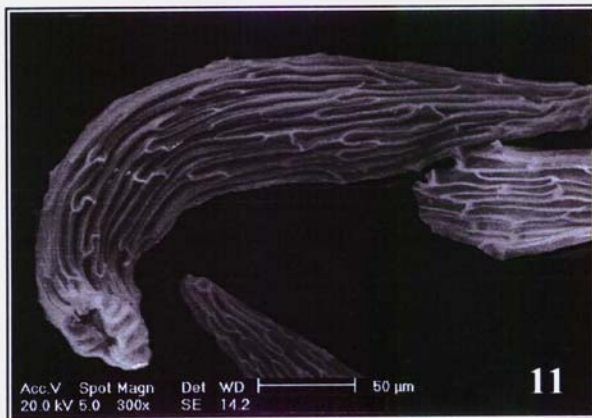
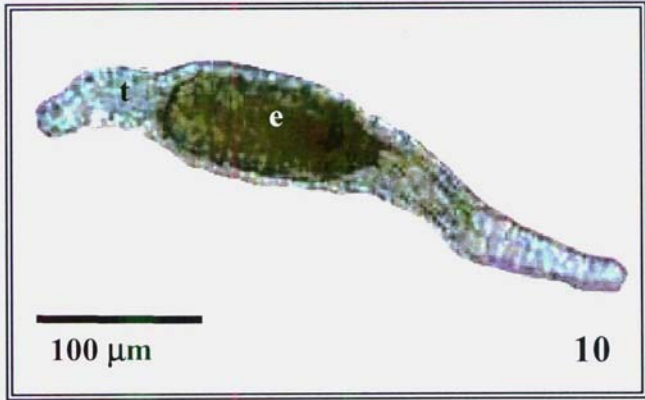
Período de desenvolvimento	Condições de cultivo			CV
	MS $\frac{1}{2}$	KC	SA	
14 dias	^A 577,41 ^a	^A 576,94 ^a	^B 734,12 ^a	3,25 %
28 dias	^A 741,18 ^b	^C 977,88 ^b	^B 864,94 ^b	1,94 %
42 dias	^A 1429,65 ^c	^A 1474,82 ^c	^A 1434,35 ^c	2,40 %
56 dias	^A 1485,18 ^{cd}	^B 2012,24 ^d	^B 1907,76 ^d	1,82 %
70 dias	^A 1651,76 ^d	^B 2234,35 ^d	^C 2856,47 ^e	2,53 %
CV	2,55 %	2,58 %	2,01 %	

Nota: Letras que antecedem os valores comparam na horizontal. Letras que seguem os valores comparam na vertical. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Diâmetro (μm) dos protocormos de *Cattleya eldorado* Lind., originados da germinação das sementes da espécie, sob diferentes condições de cultivo, em meios de cultura assépticos MS $\frac{1}{2}$ e KC e em substrato não-asséptico constituído por sementes de açaí (SA).

Período de desenvolvimento	Condições de cultivo			CV
	MS $\frac{1}{2}$	KC	SA	
14 dias	^A 493,65 ^a	^A 458,35 ^a	^A 505,88 ^a	2,75 %
28 dias	^B 685,65 ^b	^C 838,12 ^b	^A 558,59 ^a	2,69 %
42 dias	^A 894,12 ^c	^B 1023,06 ^c	^B 1031,53 ^b	2,60 %
56 dias	^A 979,76 ^{cd}	^A 1108,71 ^c	^A 1037,18 ^b	2,75 %
70 dias	^A 1046,59 ^d	^A 1172,24 ^c	^B 1495,53 ^c	2,64 %
CV	2,70 %	2,74 %	2,21 %	

Nota: Letras que antecedem os valores comparam na horizontal. Letras que seguem os valores comparam na vertical. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Tukey.



Figuras 9-12. Sementes de *Cattleya eldorado* Lind. **9.** Sementes *in natura* (CFD). **10.** Detalhe do embrião (e), visto por transparência da testa (t), centralizado na semente *in natura* (MO). **11.** Aspecto geral da semente (MEV). **12.** Detalhe das células da testa (MEV).

Figura 13. Comprimento (μm) dos protocormos de *Cattleya eldorado* Lind., de 14 a 70 dias após ocorrer a germinação, em meios de cultura MS $\frac{1}{2}$ e KC (*in vitro*) e em substrato constituído por sementes de açaí (SA).

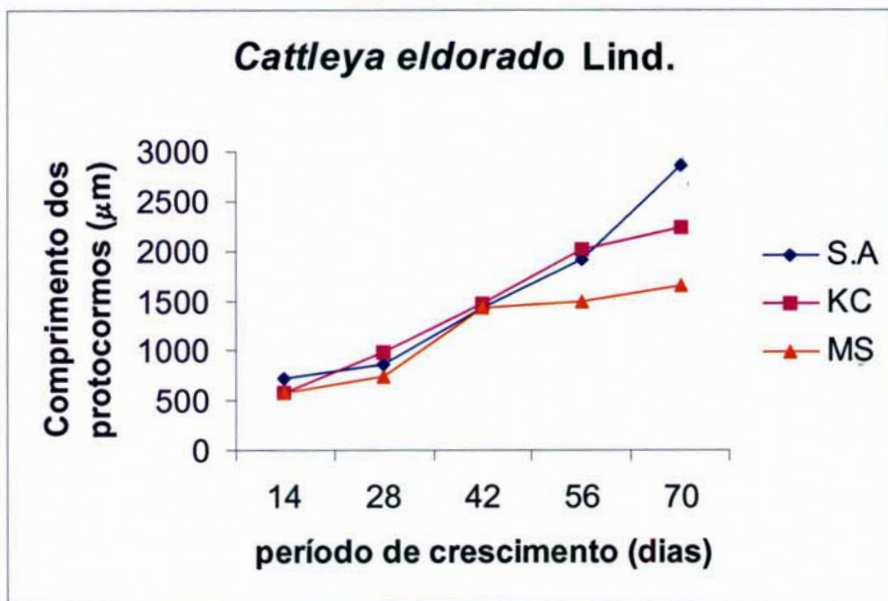
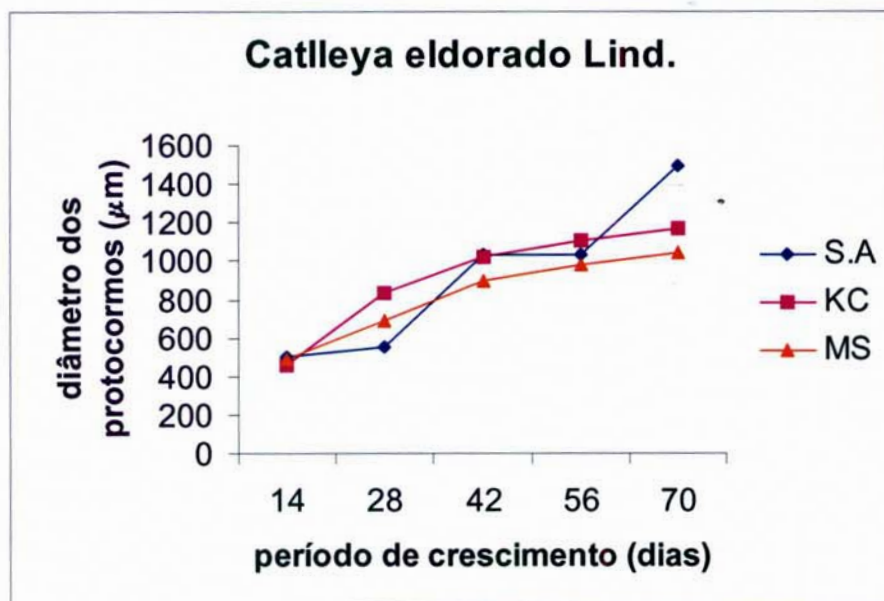
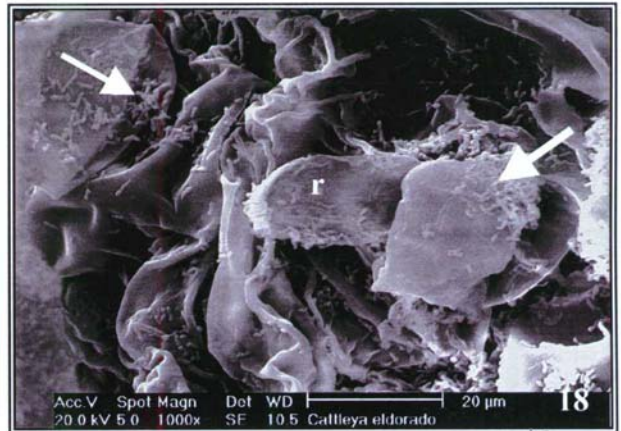
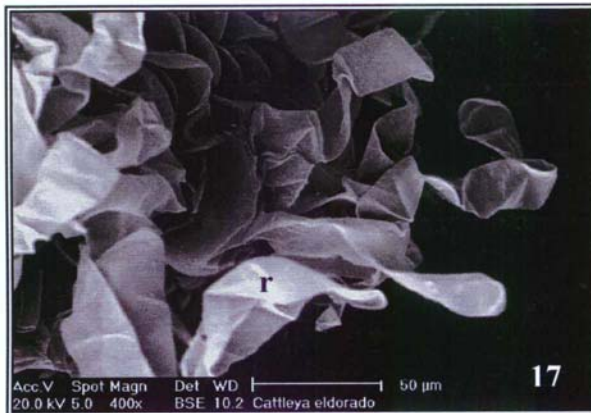
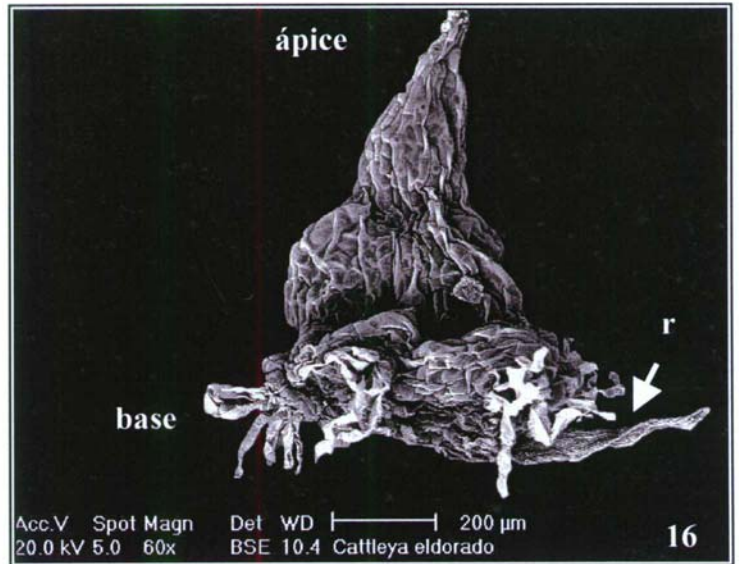
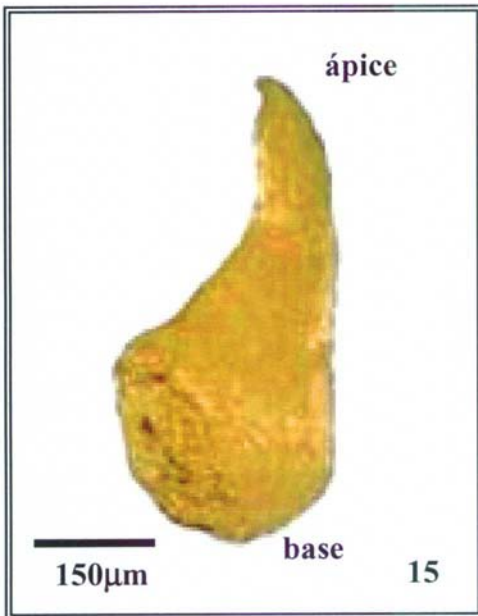
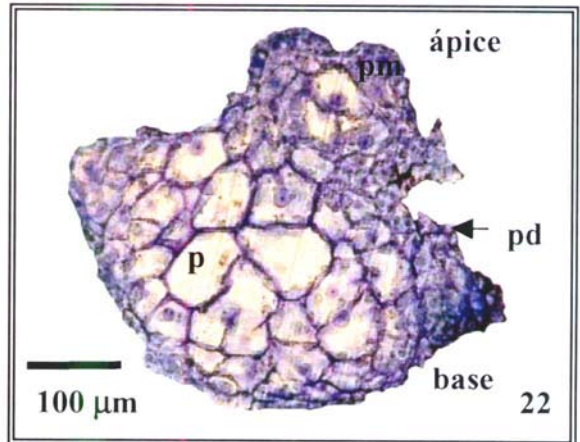
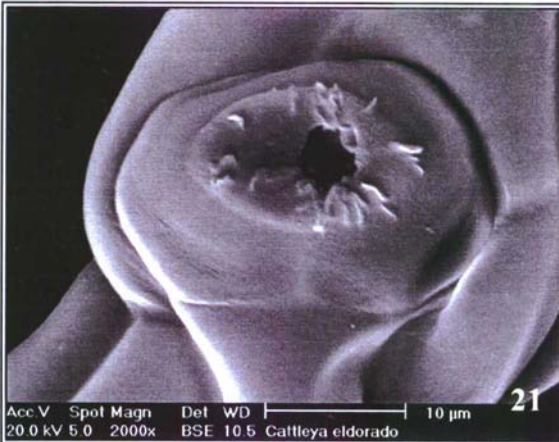
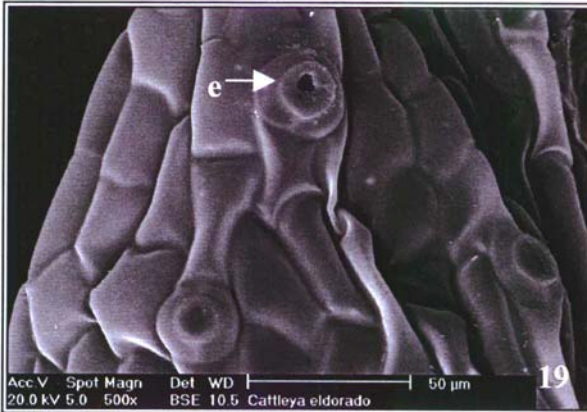


Figura 14. Diâmetro (μm) dos protocormos de *Cattleya eldorado* Lind., de 14 a 70 dias após ocorrer a germinação, em meios de cultura MS $\frac{1}{2}$ e KC (*in vitro*) e em substrato constituído por sementes de açaí (SA).

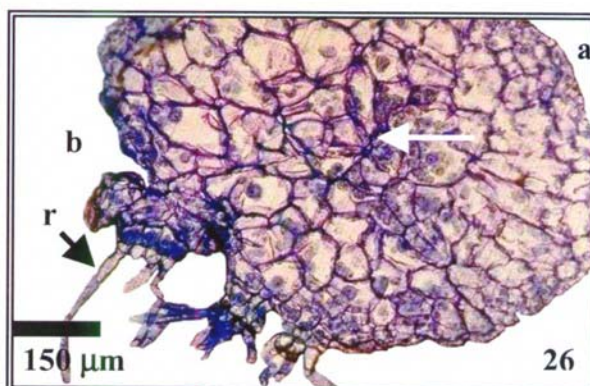
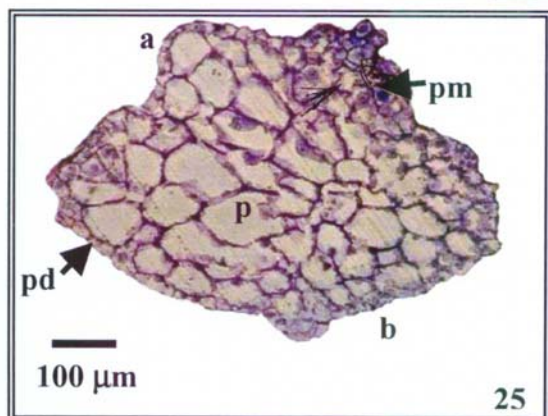
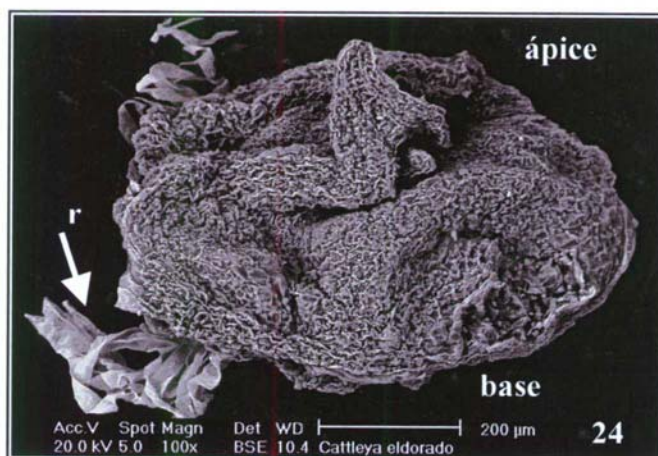
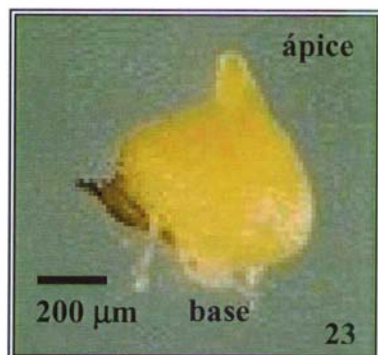




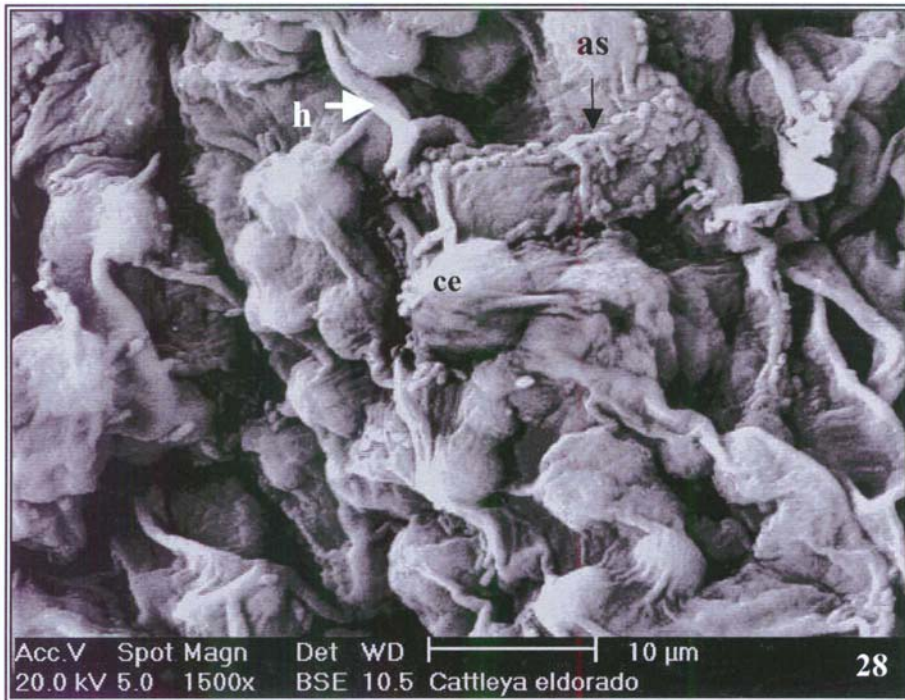
Figuras 15-18. Plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lind., 14 dias após a germinação das sementes. **15.** Protocormo, *in natura*, desenvolvido no substrato SA (MO). **16.** Protocormo desenvolvido no meio KC (MEV). **17.** Detalhe da fig. **16**, destacando os rizóides (r) (MEV). **18.** Rizóides (r) de protocormo desenvolvido em substrato SA, evidenciando a presença de artrosporos (indicados pelas setas) (MEV).



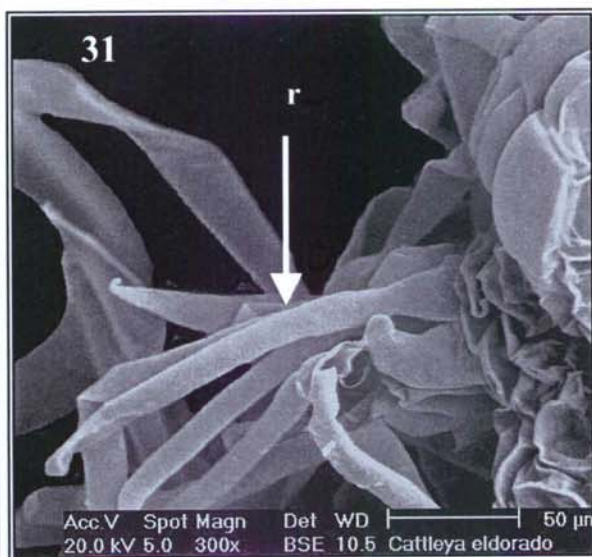
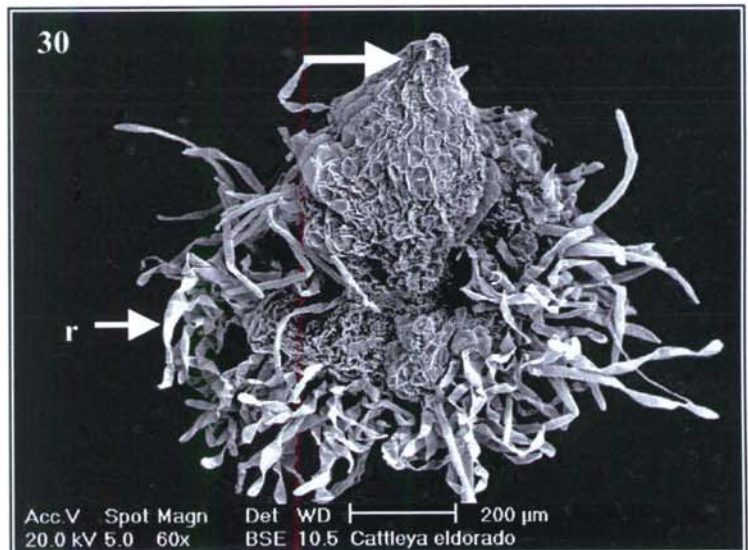
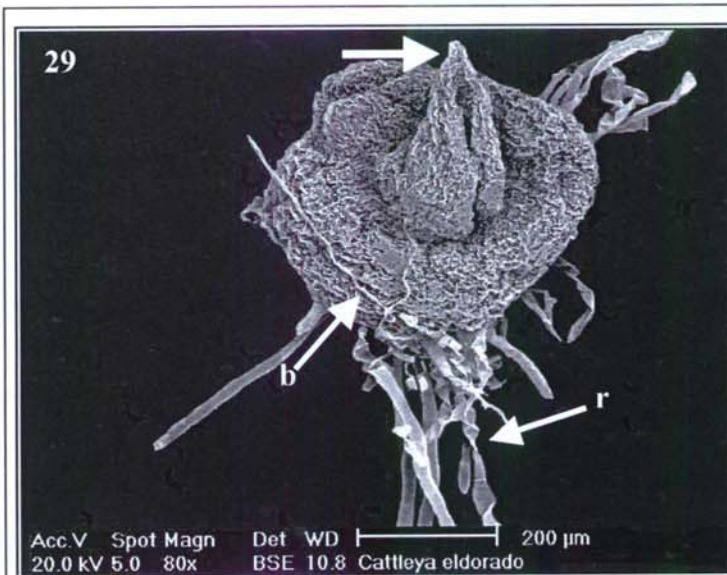
Figuras 19-22. Plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lind., 14 dias após a germinação das sementes. **19.** Região apical evidenciando estômatos em formação no primórdio foliar (folha cotiledonar) de protocormo desenvolvido em meio KC (MEV). **20** e **21.** Detalhes dos estômatos da fig. 19, em estágio inicial, sem poro estomático (**20**), e estágio mais avançado, já com poro estomático (**21**) (MEV). **22.** Secção longitudinal do protocormo, desenvolvido em meio MS (p- parênquima, pd- protoderme, pm- promeristema).



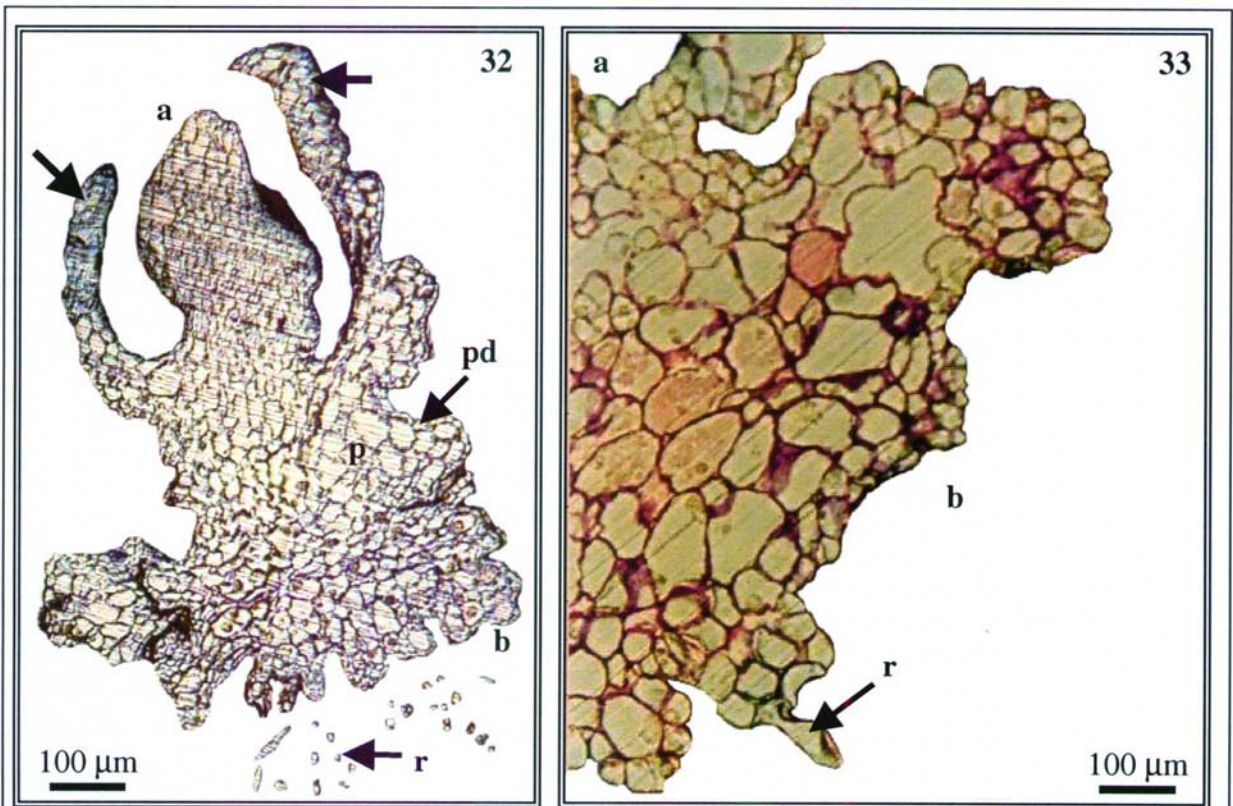
Figuras 23-26. Plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lind., 28 dias após a germinação das sementes. **23.** Protocormo, desenvolvido em meio KC, com aspecto tuberculiforme (ME). **24.** Protocormo, desenvolvido em substrato SA, destacando o aspecto discóide da base e o primeiro primórdio foliar (folha cotiledonar) no ápice do protocormo (MEV). **25 e 26.** Secções longitudinais de protocormos, desenvolvido em meio MS (a- ápice, b- base, p- parênquima, pd- protoderme, pm- promeristema, r- rizóide, seta indica células precursoras do procâmbio).



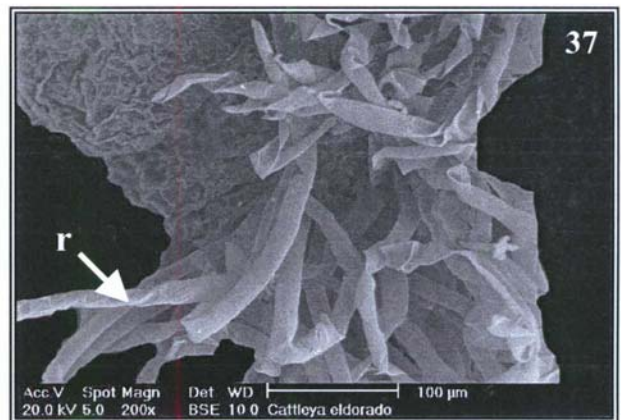
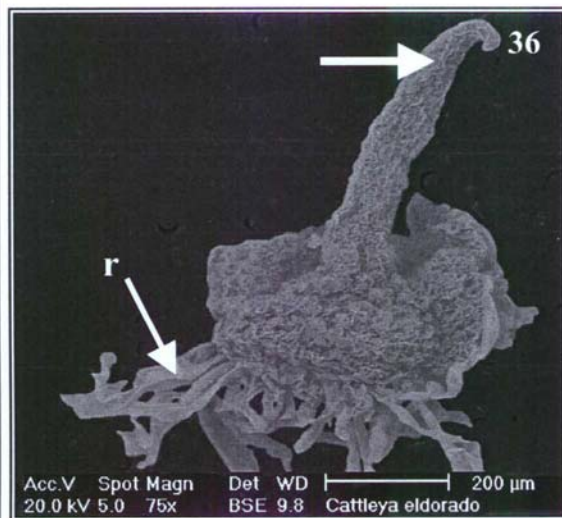
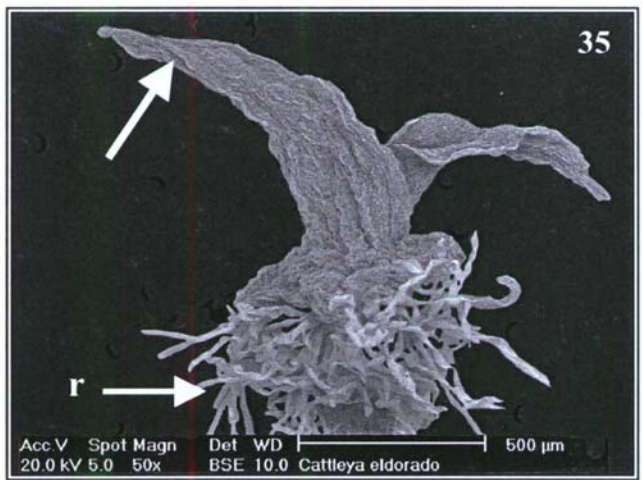
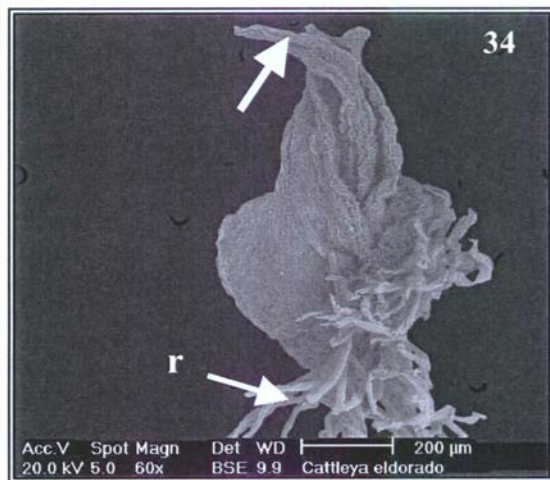
Figuras 27-28. Plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lind., 28 dias após germinação das sementes. **27.** Semente de açai com protocormos (CFD). **28.** Protocormo desenvolvido no substrato SA, evidenciando os artrosporos (as), as hifas (h) e os corpos esporodóquias (ce) na região basal (MEV).



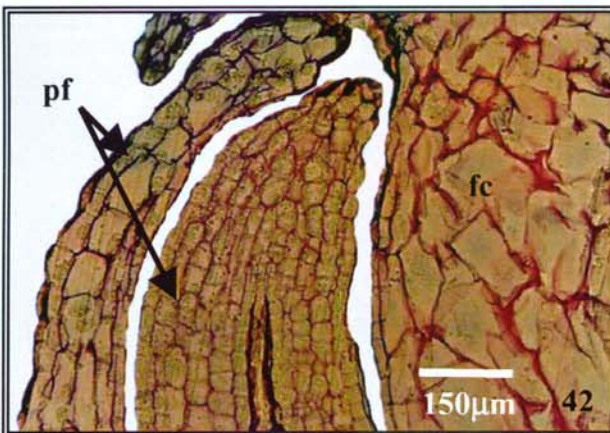
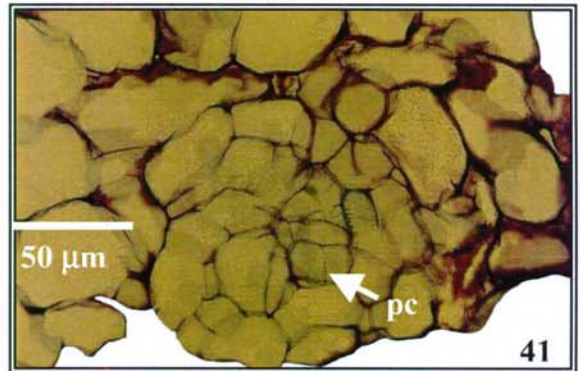
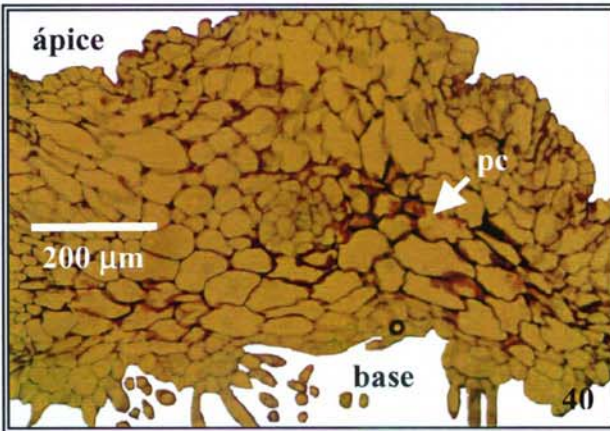
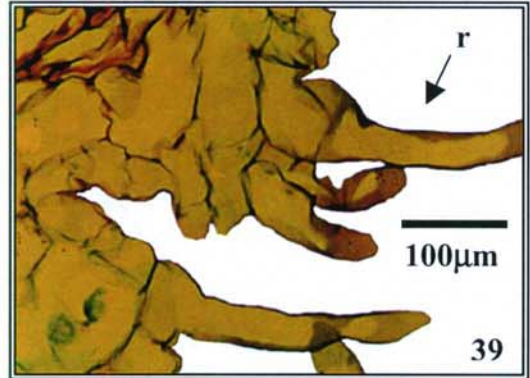
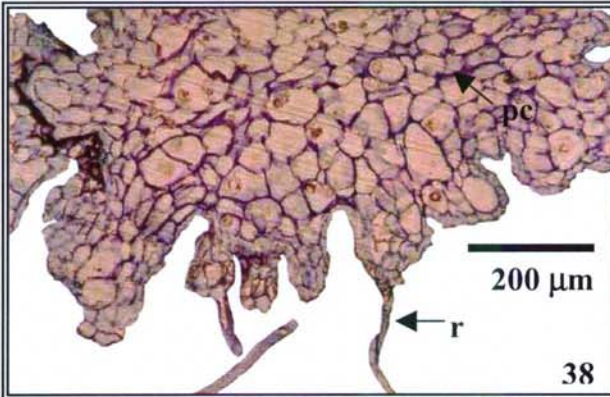
Figuras 29-31. Plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lind., 42 dias após a germinação das sementes. **29.** Protocormo desenvolvido em meio MS, com poucos rizóides (r) na região basal (b) (MEV). **30.** Protocormo desenvolvido no substrato SA, com grande quantidade de rizóides na região basal (MEV). **31.** Detalhe dos rizóides (r) da fig. 28 (MEV). Setas indicam o ápice do protocormo.



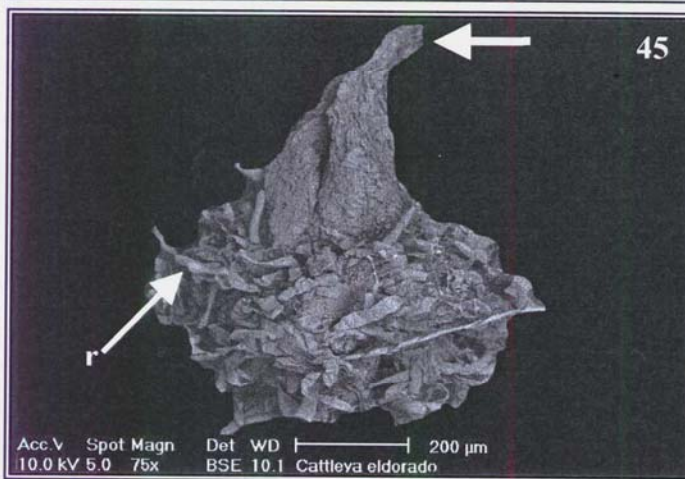
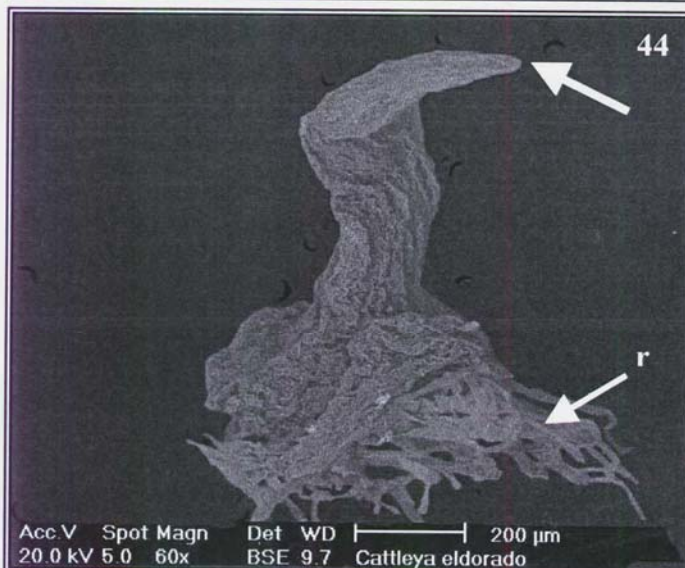
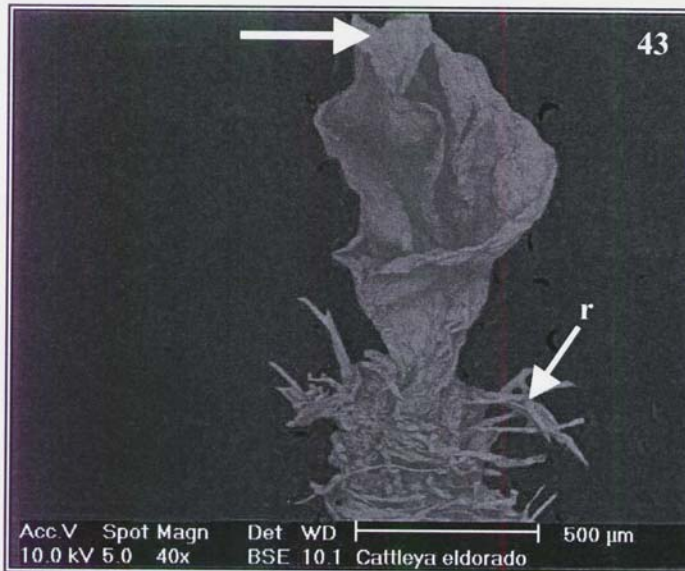
Figuras 32-33. Plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lind., 42 dias após a germinação das sementes. **32.** Secção longitudinal de protocormo, desenvolvido em meio MS, evidenciando, na região apical (a), os primórdios foliares (setas) e, na região basal (b), os rizóides (r) (MO). **33.** Detalhe da região basal de protocormo desenvolvido no meio MS, destacando a irregularidade da região basal, onde se originam os rizóides (r) (MO).



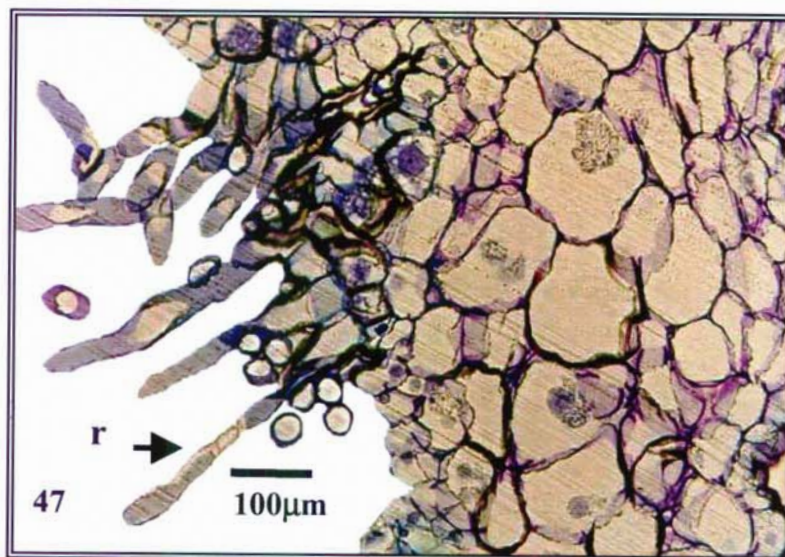
Figuras 34-37. Plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lind., 56 dias após a germinação das sementes (MEV). **34-36.** Protocormos desenvolvidos no meio MS (**34**), no meio KC (**35**) e no substrato SA (**36**), evidenciando os primórdios foliares (setas), no ápice, e os rizóides (r) na região basal. **37.** Detalhe dos rizóides do protocormo da fig. 34.



Figuras 38-42. Secções longitudinais de plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lind., 56 dias após a germinação das sementes (MO). **38.** Protocormo desenvolvido em meio MS, evidenciando, na região basal, o início da formação de células procambiais (pc) e os rizóides (r). **39-42.** Protocormos desenvolvidos no meio KC. **39.** Detalhe dos rizóides. **40.** Aspecto geral, evidenciando o procâmbio na região central. **41.** Detalhe da fig. 40. **42.** Primórdios foliares (pf), destacando células maiores da folha cotiledonar (fc).



Figuras 43-45. Plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lindl., 70 dias após a germinação das sementes, desenvolvidas no meio KC (43), no meio MS (44) e no substrato SA (45), evidenciando os primórdios foliares (setas), no ápice, e os rizóides (r) na região basal (MEV).



Figuras 46-47. Secções longitudinais de plântulas (protocormos) de *Cattleya eldorado* Lind., desenvolvidas no substrato SA, 70 dias após a germinação das sementes (MO). **46.** Evidenciando os tecidos do ápice até a base. **47.** Detalhe dos rizóides (r).

Epidendrum imatophyllum Lindle

Semente

Características morfo-anatômicas

As sementes de *Epidendrum imatophyllum* apresentam comprimento médio de $3369 \pm 441 \mu\text{m}$ e diâmetro médio de $278 \pm 41 \mu\text{m}$. A forma é elíptica, com as extremidades afiladas (Fig. 48), sendo constituída por testa e embrião. As células da testa (Fig. 49) apresentam a forma irregular, tendendo à alongada, com paredes anticlinais retas, percebendo-se com clareza, na zona de adesão entre células vizinhas, a lamela média (Fig. 50). A parede periclinal não é esculpada (Fig. 49 e 50) e observa-se sempre uma retração central, determinando uma elevação das paredes anticlinais, fato este que pode ser resultante de colapso ocorrido no processo de desidratação, refletindo a fragilidade maior desta parede.

O comprimento e diâmetro médios do embrião são de $291 \pm 38 \mu\text{m}$ e $182 \pm 39 \mu\text{m}$, respectivamente. O embrião apresenta a forma elíptica (Fig. 51) e encontra-se posicionado em uma das extremidades da semente, estando ligado à testa pelo suspensor. A delimitação das células que revestem o embrião é claramente observada devido à convexidade central dessas células, as quais mostram superfície rugosa (Fig. 52). Porém não se pode descartar a possibilidade de alterações provocadas pela preparação do material para a análise. Em secção transversal do embrião (Fig. 53), observa-se a forma crenada da superfície externa das células da protoderme, correspondendo a aparência da superfície descrita acima, para as observações em microscopia eletrônica de varredura. Nessa mesma secção ainda constata-se que as células são meristemáticas, com paredes delgadas, núcleos grandes e protoplasto denso, constituindo um maciço celular indiferenciado, com protoderme delimitando a estrutura. Entre o embrião e a testa, não se observa, na semente madura, a presença de outros tecidos, tais como tegumentos internos ou endosperma, assim o embrião encontra-se livre, mantendo-se ligado à testa, a qual é constituída por um único estrato celular (Fig. 53), apenas pelo suspensor, como já referido.

Germinação

O intumescimento do embrião e o rompimento da testa foram critérios para que se considerasse a semente como germinada. A germinação ocorreu em cerca de dez dias após a semeadura no substrato não-asséptico (sementes de açaí – SA) e em torno de vinte dias nos meios de cultura assépticos (meio KC e meio MS ½). No substrato constituído por sementes de açaí, a taxa de germinação foi de 60%, no meio MS ½ foi de 65% e no meio KC foi de 70%. Os resultados obtidos revelam que, nos meios assépticos (KC e MS ½), as taxas de germinação foram mais elevadas do que no substrato não-asséptico (SA), embora nesse último tenha sido constatado menor período de tempo entre a semeadura e a germinação.

Plântula

As características morfo-anatômicas, bem como as dimensões, das plântulas foram analisadas a cada 14 dias após a germinação. Ao longo do desenvolvimento, ocorreram alterações morfo-anatômicas, porém muito semelhantes nas três condições de cultivo, sendo mais evidentes as diferenças relativas às dimensões.

Nas Figuras 54 e 55, observa-se que, com relação ao comprimento, houve um desenvolvimento similar entre plântulas do meio KC e do substrato SA, havendo grande diferencial no período entre 56 e 70 dias. Já o diâmetro das plântulas crescendo no substrato não-asséptico (SA) destaca-se daqueles observados em plântulas dos meios assépticos (meios KC e MS ½). De modo geral, constata-se uma maior regularidade no desenvolvimento das plântulas crescendo em substrato SA, comparadas com aquelas crescendo nos meios KC e MS½.

A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$), entre as diferentes fases, com relação ao comprimento e ao diâmetro, quando considerado o mesmo tratamento. Analisando as diferenças entre as médias, ao longo do desenvolvimento, em cada um dos três tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para a largura, constatou-se que elas são quase sempre significativas, no caso de plântulas crescendo no substrato constituído por sementes de açaí, fato nem sempre constatado para os outros dois tratamentos. A comparação entre as médias obtidas nos três tratamentos é tratada nos itens correspondentes a cada período avaliado (14 a 70 dias).

14 dias após a germinação

Nessa fase, nas três condições de cultivo, observa-se que a plântula (protocormo) aumenta seu volume, porém permanece com a forma globular, mantendo-se ligada à testa da semente (Fig. 56). Sua coloração é esverdeada, denotando a presença de clorofila. Os rizóides (Fig. 57) já estão presentes, fato este que permite reconhecer a região basal da estrutura.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nos três tratamentos, são apresentados nas tabelas 3 e 4. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, para o comprimento e para o diâmetro das plântulas. Foram constatadas diferenças significativas entre os comprimentos médios das plântulas crescendo no substrato não-asséptico e nos meios assépticos, porém não foram significativas as diferenças entre os comprimentos médios de plântulas crescendo em meios assépticos. No substrato SA ocorreram as menores médias. No caso do diâmetro as diferenças foram significativas considerando as médias para os dois meios assépticos, porém não no caso comparativo entre esses meios (KC e MS $\frac{1}{2}$) e o substrato não-asséptico (SA).

28 dias após a germinação

Nesse período, morfológicamente são poucas as distinções no protocormo. Há um aumento no volume e no número de rizóides na região basal, primeira região a ficar desligada da testa (Fig. 58). Em alguns exemplares ocorreu início de diferenciação morfológica externa de região apical, podendo, assim, ser reconhecida uma base tuberculiforme e um ápice protuberante. Em secção transversal, na região média do protocormo, constata-se que, nesse estágio de desenvolvimento, já podem ser observadas grandes alterações histológicas, tais como presença de células precursoras procambiais, no centro da estruturas, células parenquimáticas e protoderme (Fig. 59).

Nas plântulas crescendo no substrato SA foi detectada a presença de artrosporos, entre e sobre os rizóides (Fig. 60), fato esse não evidenciado nas amostras provenientes dos outros tratamentos.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três diferentes condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 3 e 4. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. Para comprimento, as menores médias foram obtidas para os tratamentos KC e SA, distintas

significativamente das obtidas para o tratamento MS $\frac{1}{2}$, onde se observaram plântulas com maior comprimento médio. Com relação ao diâmetro, as maiores médias foram obtidas em plântulas dos meios KC e MS $\frac{1}{2}$, distintas significativamente das médias obtidas para plântulas do substrato SA.

42 dias após a germinação

A plântula (protocormo), nesse estágio de desenvolvimento, já apresentava a região apical distinta (Fig. 61 e 62), embora ainda pouco proeminente. Foi observado que a tonalidade verde dos tecidos tornou-se mais intensa, denotando aumento na quantidade de cloroplastos, que poderia determinar processos mais efetivos de assimilação. Em secção longitudinal do protocormo, pode ser evidenciado o procâmbio, no centro da porção média da estrutura (Fig. 62). Cabe ressaltar que, tanto nessa fase, quando o protocormo foi seccionado longitudinalmente (Fig. 62), quanto na fase anterior, onde foi seccionado transversalmente (Fig. 59), o procâmbio apresenta-se similar, fato que parece indicar que a estrutura inicia por um maciço central, sem orientação definida.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 3 e 4. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. Para comprimento, as maiores médias foram obtidas para os tratamentos KC e SA, distintas significativamente das obtidas para o tratamento MS $\frac{1}{2}$, onde se observaram plântulas com menor comprimento médio. Ressalte-se que a partir desse período, plântulas do substrato SA continuaram um gradual desenvolvimento, ao passo que plântulas do meio MS $\frac{1}{2}$ praticamente não se desenvolveram (Figs. 54 e 55). Com relação ao diâmetro, as maiores médias foram obtidas em plântulas do substrato SA, distintas significativamente das médias obtidas para plântulas dos meios KC e MS $\frac{1}{2}$.

56 dias após a germinação

Nesse período, foi observada a emissão de primórdio foliar (folha cotiledonar) nas plântulas (protocormos) desenvolvendo-se no meio KC e no substrato SA, porém não no meio MS $\frac{1}{2}$. No substrato com sementes de açaí, as plântulas apresentam aspecto mais vigoroso, por vezes já com o segundo primórdio foliar. Em secção longitudinal do protocormo (Fig. 63), percebe-se o aumento do número de células parenquimáticas preenchendo a estrutura, sem

clara distinção de promeristema no ápice, mas na base evidencia-se aumento na quantidade de rizóides.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 3 e 4. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. Para comprimento, as maiores médias foram obtidas para os tratamentos KC e SA, distintas significativamente das obtidas para o tratamento MS $\frac{1}{2}$, onde se observou plântulas com menor comprimento médio. Com relação ao diâmetro, as maiores médias foram obtidas em plântulas do substrato SA, distintas significativamente das médias obtidas para plântulas dos meios KC e MS $\frac{1}{2}$.

70 dias após a germinação

Nessa fase do desenvolvimento, as plântulas (protocormos) apresentam, nos três tratamentos, estrutura mais definida, onde se observa uma região basal discóide, com rizóides, e uma região apical proeminente (Fig. 64), com primórdios foliares (Fig. 65). Nos primórdios foliares foi observada a ocorrência de estômatos (Fig. 64). Em secção longitudinal do protocormo (Fig. 66), já é evidenciada a presença de promeristema na região apical.

Na base do protocormo ocorre grande quantidade de hifas e artrosporos (Fig. 67), evidenciando a possibilidade de simbiose entre micorrizas e a plântula de orquídea.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 3 e 4. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. Para comprimento, as maiores médias foram obtidas para as plântulas do substrato SA, seguidas daquelas do meio KC e do meio MS $\frac{1}{2}$, sendo distintas significativamente em todos os casos. Com relação ao diâmetro, as maiores médias foram obtidas em plântulas do substrato SA, distintas significativamente das médias obtidas para plântulas dos meios KC e MS $\frac{1}{2}$, essas não distintas significativamente entre si.

Tabela 3. Comprimento (μm) dos protocormos de *Epidendrum imatophyllum* Lindl. originados da germinação das sementes da espécie, sob diferentes condições de cultivo, em meios de cultura assépticos MS $\frac{1}{2}$ e KC e em substrato não-asséptico constituído por sementes de açaí (SA).

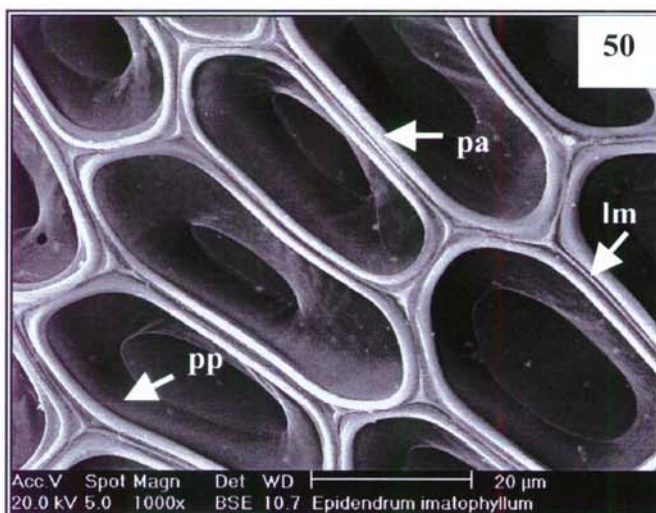
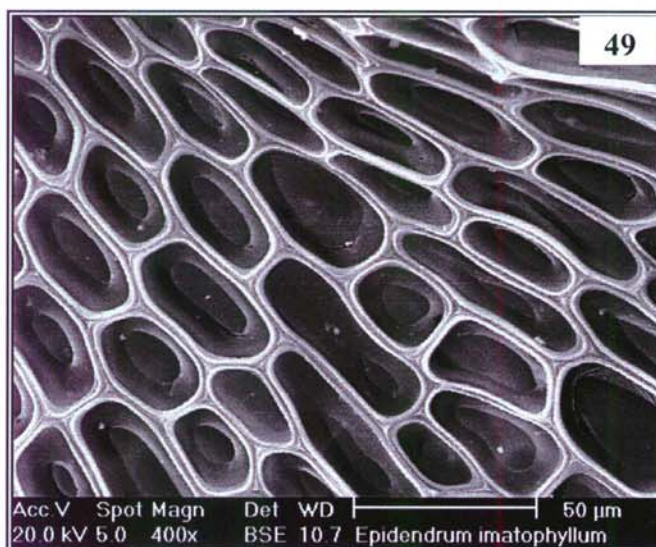
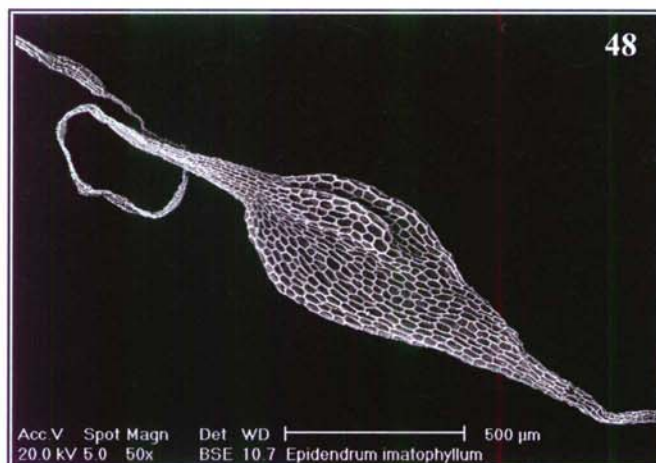
Período de desenvolvimento	Condições de cultivo			CV
	MS $\frac{1}{2}$	KC	SA	
14 dias	^B 963,76 ^a	^B 895,06 ^a	^A 766,12 ^a	1,80 %
28 dias	^B 1331,76 ^b	^A 1135,06 ^b	^A 1109,65 ^b	2,49 %
42 dias	^A 1332,71 ^b	^B 1467,29 ^c	^B 1443,76 ^c	1,74 %
56 dias	^A 1365,65 ^b	^B 2041,41 ^d	^B 2099,76 ^d	2,10 %
70 dias	^A 1795,76 ^c	^B 2062,12 ^d	^C 2473,41 ^e	1,97 %
CV	2,20 %	1,81 %	2,10 %	

Nota: Letras que antecedem os valores comparam na horizontal. Letras que seguem os valores comparam na vertical. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Tukey.

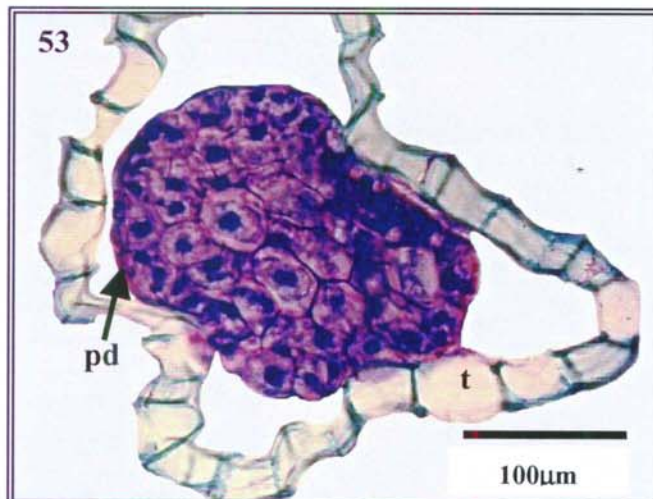
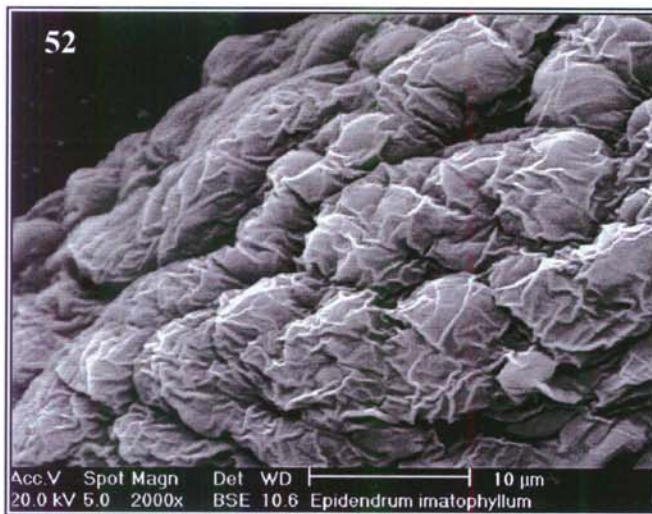
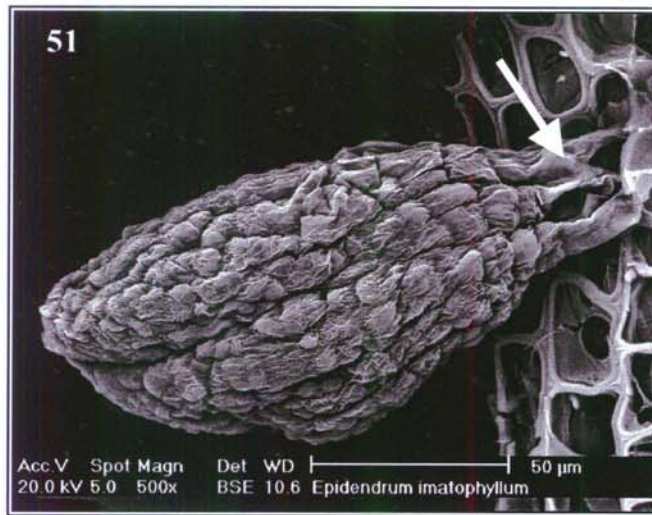
Tabela 4. Diâmetro (μm) dos protocormos de *Epidendrum imatophyllum* Lindl. originados da germinação das sementes da espécie, sob diferentes condições de cultivo, em meios de cultura assépticos MS $\frac{1}{2}$ e KC e em substrato não-asséptico constituído por sementes de açaí (SA).

Período de desenvolvimento	Condições de cultivo			CV
	MS $\frac{1}{2}$	KC	SA	
14 dias	^B 750,12 ^a	^A 661,65 ^a	^{AB} 667,29 ^a	8,71 %
28 dias	^B 967,53 ^b	^B 934,59 ^b	^A 792,47 ^b	8,20 %
42 dias	^A 989,18 ^{bc}	^A 991,06 ^b	^B 1169,88 ^c	10,37 %
56 dias	^A 1065,41 ^c	^A 998,59 ^b	^B 1280,00 ^{cd}	8,10 %
70 dias	^A 1116,24 ^c	^A 1197,18 ^c	^B 1368,47 ^d	6,05 %
CV	16,32 %	18,34 %	14,79 %	

Nota: Letras que antecedem os valores comparam na horizontal. Letras que seguem os valores comparam na vertical. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Tukey.



Figuras 48-50. Semente de *Epidendrum imatophyllum* Lindl. (MEV). **48.** Aspecto geral, note porção central mais ampla e extremidades afiladas. **49.** Células da testa. **50.** Detalhe das paredes anticlinais (pa) das células da testa, onde se observa a lamela média (lm) e a retração da parede periclinas (pp).



Figuras 51-53. *Epidendrum imatophyllum* Lindl. **51.** Embrião ligado à testa pelo suspensor (seta) (MEV). **52.** Detalhe das células do embrião (MEV). **53.** Secção transversal da semente destacando o embrião (e) e a testa (t), note a superfície crenada das células da protoderme (pd) (MO).

Figura 54 . Comprimento (μm) dos protocormos de *Epidendrum imatophyllum* Lindl., de 14 a 70 dias após ocorrer a germinação, em meios de cultura MS $\frac{1}{2}$ e KC (*in vitro*) e em substrato constituído por sementes de açaí (SA).

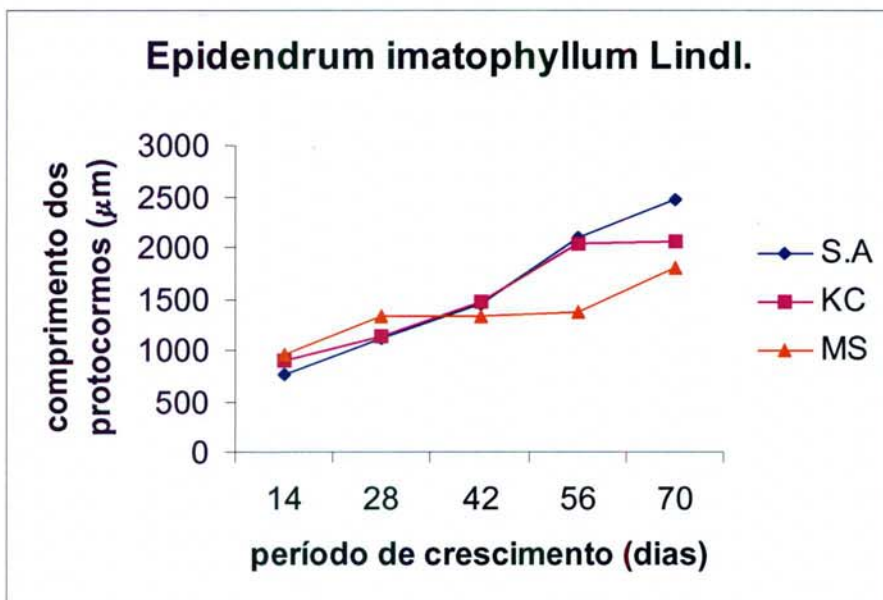
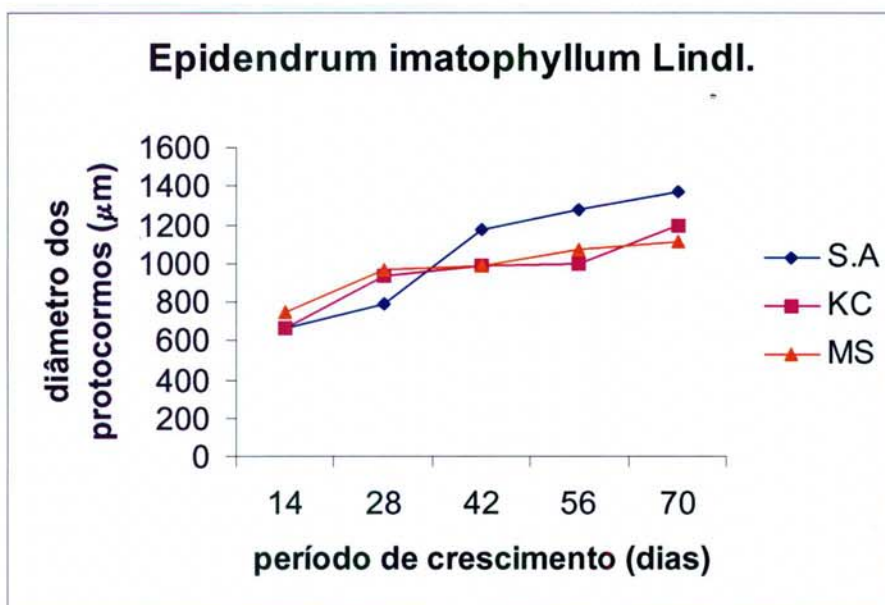
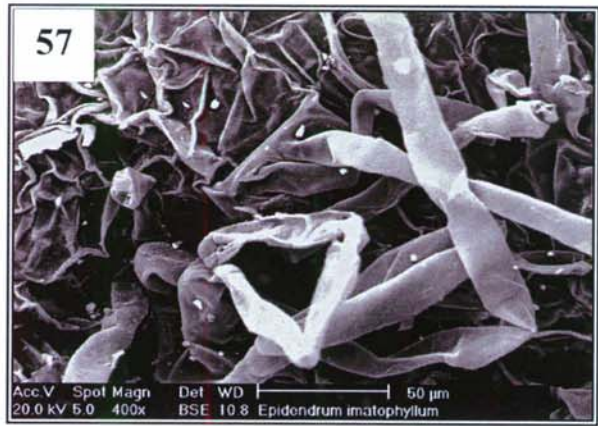
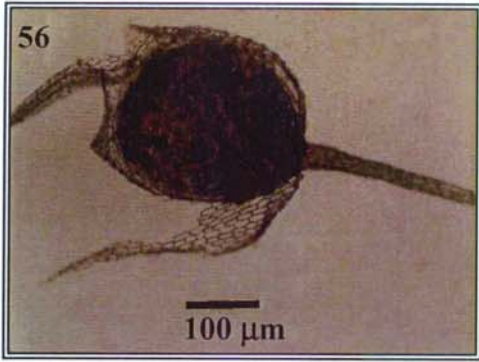
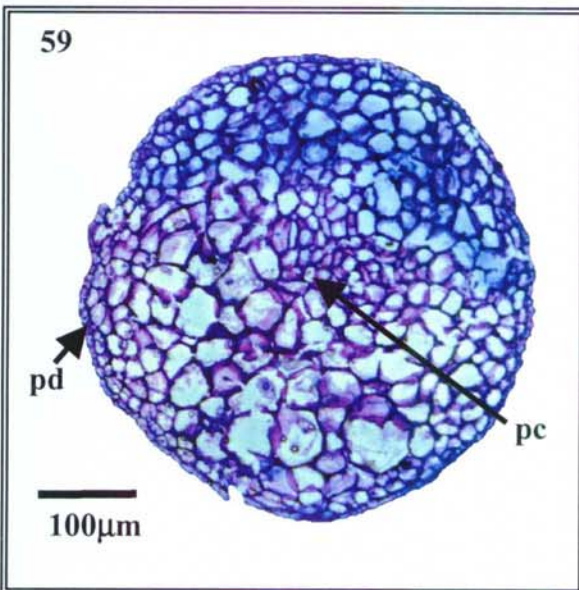
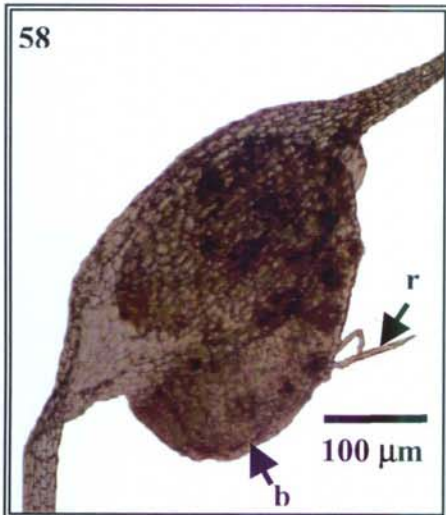


Figura 55. Diâmetro (μm) dos protocormos de *Epidendrum imatophyllum* Lindl., de 14 a 70 dias após ocorrer a germinação, em meios de cultura MS $\frac{1}{2}$ e KC (*in vitro*) e em substrato constituído por sementes de açaí (SA).

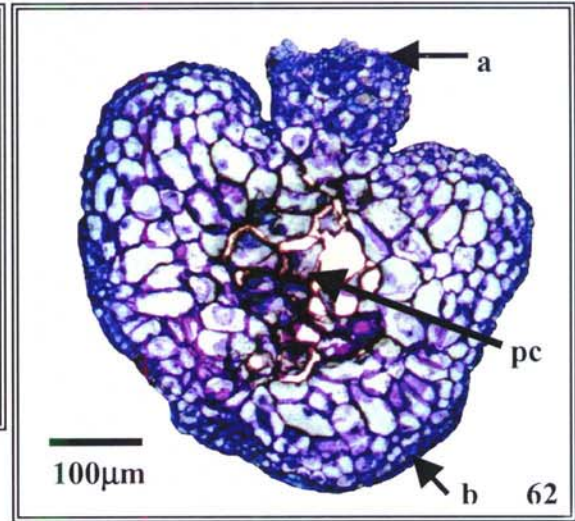
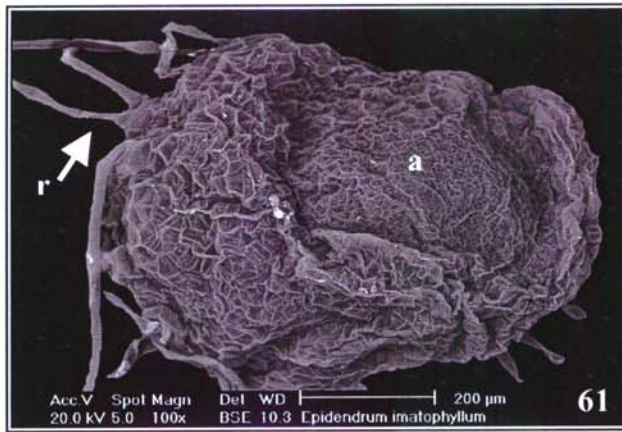




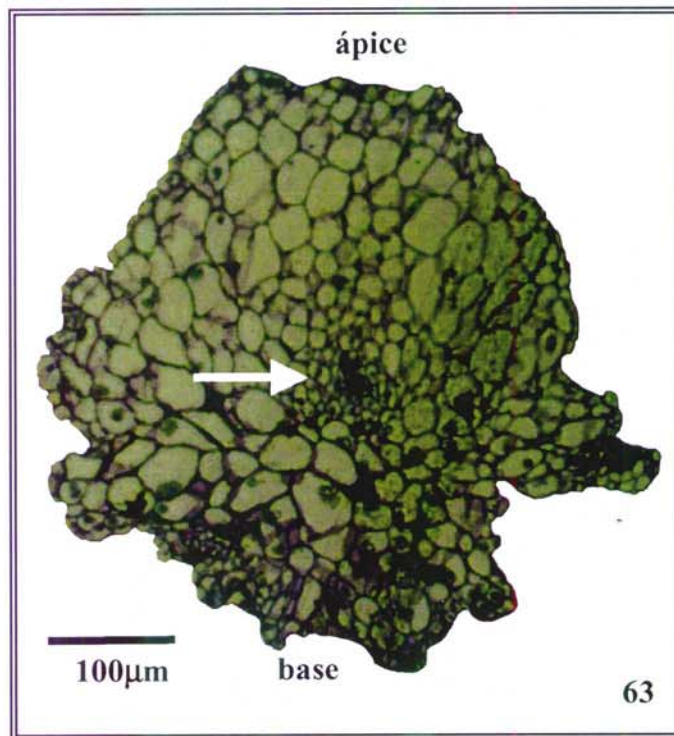
Figuras 56-57. Plântulas (protocormos) de *Epidendrum imatophyllum* Lindl., 14 dias após a germinação das sementes. **56.** Protocormo desenvolvido no substrato SA, note a testa ainda ligada à estrutura (ME). **57.** Detalhe dos rizóides em protocormo desenvolvido no meio MS (MEV).



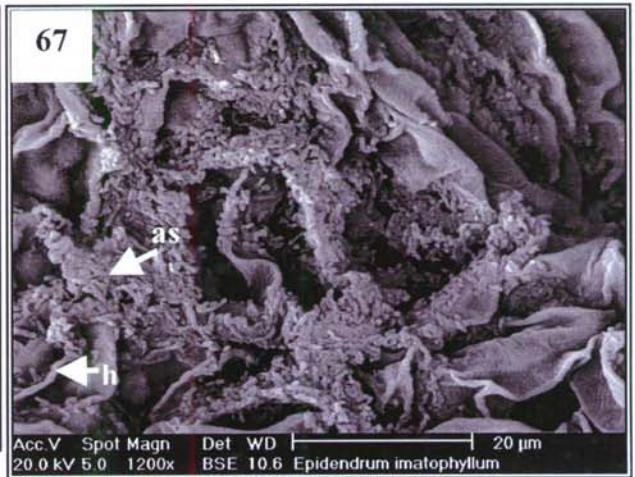
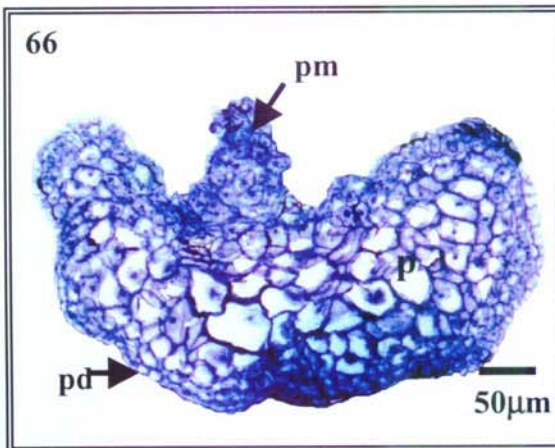
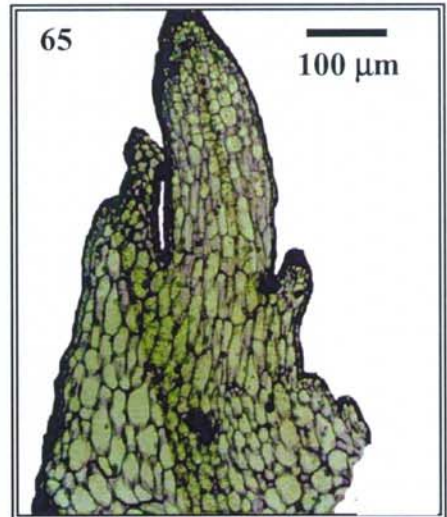
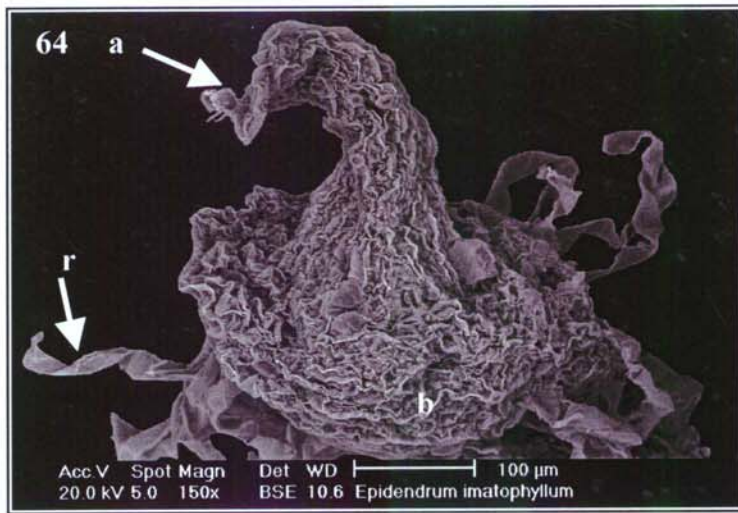
Figuras 58-60. Plântulas (protocormos) de *Epidendrum imatophyllum* Lindl., 28 dias após a germinação das sementes. **58.** Protocormo desenvolvido no meio KC, note a testa ainda ligada à estrutura, com região basal (b) apresentando rizóides (r) (ME). **59.** Secção transversal da região média de protocormo desenvolvido em substrato SA, destacando a protoderme (pd) delimitando toda estrutura, as células procambiais (pc) no centro e as células parenquimáticas (p) (MO). **60.** Detalhe dos rizóides em protocormo desenvolvido no substrato SA, note presença de artrosporos (seta) (MEV).



Figuras 61-62. Plântulas (protocormos) de *Epidendrum imatophyllum* Lindl., 42 dias após a germinação das sementes, no meio MS. **61.** Vista geral, mostrando ápice (a) pouco proeminente e alguns rizóides (r) (MEV). **62.** Secção longitudinal do protocormo evidenciando o procâmbio (pc) na porção central (MO).



Figuras 63. Secção longitudinal de plântula (protocormo) de *Epidendrum imatophyllum* Lindl., 56 dias após a germinação das sementes, no meio MS, evidenciando o procâmbio (seta) na porção central (MO).



Figuras 64-67. Plântulas (protocormos) de *Epidendrum imatophyllum* Lindl., 70 dias após a germinação das sementes. **64.** Vista geral de protocormo desenvolvido no substrato SA, apresentando base discóide (b), com rizóides (r), e ápice (a) bastante proeminente, onde estômatos (e), são observados (MEV). **65.** Secção longitudinal de primórdios foliares de protocormo desenvolvido em meio KC (MO). **66.** Secção longitudinal do protocormo evidenciando promeristema (pm) na região apical, células parenquimáticas (p) e delimitação externa por protoderme (pd) (MO). **67.** Detalhe de células quase totalmente encobertas por artrosporos (as) e hifas (h), na base de protocormo desenvolvido no substrato SA (MEV).

***Epidendrum schomburgkii* Lindle**

Semente

Características morfo-anatômicas

As sementes de *Epidendrum schomburgkii* (Fig. 68) apresentam comprimento médio de $6281 \pm 802 \mu\text{m}$ e diâmetro médio de $305 \pm 50 \mu\text{m}$. A forma é alongada, com as extremidades afiladas (Fig. 69), sendo constituída por testa e embrião. As células da testa (Fig. 70) apresentam forma retangular, com paredes anticlinais retas, percebendo-se com clareza, na zona de adesão entre células vizinhas, a lamela média (Fig. 71). A parede periclinal não é ornamentada (Fig. 71).

O comprimento e diâmetro médio do embrião é de $305 \pm 50 \mu\text{m}$ e $257 \pm 46 \mu\text{m}$, respectivamente. O embrião apresenta forma elíptica (Fig. 72), localizado ora no centro da semente e ora próximo a uma das extremidades da semente, dependendo do alongamento do suspensor. A delimitação das células que revestem o embrião é claramente observada, devido à convexidade central dessas células, as quais mostram a superfície rugosa (Fig. 73). O embrião está constituído por uma massa de células indiferenciadas, distinguindo-se apenas a protoderme que delimita toda estrutura. Entre o embrião e a testa, não se observa, na semente madura, a presença de outros tecidos, tais como tegumentos internos ou endosperma, assim o embrião encontra-se livre, mantendo-se ligado à testa apenas pelo suspensor, como já referido.

Germinação

Este processo ocorreu dez dias após a semeadura no substrato não-asséptico (sementes de açaí – SA) e em torno de vinte dias nos meios de cultura assépticos (meio KC e meio MS $\frac{1}{2}$). No meio composto por sementes de açaí, a taxa de germinação foi de 92%, no meio KC foi de 79% e no meio MS $\frac{1}{2}$ foi de 71%. Os resultados obtidos revelam, assim, que as maiores porcentagens, bem como a maior rapidez, de germinação foram obtidas no substrato composto por sementes de açaí (SA).

Plântula

As características morfo-anatômicas, bem como as dimensões, das plântulas foram analisadas a cada 14 dias após a germinação. Ao longo do desenvolvimento, ocorreram

alterações morfo-anatômicas, bastante semelhantes nos três tratamentos, sendo mais evidentes as diferenças relativas às dimensões.

A análise de variância também detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$), entre as diferentes fases, com relação ao comprimento e ao diâmetro, quando considerado o mesmo tratamento. Analisando as diferenças entre as médias, ao longo do desenvolvimento, em cada um dos três tratamentos, para o comprimento, constata-se que elas são quase sempre significativas, exceto nos dois primeiros períodos (14 e 28 dias) no caso de plântulas crescendo no substrato constituído sementes de açaí. Com relação ao diâmetro, as diferenças entre as médias concentram-se mais considerando as fases iniciais (14, 28 e 42 dias) comparadas com as finais (56 e 70 dias) de análise. Nas Figuras 74 e 75, observa-se que, com relação ao comprimento, há um desenvolvimento similar entre plântulas do meio MS $\frac{1}{2}$ e do substrato SA, havendo um diferencial após 28 dias, mas o maior desenvolvimento foi observado em plântulas crescendo no meio KC. Já com relação ao diâmetro, o das plântulas crescendo no substrato não-asséptico (SA) destaca-se daquele observado em plântulas dos meios assépticos (meios KC e MS $\frac{1}{2}$), especialmente no último período analisado (70 dias), havendo certa constância de diâmetro nas plântulas desenvolvendo-se nos meios assépticos, com alguma vantagem naquelas do meio KC.

14 dias após a germinação

Nessa etapa do desenvolvimento, observa-se o protocormo com ápice alongado e base globular (Fig. 76). Alguns exemplares permanecem no estágio globular, sem diferenciações entre as regiões da base e do ápice, fato que se constata principalmente com plântulas desenvolvendo-se no meio MS $\frac{1}{2}$. Em muitos casos a testa permanece parcialmente ligada ao protocormo. Na base há a presença de poucos rizóides.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 5 e 6. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. Para comprimento, as maiores médias foram obtidas para as plântulas do meio KC, seguidas daquelas do substrato SA e do meio MS $\frac{1}{2}$, sendo distintas significativamente em todos os casos. Com relação ao diâmetro, as maiores médias foram obtidas em plântulas do meio KC, distintas significativamente das médias obtidas para plântulas do substrato SA e do meio MS $\frac{1}{2}$, essas não distintas significativamente entre si.

28 dias após a germinação

Nesse período, os protocormos (Fig. 77) alongam-se com o desenvolvimento do primórdio foliar. As plântulas do meio KC aumentaram muito o comprimento (Tab. 5), em relação aos eventos ocorridos nos outros tratamentos, sugerindo um possível processo de estiolamento. A base dos protocormos (Fig. 78) ainda permanece com o formato globular, tuberculiforme, e aumenta a presença de rizóides. No qual nota-se, principalmente quando o desenvolvimento é no meio KC, a presença de tricomas, ao longo de toda a estrutura.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 5 e 6. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. Para comprimento, as maiores médias foram obtidas para as plântulas do meio KC, seguidas daquelas do substrato SA e do meio MS $\frac{1}{2}$, sendo distintas significativamente em todos os casos. Com relação ao diâmetro, as maiores médias foram obtidas em plântulas do meio KC, distintas significativamente das médias obtidas para plântulas do substrato SA e meio MS $\frac{1}{2}$, essas não distintas significativamente entre si.

42 dias após a germinação

As plântulas, nesse estágio, já apresentam primórdios foliares bastante desenvolvidos (Fig. 79 e 80). No meio KC, o processo de possível estiolamento continua. A presença de rizóides (Fig. 81 e 82), na base dos protocormos, é ainda mais acentuada, pois além de aumentar em quantidade, tornam-se mais alongados. Tricomas (Fig. 83) ocorrem em grande quantidade nos primórdios foliares. Nas plântulas desenvolvendo-se nas sementes de açaí, notou-se um aspecto mais vigoroso, ou seja, com primórdios foliares mais desenvolvidos que nas plântulas do meio MS $\frac{1}{2}$ e não excepcionalmente alongadas como no meio KC, além de já apresentarem raízes adventícias, originadas no primeiro nó caulinar (Fig. 81).

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 5 e 6. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. Para comprimento, as maiores médias foram obtidas para as plântulas do meio KC, seguidas daquelas do substrato SA e do meio MS $\frac{1}{2}$, sendo distintas significativamente em todos os casos. Com relação ao diâmetro, as maiores médias foram obtidas em plântulas do tratamento KC, distintas significativamente

das médias obtidas para plântulas dos tratamentos SA e MS $\frac{1}{2}$, essas não distintas significativamente entre si.

56 dias após a germinação

As plântulas cultivadas no substrato SA (Fig. 84) já apresentam vários primórdios foliares, dois e, por vezes, três, e o número de raízes adventícias aumenta, bem como o comprimento das mesmas. No meio KC, a plântula continua o processo de possível estiolamento, como nos períodos anteriores, e ocorre a formação de raízes adventícias (Fig. 85), nas quais percebe-se grande quantidade de pêlos absorventes. Na base dos protocormos ocorrem rizóides (Fig. 86), especialmente naqueles que se desenvolveram nos tratamentos MS $\frac{1}{2}$ e SA. Em secções transversais, da base dos protocormos, é possível visualizar a presença do procâmbio (Fig. 87) e rizóides (Fig. 88), esses últimos originados a partir da protoderme. Nas análises feitas em microscopia eletrônica de varredura, em plântulas que se desenvolveram no substrato SA, constatou-se a presença de grande quantidade de hifas e artrosporos (estruturas de reprodução de fungos), tanto na região superior do tubérculo, na área estomática (Fig. 89 e 90), quanto, de modo mais denso, na região basal (Fig. 91 e 92). Tais estruturas não foram encontradas em plântulas desenvolvendo-se nos meios assépticos (KC e MS $\frac{1}{2}$).

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nas três condições de cultivo, são apresentados nas tabelas 5 e 6. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. Para o comprimento, as maiores médias foram obtidas para as plântulas do meio KC, seguidas daquelas do substrato SA e do meio MS $\frac{1}{2}$, sendo distintas significativamente em todos os casos. Com relação ao diâmetro, as maiores médias foram obtidas em plântulas do substrato SA e meio KC, distintas significativamente das médias obtidas para plântulas do meio MS $\frac{1}{2}$.

70 dias após a germinação

A plântula (Fig. 93), nesse estágio de desenvolvimento, apresenta maior número de primórdios foliares, geralmente com presença de raízes adventícias, ocorrendo isso nos três tratamentos. Em secções longitudinais no protocormo, evidencia-se a presença de procâmbio, caracterizado por células alongadas no centro da estrutura (Fig. 94). Como constatado na fase de desenvolvimento anterior, grande quantidade de hifas (Fig. 95), bem como artrosporos, são observados na região basal dos protocormos desenvolvidos no substrato SA. Nos protocormos

crescendo nos outros dois meios, assépticos (KC e MS $\frac{1}{2}$), não foram vistas tais estruturas, como pode ser evidenciado, por exemplo, na Figura 96, que apresenta detalhe dos rizóides da base de protocormo desenvolvido no meio KC.

Os resultados referentes ao comprimento médio e diâmetro médio das plântulas nesta etapa do desenvolvimento, nos três meios de cultura, são apresentados nas tabelas 5 e 6. A análise de variância detectou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos, tanto para o comprimento, quanto para o diâmetro da plântula. Para comprimento, as maiores médias foram obtidas para as plântulas do meio KC, seguidas daquelas do substrato SA e do meio MS $\frac{1}{2}$, sendo distintas significativamente em todos os casos. Com relação ao diâmetro, as maiores médias foram obtidas em plântulas do meio KC, seguidas daquelas do substrato SA e do meio MS $\frac{1}{2}$, sendo todas distintas significativamente entre si.

Tabela 5. Comprimento (μm) dos protocormos de *Epidendrum schomburgkii* Lindl. originados da germinação das sementes da espécie, sob diferentes condições de cultivo, em meios de cultura assépticos MS $\frac{1}{2}$ e KC e em substrato não-asséptico constituído por sementes de açaí (SA).

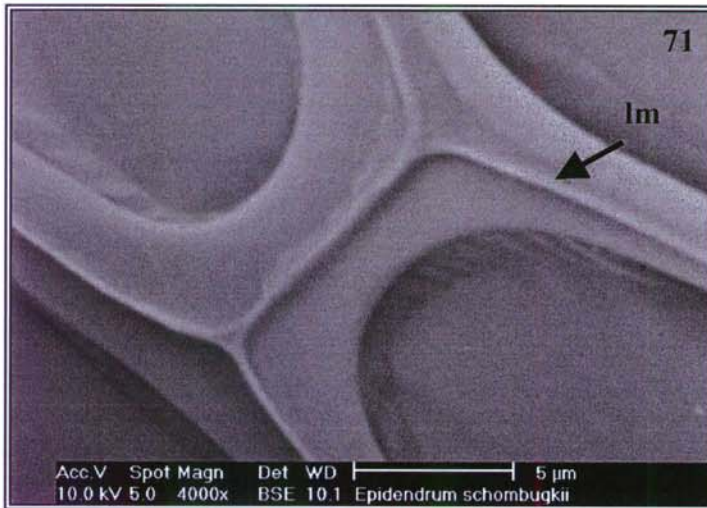
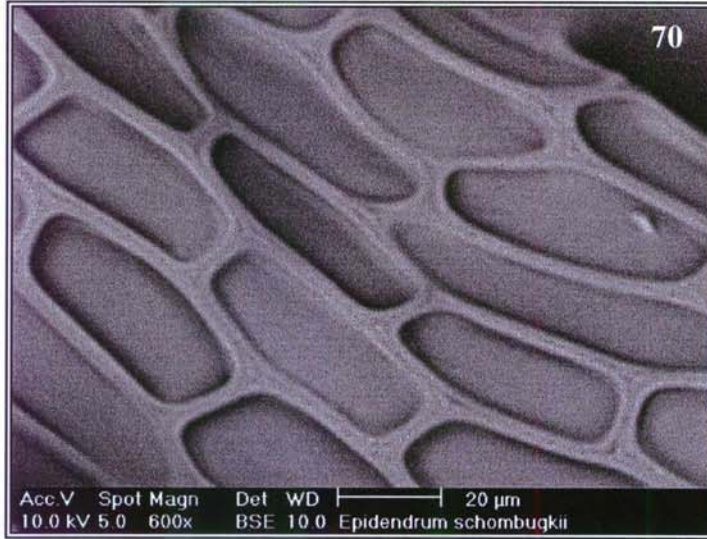
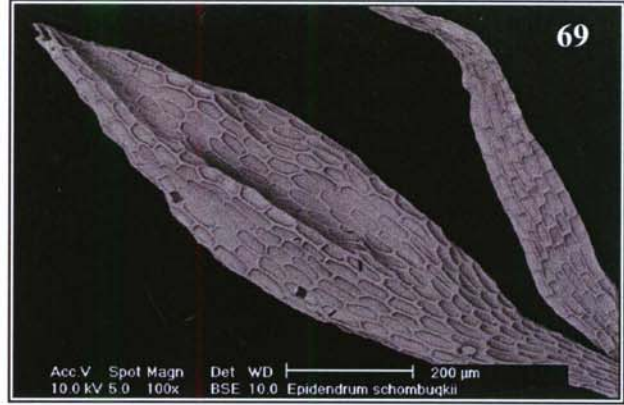
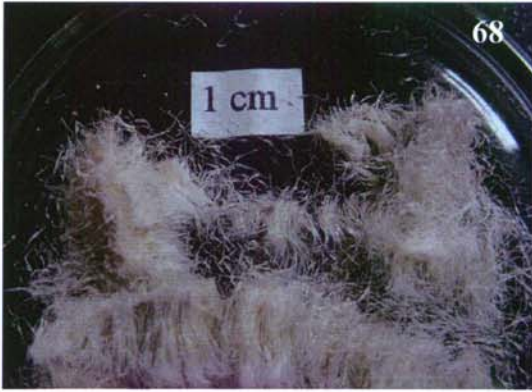
Período de desenvolvimento	Condições de cultivo			CV
	MS $\frac{1}{2}$	KC	SA	
14 dias	^A 1024,00 ^a	^C 7520,00 ^a	^B 1308,24 ^a	3,81 %
28 dias	^A 1216,94 ^b	^C 15040,00 ^b	^B 1451,29 ^a	2,97 %
42 dias	^A 4280,00 ^c	^C 31280,00 ^c	^B 9360,00 ^b	2,18 %
56 dias	^A 7740,00 ^d	^C 41840,00 ^d	^B 16400,00 ^c	1,89 %
70 dias	^A 14240,00 ^e	^C 54920,00 ^e	^B 25640,00 ^d	1,59 %
CV	2,57 %	1,62 %	2,21 %	

Nota: Letras que antecedem os valores comparam na horizontal. Letras que seguem os valores comparam na vertical. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Tukey.

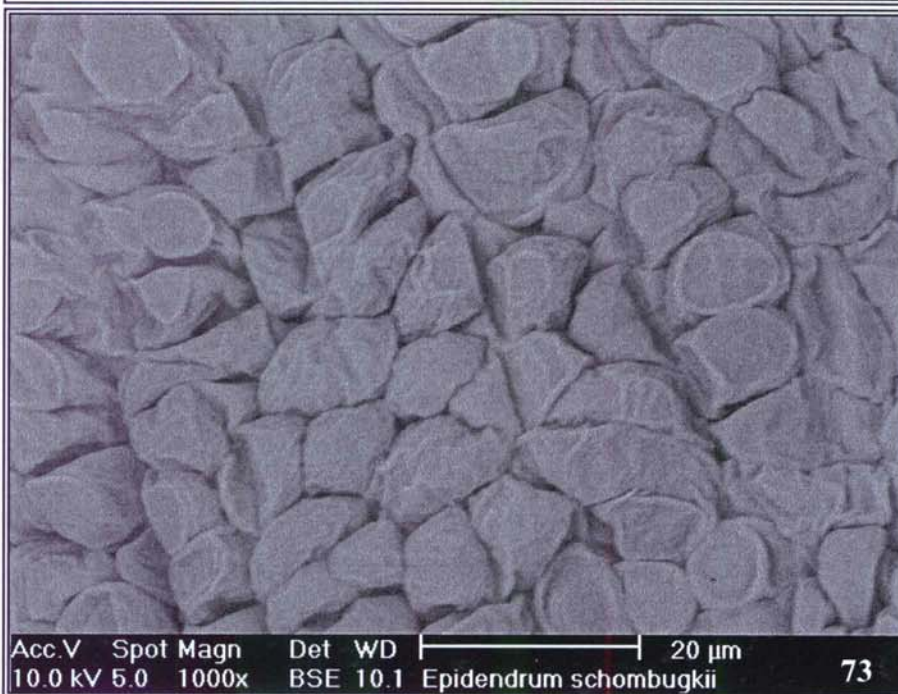
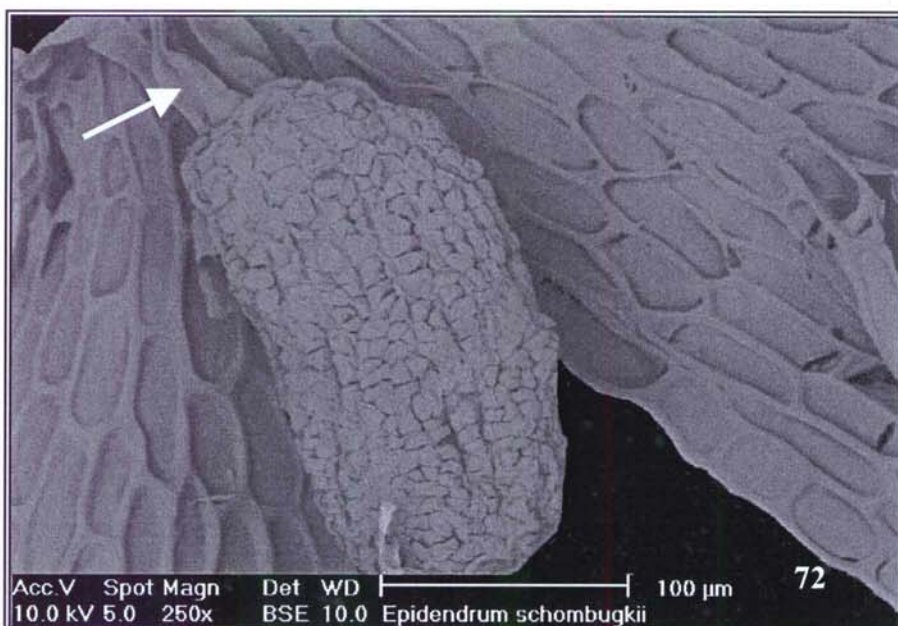
Tabela 6. Diâmetro (μm) dos protocormos de *Epidendrum schomburgkii* Lindl. originados da germinação das sementes da espécie, sob diferentes condições de cultivo, em meios de cultura assépticos MS $\frac{1}{2}$ e KC e em substrato não-asséptico constituído por sementes de açaí (SA).

Período de desenvolvimento	Condições de cultivo			CV
	MS $\frac{1}{2}$	KC	SA	
14 dias	^A 838,59 ^a	^B 995,76 ^a	^A 762,35 ^a	3,53 %
28 dias	^A 872,47 ^a	^B 1169,88 ^{ab}	^A 825,88 ^a	2,90 %
42 dias	^A 904,47 ^a	^B 1170,82 ^b	^A 832,00 ^a	3,00 %
56 dias	^A 1061,18 ^b	^B 1206,12 ^b	^B 1261,18 ^b	2,22 %
70 dias	^A 1072,00 ^b	^B 1228,24 ^b	^C 2039,53 ^c	1,83 %
CV	2,72 %	3,11 %	2,28 %	

Nota: Letras que antecedem os valores comparam na horizontal. Letras que seguem os valores comparam na vertical. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Tukey.



Figuras 68-71. Sementes de *Epidendrum schomburgkii* Lindl. **68.** Sementes *in natura* (CFD). **69.** Aspecto geral da semente (MEV). **70.** Detalhe das células da testa (MEV). **71.** Detalhe das paredes anticlinais das células da testa, com a lamela média (lm) proeminente.



Figuras 72-73. *Epidendrum schomburgkii* Lindl. **72.** Embrião ligado à testa pelo suspensor (seta) (MEV). **73.** Detalhe das células do embrião (MEV).

Figura 74 . Comprimento (μm) dos protocormos de *Epidendrum schomburgkii* Lindl., de 14 a 70 dias após ocorrer a germinação, em meios de cultura MS $\frac{1}{2}$ e KC (*in vitro*) e em substrato constituído por sementes de açaí (SA).

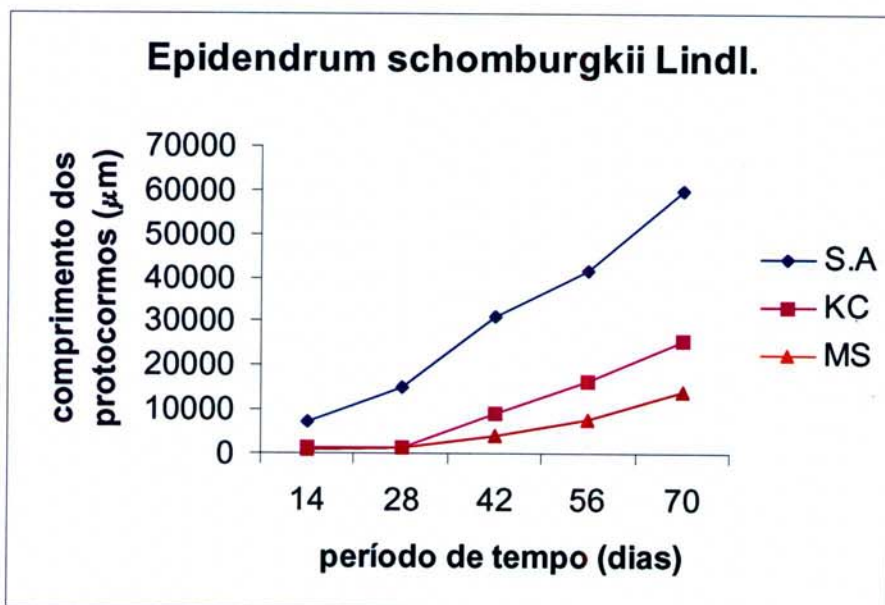
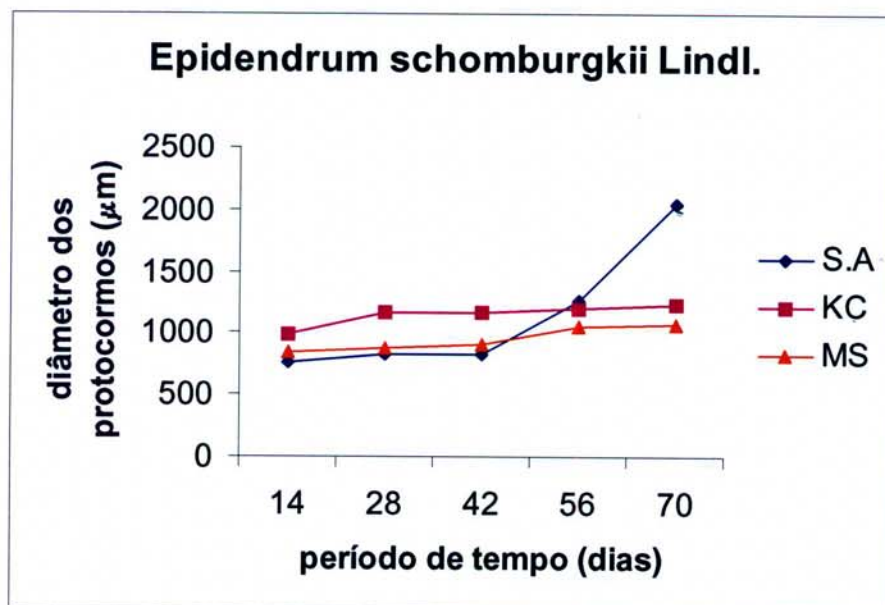


Figura 75 . Diâmetro (μm) dos protocormos de *Epidendrum schomburgkii* Lindl., de 14 a 70 dias após ocorrer a germinação, em meios de cultura MS $\frac{1}{2}$ e KC (*in vitro*) e em substrato constituído por sementes de açaí (SA).



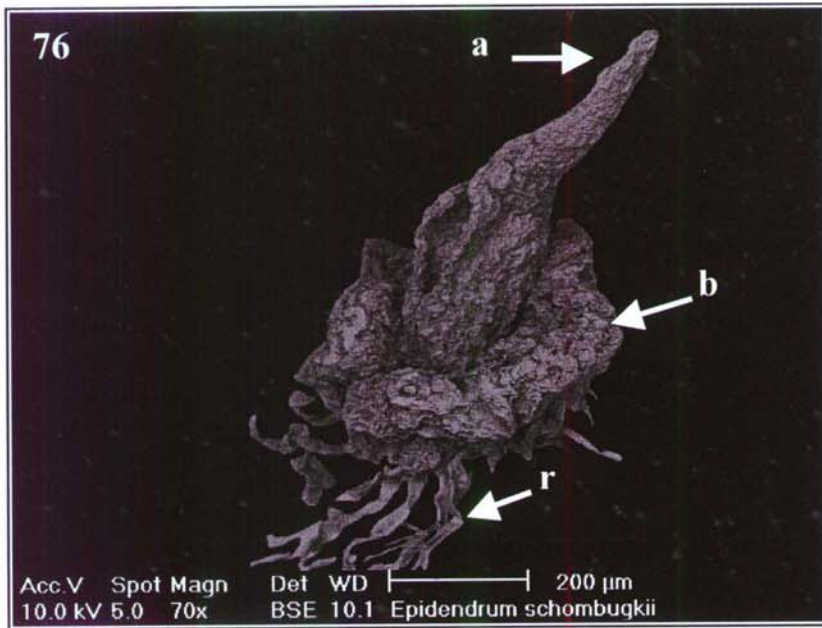
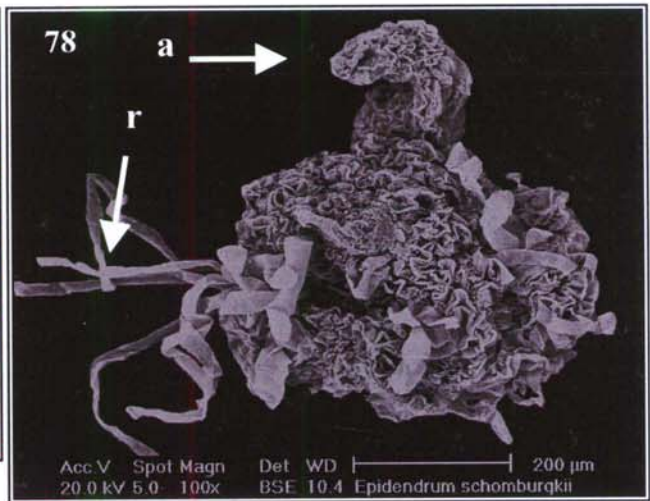
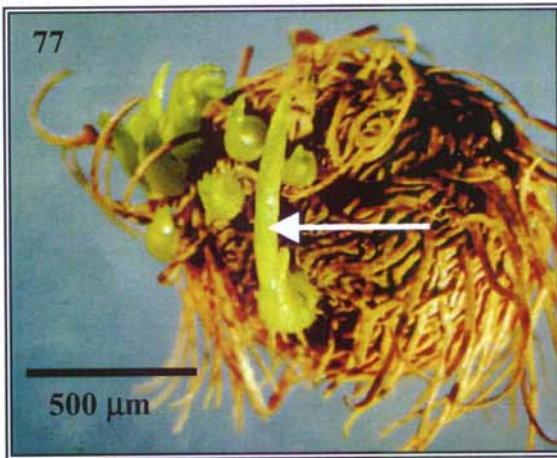
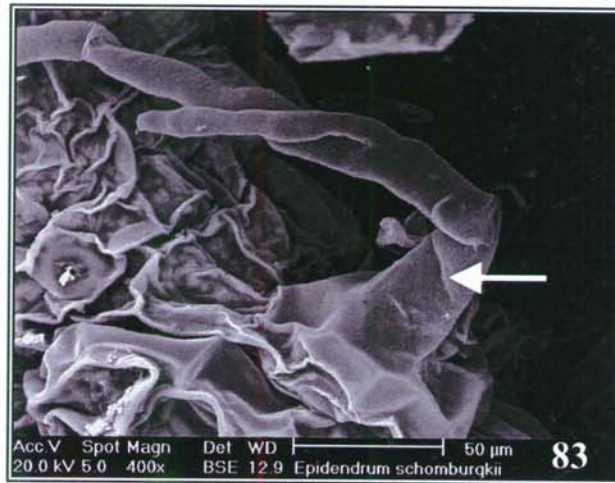
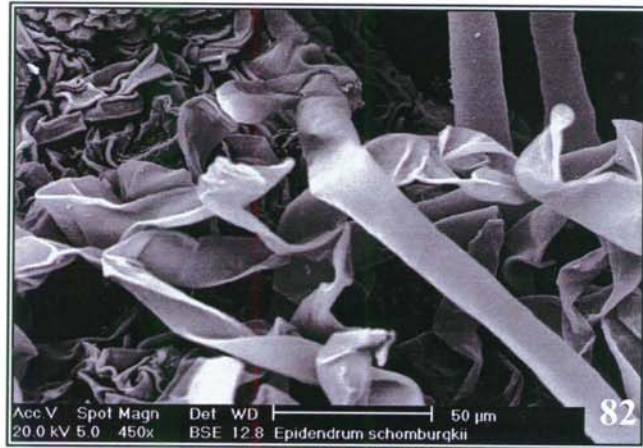
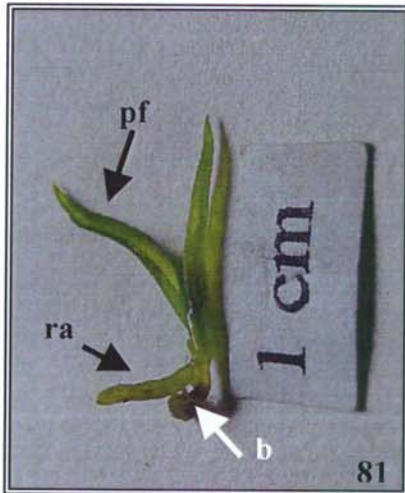
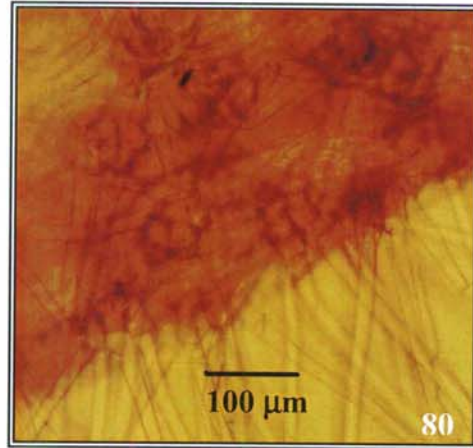
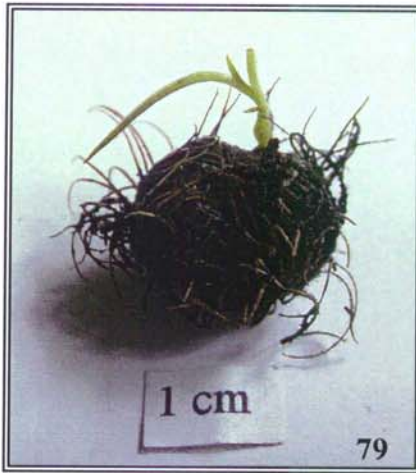


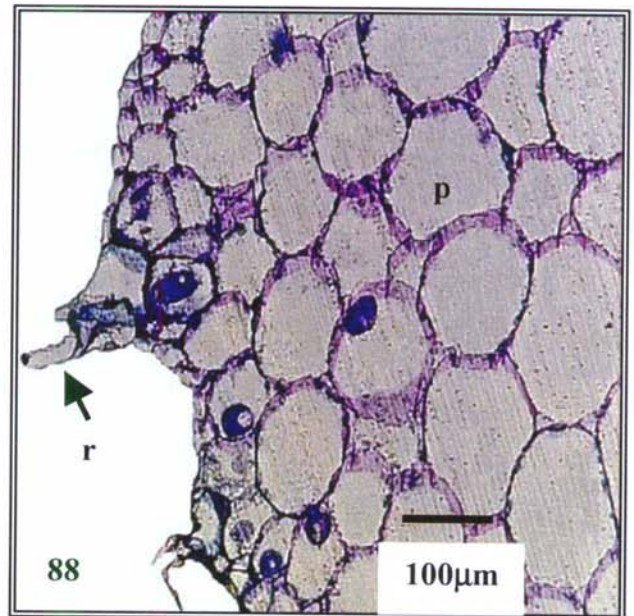
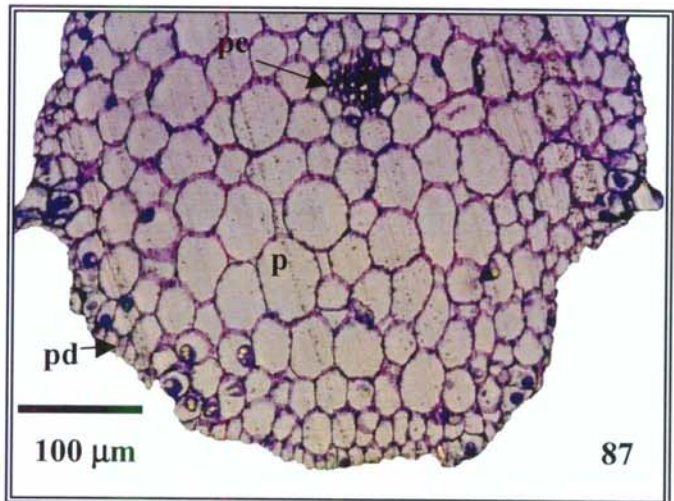
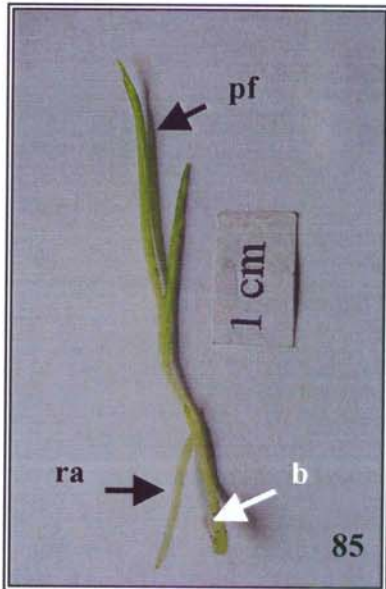
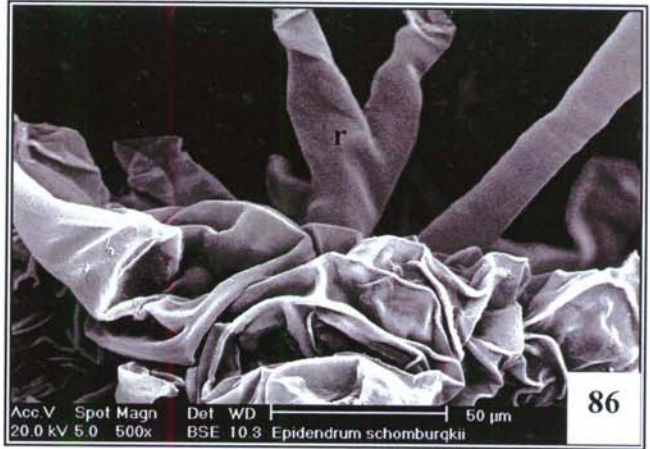
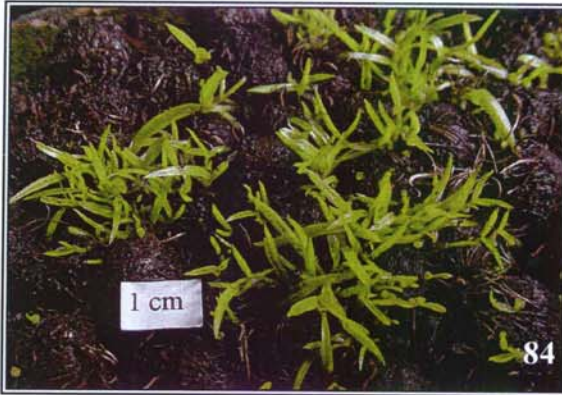
Figura 76. Plântula (protocormo) de *Epidendrum schomburgkii* Lindl., 14 dias após a germinação da semente, desenvolvido no meio SA. Note o ápice (a) proeminente e a base (b) com rizóides (r) (MEV).



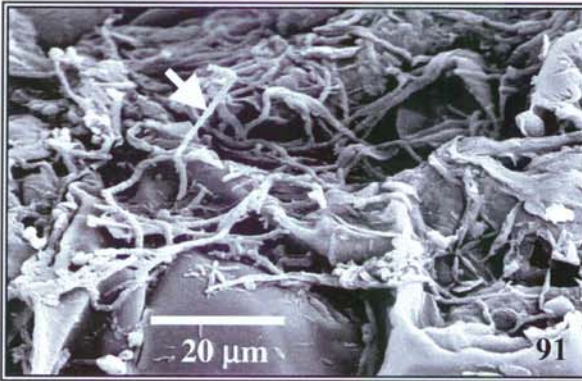
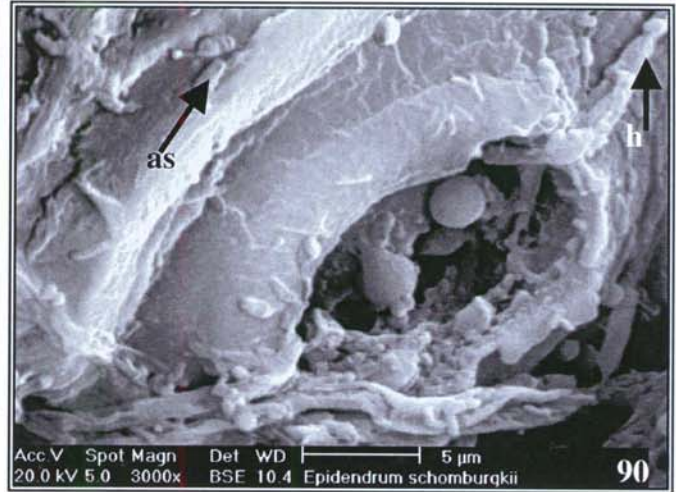
Figuras 77-78. Plântulas (protocormos) de *Epidendrum schomburgkii* Lindl., 28 dias após a germinação das sementes. **77.** Semente de açaí com vários protocormos (ME). Seta indica um protocormo com 28 dias, outros germinaram posteriormente. **78.** Protocormo desenvolvido no substrato SA, com muitos rizóides (r) na base (b) e primórdio foliar no ápice (a) (MEV).



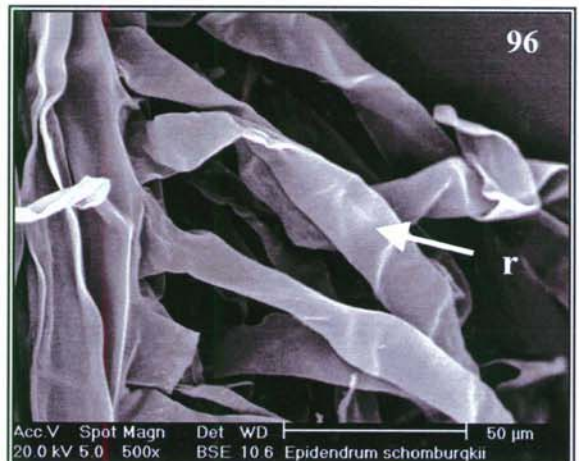
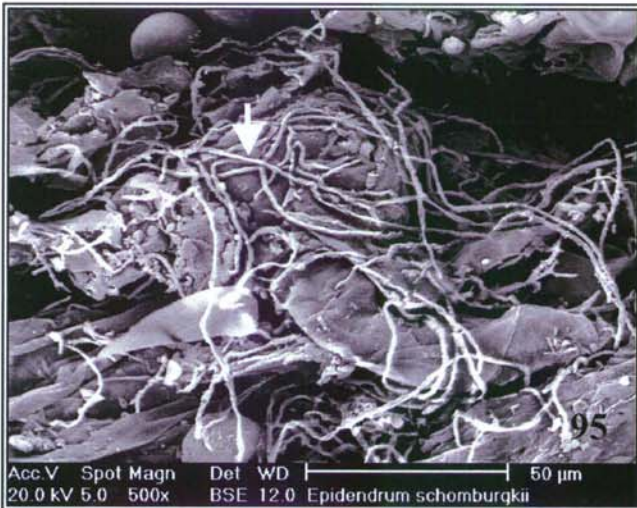
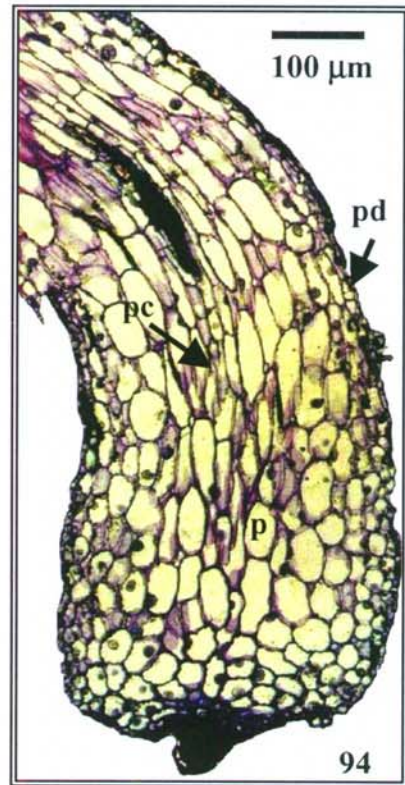
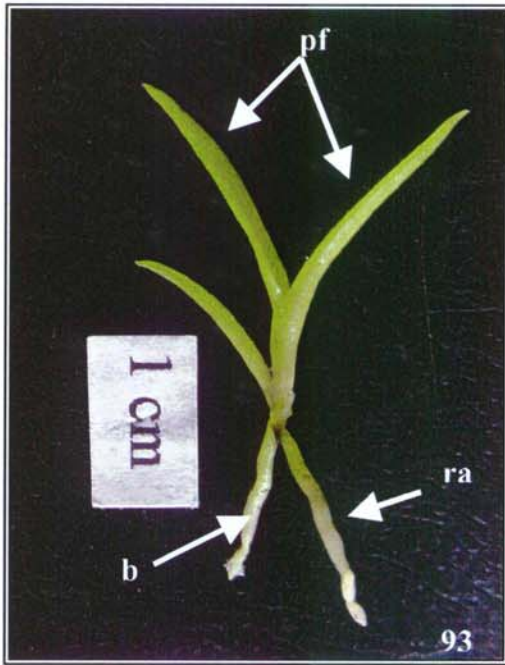
Figuras 79-83. Plântulas (protocormos) de *Epidendrum schomburgkii* Lindl., 42 dias após a germinação das sementes. **79.** Semente de açai com protocormos (CFD). **80.** Plântula cultivada em substrato com sementes de açai, note primórdios foliares (pf), região basal (b) e raiz adventícia (ra) (CFD). **81-82.** Rizóides da base de protocormos desenvolvidos no meio MS (**81.** MO e **82.** MEV). **83.** Tricoma (seta) próximo a região apical de protocormo desenvolvido em meio MS (MEV).



Figuras 84-88. Plântulas (protocormos) de *Epidendrum schomburgkii* Lindl., 56 dias após a germinação das sementes. **84.** Plântulas desenvolvendo-se no substrato SA (CFD). **85.** Plântula cultivada no meio KC, note região basal (b), primórdios foliares (pf) e raiz adventícia (ra) (CFD). **86.** Rizóides (r) da base de protocormo desenvolvido em meio MS (MEV). **87-88.** Secções transversais da base de protocormo desenvolvido no meio KC (MO). **87.** Note o procâmbio (pc), o parênquima (p) e a protoderme (pd). **88.** Detalhe de rizóide (r) originado da protoderme.



Figuras 89-92. Detalhes de plântulas (protocormos) de *Epidendrum schomburgkii* Lindl., 56 dias após a germinação das sementes, cultivadas no substrato SA (MEV). **89-90.** Região apical do protocormo, contendo hifas (h) e artrosporos (as), estruturas reprodutivas de fungos, junto à área estomática. Seta indica hifa (h) germinando. **91-92.** Hifas (setas) na região basal do protocormo.



Figuras 93-96. Plântulas de *Epidendrum schomburgkii* Lindl., 70 dias após a germinação das sementes. **93.** Plântula desenvolvida no substrato SA (pf – primórdios foliares, ra – raiz adventícia e b – base) (CFD). **94.** Secção longitudinal do protocormo desenvolvido no substrato SA (MO). Note o procâmbio (pc), com células alongadas, o parênquima (p) e a protoderme (pd). **95.** Detalhe de hifas (setas) presentes em grande quantidade na base de protocormo desenvolvido em meio SA (MEV). **96.** Detalhe de rizóides (r) na base de protocormo desenvolvido em meio KC (MEV).

DISCUSSÃO

Sementes

Estudos sobre a estrutura de sementes, assim como de frutos, da família Orchidaceae têm sido bastante negligenciados, conforme ressaltam Chase & Pippen (1990) e Dressler (1993). Os primeiros trabalhos, referentes à estrutura de sementes de representantes dessa família, realizados por Beer (1863, *apud* Dressler, 1993) e Arditti (1967), se propuseram a compreender um pouco da diversidade dessas sementes.

As sementes de orquídeas, como observado em *Cattleya eldorado*, *Epidendrum imatophyllum* e *E. schomburgkii*, vistas em microscopia óptica, apresentam testa transparente, e percebe-se claramente a delimitação das células, mostrando aspecto, como referido por Leroux *et al.* (1997), reticulado. Conforme esses autores, as células da testa, quando a semente está madura, são destituídas de protoplasto.

Com o advento da microscopia eletrônica de varredura, a partir de investigações de Barthlott, em 1976, cogitou-se que as características ultra-estruturais das sementes poderiam ser usadas na taxonomia (Dressler 1993). Esse recurso, como enfatizam Cameron & Chase (1998), resultou num maior número de publicações acerca do assunto (Arditti *et al.*, 1980; Tohda, 1983, 1985 e 1986). Cameron & Chase (1998) utilizaram a MEV para descrever a morfologia externa das sementes. No Brasil, Milaneze (1997) analisou, através desse recurso, a morfologia das sementes de espécies que ocorrem nos Estados do Espírito Santo, São Paulo e Tocantins. Para espécies ocorrentes na Região Amazônica nenhum registro foi encontrado. Milaneze (1997) registra presença de ornamentações, na forma de escamas, nas paredes periclinais da testa das sementes de *Cattleya schiilleriana* e de *C. intermédia*, espécies epífitas. Ainda, segundo esse autor, a ausência de ornamentações nas células da testa das sementes de *Epidendrum patens* e *E. fulgens* poderia estar relacionada ao hábito terrícola de ambas espécies, uma vez que nas de hábito epifítico foram encontradas ornamentações. Nas espécies estudadas, *Cattleya eldorado*, *Epidendrum imatophyllum* e *E. schomburgkii*, não foram constatadas ornamentações nas paredes periclinais, nem nas paredes anticlinais, apesar do hábito epifítico, portanto a ornamentação parece ser característica específica e independente do modo de vida.

Nas sementes das espécies aqui estudadas constatou-se que as paredes anticlinais das células da testa são altamente justapostas, assim como referido por Chase & Pippen

(1990), para o gênero *Cymbidium*. Nas duas espécies do gênero *Epidendrum*, observa-se a presença da lamela média distinta entre as células vizinhas, com aspecto diferente entre as duas espécies, porém indiferenciada em *Cattleya eldorado*. Molvray & Kores (1995) observaram, em exemplares das subfamílias Spiranthoideae e Orchidoideae, variações nas características das paredes anticlinais, com lamela média mais ou menos saliente, ou mesmo indistinta, sugerindo que tais características poderiam ter valor taxonômico. Outro aspecto evidenciado por esses autores, para *Spiranthes vernalis*, refere-se ao aprofundamento das paredes periclinais, fato constatado nas duas espécies do gênero *Epidendrum* aqui analisadas. Entretanto, questiona-se esse aspecto como uma real característica, pois pode tratar-se de artefato resultante do processo de preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura. Mesmo assim, os dados obtidos sobre o padrão ultra-estrutural da testa das sementes verificado nas espécies *C. eldorado*, *E. imatophyllum* e *E. schomburgkii* poderá contribuir para um melhor conhecimento das sementes das espécies amazônicas.

As sementes de *Epidendrum schomburgkii* foram as que apresentaram os maiores valores, quanto ao comprimento e ao diâmetro médio, seguido por *E. imatophyllum* e *Cattleya eldorado*. Arditti *et al.* (1980) ao analisar os parâmetros de comprimento e largura de sementes de mesmo gênero, provenientes da Tchecoslováquia, sugeriram que a morfometria de sementes não é indicativo de origens geográficas, podendo ser usada como uma ferramenta taxonômica, mas os resultados devem ser avaliados uma vez que podem estar sendo afetados pela idade ou pelas condições de desenvolvimento do embrião. As extremidades afiladas, conferindo o aspecto alado às sementes, e tendo em vista o espaço vazio entre a testa e a semente, provavelmente são características que estão relacionadas à dispersão pelo vento.

Cameron & Chase (1998) referem que o embrião em Orchidaceae é tipicamente pequeno, indiferenciado e raramente envolvido por endosperma. Nas três espécies estudadas constataram-se embriões pequenos, constituídos por um conjunto de células indiferenciadas, delimitadas por protoderme, não sendo evidenciado nenhum tecido endospermático. Veyret (1974), verificando embriões de alguns gêneros constata que *Epidendrum ciliare* e *E. radicans* foram os mais diferenciados histologicamente. Entre as espécies examinadas no presente estudo, não foram observadas evidências que pudessem distinguir as mesmas quanto à diferenciação histológica do embrião. Pela indiferenciação dos tecidos do embrião das espécies estudadas, talvez fosse mais adequado usar o termo proembrião, como usado por Leroux *et al.* (1997). Chase *et al.* (1995), *apud* Cameron & Chase (1998), citam que algumas famílias de monocotiledôneas associam-se com Orchidaceae devido à estrutura morfológica

das sementes, consideradas microspermas. Para Cameron & Chase (1998), a semente formada é indubitavelmente correlacionada com o estilo de vida micotrófico das orquídeas, que estariam aparentemente sob pressão seletiva, para garantir após a germinação, a infecção pelo fungo.

Os embriões de *Epidendrum imatophyllum* e de *E. schomburgkii*, vistos ao MEV, mostram células com convexidade central, tal com observado por Leroux *et al.* (*op cit.*), para *Cypripedium acaule* (Orchidaceae).

Germinação e desenvolvimento nas diferentes condições de cultivo

As sementes de orquídeas, ao contrário de todas as demais sementes, não possuem reservas nutritivas e, por isso, necessitam da ação de um fungo micorrízico (Arditti, 1967). Rasmussen & Rasmussen (1991) ressaltam que estudos referentes à germinação de sementes de orquídeas e desenvolvimento de plântulas, sob condições naturais, são dificultados, devido ao reduzido tamanho das sementes. Stasinopoulos & Hangarter (1990) salientam que, nos procedimentos *in vitro*, as células e os tecidos vegetais são normalmente cultivados sobre meio nutritivo definido, no qual as concentrações de todos componentes são previamente conhecidas. Arditti (1967), Harrison & Arditti (1978), Arditti *et al.* (1982) e Oliva & Arditti (1984) salientam que os requisitos, para que a germinação assimbiótica das sementes de orquídeas ocorra, variam quanto à utilização dos componentes nutritivos disponíveis e quanto ao aproveitamento das condições de iluminação e de temperatura aplicados. Os métodos *in vitro*, utilizados nesse experimento, meios KC e MS ½, embora de custo mais elevado, proporcionam resultados seguros, tendo assim a preferência por parte dos produtores. O método simbiótico é o processo natural de reprodução das orquídeas na natureza. A semente de açaí usada, no Estado do Pará, como substrato para plantio de orquídeas adultas (Campos, 2000), mostrou, no presente estudo, ser eficiente como meio alternativo para o cultivo das espécies em estudo, possibilitando a presença de micorrizas, e resultando em plântulas rápida e convenientemente desenvolvidas.

As condições mais adequadas para a germinação das sementes e o crescimento das plântulas de orquídeas podem variar com o gênero e, algumas vezes, com a espécie (Henrich *et al.*, 1981; Arditti & Ernst, 1984). Shushan (1974) e Frei & Dodson (1972) observaram grandes variações no desenvolvimento inicial das plântulas de uma mesma cultura assimbiótica de orquídeas, como, em geral, ocorre entre os indivíduos de uma população, fato que, segundo Batchelor (1982), encontra-se vinculado à complexidade genética da família Orchidaceae.

Na última década, os estudos relativos à composição dos meios nutritivos e as possíveis modificações que podem ocorrer em sua composição durante a fase de preparo e cultivo de células ou tecidos vegetais, tornaram-se mais amplos e variados, revelando a instabilidade das formulações nutritivas usadas e dos sistemas *in vitro* como um todo (Milaneze, 1997). Para que um meio de cultura possa ser considerado adequado ao desenvolvimento dos tecidos vegetais *in vitro*, deve ser capaz de oferecer-lhes as condições físicas e nutricionais apropriadas. Os requerimentos nutricionais para o desenvolvimento das orquídeas têm sido extensivamente estudados, uma vez que a família apresenta representantes de interesse comercial (Knudson, 1951, *apud* Stancato & Faria, 1996). Apesar disso, Stancato & Faria salientam que em muitos grupos de orquídeas, ainda são desconhecidas as demandas nutricionais tanto no hábitat natural, quanto nas condições *in vitro*. O mesmo autor cita ainda que meio "C" de Knudson tem tido ampla aceitação no cultivo de muitas espécies de orquídeas, verificada nos laboratórios produtores de plântulas de várias regiões do Brasil.

Estudos sobre os eventos ocorridos durante o desenvolvimento, a partir da germinação de espécies de Orchidaceae têm raramente sido acompanhadas sob condições naturais.

Para as três espécies constatou-se que a germinação foi mais rápida no meio SA do que nos meios KC e MS ½, ou seja, levou cerca de 10 dias no primeiro caso e em torno de 20 dias para o segundo caso, provavelmente devido à presença de micorrizas nesse substrato (aspecto discutido no próximo item – Presença de micorrizas). O desenvolvimento foi progressivo nos três tratamentos, para todas espécies investigadas, havendo, entretanto, diferenças quanto às dimensões atingidas em cada etapa, para cada tipo de tratamento e ainda dependendo da espécie. De acordo com Knudson (1922), Frei & Dodson (1972) e Milaneze (1992), a heterogeneidade presente no desenvolvimento dos protocormos e plântulas, inclusive suas dimensões e o número de órgãos formados, pode ocorrer em muitas espécies de orquídeas. Batchelor (1982) atribuiu esta característica à complexidade genética da família Orchidaceae. Rasmussen *et al.* (1990a) considera que os indivíduos menores, em cultura, correspondem a genótipos menos competitivos.

Para *Catleya eldorado* e para *Epidendrum imatophyllum*, o desenvolvimento nas fases iniciais não se distinguiu muito entre os tratamentos, mas nas fases finais foi mais evidente a vantagem do substrato SA, seguido pelo meio KC, sendo menos eficiente o meio MS ½. Acrescente-se que na maioria dos casos o desenvolvimento dimensional foi acompanhado por modificações estruturais. Para *Epidendrum schomburgkii*, com relação ao comprimento, ocorreu vantagem do meio KC, em relação aos outros dois, entretanto, nesse

caso não se verificou o mesmo desenvolvimento estrutural interno, de modo proporcional. Ressalte-se, porém que o diâmetro, nas fases finais do desenvolvimento, foi maior em plântulas desenvolvendo-se no substrato SA. Para essa espécie, o desenvolvimento nos tratamentos, SA e MS $\frac{1}{2}$, deu-se de modo similar ao ocorrido com as outras duas espécies, vantagem do substrato SA sobre o meio MS $\frac{1}{2}$. Assim, embora havendo diferenças entre as espécies e entre as condições de cultivo onde germinaram e desenvolveram-se, pode ser considerado que os três tratamentos são adequados, porém entre os meios assépticos, o meio KC mostrou maior eficiência. Entretanto, o substrato SA, pelo baixo custo operacional e pelos resultados apresentados parece ser tão adequado, quanto o meio KC, ou mesmo mais eficiente que esse.

Presença de micorrizas

A simbiose entre os membros da família Orchidaceae e as micorrizas é conhecido há aproximadamente 100 anos. Bernard, em 1909, foi quem desenvolveu o primeiro grande trabalho experimental com raízes micóticas das orquídeas, o qual incluiu o isolamento e a identificação dos fungos envolvidos, estudos sobre germinação simbiótica e assimbiótica, estudo sobre a natureza variável das simbioses e as respostas de defesa da planta, bem como a significância de tais estudos para a produção horticultural (Hadley & Pegg, 1989). Blowers & Arditti (1970) referem que o fungo contribui com enzimas e certas vitaminas. Peterson *et al.* (1997) salientam que a germinação de sementes de orquídeas depende do estabelecimento de uma associação com o fungo específico, pois esse abastece o protocormo com os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Smith & Read (1997) considera que as interações fisiológicas entre fungos e espécies de Orchidaceae ainda não são bem conhecidas. De acordo com Peterson *et al.* (1997), as espécies de fungos envolvidas em germinação de sementes e desenvolvimento do protocormo na natureza também não são bem conhecidas.

No início do século XX houve uma controvérsia sobre se a simbiose seria, ou não, um pré-requisito para a germinação e o completo desenvolvimento das plantas (Knudson, 1922, 1930; Withner, 1974; Arditti, 1982). Smith & Read (1997) não questiona a possibilidade de algumas espécies de orquídeas e de híbridos chegarem a maturidade e florescerem em condições não micorrizais, mas, *in natura*, afirma que isto não ocorre.

A presença de estruturas micorrizais (artosporos, corpos esporoquiais e hifas) sobre as células dos protocormos foi detectada através da análise em MEV, nas três espécies, mas apenas em plântulas desenvolvendo-se no meio SA. Tais estruturas foram mais frequentes na região basal, junto aos rizóides, mas também foram observadas na região apical,

na área estomática. Entretanto, dependendo da espécie, foram constatados em períodos diferentes de desenvolvimento. Em *Cattleya eldorado* a presença dessas estruturas foi constatada em amostra a partir de 14 dias de desenvolvimento, em *E. imatophyllum*, a partir de 28 dias e em *E. schomburgkii* somente a partir de 56 dias.

De acordo com Smith & Read (1997), estabilizada a colonização em padrão micorrizal, o crescimento dos protocormos procede rapidamente, com diferentes fases de colonização restritas às regiões bem definidas, tal como observado nas espécies em estudo. De acordo com Smith & Read (*op cit.*), o crescimento dos protocormos micorrizais é geralmente muito mais rápido do que os protocormos assimbióticos originados sob as mesmas condições. Por exemplo, plantas de *Goodyra repens* colonizadas por *Ceratobasidium cornigerum*, chegaram à altura de 5-10 cm em apenas doze meses, em ágar de celulose, enquanto que protocormos assimbióticos tiveram de 2-3 cm de altura. No presente experimento as observações foram interrompidas aos 70 dias, porém, considerando os dados apresentados, é possível extrapolar para a possibilidade de que em fases posteriores o desenvolvimento das plântulas no substrato SA poderia mostrar-se ainda mais eficiente.

A maioria dos trabalhos experimentais com colonização fungal de tecido de orquídea tem sido desenvolvida usando protocormos em cultura asséptica. De acordo com Peterson & Currah (1990), a entrada do fungo parece ocorrer via suspensor, sendo que, em algumas espécies o fungo penetra via pêlos absorventes. Em nossas observações não foi possível detectar a região de entrada do fungo, uma vez que foram pela primeira vez observados em estágio avançado de desenvolvimento dos protocormos, entretanto as estruturas micorrizais estavam concentradas na região basal, sobre os rizóides, e na região apical, na área estomática. Estas observações encontram-se de acordo com Smith & Read (1997) que cita que o fungo espalha-se de uma célula a outra, de forma que a região basal torna-se extensivamente colonizada. O desenvolvimento dos protocormos de *Gastrodia elata* foi avaliado por Xu & Um (1988), verificando que a espécie requer fungos do tipo *Rhizoctonia*, nos estádios iniciais, porém o completo desenvolvimento da plântula necessita de uma colonização secundária por *Armillaria*. Como não são conhecidas outras espécies com essa sucessão fungal, Smith & Read (1997) ressaltam que isso pode acrescentar outro nível de complexidade para a determinação das especificidades das interações orquídea-fungo.

Histogênese e Organogênese das espécies a partir da germinação

Nas espécies em estudo os eventos relacionados à histogênese e à organogênese ocorreram de forma semelhante, porém em períodos diferenciados, dependendo do meio de cultivo e da espécie considerada.

Em Orchidaceae, é discutível o momento a ser considerado que a semente germinou. Alguns consideram que a semente germinou quando o embrião demonstra qualquer indício de atividade (Harvais, 1973), outros entendem que isso ocorre quando o embrião mostra-se intumescido e capaz de romper o tegumento da semente (Henrich *et al.*, 1981, Rasmussen *et al.*, 1990a e 1990b; Szendra & Read, 2000), ou quando os rizóides tornam-se visíveis no protocormo (Takahashi *et al.*, 2000), mas outros consideram-na germinada somente após gema caulinar estar diferenciada (Curtis & Nichol, 1948, Ichihashi, 1990). No presente estudo, optou-se por considerar que a semente germinou quando o embrião apresentava-se intumescido e rompia a testa. Tais variações na conceituação de germinação para essa família certamente decorrem das características apresentadas pelos embriões, pois, como esclarecem Alvarez & King (1969), a plântula emerge da semente em condições de relativa indiferenciação e seu desenvolvimento subsequente é muito lento. Nas sementes de Orchidaceae, não existe endosperma e nem cotilédones (Harrison & Arditti, 1978), fatores que provavelmente são determinantes do pouco desenvolvimento do embrião. Assim, o embrião presente na semente madura, pode mais adequadamente ser considerado como um proembrião, o qual ao germinar complementa a estrutura embrionária, passando a ser realmente um embrião, razão que leva ao uso do termo protocormo, para a estrutura recém germinada, ao invés de denominá-la de plântula. O termo protocormo foi adotado pelo botânico francês Bernard, no início do século XX, para designar, em Orchidaceae, os embriões intumescidos e em fase inicial de germinação e desenvolvimento, sendo, posteriormente, bem aceito e adotado por pesquisadores dessa família (Morel, 1974). Barabé *et al.* (1993) salienta que o protocormo pode ser considerado como uma extensão do estágio embrionário que, ao contrário das demais espécies fanerógamas, ocorre fora das sementes. Leroux *et al.* (1995), por exemplo, estudando morfogênese de *Cypripedium acaule* (Orchidaceae), fazem uso dos termos proembrião, estrutura anterior a germinação, e protocormo, estrutura nas fases iniciais de desenvolvimento pós-germinativo.

No início da germinação das sementes de orquídeas, os embriões expandem-se tanto no número, quanto no tamanho de suas células (Rao, 1964; Mitra, 1971; Shushan, 1974) originando uma estrutura cônica (Arditti, 1967; Rasmussen *et al.*, 1990a).

Em *Cattleya eldorado*, aos 14 dias após a germinação, já mostra distintas as regiões apical e basal, com primórdios foliares no ápice, os primórdios foliares e rizóides na base. Esse protocormo, ou plântula, ainda encontra-se ligado parcialmente à testa. Nas fases posteriores morfológicamente as modificações consistem em crescimento do protocormo, com aumento do diâmetro da base, bem como do número e comprimento dos rizóides, e alongamento do ápice, surgindo novos primórdios foliares. O aparecimento do segundo primórdio foliar foi observado com 56 dias. Nas plântulas do meio MS ½, constatou-se que geralmente atingiam características similares àquelas presentes em plântulas dos outros meios de cultura, em períodos posteriores, ou seja, mostravam retardo no desenvolvimento. Aos 70 dias as plântulas crescendo no substrato SA apresentaram aspecto mais vigoroso, caracterizado por uma região basal mais globosa, com grande número de rizóides e primórdios foliares mais numerosos, já bastante expandidos. Isso pode ser consequência de melhor condição nutricional relacionada à presença de micorrizas.

O crescimento de *C. eldorado*, resultante de intensas mitoses, parece anterior a histogênese. Exceto das células que constituem a protoderme, já diferenciada antes mesmo da germinação, todo restante da estrutura, por longo tempo permanece constituída por células similares, geralmente caracterizadas como parenquimáticas. Essa denominação deve-se à presença de vacúolos com grande acúmulo de substâncias de reserva. Em fases mais avançadas, 56 dias após a germinação, é que se observa que algumas células passam a diferenciar-se em procâmbio. Até os 70 dias, período analisado, não foi possível evidenciar claramente uma região com promeristema, embora se apresenta a região apical bastante desenvolvida.

Epidendrum imatophyllum, entre as espécies analisadas, foi a que mostrou um desenvolvimento mais lento, tanto com relação à organogênese. Aos 14 dias só foi observado o maior intumescimento do protocormo e a presença de alguns rizóides, naqueles que se desenvolviam nos tratamentos KC e SA. Em algumas plântulas, aos 28 dias, podia ser visto um ápice proeminente, mas somente aos 56 dias é que se tornaram evidentes os primórdios foliares, porém apenas quando do meio KC ou do substrato SA. Mas, é importante ressaltar, que na morfologia externa as alterações processavam-se lentamente, internamente a histogênese mostrava mais evidências de desenvolvimento. Aos 28 dias já se notava a presença do procâmbio, mas esse pouco se diferenciou nas fases subseqüentes, e aos 70 dias era distinta a região do promeristema apical.

Em *Epidendrum schomburgkii*, aos 14 dias após a germinação já eram distintos o ápice e a base do protocormo. Aos 42 dias, os primórdios foliares já estavam bastante

desenvolvidos e foi constatada a presença de raízes adventícias. Nos primórdios foliares, a presença de tricomas pode ser compreendida como evidência de que o tecido de revestimento já deva ser caracterizado como epiderme. Assim como ocorreu também com as estruturas de absorção das raízes adventícias, referidas como pêlos absorventes e não como rizóides, observados nas plântulas, aos 56 dias, em todos os tratamentos. Rizóide, embora estrutural e funcionalmente possa ser igualado a pêlo absorvente, tem sido o termo mais usual para as estruturas de absorção presentes nos protocormos de Orchidaceae.

Embora *Epidendrum schomburgkii* tenha apresentado um desenvolvimento externo mais evidente desde as primeiras fases analisadas, internamente alguns tecidos meristemáticos só foram reconhecidos em fases do desenvolvimento bastante avançado. Assim, o procâmbio foi observado somente em plântulas com 56 dias, porém aos 70 dias mostrava-se em fases adiantadas de diferenciação, contrariamente ao que ocorrem *E. imatophyllum*, que já apresentava procâmbio aos 28 dias, porém sem mostrar diferenciação em fases posteriores.

De acordo com Barabé *et al.* (1993), a organogênese começa com o desenvolvimento do primórdio foliar, citando ainda que, o tamanho, a forma e o número de folhas sobre o protocormo, podem variar de acordo com a espécie e as condições de crescimento. O aparecimento do primórdio foliar foi observado por Stenberg & Kane (1998) somente próximo à 12^o semana após a germinação das sementes de *Encyclia boothiana*, enquanto que Harrisson (1977) cita que o aparecimento do primórdio foliar se deu após a infecção pelo fungo. Nas espécies estudadas, constatou-se que o aparecimento dos primórdios foliares não está necessariamente relacionado com a infecção por fungo, pois surgiram em plântulas dos meios KC e MS ½, embora algumas vezes com certo retardo. Leroux *et al.* (1997) referem que o primeiro primórdio foliar aparece lateralmente ao ápice e desenvolve-se rapidamente em *Cypripedium acaule*. Ainda segundo Stenberg & Kane (*op cit.*) a presença do primórdio foliar caracteriza o terceiro estágio de desenvolvimento.

CONCLUSÕES

A estrutura embrionária, contida no interior das sementes de *Cattleya eldorado*, *Epidendrum schomburgkii* e *E. imatophyllum*, corresponde ao que pode ser chamado de proembrião, uma vez que esta é formada por células indiferenciadas. O embrião corresponde à estrutura pós-germinada, tratada no presente estudo como protocormo ou plântula em fase inicial de desenvolvimento.

Nas plântulas das três espécies, nos distintos tratamentos, o desenvolvimento estrutural (morfo-anatômico) foi semelhante, ocorrendo variação do grau de diferenciação alcançado, ao longo do tempo pós-germinação, conforme a espécie considerada.

O substrato não-asséptico, constituído por sementes de açaí, proporcionou melhores resultados em relação aos parâmetros comprimento e diâmetro, considerados para avaliar o desenvolvimento das espécies, fato que pode estar relacionado à presença de micorrizas. Mesmo considerando o maior alongamento de *Epidendrum schomburgkii*, no meio KC, as plântulas mostraram aspecto mais vigoroso das estruturas no substrato SA. A condição não-asséptica provavelmente proporcionou um bom desenvolvimento, por aproxima-se das condições de germinação das sementes de Orchidaceae na natureza.

A menor eficiência, para promover o desenvolvimento das plântulas, dos meios assépticos (MS $\frac{1}{2}$ e KC), pode estar relacionada à constituição nutricional, o que aponta para necessidade de investigações referentes às concentrações de macro e micronutrientes do meio.

Os resultados revelaram que as sementes de açaí podem ser utilizadas como eficiente substrato alternativo. Por se tratar de um substrato que há pouco tempo vem se utilizando para germinar sementes de orquídeas, e, portanto, sem nenhum estudo prévio da sua composição, enquanto semente, os dados alcançados nesse estudo poderão ser utilizados em pesquisas de propagação de orquídeas. Isso se torna fundamental para ampliar os estudos sobre importantes espécies, tanto as endêmicas, quanto as que ocorrem na Região Amazônica, para programas de conservação dessas espécies, que constituem importantes Recursos Genéticos Vegetais no Brasil.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Desde o século XIX diversos estudos vêm sendo realizados sobre a germinação e o estabelecimento de plântulas da família Orchidaceae. Entretanto, apesar dos avanços no sentido de se conhecer as necessidades nutricionais para efetivar tais processos, poucas pesquisas têm sido realizadas com espécies nacionais, em especial àquelas da Região Amazônica. Dados sobre os aspectos morfo-anatômicos das sementes e das fases iniciais do desenvolvimento dessas espécies, também são bastante restritos.

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitarão elucidar algumas características morfo-anatômicas de espécies de ocorrência na Amazônia, visto que, até o momento, trabalhos similares não foram realizados, podendo ser de grande utilidade em outras áreas de estudo com as mesmas espécies.

Em condições naturais, devido ao tamanho reduzido das sementes de Orchidaceae, alguns estudos tornam-se dificultados. A utilização de sementes de uma espécie de palmeira amazônica (semente de açaí), como substrato alternativo, com base nos resultados obtidos a partir do presente estudo, abre perspectivas para novas investigações, quer quanto ao uso com outras espécies, quer quanto à ocorrência de micorrizas. Com relação as micorrizas, muitos outros aspectos ainda necessitam esclarecimento, tais como: qual a forma de colonização dos fungos micorrízicos; se ocorre, ou não, associação simbiótica; qual a identificação taxonômica e quais as condições ambientais para que se manifestem.

Além disso, torna-se importante conhecer as condições ambientais e os componentes nutricionais que atuam no processo de germinação e de desenvolvimento da espécie de Orchidaceae investigada, pois as necessidades provavelmente são específicas. Deste modo, seria possível melhorar a composição dos meios de cultura utilizados e buscar essas condições em substratos alternativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMAN, A. N. On the evidence for a primitivity epiphytic habitat in orchid. *Syst. Bot.*, v.8, p. 474-477, 1983.
- ALVAREZ, M. R.; SAGAWA, Y. A. A histochemical study of embryo sac development in *Vanda* (Orchidaceae). *Cariologia*, v.18, n. 2, p. ,1965.
- ALVAREZ, M. R.; KING, D. O. Peroxidase localization, activity and isozyme patterns on the developing seedling of *Vanda* (Orchidaceae). *Amer. J. Bot.*, v.56, n.2, p. 180-6, 1969.
- ANDERSON, T. F. Techniques for the preservation of three dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *New York: Acad. Sci.*, v.13, p.130-40, 1951.
- ARDITTI, J. Orchids. *Scientific Amer*, 214 (1): 70-78, 1966.
- _____. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.*, v. 33, n. 1, p.1-97, 1967.
- _____. Aspects of Orchids Physiology. *Advances in Botanical Research*, v. 7, p. 422-423, 1979.
- _____. A short history of orchid hybridization, seed germination and clonal propagation in vitro. *South African Orchid Journal*, v. 13, p. 5-7, 1982.
- _____. *Fundamentals of Orchid Biology*. Toronto: John Wiley & Sons, Inc., p.691, 1992.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germination orchid seeds. In: Arditti, J. (Ed). *Orchid biology: reviews and perspectives*. I. New York: Cornell University Press, 1984.
- ARDITTI, J.; MICHAUD, D. ; HEALEY, P. Morphometry of orchid seeds I. *Paphyopedilum* and native California and related species of *Cypripedium*. *American Journal Bot*, v. 66, n. 10, p.1128-37, 1979.
- _____. Morphometry of orchid seeds II. Native California and related species of *Calypso*, *Cephalanthera*, *Coraallorhiza* and *Epipactis*. *American Journal Bot*, 67(3): 347-360, 1980.
- _____. Seed germination of north american orchids I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera*. *Bot. Gaz*, v. 142, n.4, p.442-453, 1981.
- ARDITTI, J; MICHAUD, D; OLIVA, A. P. Pratical germination of North American and related orchid I *Epipactis atrorubens*, *E. gigantean* and *E. helleborine*. *Amer. Orchid. Soc. Bull.*, v. 51, n. 2, p. 162-171, 1982.
- AREKAL, G.D; KARANTH, A. *In vitro* seed germination and development morphology of seedling in *Dendrobium lawianum*. *Phytomorphology*, v. 30, n. 1, p. 78-84, 1980.

- BALL, E. Hydrolises of sucrose by autoclaving media, a neglected aspect in the technique of culture of plants tissues. *Bull. Torrey. Bot. Clu*, v. 80, n 5, p. 409-11, 1953.
- BARABÉ, D; SAINT-ARNAUD, M; LAUZER, D. Sur la natureza des protocormes d Orchidées (Orchidaceae). *C. R. Acad. Sci. Paris*, t.316, Série III, p.139-144, 1993.
- BARROS, F. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras. *Acta Bot. Bras*, v. 4,n.1, p.177-185, 1990.
- BARROSO, J. ; CHAVES-NEVES, H. Producion of índole-3-ethanol and índole 3-acetic acid by the mycorrhizal fungus of *Ophrys lútea* (Orchidaceae). *New Phytol*, v. 103, p. 745-749, 1990.
- BATCHELOR, S. R. Orchid culture II. Nomenclature and seedling versus mericlones. *Amer. Orchid. Soc. Bull*, v. 51, n. 1, p. 7-11, 1982.
- BENZING, D. H. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? *Seblyana*, v. 5, n. 3-4, p. 241-242, 1985.
- _____. Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptative diversity. *Ann. Missouri Bot. Gard*, v. 74, n. 2, p. 183-204, 1987.
- BENZING, D. H.; FRIEDMAN, W. E. Mycotrophy:its occurrence and possible significance among epiphytic orchidaceae. *Selbyana*, v. 5, p. 243-247, 1981.
- BENZING, D. H, *et al.* Shootlessness, velamentous roots, and the pre-eminence of orchidaceae in the epiphytic biotope. *Amer. J. Bot*, v. 70, n. 1, p. 121-123, 1983.
- BEYRLE, H.F; SMITH, S. E. The effect of carbohydrate on the development of a *Cattleya* hibrid in association with its mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza*, 32(2): 57-62, 1993.
- BONNER, J. Transport of thiamin in the tomato lant. *American Journal Botany*, v. 29, p. 136-142, 1942.
- BOZZOLA, J. J & RUSSEL, L. D. *Electron Microscopy. Principles and techniques for Biologists*. Boston: Jones and Barlett Publ. , 542 p, 1991.
- BLOSSFELD, A. *Orquidologia, Orquidofilia e Orquicultura*. Jaboticabal: Funep, p. 89, 1999.
- BOWLING, J.C.; THOMPSON, P.A. On storing orchid seed. *The Orchid Review*, 80:120-121, 1972.
- BLOWERS, J; ARDITTI, J. The importance of orchid mycorrhiza. *The Orchid Review*, 1970.
- BRAGA, P. I. Orquídeas – *Biologia Floral*. *Ciência Hoje*, v. 5, n.28, p. 53-55, 1987.
- _____. Orquídeas: Entrada e dispersão na Amazônia. *Ciência Hoje*, v. 5, n. 28, p. 44-51, 1988.
- CAMERON, K. & CHASE, M. Seed morphology of *Vanilloid* Orchids (Vanilloideae:

- Orchidaceae). *Lindleyana*, v. 13, n. 3, p. 148-169, 1998.
- CAMPOS, D. de 2000. *Orquídeas: Manual Prático de Reprodução*. Rio de Janeiro: Ed. Expressão e Cultura, 127 p, 2000.
- _____. Substrato para orquídeas - Sementes de açaí. *Nossas Orquídeas*. Informativo da Associação Brasileira de Orquidólogos, Campinas, SP, ano II, v. 4, 1999.
- CHASE, M. W; PIPPEN, J.S. Seed morphology (Orchidaceae). *Sist. Bot*, v.1, n.3. p.313-23. , 1988.
- _____. Seed morphology and phylogeny in subtribe Catasetinae (Orchidaceae). *Lindleyana*, v. 5, n. 2, p. 126-33, 1990.
- CLEMENTS, M. A. Australian native orchids (epiphytic and terrestrial). In: Arditti, J. (Ed). *Orchid biology: reviews and perspectives II*. New York, P. 295-303, 1982.
- _____. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana*, v. 3, .p. 73-86, 1988.
- CLIFFORD, H & SMITH, W. Seed Morphology and classification of Orchidaceae. *Phytomorphology*, v. 19, p. 133-139, 1969.
- CRUZ, J. ; BRAGA, P..Distribuição de orquídeas amazônicas II. *Ciência e Cultura*. v. 21, n. 3, p. 45-48, 1997.
- CURTIS, J. T. Germination and seedling development in five species of *Cypripedium*. *Amer. Jornal Bot*, v. 30, p. 199-206, 1943.
- CURTIS, J. T. ; NICHOL, M. A. Culture of proliferation orchid embryos *in vitro*. *Bull Torrey Bot. Club*, v. 75, n. 4, p. 358-373, 1948.
- DAHLGREN, R. T.; CLIFFORD, H. T. *The monocotyledons: a comparative study*. New York: Academic Press, 378p.1982.
- DALTON, C.C.; IQBAL, K; TURNER, D. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. *Physiol. Plant*, v. 57, p. 472-76, 1983.
- DHILLON, K. S. ; YAGODEEN, B. A. ; VRENICHENKO, V. A. Micronutrientes and nitrogen metabolism.II. Effect of micronutrients on the assimilation of ammonium and nitrate ions by maize (*Zea mays* L.).*Plant Soil*, v. 103, p. 51-55, 1987.
- DRESSLER, R. L. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland: Dioscorides Press, 314p, 1993.
- _____. *The orchids and classification*. Harvard: Harvard University Press, 332 p, 1981.
- DUNLAP, S. R.; KRESOVICH, S. ; McGEE, R. E.The effect of salt concentration on auxin stability in culture media *Plant. Physiol*, v. 81, p. 934-936, 1986.
- DUNLAP, J. ; ROBACKER, K. M. Nutrient salts promote light- induced degradation of

- indole-3-acetic acid in tissue culture media. *Plant Physiol*, v. 81, p. 934—936, 1988.
- DYCUS, A. ; KNUDSON, L. The role of the velamen of the aerial roots of orchids. *Botanical Gazette*. N. 2, 119:78: 87, 1957.
- EAMES, A. J. Morphology of angiosperms. Bombay: Tata McGraw Hill, p.354, 1997.
- ENGLERT, S. I. Orquídeas & Bromélias: Manual Prático de Cultivo. Guairá. Agropecuária, p. 96, 2000.
- ERSNST, R. Studies in asymbiotic culture of orchids. *Amer. Orchid. Soc. Bull*, v. 44, p. 12-8, 1975.
- ERSNST, R; ARDITTI, J.; HEALEY, P. L. The nutrition of orchid seedlings. *Amer. Orchid. Soc. Bull*, v. 39, p. 599-605, 1970.
- _____. Carbohydrate physiology of orchid seedling II. Hidrolysis and effects of oligosacarides. *Amer. J. Bot*, v. 58, n. 9, p. 827-835, 1971.
- ERSNST, R; ARDITTI, J. Carbohydrate physiology of orchid seedling III. Hidrolises of maltooligosacarides by *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedling. *American Journal Botany*, v. 77, n. 2, p. 188-195, 1990.
- ERNST, R.; BJORNSEN, J. E.; ARDITTI, J. Effects of ethephon, its nonethylene-generating analogethylphosphonic acid, and phosphorus-acid in aseptic culture of orchid seedlings. *American Journal of Botany*, v. 79, n. 3, p. 275-78, 1992.
- FERREIRA, A. B. G. O substrato coxim, 1991. Disponível em: <<http://www.delfinadearaujo.com/on/on4/forumbr1.htm>>. Acesso em: 18/05/2001.
- FLAMÉE, M. Influence of selected media and supplements on the germination and growth of *Paphyopedilum* seedling. *Amer. Orchid. Soc. Bull*, v.47.419-423, 1978.
- FREDRIKSON, M. Embriological studies of *Herminium monorchis* (Orchidaceae) using confocal scanning laser microscopy. *Amer. J. Bot*, v. 7, n. 1, p. 123-7, 1990.
- FREI, J. K. ; DONNISON, C. H. The chemical effects of certain bark substrates on the germination and early growth of epiphytic orchids. *Bul. Torrey Bot. Club*. v. 99, n. 6, p. 301-307, 1972.
- GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. *J. Arnold. Arbor. Harv. Univ*, v. 53, p. 203-15, 1972.
- GENTRY, A.; DODSON, C. H. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Ann. Missouri Bot. Gard*, v. 74, n. 2, p. 205-233, 1987.
- GRILO-MENSA, E.; PEÑA, E.; PÉREZ, D. Germination masiva *in vitro* de algumas espécies de orquídeas em el Jardin Botánico Nacional. *Rev. Jard. Bot. Nac*, v. 6, n. 2, p. 95-100, 1985.
- HADLEY, G.; HARVAIS, G. Asymbiotic germination and development of *Orchis*

purpurella. New Phytol, v. 62, n.2, p. 441-445, 1968.

HADLEY, G. Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza. New. Phitol, v. 68, p. 933, 1969.

_____.The interaction of kinetin, auxin and other factors in the developments of north temperate orchids. New Phytol, v. 69, p. 549-555, 1970.

_____.Orchid mycorrh. In: Arditti, J.(Ed). Orchid biology:reviews and perspectives II. New York: Cornell University Press, p. 84-115, 1982.

_____.Symbiotic germination of orchid seed. Orchid Rev, v. 2, p. 44-47, 1983.

HADLEY, G.; PEEG, G.F. Host- fungus relationships in orchid mycorrhizal systems.In:Pritchard, W.H, Ed Modern methodsiin orchid conservation Cambridge: University Press, p. 157-17, 1989.

HAGEN, S. R; STASINOPOLOUS, T. C. Stability and utilization of picloran, vitamins and sucrose in a tissue culture medium. Plant Cell T. Org. Cult. v. 25, p. 45-48, 1991.

HANDRO, W. ; KERBAUY, G. B. Cultura de embriões de orquídea em meio líquido. Ciência e Cultura. v. 32, n. 8, p , 1980.

HARRISON, C. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). Bot. Gaz.139 (2): 180-189, 1977.

HARRISON, C. ; ARDITTI, J. Physiological changes during the germination of *C attleya aurantiaca* (Orchidaceae). Bot. Gaz.139(2): 180-189, 1978.

HARVAIS, G. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture. Can. J. Bot, v. 51, p. 327-32, 1973.

_____.An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. Can. J. Bot. v. 60, p, 237-44, 1982.

HARVAIS, G. ; HADLEY, G. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. New Phytol, v. 66, n. 2, p. 217-230, 1967.

HEALEY, P.; MICHAUD, D.; ARDITTI, J. Morphometry of orchid seeds III. Native California and related species of *Goodyera*, *Piperia*,*Platanthera* and *Spiranthes*. American Journal Botany, v. 67,n. 4, p. 508-18, 1980.

HENRICH, J.; STIMART, D. P.; ASCHER, P. D. Terrestrial orchid seed germination *in vitro* on a defined medium. J. Amer. Soc. Hort. Sci, v.196, n.2, p. 193-196, 1981.

HEW, C. S.; MAH, T. C. Sugar uptake and invertase activity in *Dendrobium* tissues. New Phytol, v. 111, p. 167-171, 1989.

HINNEN, M. G. S. ; PIERIK, R. L. M.; BRONSEMA, F. B. F. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedling *in vitro*.

- Sci. Horticult, v.41, p. 105-116, 1989.
- HOMÉS, J.; VANSERVEREN-VAN ESPEN, N.1973..Effects du daccharose et de la luminere sur le development et la morphologie de protocormes d orchidees cultives in vitro. Bull. S. R. Bot. Belgique, v.106, p. 89-106, 1973.
- IANNOTTI, M. A; STORT, M. N; MORALES-MARIN, M. 1987.O sistema reprodutivo de *Epidendrum rigidum* Jacq.(Orchidaceae).Ciência e Cultura, v. 39, n. 7, p. 641-644, 1987.
- ISLAM, M. O.; Matsumi, S.; Ichihashi, S. Effects of light quality on seed germination and seedling growth of *Cattleya* orchids in vitro. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 68: (6) 1132-38, 1999.
- ICHIHASHI, S. Effects of light on root formation of *Bletilla striata* seedlings. Lindleyana, v. 5, n. 2, p. 140-143, 1990.
- JANZEN, D. H. Ecologia vegetal nos trópicos. São Paulo: EPUED, USP (Temas de Biologia 7), v. 7, p. 79, 1980.
- JOHANSEN, D. A. Plant Microtechnique. 2 ed. New York: Mcgraw Hill, 523p, 1940.
- KERBAUY, G. B. *In vitro* Conversion of *Cattleya* Root Tip cell into Protocorm- like Bodies. J Plant Physiol, v. 138, p. 248-251, 1991.
- _____. Estudo da formação *in vitro* de estruturas semelhantes a protocormos a partir de células meristemáticas de raízes de *Oncidium varicosum*. Tese (Livre Docência), Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 1988.
- KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz, v. 73, p. 1-25, 1922.
- _____. Flower production by orchids grow nonsymbiotically. Botanical Gazette, v. 89, p. 192-199, 1930.
- _____. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. Am. Orchid Soc. Bull, v. 15, p. 214-217, 1946.
- _____. Germination od seed of *Vanilla*. Amer. J. Bot, v. 37, p. 241-47, 1950.
- KUMARIA, S. ; TANDON, P. Asymbiotic germination of *Dendrobium fimbriatum* var.*oculatum* H.K.F. seeds on different media. Proc. Indian Natur. Sci. Acad, v. 185, n. 3 e 4, p. 277-279, 1991.
- KURZWEIL, H. Seed morphology in southern African Orchidoideae (Orchidaceae). Pl. Syst. Evol, v. 185, p. 229-247, 1993.
- LACERDA, K. G. Habitats das orquídeas da Amazônia Brasileira. Bol. Assoc. Orq. Biotropica, v. 16, n. 3, p. 249-256, 1981.
- LEROX, G. ; DENIS, B. ; VIETH, J. Morphogenèse comparée de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) cultives *in vitro* avec ou sans sucre. Can. J. Bot, v. 73, p.

1391-1406, 1995.

_____. Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). Pl. Syst. Evol, v. 205, p. 53-72, 1997.

LEIFERT, C. ; LIN, L. Y. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro. Plant Cell T. Org.Cult, v. 30, p. 171-179, 1992.

LIN, L. Y. Effects of light intensity, sugar and Co₂ concentrations on growth and mineral uptake of *Dendrobium* plantlets. J. Horticulture. Sci, v. 67, n. 5, p. 601-611, 1992.

LINDEN, B. Aseptic germination of seeds of northern terrestrial orchids. Ann. Bot. Fennici, v. 17, p. 174-182, 1980.

MANNING, J. C. ; VAN STADEN, J. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. Aust. J. Bot, v. 35, p. 343-353, 1987.

MARIAT, M. Recherches sur la physiologie des embryons d'orchidées. Revue Générale de Botanique, v.59, n. 701, p. 324-377, 1952.

MARIN MORALES, M. Estudos em híbridos F1 artificiais envolvendo espécies do gênero *Cattleya* e *Laelia* Lindl.(Orchidaceae). Dissertação de Mestrado/IB/Unesp, São Paulo, 1982.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 5. ed. London: Academic Press, 654p, 1993.

MEAD, J. W.; BULARD, C. Effects of vitamins and nitrogen sources on asymbiotic germination and development of *Orchis laxiflora* and *Oprys sphegodes*. New Phytol, v. 74, p. 33-40, 1975.

_____. Vitamin and nitrogen requirements of *Orchis laxiflora* Lank. New Phytol, v. 83, p. 126-36, 1979.

MELLO, C. M. C. Conservação de sementes de orquídeas do Cerrado. 48 f. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB, Brasília., 2000.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorns of *Epidendrum fulgens*. J. Plant. Physiol, v. 138, n. 2, p. 195-199, 1991.

MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICHIO, G. *Actinidia deliciosa* C.F. Liang *in vitro*. 1.Growth and mineral uptake by explants. Plant Cell T. Org. Cult, v.25, .p. 91-98, 1991.

MILANEZE, M. A. A influência da intensidade luminosa e do fotoperíodo no desenvolvimento inicial de *Pseudolaelia velozicola* (Hoene) Porto Brade, a partir de sementes selecionadas por densidade. Dissertação de Mestrado, UNESP, Rio Claro, São Paulo, p. 223, 1992.

_____. Estudos em orquídeas do Brasil: Morfologia de sementes e cultivo assimbiótico.. 234f. Tese de Doutorado, Unesp, Rio Claro, São Paulo, 1997.

- MITRA, G. C. Studies on seeds, shoot-tips & sten-discs of an orchid grown in aseptic culture. *Ind. J. Ex. Biol.*, v. 9, p. 79-85, 1971.
- MIYOSHI, K; MII, M. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of some members of Coelogyninae (Orchidaceae). *Phytomorphology*, v. 37, n. 2/3, p.191-199, 1988.
- MOLVRAY, M. ; KORES, P. Character analysis of the seed coat in Spiranthoideae and Orchidoideae, with special reference to the Diurideae (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, v. 82, n. 11, p. 1443-1454, 1995.
- MOREL, G. M. Clonal multiplication of orchids. In: WITHNER, C. L (Ed). *The orchid: a scientific studies*. New York: Wiley – Interscience, p. 162-222, 1974.
- MURAI, Y.; LUBOTA, C.; KOSAI, T. Culture medium volume as a factor affecting changes with time in concentrations of medium components and growth of plantlets in vitro. In: Kosal, T; Fujiwara, K; Hayashi, M. *Collected papers on environmental control in micropropagation*. :Byoung Ryong Jeong, 1992.
- MURASHIGE, T. E.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NAGASHIMA, T. Studies on seed germination and subsequent development in Orchidaceae. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, v. 63, n. 1, p. 139-49, (Abstract), 1994.
- NISHIMURA, G. Comparative morphology of cotyledonous orchid seedling. *Lindleyana*, v. 6, n. 3, p. 140-146, 1991.
- NOGGLE, G. R.; WYND, F. L. Effects of vitamins on germination and growth of orchid *Bot. Gaz.*, v. 104, p.455-459, 1943.
- OERTLI, G. Exogenous application of vitamins as regulators for growth and development of plant – a review. v.150, p. 375-391, 1987.
- OLIVA, A. P.; ARDITTI, J. Seed germination of north american orchids II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Spiranthes*. *Bot.Gaz.*, v. 145, n. 4, p. 495-501, 1984.
- OWEN, H.R.; ARDITTI, J. Seed germination of north American Orchids II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Aspiranthes*. *Plant. Cell. Rep.*, v. 10, n. 11. p. 583-586, 1991.
- PABST, G.F.J.; DUNGS, F. *Orchidaceae Brasiliensis I*. Hildesheim, Brucke-Kurt Schmersow, 408p, 1977.
- PABST, G.F.J.; DUNGS, F. *Orchidaceae Brasiliensis II*. Hildesheim, Brucke-Kurt Schmersow. 418p, 1977.
- PAVANELLI, E. A. Fertilidade de cruzamentos e embrionia adventícia em *Epidendrum nocturnum* Jacq.(Orchidaceae). Dissertação de Mestrado, IB/UNESP, São Paulo, 1982.

PETERSON, K. L.; CUKRAH, K. S. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. Canadian Journal of Botany, v. 68, p. 1117-1125, 1990.

PHILIP, V. J.; NAINAR, S. A. Z. Structural changes during the in vitro germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). Ann. Bot., v. 61, p. 139-145, 1988.

PIERIK, R. L. M. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedium ciliolare* Pfitz in vitro. Sci. Hort. Amster, v. 34, n. 1/2, p. 139-153, 1988.

_____. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Ediciones Mudi Prensa, p. 326, 1990.

PRASAD, R. N. ; MITRA, G. C.; Nutrient requirements for germination of seed and development of protocorms and seedling of *Cymbidium* in aseptic cultures. Indian J. Exp. Biol, v. 3, p. 123-126, 1975.

PRIDGEON, A. M. Anatomical adaptations in Orchidaceae Lindleyana, v. 1, n. 2, p. 90-101, 1986.

PRITCHARD, H. W.; PRENDERGAST, F.G. Factors influencing the germination and storage characteristics of orchid pollen. In: PRITCHARD, H.W. (Ed.). Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management. Cambridge, p. 1-160, 1989.

RAGHAVAN, V. Effects of certain organic nitrogen compounds on growth in vitro of seedling of *Cattleya*. Bot.Gaz, v. 125, n. 4, p. 260-7, 1964.

RAGHAVAN, V.; TORREY, J. G. Inorganic nitrogen nutrition of the seedling of the orchid *Cattleya*. American Journal Botany, v. 51, n. 3, p. 264-74, 1964.

RAO, A .N. Tissue culture in orchid industry. In: Reinert, J; Bajaj, Y.P.S (Eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin: Springer Verlag. p. 44-69, 1977.

_____. Occurrence of polyembryony in *Vanda* during in vivo and in vitro conditions. Experientia. v. 20, p. 388, 1964.

RASMUSSEN, H. N. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. F.) Hunt & Summerh (Orchidaceae) during germination in vitro. New Phytol, v.116, p. 137-147, 1990.

RASMUSSEN, H. N.; ANDERSEN, T. F.; JOHANSEN, B. Light stimulation and darkness requirement for the symbiotic germination of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) in vitro. Physiol. Plant, v. 79, p. 226-230, 1990a.

_____. Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. Plant Cell Envir. v.13. p.171-177. Physiol. Plant, v. 79, p. 226-230, 1990b.

RASMUSSEN, H. N.; RASMUSSEN, F. N. Climatic and seasonal regulation of seed plant establishment in *Dactylorhiza majalis* inferred from symbiotic experiments in vitro. *Lindleyana*, v. 6, p. 221-227, 1991.

REDINBAUGH, M.G.; CAMPBELL, W. H. Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiol.Plant*, v. 82, p. 640-650, 1991.

RIBEIRO, J. E. Orchidaceae. In: Ribeiro *et al.* (ed). Flora da Reserva Ducke-Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. p. 728-749,1999.

RICHARDSON, K. A.; PETERSON, R. L.; CURRAH, R. S. I. Seeds reserves and early symbiotic protocorm development of *Plantanthera hyperborean* (Orchidaceae). *Can. J. Bot*, v. 70, p. 291-9, 1992.

ROBINSON, H.; BURNS-BALOGH, P. Evidence for a primitively epiphytic habit in Orchidaceae. *Syst. Bot*, v. 7, n. 4, p. 353-358, 1982.

SARMA, K. S. Effects of methods of Agar addition on post- autoclave pH of the tissue culture media. *Ann. Bot*, v. 53, p. 1942-1949, 1990.

SANFORD, W. The ecology of orchids. In: *The Orchids*, p.100, 1974.

SEATON, P. A grower guide to orchid seed storage. *Wild Orchid Echo*. p. 4-7. 1992.

SEATON, P.; Pritchard, H. Observations concerning the storage of orchid pollen and seed. *The Orchid Review*, v. 98, p. 394-395, 1990.

_____. The do's and don'ts of orchid seed storage. *The Orchid Review*, v. 98, p. 172-174, 1990.

SCHIMITZ, V.; LORZ, H. Nutrient uptake in suspension cultures of gramineae.II.Suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*, v. 66, p. 95-111, 1990. .

SHUSHAN, S. Development anatomy of an orchid *Cattleya Xtrimos*. In :Withner, C.L.(Ed). *The Orchis: a scientific survey*. New York: Ronald Press, p.45-72, 1974.

SILVA, W. O cultivo de orquídeas no Brasil. 4. ed. São Paulo/SP: Ed. Nobel, 1979. 98 p.

SINGHA, S; OBERLY, G; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell T. Org. Cult*, v. 11, p. 209-220, 1987.

SKIRVIN , R.M. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. *Plant Cell Rep*, v. 5, n. 4, p. 292-294, 1986.

SMITH, S. E. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol*, v. 65, p. 488-99, 1966.

_____. Asymbiotic germination of seed on carbohydrates of fungal origin. *New Phytol*, v. 72, p. 497-499, 1973.

SMITH, S. E., GIANINAZZINI-PEARSON, V.; KOIDE, R.; CAIRNEY, J. W. G. Nutrients transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant. Soil*, v. 159, p. 103-113, 1994.

SMITH, S. E.; READ, D. J. Orchid mycorrhizas. In: *Mycorrhizas Symbiosis*. 2. ed. New York: Acad. Press, 1997.

SNOW, R. Improvements in methods for the germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin*, v. 54, n. 2, p. 178-181, 1985.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. *Biometry*. San Francisco: Freeman and Company, 776p, 1969.

SPOEL, E. Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. *American. J. Bot*, v. 35, p. 88-95, 1948.

STANCATO, G. C.; FARIA, R. In vitro growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae) I: Effects of Macro and Microelements. *Lindleyana*, v. 11, n. 1, .p. 41-43, 1996.

STASINOPOLUS, C; HANGERTER, R. P. Preventive photochemistry in culture media by long – pass light filters alters growth of culture tissues. *Plant Physiol*, v. 93, p. 1365-1369, 1990.

STEMBERG, M. ; KANE, M. In vitro seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* Var. *Erythronioides*, an endangered florida orchid. *Lindleyana*, v. 13, n.2, p. 101-112, 1998.

STERN, W. Vegetative anatomy of subtribe Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 125, p. 211-227, 1997.

STORT, M. N. S. Estudos em híbridos F1 artificiais de orquídeas (Orchidaceae) com vistas à esterilidade. Tese de Doutorado/ESALQ/USP, 164p. 1970.

_____. Cruzamentos artificiais envolvendo espécies do gênero *Cattleya*, subgênero *Monophyllae* e *Cattleya* (Orchidaceae). *Ciência e cultura*, v. 35, n. 10, p. 1481-1486, 1983.

STOLTZ, L. P. Iron nutrition of *Cattleya* orchid growth in vitro. *J. Amer. Soc. Hor. Sci*, v. 104, n. 3, p. 308-310, 1979.

STOUTAMIRE, W. Terrestrial Orchid Seedlings. *Australian Plants – Orchidaceae*, v. 2, p. 119-122, 1963.

_____. Seeds and seedling of native orchids. *Mich. Bot*, v. 3, n. 4, p. 104-119, 1964.

_____. Terrestrial orchid seedling. In: Withner (ed). *The orchids; Scientific studies*. New York: Wiley – Interscience, 1974.

SWAMY, B. G. L. Embryogenesis in *Cheirostylis flabellate*. Phytomorphology, v. 29, n. 3/4, p. 199-202, 1979.

_____. Embryological studies in the Orchidaceae II. Embryogeny. Amer. Mid. Nat, v. 41, p. 202-32, 1949.

SZEDRAK, E. ; READ, P.E. *In vitro* propagation and anatomical studies of temperate orchid species (Orchidaceae). Acta Horticulturae, v. 520, p. 75-81, 2000.

TAKAHASSHI. K.; OGIWARA, I.; HAKODA, N. Seed germination of *Habenaria (Pecteilis) radiata* (Orchidaceae: Orchideae) in vitro, 2000.

TERYOKHIN, E. S. ; NIKITICHEVA, Z.I. Biology and evolution of embryo and endosperm in parasitic flowering plants. Phytomorphology, v. 32, p. 335-9, 1982.

TOHDA, H. Seed Morphology in Orchidaceae I. *Dactylorchis*, *Orchis*, *Ponerorchis*, *Chondradenia* and *Galeorchis*. Sci. Rep. Tohoku Univ. 4th ser. (Biology), v. 38, p. 253-268, 1983.

_____. Seed Morphology in Orchidaceae II Tribe Cranichideae. Sci. Rep. Tohoku Univ. 4th ser. (Biology), v. 39, p. 21-43, 1985.

_____. Seed Morphology in Orchidaceae III. Tribe Neottieae. Sci. Rep. Tohoku Univ. 4th ser. (Biology), v. 39, p. 103-119, 1986.

UEDA, H.; TORIKATA, H. Effects of light and culture medium on adventitious root formation by Cymbidiums in aseptic culture. Amer. Orchid. Soc. Bull, v. 41, p. 322-327, 1972.

UETAKE, Y; KOBAYASHI, K.; OGOSHI, A. A ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spitanthes sinensis* (Orchidaceae) protocorms associated with binucleate *Rhizoctonia anastomosis* group C. Mycol. Res, v. 96, n. 3, p. 199-209, 1992.

VANCIN, F. E.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz, v. 110, p. 605-613, 1949.

WARCUP, J.D. Specificity of mycorrhizal association in some australian terrestrial orchids. New Phytol, v. 70, p. 41, 1971.

_____. Symbiotic germination of some australian terrestrial orchids. New Phytol, v. 72, p. 387-392, 1973.

VAN DER KINDEREN, G. A. method for the study of field germinated seed to terrestrial orchids. Lindleyana, v. 10, n. 2, p. 84-87, 1995.

VAN WAES, J. M.; DEBERGH, P. C. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability and scanning electro microscopy study of some western European orchids. Physiol. Plant, v. 66, p. 435-442, 1986a.

_____. In vitro germination of some western European orchids. Physiol. Plant, v. 67, p. 253-61, 1986b.

WETZSTEIN, H. Y.; KIM, C.; SOMMER, H. E. Vessel volume, gelling agent, and basal salts affect pH and gel strength of autoclaved tissue culture media. *Hortscience*, v. 29, n. 6, p. 683-5, 1994.

VEYRET, Y. Development of the embryo and the young seedling stages of orchids. In: WITHNER, C.L. (Ed.). *The orchids - scientific studies*. New York: Wiley-Interscience, p.224-65, 1974.

WILKINSON, K. G.; WILLIAMS, R. Effects of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid – associated bacteria. *Plant Soil*, v. 159, p. 291-295, 1994.

YAM, T. W.; WEATHERHEAD, M. A. Germination and seedling development of some Hong Kong orchid. I. *Lindleyana*, v. 3, n. 3, p. 156-60, 1988.

ZETTLER, L. W. ; HOFER, C. J. Sensitivity of *Spirants odorata* seeds to light during in vitro symbiotic seed germination. *Lindleyana*, v. 12, n. 1, p.26-9, 1997.