

Resumo: O cultivo *in vitro* tem sido empregado para a propagação e conservação de orquídeas. Neste contexto, estabeleceu-se um método eficiente de propagação *in vitro* para *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues utilizando a técnica de camada fina celular longitudinal (ITCL). Foram utilizados protocormos germinados *in vitro* seccionados longitudinalmente (2 mm) em meio Knudson C líquido estacionário e semissólido, suplementado com thidiazuron (TDZ) (1,0 a 8,0 μM) para a formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESP). Para a regeneração de plântulas foi utilizado meio de cultura isento de regulador de crescimento vegetal. A formação de ESP ocorre por via direta, sem calo. A utilização de meio de cultura líquido é mais eficiente do que o meio semissólido com relação ao número de ESP formado por explante. Em meio líquido de cultura o maior percentual de formação e o maior número de ESP por explante ocorre com a adição de 4 μM de TDZ. A eficiência (percentual de conversão) na regeneração de plântula em meio semissólido é maior do que em meio líquido.

PALAVRAS-CHAVE: Micropropagação, Técnica de camada fina celular, Estrutura semelhante a protocormo.

Recebido: 23/5/2017 – Aprovado: 10/04/2018

Abstract: *In vitro* culture has been employed for the propagation and conservation of orchids. In this context, an efficient method was established for *in vitro* propagation *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues through longitudinal thin cell layer technique. Protocorms germinated *in vitro* were used to longitudinal section (2mm) in Knudson C medium liquid stationary and semisolid, supplemented with thidiazuron (TDZ) (1.0 to 8.0 μM) to perform protocorm-like body (PLB). For regeneration of plantlets was used culture medium free of plant growth regulator. The PLB formation occurs by direct route, without callus. Use of the liquid culture medium is more efficient than the semisolid medium with respect to the number of PLB formed per explant. In liquid culture medium the highest percentage of formation and PLB number per explant occurs with the addition of 4 μM TDZ. The efficiency (conversion percentage) in the regeneration of plantlets is greater in semisolid than a liquid medium.

KEY WORDS: Micropropagation, Thin cell layer technique, Protocorm-like body.

¹Professor Doutor UFSC/Curitibanos-SC, paulo.fermino@ufsc.br, Rodovia Ulysses Gaboardi, Km 03, Curitibanos, SC,

²Mestre em Agronomia UDESC/Lages-SC,

³Professor Doutor UFSC/Curitibanos-SC,

⁴Graduanda em Agronomia UFSC/Curitibanos-SC.

INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Floresta com Araucárias, representa uma importante tipologia florestal do bioma da Mata Atlântica, a qual vem sendo ocupada há décadas, em sua maioria por pequenos e médios produtores rurais (FIORENTIN et al., 2015). A extensa área de abrangência deste tipo fitogeográfico nos Estados do sul do Brasil evidencia a sua importância na conservação dos recursos florestais (CALLEGARO et al., 2015). Diante deste fato, a Floresta Ombrófila Mista possui uma estrutura complexa, sendo composta por espécies com elevado valor madeireiro e não madeireiro no mercado (NASCIMENTO et al., 2001). Dentre as espécies com interesse destacam-se as orquídeas em razão da elevada beleza e exuberância de suas flores, e na manutenção dos ecossistemas naturais (GALDIANO JUNIOR et al., 2013).

Orchidaceae é umas das famílias botânicas com a maior biodiversidade dentre as angiospermas, com cerca de 25.000 espécies, com grande ocorrência nas regiões neotropicais (WANGLER et al., 2015). No Brasil, existem registradas 2539 espécies de orquídeas (BARROS et al., 2016) e em Santa Catarina cerca de 560 espécies (SIQUEIRA et al., 2014), dentre elas *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues (sinônimo *Gomesa ranifera* (Lindl) M. W. Chase & N. H. Williams) (BARROS et al. 2016). De acordo com Martinelli e Moraes (2013), as espécies de Orchidaceae estão entre as famílias com maior risco de extinção e de interesse para a conservação da Flora do Brasil. A espécie *C. ranifera* tem ocorrência na Floresta Ombrófila Mista e regiões de ecótonos com Floresta Ombrófila Densa (VIBRANS et al., 2013). Na literatura não existem estudos com propagação de *C. ranifera*.

Nas duas últimas décadas, as técnicas de cultivo *in vitro* têm sido utilizadas para a propagação de orquídeas, para o estudo de aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento e como método

de conservação *ex situ* para redução do risco de extinção (TEIXEIRA DA SILVA, 2013). Os primeiros estudos com o cultivo *in vitro* de orquídeas iniciaram com as gemas e segmentos nodais como fontes de explantes (ARDITTI, 2008). Entretanto, a propagação massal foi obtida a partir do uso de explantes para a formação das estruturas semelhantes à protocormos (ESPs), originalmente iniciado por Morel (1960) no cultivo de ápices caulinares de *Cymbidium*, revolucionando a industrialização nas biofábricas de orquídeas (CHUGH et al., 2009).

As estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) consistem em propágulos regenerados *in vitro* a partir da indução de diferentes tipos de explantes em cultura de tecidos vegetais (LEE et al., 2013). Dentre os reguladores de crescimento vegetal utilizados como indutores, as citocininas 6-benziadenina (BA) e o thidiazuron (TDZ) ativam os processos de regeneração *in vitro* em orquídeas (WU et al., 2012). Muitos autores afirmam que as ESPs são embriões somáticos (HOSSAIN et al., 2013; TEIXEIRA DA SILVA, 2013; LEE et al., 2013), ou que a embriogênese somática é um passo inicial na formação das ESPs (ARDITTI; ERNST, 1993; BEGUM et al., 1994; ZHAO et al., 2007).

Para a indução das estruturas semelhantes à protocormos diversos explantes tem sido empregados, tais como folhas (WU et al., 2012), gemas apicais (MONDAL et al., 2013), e os próprios ESPs (NAING et al., 2011; LIAO et al., 2011). A técnica conhecida como “thin cell layer (TCL)” na indução de ESPs foi originalmente descrita por Tran Than Van (1973), consistindo no seccionamento fino (1 a 2 mm) de diversos órgãos ou estruturas vegetais como folhas, raízes, gemas apicais e axilares, embriões e protocormos de modo longitudinal (ITCL) ou transversal (tTCL) em meio de cultura (TEIXEIRA DA SILVA, 2013). O uso de TCL possibilita a exposição de maior superfície de contato de diversos tecidos ou células de um tecido com o meio de cultura indutor, propiciando uma maior taxa proliferativa (TEIXEIRA DA SILVA, 2013).

A técnica “thin cell layer” tem sido usada para diversas espécies de orquídeas no cultivo *in vitro*, como em *Cymbidium* spp. (TEIXEIRA DA SILVA; TANAKA, 2006; TEIXEIRA DA SILVA; TANAKA, 2009; HOSSAIN et al., 2010), *Dendrobium gratiosissimum* (JAIPHET; RANGSAYATORN, 2010), *Coelogyne cristata* (NAING et al., 2011), *Paphiopedilum* (LIAO et al., 2011), *Renanthera* Tom Thumb ‘Qilin’ (WU et al., 2012), *Brasilidium forbesii* (GOMES et al., 2015).

O objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de indução de estrutura semelhante a protocormo (ESP) utilizando-se da técnica de camada fina celular longitudinal (ITCL) de protocormos, bem como, regenerar plântulas *in vitro* de *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues.

MATERIAL E MÉTODOS

Cápsulas em ponto de maturação fisiológica de *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues foram coletadas, no mês de junho, de indivíduos em população natural (Figura 1A) em uma área fragmentada de Floresta Ombrófila Mista no município de Brunópolis, SC. No Laboratório, as cápsulas tiveram suas superfícies desinfetadas inicialmente submergindo-as por 2 min em solução de etanol 70%, em seguida por 15 min em solução de hipoclorito de sódio 2,5%, seguida de tríplice lavagem em água destilada e esterilizada.

Em câmara de fluxo laminar as cápsulas foram excisadas, as sementes foram removidas

manualmente e inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), isento de regulador de crescimento vegetal, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de agar Vetec® para a germinação assimbiótica *in vitro*.

Após 60 dias, os protocormos desenvolvidos foram submetidos a técnica da camada fina celular (ITCL), consistindo no seccionamento longitudinal (2 mm) com auxílio de lâmina de aço (Figura 1B) e transferidos para meio de indução de Estrutura Semelhante a Protocormo (ESP), com o lado das secções para baixo em contato com o meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi composto por sais de Knudson C (KNUDSON, 1946), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) 0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 μ M em meio líquido estacionário e meio semissólido (com 6 g.L⁻¹ de agar Vetec®). A cada 30 dias foram realizados subcultivos com os mesmos meios de cultura utilizados. Aos 70 dias de cultivo, as análises foram realizadas consistindo no percentual de explantes responsivos, e número de ESP formado por explante.

ESPs formadas foram transferidas para meio de regeneração de plântulas, composto pelos sais de Knudson C (KNUDSON, 1946), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de agar Vetec®, e isento de regulador de crescimento vegetal. Após 90 dias de cultivo, foram avaliados o número de plântulas regeneradas por explante e o percentual de conversão de plântulas.

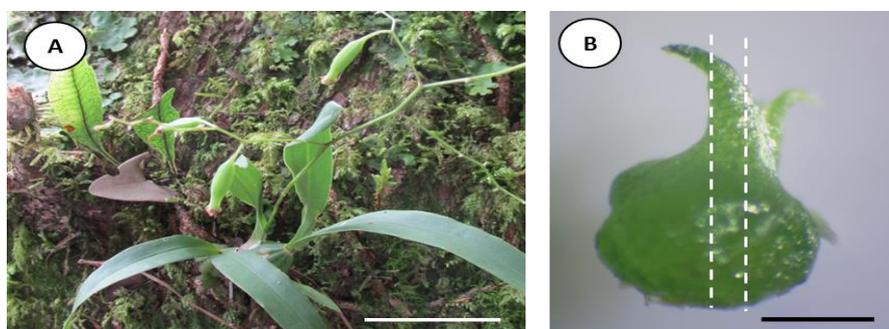


Figura 1. *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues. A. Indivíduo adulto em área natural com cápsulas maduras. B. Protocormos germinados *in vitro* utilizados como fonte de explante através da técnica ITCL (linha tracejada). Barra: A= 5,0 cm; B= 5,0 mm.

Os cultivos foram realizados em frascos de vidro com tampa de plástico de troca gasosa tipo Biosama®, com capacidade de 30 mL, contendo 20 mL de meio de cultura. Os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,8 com 1 M de KOH e HCl antes da autoclavagem a 121 °C por 20min a 1,06 kg cm⁻². As culturas foram incubadas em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, 16 h de fotoperíodo, com lâmpadas fluorescentes brancas de densidade de fluxo de fótons de 50 μmol m⁻² s⁻¹.

O experimento de indução foi organizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5 (consistências do meio X concentrações), com seis repetições para cada tratamento, sendo cada repetição composta por dez explantes. Os resultados foram avaliados quanto a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, e então submetidos análise da variância (ANOVA) com o teste SNK (P < 0,05), usando o programa estatístico Assisat 7.7 beta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão de desenvolvimento de estrutura semelhante a protocormo (ESP) foi semelhante em todos os tratamentos, inclusive na ausência de regulador de crescimento vegetal. Protuberâncias verdes amareladas emergiram gradualmente a partir do explante com três semanas de cultivo, de modo direto, ou seja, sem a formação de calo. ESP globulares foram observadas na superfície do ITCL do explante a partir da quarta semana e essas foram aumentando de tamanho e desenvolvendo-se em plântula posteriormente. A formação de ESP repetitiva, ou seja, formação de ESP a partir de ESP no cultivo também foi observada.

A formação de ESP ocorreu em todos os tratamentos na presença e ausência de thidiazuron (TDZ) (Figura 2), e em ambos os meios de indução líquido e semissólido. A análise estatística do percentual de indução de ESP comparando o meio líquido e o meio semissólido revelou a inexistência de diferenças significativas (p ≤ 0,05). A análise de regressão polinomial entre o percentual de indução de ESP e as diferentes concentrações de TDZ (Figura 3)

em meio líquido indicou que a formação de ESP apresenta valor crescente até 4 μM de TDZ, acima desse valor observa-se redução no percentual expresso por meio de uma equação quadrática com coeficiente de determinação (r²) de 0,64.

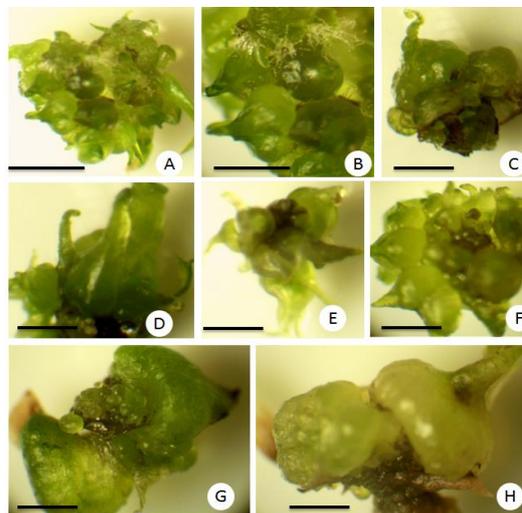


Figura 2. Indução de Estrutura Semelhante a Protocormo (ESP) a partir da técnica de Camada Fina Celular longitudinal (ITCL) de protocormos de *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues. A-B) Formação de ESP com 0,0 μM TDZ; C) Formação de ESP com TDZ 1,0 μM; D-E) Formação de ESP com TDZ 2,0 μM; F) Formação de ESP com TDZ 4,0 μM; G-H) Formação de ESP com TDZ 8,0 μM. Barra: A-C-D-E-G-H: 3,0 mm; B-F: 5,0 mm.

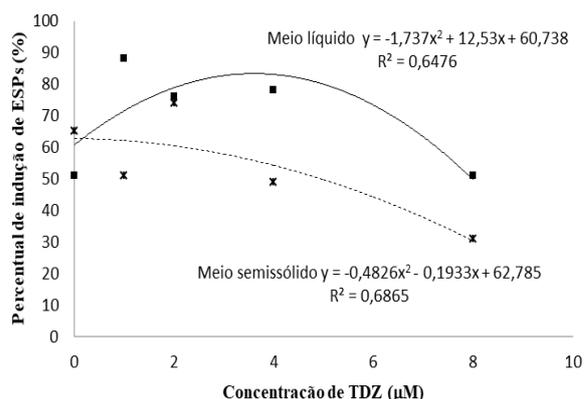


Figura 3. Respostas fisiológicas do percentual de indução de estrutura semelhante a protocormo (ESP) de *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues em diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) em meio de cultura líquido (linha contínua) e semissólido (linha tracejada).

Em meio de cultura semissólido, a adição de regulador de crescimento TDZ em concentrações crescentes promoveu a redução gradual no percentual de indução de ESP (Figura 4), expresso por equação quadrática com coeficiente de determinação (r^2) de 0,68. Os valores de r^2 para o parâmetro testado e teores de regulador de crescimento em *C. ranifera* expressam confiabilidade na trajetória, uma vez que para sistemas *in vitro* se consideram elevados os valores de r^2 compreendidos entre 0,5 e 0,9 (COMPTON, 1994).

A utilização de TDZ com mecanismo de ação hormonal semelhante às citocininas tem sido usado com sucesso na formação de ESP em orquídeas (MALABADI et al., 2009; MAYER et al., 2010). Os resultados obtidos com *C. ranifera* foram semelhantes aos observados em ITCL de protocormos de *Brasiliidium forbesii*, inclusive com formação de ESP nos tratamentos isentos de regulador de crescimento (GOMES et al., 2015).

A análise estatística do número de ESP formado comparando o meio líquido e o meio semissólido revelou a existência de diferenças significativas ($p \leq 0,05$), sendo o maior número formado em meio de cultura líquido (18,2) e o menor em meio semissólido (10,4). De acordo com Pullman e Skryabina (2007), em sistemas de cultura em meio líquido existe aumento da superfície de contato com o explante, aumentando a difusão e a absorção de moléculas. Em *C. ranifera*, o uso de meio de cultura líquido deve ter promovido o aumento da superfície de contato com os ITCL de protocormos e favoreceu o desenvolvimento do maior número de ESP nos explantes. Resultados semelhantes com maior formação de ESP em meio de indução líquido também foram descritos em *Cymbidium giganteum* em comparação ao meio de cultura semissólido (HOSSAIN et al., 2010).

A ausência do uso de TDZ promoveu a formação de ESP em ambos os meios de indução (líquido e semissólido). Em *Cymbidium giganteum*, ESP também foram formados na ausência de reguladores de crescimento (HOSSAIN et al., 2010). Resultados semelhantes foram descritos para a formação de ESP em

Brasiliidium forbesii a partir de ITCL de protocormos, demonstrando inexistência de diferenças significativas entre as diferentes concentrações de regulador, inclusive na ausência (GOMES et al., 2015). Resultados contrastantes foram descritos para *Dendrobium candidum* e *Dendrobium draconis* RChb. f., nas quais a morte dos explantes ocorre após duas ou três semanas em meio de cultura isento de regulador (ZHAO et al., 2007; RANGSAYATORN, 2009).

A análise de regressão polinomial entre o número de ESP formados e as diferentes concentrações de TDZ em meio líquido indicou que a formação de ESP apresenta valor crescente até 4,0 μM de TDZ, e acima dessa concentração ocorre decréscimo no número de ESP formados (Figura 4). No meio de cultura semissólido, o número de ESP formados diminui gradativamente com o aumento da concentração de TDZ até 8,0 μM , expresso por meio de uma equação quadrática polinomial com coeficiente de determinação (r^2) de 0,68. Os elevados valores do número de ESP formados em meio de indução isento de regulador, em ambos os casos, indica níveis endógenos hormonais suficientes para a indução dessa rota morfogênica em *C. ranifera*. Os protocormos são constituídos por células meristemáticas com elevada síntese de auxinas e atividade metabólica (FERREIRA et al., 2015).

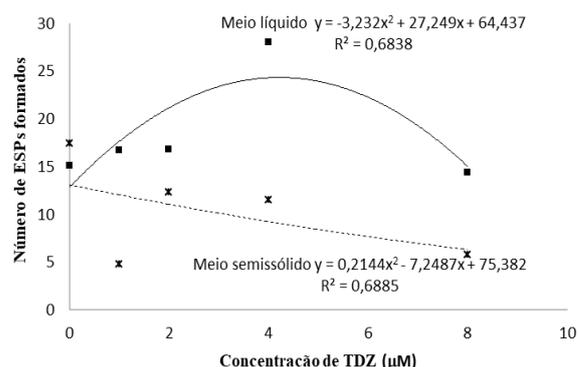


Figura 4. Respostas fisiológicas do número de estrutura semelhante a protocormo (ESP) de *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues em diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) em meio de cultura líquido (linha contínua) e semissólido (linha tracejada).

A formação rápida e direta de ESPs via ITCL de protocormos, sem a mediação de calo é um eficiente método de propagação massal de *C. ranifera*. De acordo com Sheelavanthmath et al. (2005), esse fator é muito importante porque plantas produzidas por regeneração direta exibem estabilidade genética quando comparadas àquelas produzidas por calo. Ainda, Teixeira da Silva (2013) ressalta que esse método direto por ESP é mais eficiente na propagação massal por ser mais simples e reproduzível.

A regeneração de plântulas ocorreu em todos os tratamentos de indução, inclusive na ausência de regulador (Figura 5). A análise estatística do número de plântulas regeneradas de ESP comparando o meio líquido e o meio semissólido revelou a inexistência de diferenças significativas ($p \leq 0,05$) conforme a Tabela 1. Em meio líquido, o maior número de plântulas regeneradas ocorreu com 0, 2 e 4 μM de TDZ. Com o uso de meio semissólido o maior número de plântulas regeneradas foi com 0, 2 e 8 μM .

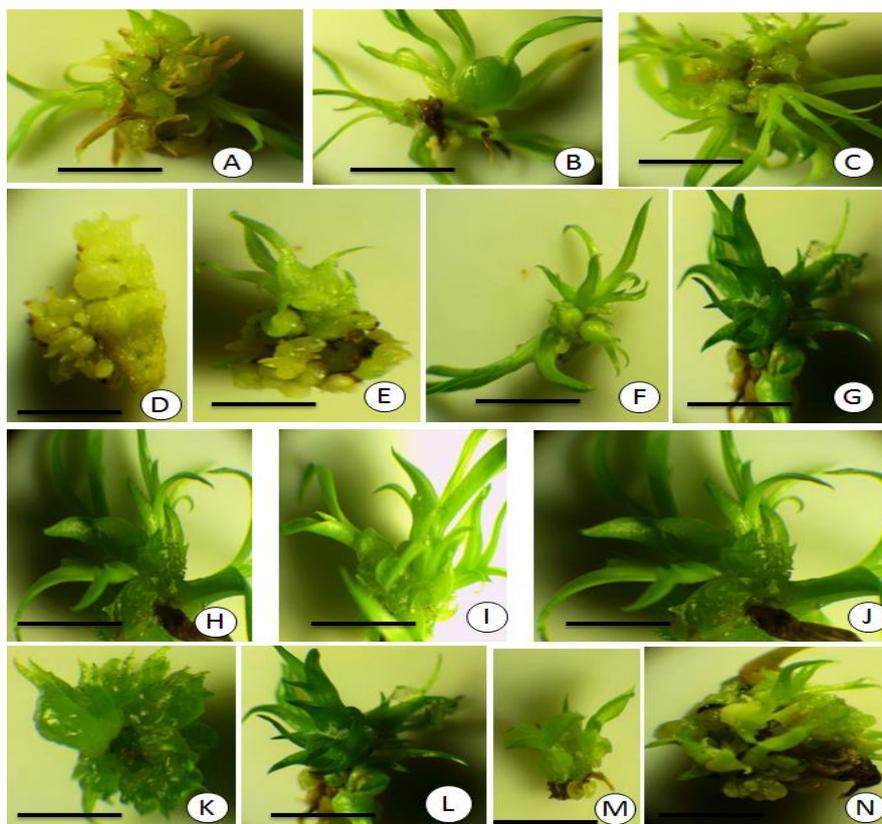


Figura 5. Conversão de plântulas de *Coppinsia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues a partir de ESP via ITCL. A-B-C) Tratamento com TDZ 0,0 μM ; D-E-F) Tratamento com TDZ 1,0 μM ; G-H-I) Tratamento com TDZ 2,0 μM ; J-K-L) Tratamento com TDZ 4,0 μM ; M-N) Tratamento com TDZ 8,0 μM ; Barras = 60 mm.

Tabela 1. Conversão de plântulas a partir de ESP via ITCL de *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V. T. Rodrigues induzidos em meio de cultura líquido e semissólido em diferentes concentrações de TDZ (Thidiazuron).

Meio de Indução (μM)	Meio de cultura líquido		Meio de cultura semissólido	
	Nº de plântulas regeneradas/ explante	% Conversão em plântula	Nº de plântulas regeneradas/ explante	% Conversão em plântula
TDZ 0,0	3,0 a	19,7	3,9 a	22,3
TDZ 1,0	1,7 c	10,2	2,7 bc	56,8
TDZ 2,0	2,4 ab	14,4	3,6 ab	29,5
TDZ 4,0	2,6 ab	9,2	2,4 c	21,1
TDZ 8,0	2,2 b	15,6	3,1 ab	54,2
CV (%)	9,7	7,7	9,2	8,3
Média	2,4 A	13,8	3,1 A	36,7

As médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo Teste SNK ao nível de 5% de probabilidade.

O percentual de conversão em plântula utilizando-se o meio semissólido foi de 36,7% enquanto em meio líquido foi de 13,8%. Em estudos de regeneração de plântulas de orquídeas do gênero *Renanthera* Tom Thum 'Qilin' o uso de TDZ (8 a 10 μM) em meio semissólido na indução de ESP possibilitou o valor máximo de 19,3% de conversão (WU et al., 2012). Elevados percentuais de conversão de plântulas (65 a 92%) foram registrados em meio semissólido com o uso de TDZ (3 e 5 μM) como indutor da formação de ESPs em *Rynchostylis gigantea* (LE et al., 1999). No presente estudo com *C. ranifera*, os resultados indicam que apesar de maior número de ESP serem induzidos em meio líquido, a maior eficiência na maturação e conversão em plântulas ocorrem em meio semissólido.

CONCLUSÃO

A formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) a partir da técnica de TCL em protocormos de *Coppensia ranifera* ocorre por via direta.

A utilização de meio de cultura líquido é mais eficiente do que o meio semissólido com relação ao número de ESP formado por explante.

O número de plântulas regeneradas por explante não difere com o uso de meio líquido e semissólido.

A eficiência (percentual de conversão) na regeneração de plântula em meio semissólido é maior do que em meio líquido.

O uso de TDZ em baixa concentração a partir de protocormos possibilita um simples e eficiente protocolo de propagação e conservação de *Coppensia ranifera*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo nº 442663/ 2014-5) pelo suporte financeiro para a execução do projeto.

REFERÊNCIAS

- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. John Wiley and Sons, New York, 1993. 1421p.
- ARDITTI, J. **Micropropagation of orchids**. Vol 1. Blackwell Publishing, 2008. 1547 p.
- AZEVEDO, C. O., GUIMARÃES, L. R. S. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016. 458p.
- BEGUM, A.A.; TAMAKI, M.; TAHARA, M.; KAKO, S. Somatic embryogenesis in *Cymbidium* through *in vitro* culture of inner tissue of protocorm-like bodies. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science**, v.63, n.1, p.419–427, 1994.

- CALLEGARO, R.M.; LONGHI, S.J.; ANDRZEJEWSKI, C. Variações estruturais entre grupos florísticos de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista Montana em Nova Prata, RS. **Ciência Florestal**, v.25, n.2, p.337-349, 2015.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulture**, v.122, n.4, p.507-520, 2009.
- COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.37, n.3, p.217-42, 1994.
- FERREIRA, D. L.; SMIDT, E. C.; RIBAS, L. L. F. Efficient micropropagation of *Epidendrum secundum* Jacq. from leaves and protocorms. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 13, p.1122-1128, 2015.
- FIORENTIN, L. D.; TEO, S. J.; SCHNEIDER, C. R.; COSTA, R. H.; BATISTA, S. Análise florística e padrão espacial da regeneração natural em área de Floresta Ombrófila Mista na região de Caçador, SC. **Floresta e Ambiente**, v.22, n.1, p.60-70, 2015.
- GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, R. T.; LEMOS, E. G. M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.4, p.583-592, 2013.
- GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, C. R. B.; RIBAS, L. F. Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.37, n.2, p.143-149, 2015.
- HOSSAIN, M. M; SHARMA, M.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; PATHAK, P. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. **Scientia Horticulturae**, v.123, n.1, p.479-487, 2010.
- HOSSAIN, M. M.; KANT, R.; THAN VAN, P.; WINARTO, B.; ZENG, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, n. 2, p.69-139, 2013.
- JAIPHET, C.; RANGSAYATORN, N. Micropropagation of a rare orchid *Dendrobium gratiosissimum* using thin cell layers. **Acta Horticulture**, v.878, n.2, p.185-189, 2010.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v.15, n.2, p.214-217, 1946.
- LE, B. V.; PHUONG, N. T. H.; HONG, L. T. A.; TRAN THANH VAN, K. High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (Orchidaceae) using thin cell layers. **Plant Growth Regulation**, v.28, n.2, p.179-185, 1999.
- LEE, Y.; HSU, S.; YENG, E. C. Orchid protocorm like bodies are somatic embryos. **American Journal of Botany**, v.100, n.11, p.2121-2131, 2013.
- LIAO, Y. J.; TSAI, Y. C.; SUN, Y. W.; LIN, R. S.; WU, F. S. *In vitro* shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v.47, n.5, p.702-709, 2011.
- MALABADI, R. B.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; MULGUND, G. S. TDZ-induced *in vitro* shoot regeneration of *Aerides maculosum* Lindl. from shoot tip thin cell layers. **Floriculture Ornamental Biotechnology**, v.3, n.1, p. 35-39, 2009.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil** - 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1102p.
- MAYER, J. L. S.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; STANCATO, G. C. Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.103, n.4, p.411-416, 2010.
- MONDAL, T.; ADITYA, S.; BANERJEE, N. *In vitro* axillary shoot regeneration and direct Protocorm-like body induction from axenic shoot tips of *Doritis pulcherrima* Lind. **Plant**

- tissue culture and **Biotechnology**, v.23, p.251-261, 2013.
- MOREL, G. M. Producing virus-free cymbidiums. **American Orchid Society Bulletin**, v.29, n.4, p.495-497, 1960.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.4, p. 473-497, 1962.
- NAING, A. H.; CHUNG, J. D.; PARK, I. S.; LIM, K. B. Efficient plant regeneration of the endangered medicinal orchid, *Coleogyne cristata* using protocorm-like bodies. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 3, p.659-666, 2011.
- NASCIMENTO, A. R. T.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Estrutura e padrões de distribuição espacial de espécies arbóreas em uma amostra de Floresta Ombrófila Mista em Nova Prata, RS. **Ciência Florestal**, v.11, n.1, p.105-119, 2001.
- PULLMAN, G. S.; SKRYABINA, A. Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. **Plant Cell Reports**, v.26, n.6, p.873-887, 2007.
- RANGSAYATORN, N. Micropropagation of *Dendrobium draconis* RChb. f. from thin cross-section culture. **Scientia Horticulturae**, v.122, n. 4, p. 662-665, 2009.
- SHEELAVANTHMATH, S. S.; MURTHY, H. N.; HEMA, B. P.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. **Scientia Horticulturae**, v.106, n. 3, p.395-401, 2005.
- SIQUEIRA, C. E.; ZANIN, A.; MENINI NETO, L. Orchidaceae in Santa Catarina: Update, geographic distribution and conservation. **Check List**, v.10, n.6, p.1452-1478, 2014.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; TANAKA, M. Multiple regeneration pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**, v.25, n.3, p.203-210, 2006.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; TANAKA, M. Impact of gelling agent and alternative medium additives on hybrid *Cymbidium* protocorm like body and callus formation. **Floriculture Ornamental Biotechnology**, v.3, n.1, p.56-58, 2009.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The role of thin cell layer in regeneration and transformation of orchids. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, v.113, n.1, p.149-161, 2013.
- TRAN THANH VAN, M. Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v.115, n.1, p.87-92, 1973.
- VIBRANS, A. C.; BONNET, A.; CAGLIONI, E.; GASPER, A. L. DE.; LINGNER, D. V. **Epífitos vasculares da Floresta Ombrófila Densa** (Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina, volume 5). Blumenau: Edifurb, 2013. 336 p.
- WANGLER, M.S.; BARBERENA, F.F.V.A.; LOPES, R.C. Orchidaceae in an Atlantic Forest área: floristics and similarity to other dense Ombrophilous Forest fragments. **Acta Botanica Brasilica**, v.29, n.1, p.82- 93, 2015.
- WU, K.; ZENG, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; CHEN, Z.; ZHANG, J.; YANG, Y.; DUAN, J. Efficient regeneration of *Renanthera* Tom Thumb Qilin from leaf explants. **Scientia Horticulturae**, v.135, n.2, p.194-201, 2012.
- ZHAO, P.; WANG, W.; FENG, F. S.; WU, F.; YANG, Z. Q.; WANG, W. J. High frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.90, n.2, p. 131-139, 2007.