

Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais

Jane Elizabeth Kraus¹, Gilberto Barbante Kerbauy^{1,2} e Walkyria Rossi Monteiro¹

Recebido: 09.08.2005; aceito: 09.03.2006

ABSTRACT - (Development of protocorms of *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: structural and conceptual aspects). Histological aspects of the development of protocorms of *Catasetum pileatum* obtained from germinating seeds *in vitro* are shown and the controversial definition and significance of these structures are discussed. The protocorms are constituted of a mass of parenchyma cells, delimited by a uni-stratified epidermis; the parenchyma cells of the upper part of the protocorms are smaller than the cells of the basal part. The upper part of the protocorm is responsible for the formation of the vegetative stem apex; the first adventitious root are formed endogenously, after the differentiation of several leaves. Remains of the parenchyma cells, and a new plant with well developed shoot and root were visualized around 120-days of culture.

Key words: asymbiotic germinating seeds, orchid, Orchidaceae, seedling

RESUMO - (Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais). São mostrados os aspectos histológicos do desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* originados a partir de sementes cultivadas *in vitro*, bem como, paralelamente, procurou-se discutir a controvertida definição e significado que essas estruturas representam. Os protocormos são constituídos por um conjunto de células parenquimáticas, revestidas por uma epiderme uni-estratificada; as células parenquimáticas da região superior são de tamanho menor quando comparadas às demais células do protocormo. A porção superior do protocormo é responsável pela formação do ápice caulinar vegetativo; a primeira raiz estabelece-se após a formação de várias folhas, sendo de natureza adventícia e de origem endógena. Por volta de 120 dias de cultura foram visualizados restos de células parenquimáticas e a nova planta com os sistemas caulinar e radicular bem desenvolvidos.

Palavras-chave: germinação assimbiótica de sementes, orquídea, Orchidaceae, plântula

Introdução

A maioria das orquídeas possui sementes extremamente diminutas, com 0,005 a 6 mm de comprimento (Arditti 1992), destituídas de endosperma (Dressler 1993, Clements 1999). Os embriões constituem-se de pequenos corpos elipsoidais formados por relativamente poucas células que acumulam reservas (Harrison 1977, Arditti 1992), predominantemente lipídicas. As sementes de orquídeas apresentam, em geral, um padrão bastante uniforme de germinação e desenvolvimento, iniciando-se por intumescimento da semente que acarreta o rompimento do tegumento seminal e a liberação do embrião. Este se desenvolve numa estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, o chamado protocormo (Arditti 1992).

O termo protocormo (do grego *prôtos* = primeiro e *kormós* = tronco de árvore, caule) foi inicialmente proposto por Melchior Treub, em 1888 (Font Quer 1979) ou 1890 (Arditti & Ernst 1993), para descrever o estágio inicial do desenvolvimento de licopodíneas, que forma uma estrutura tuberiforme a partir da germinação de esporos. Há, também, discordância quanto ao primeiro autor a designar de protocormo a estrutura tuberiforme resultante da germinação das sementes de orquídeas. Para Font Quer (1979) teria sido Karl Goebel, na primeira edição do livro *Organographie der Pflanzen*, em 1898, o precursor do uso do termo protocormo, enquanto que para Arditti & Ernst (1993) e Cribb (1999), seria Noël Bernard, em 1899. Vale ressaltar que Goebel (1889 *apud* Nishimura 1981) já havia estudado o desenvolvimento do protocormo de *Taeniophyllum zollingeri* Rchb. f.

1. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Caixa Postal 11461, 05422-970 São Paulo, SP, Brasil
2. Autor para correspondência: gbtkerba@usp.br

Sob condições naturais, o protocormo permanece como tal até que seja infectado por um fungo micorrízico apropriado; somente após esse evento tem início a formação da gema vegetativa e seus primórdios foliares (Harrison 1977). A formação da raiz ocorre mais tarde, após o surgimento de várias folhas (Veyret 1974, Arditti 1992).

Quando a germinação das sementes ocorre sob condições assépticas (germinação assimbiótica, obtida via de regra *in vitro*), o desenvolvimento do protocormo se faz de forma similar, desde que seja adicionada ao meio de cultura uma fonte adequada de carboidrato (Harrison 1977). Segundo Arditti (1992), tanto a germinação das sementes quanto o desenvolvimento dos protocormos *in vitro* não diferem muito dos mesmos eventos observados sob condições naturais. Entretanto, sob condições apropriadas *in vitro*, o desenvolvimento é mais rápido do que em condições naturais.

Dado o elevado número de espécies de Orchidaceae, os estudos de estrutura e ultra-estrutura das sementes e de sua germinação são raros (Arditti 1992). Sob esse enfoque podem ser citados os trabalhos realizados com *Calopogon pulchellus* (Sw.) R. Br. (Carlson 1943), *Cattleya x trimos* (= *Cattleya mossiae* C. Parker ex Hook. × *Cattleya trianaei* L. Linden & Rchb. f.) (Shushan 1959), *Vanda Jones* ex R. Br. (Alvarez & Sagawa 1965), *Cymbidium* Sw. (Champagnat *et al.* 1966), *Stanhopea costaricensis* Rchb. f. e *Bulbophyllum bufu* (Lindl.) Rchb. f. (Veyret 1974), *Cattleya aurantiaca* (Batem. ex Lindl.) P.N. Don (Harrison 1977), *Cattleya aurantiaca* e *Phalaenopsis lueddemanniana* Rchb. f. (Nishimura 1981) e *Eulophia yushuiana* S.H. Hu (Weatherhead *et al.* 1986), entre outros.

Em *Catasetum pileatum* Rchb. f., a despeito de estudos anatômicos já realizados abordando a ontogênese da estruturas semelhantes a protocormos a partir da cultura *in vitro* de ápices radiculares isolados (Kraus & Monteiro 1989, Kraus *et al.* 2004), até o presente momento não foi realizado nenhum estudo voltado especificamente ao desenvolvimento de protocormos formados a partir de sementes dessa planta, objetivo do presente trabalho.

Material e métodos

Obtenção dos protocormos – Para a obtenção dos protocormos foram utilizadas sementes oriundas de um único fruto de *Catasetum pileatum*, uma espécie de orquídea encontrada na região amazônica (AM,

Brasil). A descontaminação das sementes foi realizada por meio de uma solução de hipoclorito de sódio a 10%, adicionada de algumas gotas de detergente doméstico, mantida sob agitação por 15 min. A seguir, as sementes foram lavadas por quatro vezes com água destilada e esterilizada e colocadas no meio de cultura de Knudson - fórmula C (Knudson 1946), modificado pelo uso de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (27 mg L⁻¹) e Na_2EDTA (37 mg L⁻¹). Ao meio de cultura foram adicionados 60 g L⁻¹ de banana nanica (*Musa* subgrupo AAA “Grande Naine”) madura, 10 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de ágar; o pH do meio foi ajustado para 5,6. Em frascos de erlenmeyer com capacidade de 250 mL foram colocados 100 mL de meio de cultura em cada um e, a seguir, foram esterilizados em autoclave por 15 min a 120 °C. Após a inoculação das sementes, os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfuradas, cujos furos foram preenchidos com pequenos tufo de algodão umedecidos com uma solução de permanganato de potássio. Os frascos foram mantidos sob um fotoperíodo de 16 h (55 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a 26 ± 2 °C.

Histologia – Para os estudos histológicos dos protocormos em seus diferentes estágios de desenvolvimento, amostras foram coletadas no 10^o, 20^o, 30^o, 60^o e 120^o dia após a inoculação das sementes. As amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%, 1:1:18, v/v) (Johansen 1940), desidratadas em série butanólica terciária e incluídas em parafina com polímeros plásticos (“paraplast”), segundo os procedimentos descritos em Kraus & Arduin (1997). Cortes transversais e longitudinais, seriados e com 10 μm de espessura das amostras incluídas em parafina foram obtidos em micrótomo rotativo. Os cortes foram afixados em lâminas histológicas por meio do adesivo de Haupt (1930). A coloração dos cortes foi feita com safranina e verde-firme, com a utilização de ácido tânico e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Foster modificado *apud* Schneider 1981). Para a montagem das lâminas histológicas empregou-se resina sintética (“permount”).

Resultados e Discussão

A despeito da importância inofismável do protocormo na reprodução sexuada de orquídeas levando à formação de uma nova planta, ainda não está claro a partir de que momento inicia-se seu estabelecimento no processo germinativo. Tal falta de entendimento tem levado a interpretações equivocadas

nos estudos básicos de germinação de sementes dessas plantas, como também nas pesquisas de fitotecnia direcionadas à micropropagação a partir de tecidos meristemáticos, com a formação do que convencionou-se cunhar, em inglês, de *protocorm-like body* (PLB), ou seja, estrutura semelhante a protocormo. Não raramente, qualquer tipo de proliferação oriunda dos explantes meristemáticos tem sido denominado, descuidadamente, de PLB.

Segundo Pridgeon *et al.* (1999), o protocormo seria uma estrutura efêmera resultante da germinação de sementes de orquídeas, a partir da qual se formariam os primórdios dos sistemas caulinar e radicular. Cribb (1999), por outro lado, define o protocormo como um tubérculo efêmero que se desenvolve após a germinação das sementes de orquídeas e que se associa a um fungo micorrízico apropriado, antes da produção da primeira folha e raiz da plântula.

Alguns autores denominam de protocormo a estrutura que se apresenta com a forma de um pião ou cone invertido, na porção superior da qual está diferenciado apenas o meristema do ápice caulinar (Carlson 1943) ou, então, a partir do momento em que além do meristema apical, já estão presentes os primórdios foliares, ou seja, a gema encontra-se diferenciada (Bernard 1903, Mariat 1952, Harrison 1977). O término do estágio de protocormo também não apresenta muita concordância entre os autores; para alguns, esse estágio se encerraria com o desenvolvimento das primeiras folhas (Mariat 1952), ou se estende até estágios posteriores, com a formação da raiz (Veyret 1974). Segundo Alvarez & Sagawa (1965), o estágio de protocormo terminaria com o aparecimento da primeira raiz, evento esse acompanhado por necrose e desaparecimento da região parenquimática. Carlson (1943) e Nishimura (1981) empregam os termos plântula e protocormo indistintamente.

Após 10 dias da inoculação *in vitro*, as sementes de *C. pileatum* apresentavam o tegumento seminal rompido, podendo ser visualizados protocormos de formato cônico e coloração verde, similares aos descritos para outras espécies de orquídeas (Mariat 1952, Alvarez & Sagawa 1965, Champagnat *et al.* 1966, Nishimura 1981, Wheatherhead *et al.* 1986). Vale ressaltar que a forma do protocormo varia, mas pode ser característica para certos táxons (Bernard 1903, Veyret 1974, Clements 1995 *apud* Cribb 1999). Os protocormos também variam em tamanho, de 2 a 24 mm de comprimento por 2 a 10 mm de largura,

excepcionalmente apresentando-se maiores (Clements 1999).

Cortes longitudinais ao protocormo de *C. pileatum* evidenciaram que ele era constituído por um conjunto de células parenquimáticas, revestidas pela epiderme; as células parenquimáticas da região superior são de tamanho menor quando comparadas às demais células do protocormo (figuras 1-2). Em alguns dos protocormos analisados observou-se, na porção superior, a presença de uma região meristemática (figura 2), enquanto rizóides (tricomas unicelulares) foram detectados na porção inferior (figura 1). Segundo Cribb (1999), o protocormo típico seria constituído por uma região meristemática na porção superior (calazal), uma região central e uma região basal (micropilar), além da epiderme com rizóides uni ou pluricelulares. Protocormos com células parenquimáticas de tamanho menor na região superior, e maiores, nas demais partes, têm sido observados em várias espécies de orquídeas (Alvarez & Sagawa 1965, Harrison 1977, Nishimura 1981).

No 20º dia de incubação, na porção superior do protocormo foi observada a formação de um primórdio de gema com estruturas foliáceas em início de diferenciação (figura 3). No meristema apical caulinar, as células são menores e com conteúdo citoplasmático denso. As células meristemáticas apresentam intensa atividade mitótica (figura 3, detalhe superior à direita). Levando-se em consideração os aspectos hormonais, é bem conhecido que as citocininas participam ativamente do controle da divisão e da diferenciação celular, estando, portanto, intimamente envolvidas no processo de formação de gemas em diversas plantas (Peres & Kerbauy 2004). Em sementes da orquídea *Epidendrum fulgens* Brongn., Mercier & Kerbauy (1991) verificaram concentrações de citocininas relativamente elevadas, sendo 2iP (2-isopenteniladenina) a forma mais abundante, seguida pela zeatina; ambos os tipos de hormônio variaram quantitativamente nos protocormos desenvolvidos *in vitro*, dependendo da fonte nitrogenada adicionada ao meio de cultura: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 ou uréia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$). Níveis endógenos de citocininas mais elevados foram detectados nos protocormos cultivados em meio suplementado com NH_4NO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

No protocormo de *C. pileatum* foram observados amiloplastos nas células parenquimáticas, principalmente naquelas localizadas na porção basal (figuras 3-4). A presença de amiloplastos nas células maiores e mais diferenciadas foi relacionada com o fornecimento

de energia. Acúmulo de amido parece ser típico das células dos embriões de orquídeas cultivados em meios contendo açúcar (Alvarez & Sagawa 1965, Arditti 1992). Sob condições naturais, a maioria das sementes de orquídeas acumula preferencialmente lipídios (Arditti 1967), adequando-as à anemocoria.

Rizóides (tricomos) também foram visualizados na epiderme da porção basal do protocormo de *C. pileatum* com 20 dias de cultivo (figura 4). A presença de rizóides é uma característica comum nos protocormos de muitas espécies tanto *in vitro* (Harrison 1977, Nishimura 1981, Weatherhead *et al.* 1986) quanto *in natura* (Poddubnaya-Arnoldi & Selezneva 1957 e Poddubnaya-Arnoldi 1976 *apud* Arditti 1992). Os rizóides estão relacionados à fixação inicial do protocormo em espécies epifíticas bem como com a absorção de nutrientes (Arditti 1967, 1992). Na natureza, o provimento inicial de nutrientes ao protocormo é realizado por fungos simbioses como, por exemplo, basidiomicetos, por meio da degradação de reservas acumuladas ou síntese de novas substâncias metabolicamente importantes (Arditti 1967, 1992). Na condição *in vitro*, os nutrientes necessários para o desenvolvimento do protocormo são providos pelo meio de cultura e os rizóides podem representar estruturas importantes, porém não necessariamente essenciais para a absorção desses nutrientes.

Aos 30 dias de incubação, os protocormos mostraram-se maiores (figura 5, parte superior, à direita) e as principais modificações ocorreram na sua porção superior. Nesse estágio, os dois primórdios foliáceos estavam mais desenvolvidos (figura 5); notou-se, também, a presença de cordões procambiais, que se estendem da gema até a porção mediana do protocormo (figura 6). Gemas vegetativas em desenvolvimento são importantes sítios de síntese de auxina, hormônio que atua na diferenciação do tecido vascular e no seu padrão de organização (Aloni 1994). Assim, em *C. pileatum*, a diferenciação dos cordões procambiais da gema em direção à porção mediana do protocormo pode estar relacionada à formação prévia da própria gema.

Pesquisas recentes têm mostrado que a auxina desempenha, ainda, um papel conspícuo tanto na formação do primórdio foliar quanto na filotaxia (Stieger *et al.* 2002, Vogler & Kuhlemeier 2003). A natureza dos primeiros primórdios foliáceos dispostos lateralmente ao meristema apical caulinar tem sido interpretada de forma diversa em orquídeas. Segundo Velenowsky (1907 *apud* Nishimura 1981),

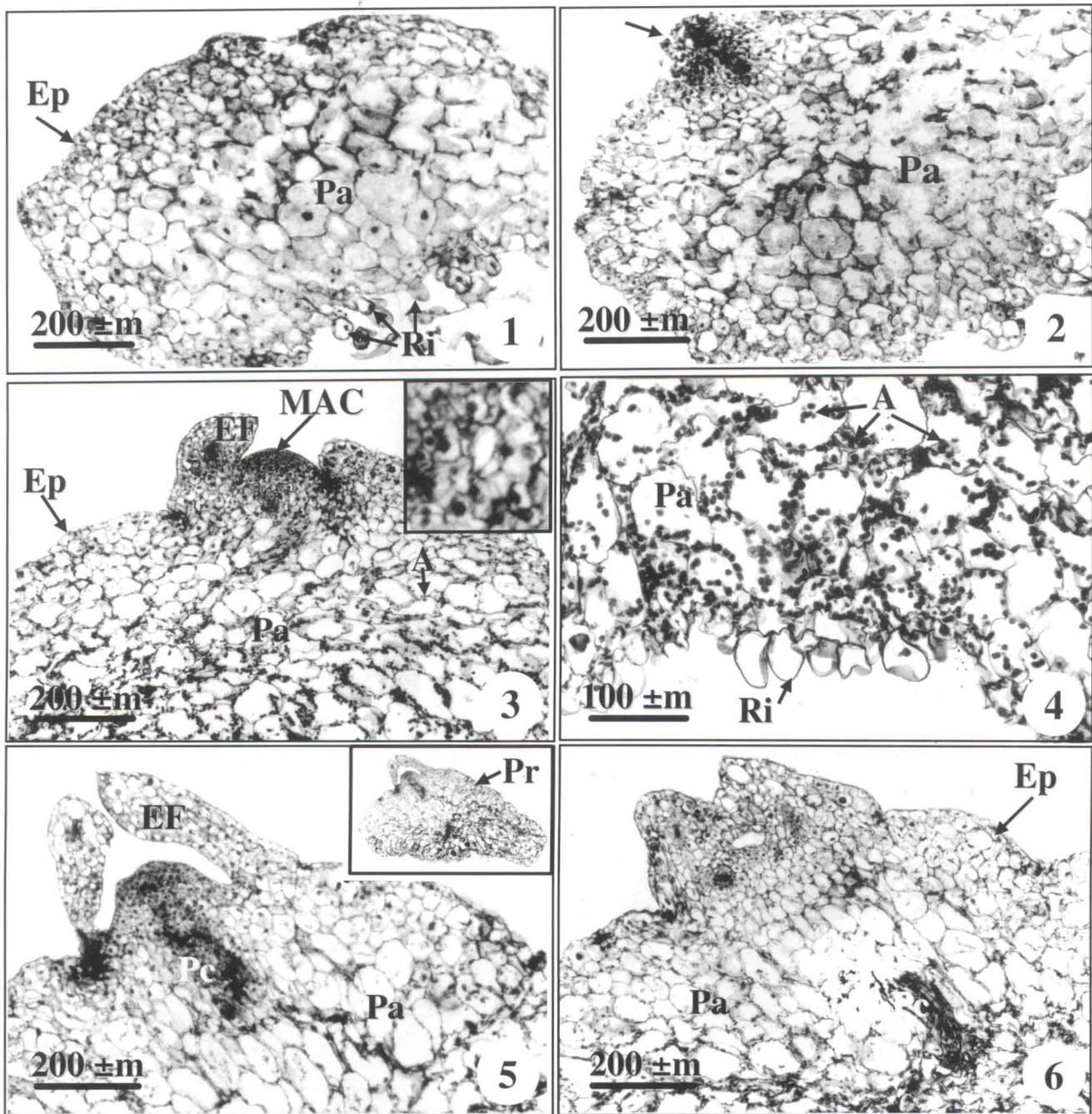
o primeiro dos órgãos foliáceos formados deve ser considerado como um cotilédone e somente o segundo como a folha propriamente dita. Todavia Carlson (1943) e Veyret (1974) postularam que a primeira estrutura formada corresponderia à folha. Baseando-se no conceito de que o cotilédone é uma folha embrionária ou seminal, Batygina *et al.* (2003) consideraram inadequado usar o termo cotilédone para os órgãos de natureza foliar formados durante o desenvolvimento pós-seminal; assim, no protocormo são formadas folhas propriamente ditas.

No material com 60 dias de cultivo verificou-se a formação da primeira raiz na porção superior ou mediana do protocormo, logo abaixo da gema, e após o desenvolvimento de várias folhas (figura 7). Em protocormos de várias espécies de orquídeas foi observado que a primeira raiz se forma adjacente à gema (Nishimura 1981). O surgimento da primeira raiz logo abaixo da gema no protocormo de *C. pileatum* possivelmente decorre da síntese de auxinas pela própria gema. A importância das auxinas na formação de raízes é bem conhecida (Mercier 2004).

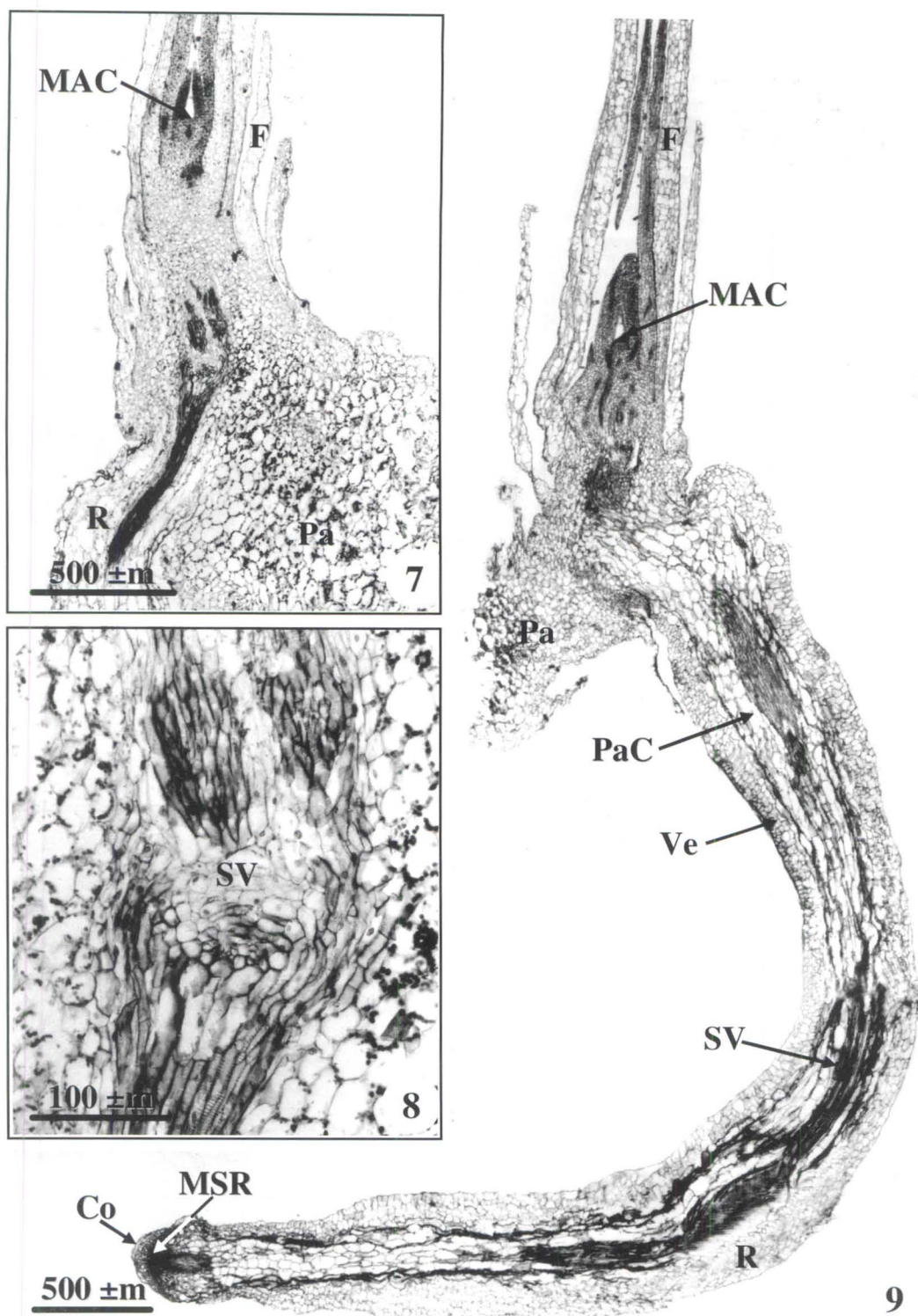
Em *C. pileatum* não se observou a formação de uma raiz primária exógena, como ocorre na maioria das angiospermas (*cf.* Yamashita 1991). A primeira raiz formada é de origem endógena e seus elementos condutores mostraram-se conectados com aqueles que vascularizam o sistema caulinar (figuras 7-8). Levando em consideração a natureza hipocotiledonar que Goebel (1889 *apud* Nishimura 1981) e Clements (1995 *apud* Cribb 1999) atribuem ao protocormo, a primeira raiz formada em *C. pileatum*, além de ser endógena, teria natureza adventícia. Deve ser mencionado que alguns autores (*cf.* Groff & Kaplan 1988) preferem não empregar o termo adventício e fazem uso da expressão raiz originada no caule, a qual é mais explícita e evita a conotação de que essa condição é anormal no desenvolvimento da estrutura avaliada.

Ao redor do 120º dia de cultivo, restavam poucas células parenquimáticas e a planta de *C. pileatum* encontrava-se já formada com os sistemas caulinar e radicular bem desenvolvidos (figura 9). A presença de raiz e do agregado celular em degeneração indicariam o término do estágio de protocormo ou plântula, segundo a interpretação de Alvarez & Sagawa (1965).

No presente trabalho verificou-se que o padrão de desenvolvimento do protocormo de *C. pileatum* a partir da germinação de sementes *in vitro* é similar ao apresentado por outras espécies de orquídeas já estudadas. O padrão de desenvolvimento dos



Figuras 1-6. Protocormos de *Catasetum pileatum* cultivados *in vitro*. Cortes longitudinais. 1. Com 10 dias de cultura: notar a presença de células parenquimáticas menores na porção superior e, maiores, na inferior. Rizóides estão presentes na epiderme da porção inferior. 2. Com 10 dias de cultura: na região superior nota-se um agrupamento de células meristemáticas (seta). 3. Com 20 dias de cultura: na porção superior, nota-se a presença do meristema do ápice caulinar vegetativo e os primórdios foliáceos. Na porção basal, as células parenquimáticas são maiores e contêm amiloplastos. O detalhe, acima à direita, mostra células recém divididas. 4. Em maior aumento: na porção basal são evidenciados os amiloplastos nas células parenquimáticas e os rizóides unicelulares na epiderme. 5. Com 30 dias de cultura: notar os cordões procambiais da gema que se estendem em direção à porção central do protocormo; os órgãos foliares mostram-se mais desenvolvidos. O detalhe, acima à direita, evidencia o aspecto geral do protocormo. 6. Cordões procambiais atingindo a porção central no protocormo, em corte subsequente. A = Amiloplasto, EF = Estrutura Foliácea, Ep = Epiderme, MAC = Meristema do pice Caulinar Vegetativo, Pa = Parênquima, Pc = Procâmbio, Pr = Protocormo, Ri = Rizóides.



Figuras 7-9. Protocormos de *Catasetum pileatum* cultivados *in vitro*. Cortes longitudinais. 7. Com 60 dias de cultura: notar o sistema caulinar e a primeira raiz formada. 8. Detalhe, em maior aumento, da região de conexão dos elementos condutores do caule e da raiz. 9. Com 120 dias de cultura: notar a planta com os sistemas caulinar e radicular bem desenvolvidos e restos do tecido parenquimático. Na raiz podem ser observados a coifa, o meristema subapical, o velâmen, o parênquima cortical e o sistema vascular. Co = coifa, F= Folha, MAC = Meristema do pice Caulinar Vegetativo, MSR = Meristema Subapical da Raiz, Pa = Parênquima, PaC = Parênquima Cortical, R = Raiz, SV = Sistema Vascular, Ve = Velâmen.

protocormos de *C. pileatum in vitro* deve ser, também, similar ao dos protocormos desenvolvidos *in natura*, conforme proposto por Arditti (1992), exceto pelo crescimento mais rápido dos primeiros.

Diante do exposto, somos levados a postular, que em orquídeas, tanto o termo protocormo (*sensu lato*) quanto o termo plântula podem ser usados indistintamente (*cf.* Carlson 1943, Nishimura 1981, Batygina *et al.* 2003), pois se referem à mesma estrutura, resultante do desenvolvimento do embrião zigótico germinado. É provável que o termo protocormo tenha sido mais empregado não só por uma questão histórica, mas pelo fato das sementes de orquídeas conterem um embrião relativamente pouco diferenciado, apresentando, durante a germinação, um padrão de desenvolvimento inicial bastante distinto do das demais angiospermas e específico para o grupo.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Fábio de Barros pelo auxílio na parte taxonômica e pela leitura do manuscrito. O primeiro autor agradece ao CNPq pela bolsa de pesquisa (processo 301776/83).

Literatura citada

- Aloni, R.** 1994. The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. *In:* P.J. Davies (ed.). Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. 2 ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 531-546.
- Alvarez, M.R. & Sagawa, Y.** 1965. A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). *Caryologia* 18: 251-261.
- Arditti, J.** 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review* 33: 1-97.
- Arditti, J.** 1992. Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons, New York.
- Arditti, J. & Ernst, R.** 1993. Micropropagation of orchids. John Wiley & Sons, New York.
- Batygina, T.B., Bragina, E.A. & Vasilyeva, V.E.** 2003. The reproductive system and germination in orchids. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 45: 21-34.
- Bernard, N.** 1903. La germination des orchidées. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 137: 483-485.
- Carlson, M.C.** 1943. The morphology and anatomy of *Calopogon pulchellus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 70: 349-368.
- Champagnat, M., Morel, G., Chabut, P. & Cognet, A.M.** 1966. Recherches morphologiques e histologiques sur la multiplication végétative de quelques orchidées du genre *Cymbidium*. *Revue Générale de Botanique* 73: 706-746.
- Clements, M.A.** 1999. Embryology. *In:* A.M. Pridgeon, P.J. Cribb & M.W. Chase (eds.). *Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae*. Oxford University Press, Oxford, v.1, pp. 38-58.
- Cribb, P.J.** 1999. Morphology. *In:* A.M. Pridgeon, P.J. Cribb & M.W. Chase (eds.). *Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae*. Oxford University Press, Oxford, v.1, pp. 13-23.
- Dressler, R.L.** 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland.
- Font Quer, P.** 1979. Diccionario de Botánica. 7 ed. Editorial Labor, Barcelona.
- Groff, P.A. & Kaplan, D.R.** 1988. The relation of root systems to shoot systems in vascular plants. *The Botanical Review* 54: 387-422.
- Harrison, C.R.** 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 138: 41-45.
- Haupt, A.W.** 1930. A gelatin fixative for paraffin sections. *Stain Technology* 5: 97-98.
- Johansen, D.A.** 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- Knudson, L.** 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- Kraus, J.E. & Arduin, M.** 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora da Universidade Rural, Seropédica.
- Kraus, J.E., Kerbauy, G.B. & Monteiro, W.R.** 2004. Aspectos histoquímicos da formação de protocormóides em ápices radiculares de *Catasetum pileatum* cultivados *in vitro*. *In:* F. Barros & G.B. Kerbauy (eds.). *Orquidologia sul-americana: uma compilação científica*. Secretaria do Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 85-89.
- Kraus, J.E. & Monteiro, W.R.** 1989. Formation of protocorm-like bodies from roots apices of *Catasetum pileatum* (Orchidaceae) cultivated *in vitro*. I. Morphological aspects. *Annals of Botany* 64: 491-498.
- Mariat, M.F.** 1952. Recherches sur la physiologie des embryons d'orchidées. *Revue Générale de Botanique* 59: 324-377.
- Mercier, H.** 2004. Auxinas. *In:* G.B. Kerbauy (ed.). *Fisiologia vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 217-249.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1991. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. *Journal of Plant Physiology* 138: 195-199.

- Nishimura, G.** 1981. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. *Botanical Gazette* 142: 306-365.
- Peres, L.E.P. & Kerbauy, G.B.** 2004. Citocininas. *In*: G.B. Kerbauy (ed.). *Fisiologia vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 250-278.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J. & Chase, M.W.** 1999. *Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae*. Oxford University Press, Oxford.
- Schneider, H.** 1981. Plant anatomy and general botany. *In*: G. Clark (ed.). *Staining procedures used by the Biological Stain Commission*. 4 ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 315-333.
- Stieger, P.A., Reinhardt, D. & Kuhlemeier, C.** 2002. The auxin influx carrier is essential for correct leaf positioning. *The Plant Journal* 32: 509-517.
- Shushan, S.** 1959. Developmental anatomy of an orchid *Cattleya* × *Trimos*. *In*: C.L. Withner (ed.). *The orchids: a scientific survey*. The Ronald Press Company, New York, pp. 45-72.
- Veyret, Y.** 1974. Development of the embryo and young seedling stages of orchids. *In*: C.L. Withner (ed.). *The orchids: scientific studies*. John Wiley & Sons, New York, pp. 223-265.
- Vogler, H. & Kuhlemeier, C.** 2003. Simple hormones and complex signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 51-56.
- Weatherhead, M.A., Zee, S.Y. & Barretto, G.** 1986. Some observation on the early stages of development of *Eulophia yushuiana*. *Memoires of the Hong Kong Natural History Society* 17: 85-90.
- Yamashita, T.** 1991. Ist die Primärwurzel bei Samenpflanzen exogen oder endogen? *Beitrage zur Biologie der Pflanzen* 66: 371-391.