

Armazenamento de sementes e concentrações de ágar no cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae)

Gisele Garcia de Sousa¹ , Benedita Maria Rodrigues Otubo² , José Carlos Sorgato^{3,*} ,
Jackeline Schultz Soares³ , Luan Marlon Ribeiro³ 

¹Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal, Av. Senador Filinto Muller, 1146, CEP 79074-902, Campo Grande, MS, Brasil.

²Agência Estadual de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural, Av. Desembargador José Nunes da Cunha, S/N, Bloco 12, CEP 79031-310, Campo Grande, MS, Brasil

³Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Agrárias, Unidade II, Rodovia Dourados/Itahum, Km 12, CEP 79804-970, Dourados, MS, Brasil.

*josesorgato@ufgd.edu.br

Recebido em 13.II.2019

Aceito em 16.VI.2020

DOI 10.21826/2446-82312020v75e2020017

RESUMO – A sementeira *in vitro* e a formação de bancos de sementes contribuem para a conservação da variabilidade genética das orquídeas. Objetivou-se avaliar o tempo de armazenamento e as concentrações de ágar na germinação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. Foram utilizadas sementes dessecadas por 14 dias e armazenadas por 0, 30, 60 e 90 dias a 4±2 °C. O meio de cultivo MS ½ foi utilizado, suplementado com ágar (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 ou 8 g L⁻¹). Aos 30 dias após a sementeira foi avaliada a porcentagem de germinação, sendo os dados submetidos a análise de variância. As sementes de *B. tuberculata* germinaram em todas as concentrações de ágar e períodos de armazenamentos avaliados, apresentando germinação média acima de 70%. A porcentagem de germinação diminuiu com o aumento do período de armazenamento e das concentrações de ágar. Assim, recomenda-se para a sementeira *in vitro* dessa espécie, sementes armazenadas por até 30 dias, independente da concentração de ágar utilizada no meio de cultura.

Palavras-chave: agente geleificante, conservação de espécies, orquídeas nativas.

ABSTRACT – Seed storage and agar concentrations on *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae) *in vitro* culture. *In vitro* sowing and seed banks contributes to the conservation of the genetic variability of the orchids. Aimed to evaluate the storage time and agar concentrations on the *in vitro* germination of *Brassavola tuberculata* Hook. Seed samples were dried for 14 days and stored for 0, 30, 60 and 90 days under 4±2 °C. The culture medium was ½ MS, supplemented with agar (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 or 8 g L⁻¹). At 30 days after sowing the germination percentage was evaluated and the data were submitted for analysis of variance. The *B. tuberculata* seeds germinated at all concentrations of agar and storage periods evaluated, presenting average germination above 70%. Germination percentage decreases with increasing storage period and agar concentrations. Thus, for *in vitro* sowing of this species, seeds stored for up to 30 days are recommended, regardless of the agar concentration used in the culture medium.

Keywords: gelling agent, species conservation, native orchids.

INTRODUÇÃO

As espécies de Orchidaceae nativas do Brasil são visadas não apenas por colecionadores, mas também por melhoristas (Cardoso 2017). No país, Barros *et al.* (2019) listam, no projeto Flora do Brasil 2020 em construção, 2.443 espécies nativas, distribuídas em 207 gêneros, das quais 1.571 são endêmicas, possuindo espécies com potencial econômico, medicinal e ornamental pouco explorados. Dentre estas, destaca-se *Brassavola tuberculata* Hook, de hábito epifítico, encontrada nos biomas Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, em todos os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e alguns estados nas regiões Norte e Nordeste (Barros *et al.* 2019) Esta espécie é unifoliada, apresentando folhas e caule teretes, cespitosa, que crescem formando densas touceiras com inflorescências que podem ter duas a seis flores agrupadas e perfumadas, de

coloração creme a verde-claro, com sépalas e pétalas longolanceoladas e labelo largo, com extremidade pontiaguda. Esse conjunto de características é responsável pelo seu potencial ornamental (Silva *et al.* 2015).

Na natureza as orquídeas dependem da interação entre fatores bióticos e abióticos, que atuam em seu crescimento, desenvolvimento e sucesso reprodutivo, determinando sua sobrevivência. Nessas condições, ações antropogênicas limitam e reduzem a distribuição e a abundância dessas espécies, por meio da coleta de plantas ou alteração ambiental, resultando na vulnerabilidade dessa família botânica (Fajardo *et al.* 2017, Gale *et al.* 2018). Para a conservação destas espécies, a proteção *in situ* deve ser associada a métodos de conservação *ex situ* (Yang *et al.* 2017), tais como a propagação de plantas e a formação de bancos de sementes (Dowling & Jusaitis 2012, Seaton *et al.* 2018).

A germinação assimbiótica tem se mostrado eficiente para propagação de Orchidaceae, pois resulta em maiores porcentagens de germinação, em relação a condições naturais (Abrão *et al.* 2014, Yang *et al.* 2017). O meio de Murashige & Skoog (1962), conhecido como MS, é um dos mais utilizados nesse tipo de cultivo (Vudala & Ribas 2017) e, dependendo da espécie, pode ser utilizado polimerizado ou líquido. Em meio polimerizado, o ágar tem sido empregado pela sua eficiência como agente geleificante, dando suporte ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas. Apesar das vantagens apresentadas, é necessário o estabelecimento de concentrações nos meios de cultivo que possibilitem elevados percentuais germinativos e o desenvolvimento satisfatório das plântulas de cada espécie (Faria *et al.* 2012).

Ainda, o armazenamento de sementes de espécies nativas constitui uma importante ferramenta para evitar a perda de recursos genéticos, de modo a garantir a preservação da diversidade dessa família de plantas especialmente ameaçadas. Um fator essencial para a formação de um banco de sementes de orquídeas é a manutenção da viabilidade das sementes armazenadas, que podem ser utilizadas para a propagação e conservação das espécies, uma vez que, mesmo armazenadas em condições favoráveis, podem ter a viabilidade afetada (Hosomi 2017).

No entanto, para *B. tuberculata*, ainda são poucos os estudos sobre o armazenamento de sementes e a germinação *in vitro*, tanto visando a conservação quanto a horticultura. Em vista do exposto, objetivou-se com este trabalho, avaliar o armazenamento de sementes e as concentrações de ágar na germinação *in vitro* de *B. tuberculata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados como material de estudo, frutos maduros, ainda fechados, oriundos de autopolinização manual de *Brassavola tuberculata*, provenientes de matrizes com dez anos. Essas foram cultivadas em vasos plásticos número 10, providos de furos na base para drenagem do substrato, sendo seu volume preenchido com fibra de coco (Golden-Mix Chips, Amafibra). Sendo mantidas em viveiro telado, coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50% (radiação fotossintética média = 235 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}/12\text{h}/\text{dia}$), sob condições médias de temperatura e umidade relativa de 22,6 \pm 5 °C e 73,9 \pm 10% e provido de irrigação por micro aspersão, constituído de difusores, posicionados um metro acima das plantas, acionados automaticamente por temporizador digital, sendo realizadas irrigações diárias, que totalizaram uma lâmina de água de 1 mm dia⁻¹. Quinzenalmente foram realizadas adubações, via foliar, com 2 mL L⁻¹ de NPK 10-10-10, acrescido dos micronutrientes: 0,025% de magnésio, 0,02% de boro, 0,05% de cobre, 0,10% de ferro, 0,05% de manganês, 0,0005% de molibdênio e 0,05% de zinco, com teor máximo de cloro de 0,025%. Para controle fitossanitário, as matrizes foram pulverizadas, preventivamente, com O-S-dimetil-N-acetil-fosforoamidotioato (4 mg L⁻¹) e Mancozeb

(4 mg L⁻¹). Tanto para a adubação foliar, quanto para o controle fitossanitário, foi utilizado pulverizador costal com capacidade para 5 L.

Cinco frutos foram colhidos aos 210 dias após sua formação (Rosa *et al.* 2013, Macedo *et al.* 2014) e levados para o Laboratório de Cultivo *in vitro*, onde foram lavados com água corrente e, na sequência, alocados em Béquer com capacidade para 500 mL e desinfestados com 300 mL de álcool (70%) por cinco minutos, para minimizar a possível contaminação. A seguir, os frutos desinfestados foram abertos com auxílio de bisturi e as sementes foram removidas e homogeneizadas. Em seguida foram pesadas em balança de precisão três amostras de 0,005 g cada colocadas em tubos de ensaio recebendo 3 mL de solução aquosa de cloreto de trifetil tetrazólio 0,5%, conforme metodologia proposta por Soares *et al.* (2014).

Os três tubos de ensaio com as suspensões de sementes foram acondicionados em ambiente desprovido de luz, a 25 \pm 2 °C por 24 horas. A seguir foram acrescidos de 7 mL de água destilada e agitados por 1 minuto. Depois, foi pipetado 1 mL dessa suspensão em câmara de Peters para identificação de sementes viáveis, com o auxílio de um microscópio estereoscópico binocular. Foram consideradas viáveis apenas as sementes com embriões totalmente coloridos de carmim, enquanto que as sementes com embriões incolores, parcialmente corados ou desprovidas de embrião foram consideradas inviáveis Soares *et al.* (2014).

Após identificação da viabilidade, as sementes provenientes dos cinco frutos, que não foram submetidas ao teste de tetrazólio, foram divididas em quatro porções de igual peso (0,5 g) e transferidas para dessecador provido de sílica gel por 14 dias. Na sequência, uma dessas quatro amostras foi utilizada para a semeadura *in vitro*, correspondendo ao tempo de armazenamento de 0 dias [TA(0)], e as outras três foram embaladas individualmente em papel alumínio e colocadas em frascos de polipropileno opaco, com tampa rosqueável, providos de sílica gel, e mantidos sob refrigeração a 4 \pm 2 °C, por 30 [TA(30)], 60 [TA(60)] e 90 dias [TA(90)].

Para a semeadura *in vitro*, foram utilizadas 0,02 g de sementes de cada tempo de armazenamento que, em fluxo laminar, foram embebidas em água destilada estéril por 15 minutos em Béquer. Na sequência, a água de embebição foi descartada e as sementes foram desinfestadas por 15 minutos com uma solução de hipoclorito de sódio (0,8%), recebendo a seguir, tríplice lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Após o descarte da água de lavagem o volume da solução foi completado para 120 mL com água destilada estéril, para a realização da semeadura *in vitro*.

O meio de cultura utilizado foi Murashige & Skoog (1962), com metade da concentração dos macro e micronutrientes (MS ½), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e com as concentrações de ágar bacteriológico (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 ou 8 g L⁻¹) ou sem a utilização de ágar (meio líquido - 0 g L⁻¹), com o pH ajustado para 5,8 \pm 0,1 com KOH (1M). Foram utilizados como frascos de cultivo

recipientes de polipropileno transparentes, providos de tampa, com capacidade para 50 mL, e que após receberem 20 mL de meio de cultura, foram esterilizados em autoclave a 120 °C e à pressão de 1 atm, por 20 minutos.

Para cada tempo de armazenamento, após os meios de cultura atingirem a temperatura ambiente, 36 frascos (quatro para cada concentração de ágar testada) foram transferidos para fluxo laminar, e cada um deles recebeu 200 µL da suspensão de sementes com auxílio de micropipetador automático estéril. Em seguida, os frascos foram tampados e as culturas acondicionadas em sala de crescimento, com temperatura média 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 20,0 µmol m⁻² s⁻¹, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 20 W cada, permanecendo nessas condições por 30 dias.

Decorrido este período, os frascos foram abertos e aqueles contendo meio geleificado, foram acrescidos de 20 mL de água destilada. Todos foram agitados de forma manual e delicada para formação de suspensão contendo os propágulos, que foi vertida em placa de Petri. Na sequência, com o auxílio de um microscópio estereoscópico binocular com zoom, contou-se o número de embriões clorofilados (EC), número de sementes não germinadas (SNG), sendo a seguir calculada a porcentagem de germinação (%G) pela expressão: $G = \left(\frac{EC}{SNG} + EC \right) * 100$, modificada de Rosa *et al.* (2013).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e os tratamentos foram arranjados em esquema de parcelas subdivididas. Foram alocados nas parcelas, os tempos de armazenamento [TA(0); TA(30); TA(60) e TA(90)] e nas subparcelas as concentrações de ágar (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 ou 8 g L⁻¹), com quatro repetições de um frasco de cultivo para cada concentração de ágar dentro do mesmo tempo de armazenamento, totalizando 144 frascos de cultivo.

A variável porcentagem de germinação foi transformada por meio da função $\sqrt{x+1}$ e, a seguir, submetida à análise de variância com auxílio do programa SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, MG). Havendo significância, para os fatores estudados foram ajustadas curvas de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito conjunto do tempo de armazenamento e das concentrações de ágar sobre a porcentagem de germinação (%G) de *Brassavola tuberculata* (Fig. 1). Entretanto, só foi observado efeito significativo isolado dos fatores analisados em relação ao tempo de armazenamento.

Quando houve semeadura imediatamente após o período de dessecação [TA(0)], foi observada a maior porcentagem de germinação (94%), com o valor calculado de 2,9 g L⁻¹ de ágar, derivado da regressão linear (Fig. 1A), valor este sem diferença estatística do observado para sementes armazenadas por 30 dias [TA(30)] e germinadas em concentração de ágar variando de 0 a 8 g L⁻¹ (Fig. 1B).

Sementes armazenadas por 60 dias [TA(60)] apresentaram um decréscimo na %G de 11% em relação

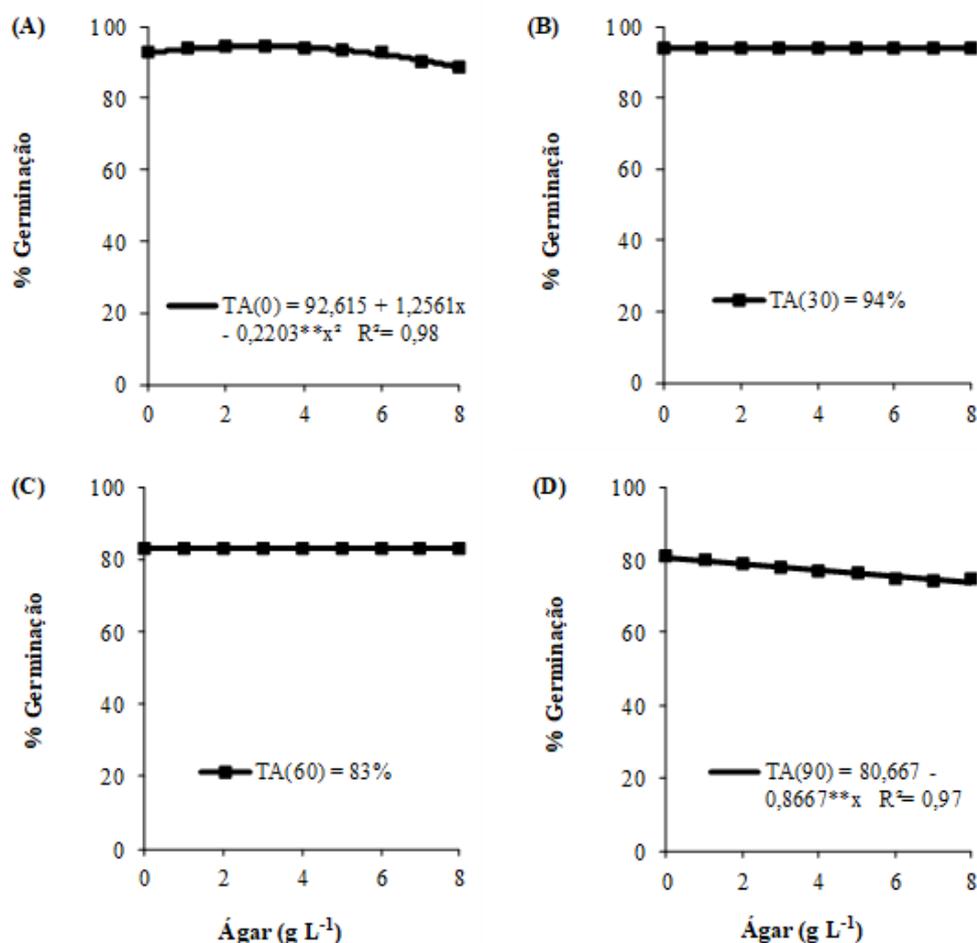
àquelas armazenadas por 30 dias (Figs. 1B, 1C) não sendo observado efeito da concentração do ágar nesses resultados. Entretanto, quando as sementes foram armazenadas por 90 dias [TA(90)], a porcentagem de germinação decresceu à medida que a concentração de ágar aumentou, sendo o maior valor (80,1%) observado na ausência do geleificante, ou seja em meio líquido (Fig. 1D).

Na conservação de sementes de orquídeas, a umidade e a temperatura das sementes armazenadas interferem nas reações bioquímicas que regulam o metabolismo de cada espécie (Hosomi *et al.* 2012, Vudala & Ribas 2017, Seaton *et al.* 2018). Neste trabalho, de maneira geral, as sementes de *B. tuberculata* apresentaram decréscimo na germinação com o avanço do tempo de armazenamento. Sementes dessecadas por 14 dias e semeadas em seguida [TA(0)], em meio com o valor calculado de 2,9 g L⁻¹ de ágar e aquelas armazenadas por até 30 dias [TA(30)], em todas as concentrações de ágar, apresentaram %G semelhante. Entretanto, quando armazenadas por até 60 dias, independente das concentrações de ágar, apresentaram germinação 11% menor e nas armazenadas por até 90 dias as perdas foram de 14,8%, ambas em relação ao [TA(0)].

Hosomi *et al.* (2012), estudando a conservação de sementes de nove espécies de *Cattleya* armazenadas a -18 °C, observaram que a maioria das espécies apresentaram alta viabilidade aos 35 dias de armazenamento, com germinação variando de 96% a 99%. Estes resultados corroboram com os encontrados neste trabalho, uma vez que sementes de *B. tuberculata* quando armazenadas a 4±2 °C, durante 30 dias também apresentaram elevada germinação (94%). Indicando que para as espécies estudadas, este período de armazenamento não influenciou na porcentagem de germinação das sementes, independente da temperatura. Esses autores ainda relatam a importância de avaliações periódicas da qualidade das sementes ao longo do tempo, pois apesar da manutenção da viabilidade e da germinação, podem ocorrer mudanças sutis na porcentagem de germinação de algumas espécies, que podem ter implicações no armazenamento ao longo prazo.

Em relação a utilização de ágar, Mweetwa *et al.* (2008), avaliando a germinação de sementes de *Phalaenopsis* Sogo Lit-Angel e *Phalaenopsis* spp. linhagem 9450, armazenadas a 4 °C, também por 30 dias, observaram germinação abaixo de 50%, em meio líquido. Enquanto neste trabalho, para *B. tuberculata*, a germinação observada foi superior, em torno de 80%.

Embora tenham ocorrido diminuições na %G ao decorrer do tempo de armazenamento, estas não foram expressivas, mesmo aos 90 dias, em meios com concentrações mais elevadas de ágar. Esse fato pode indicar que o processo de envelhecimento das sementes não foi acentuado neste tempo de armazenamento, pois em períodos mais prolongados, as reservas de lipídios presentes nas sementes podem estar sujeitas ao processo de peroxidação, um dos eventos mais deletérios, pois causa danos às membranas e outras macromoléculas (Machado-Neto & Custódio 2005, Colville *et al.* 2016).



Figs. 1. A-D. Porcentagem de germinação de *Brassavola tuberculata* Hook. nos tempos de armazenamento (TA). A. zero dias; B. 30 dias; C. 60 dias; D. 90 dias, em função das concentrações de ágar.

Ao analisar cada concentração de ágar dentro do tempo de armazenamento, observou-se que concentrações variando de 0 a 3 g L⁻¹ proporcionaram efeitos lineares decrescentes na %G à medida que o tempo de armazenamento aumentou. Valores médios, em torno de 96%, foram registrados em TA(0) e de 80% para TA(90) nessas concentrações (Figs. 2A, 2B, 2C, 2D).

A %G de *B. tuberculata* em meios de cultura com concentrações de ágar variando entre 4 e 8 g L⁻¹ apresentou comportamento quadrático. As maiores %G (média de 94%) foram calculadas para o período médio de armazenamento de 11,5 dias. Para essas concentrações de ágar, o armazenamento por 90 dias propiciou %G média de 74,4% (Figs. 2E, 2F, 2G, 2H, 2I), 5% a menos do que aquelas armazenadas pelo mesmo período, porém cultivadas em meios com concentrações de ágar variando de 0 a 3 g L⁻¹ (Figs. 2A, 2B, 2C, 2D).

Houve perdas na %G em sementes armazenadas por maior período em função do aumento das concentrações de ágar. Em até 3 g L⁻¹ de ágar, as perdas aumentaram com os valores crescentes de ágar e do tempo de armazenamento, enquanto que, para as concentrações mais elevadas de ágar, a maior porcentagem média de germinação (94%), ocorreu em torno de 11 dias de armazenamento, indicando que

meios mais consistentes não favoreceram a germinação das sementes armazenadas.

Deste modo, além da escolha do meio, a sua consistência também deve ser considerada, uma vez que a difusão dos nutrientes para o material vegetal propagado aumenta ou diminui em função da concentração do agente geleificante utilizado (Faria *et al.* 2012). Possivelmente, neste trabalho, o aumento da concentração de ágar promoveu a elevação do potencial osmótico do meio MS ½, dificultando a difusão dos nutrientes para as sementes e consequentemente interferindo na germinação.

A utilização de meio líquido, embora possa favorecer a absorção de nutrientes e minerais, devido à mudança na disponibilidade de substâncias solúveis (Faria *et al.* 2012), com o aumento das concentrações de ágar não favoreceu a germinação das sementes de *B. tuberculata* armazenadas por 90 dias.

Os resultados deste trabalho indicam que as sementes de *B. tuberculata* armazenadas por até 90 dias, germinaram em todas as concentrações de ágar avaliadas, mesmo em meio com 8 g L⁻¹ ágar. No entanto, aquelas armazenadas por períodos superiores a 30 dias tiveram redução na %G conforme o aumento das concentrações de ágar no meio de cultivo.

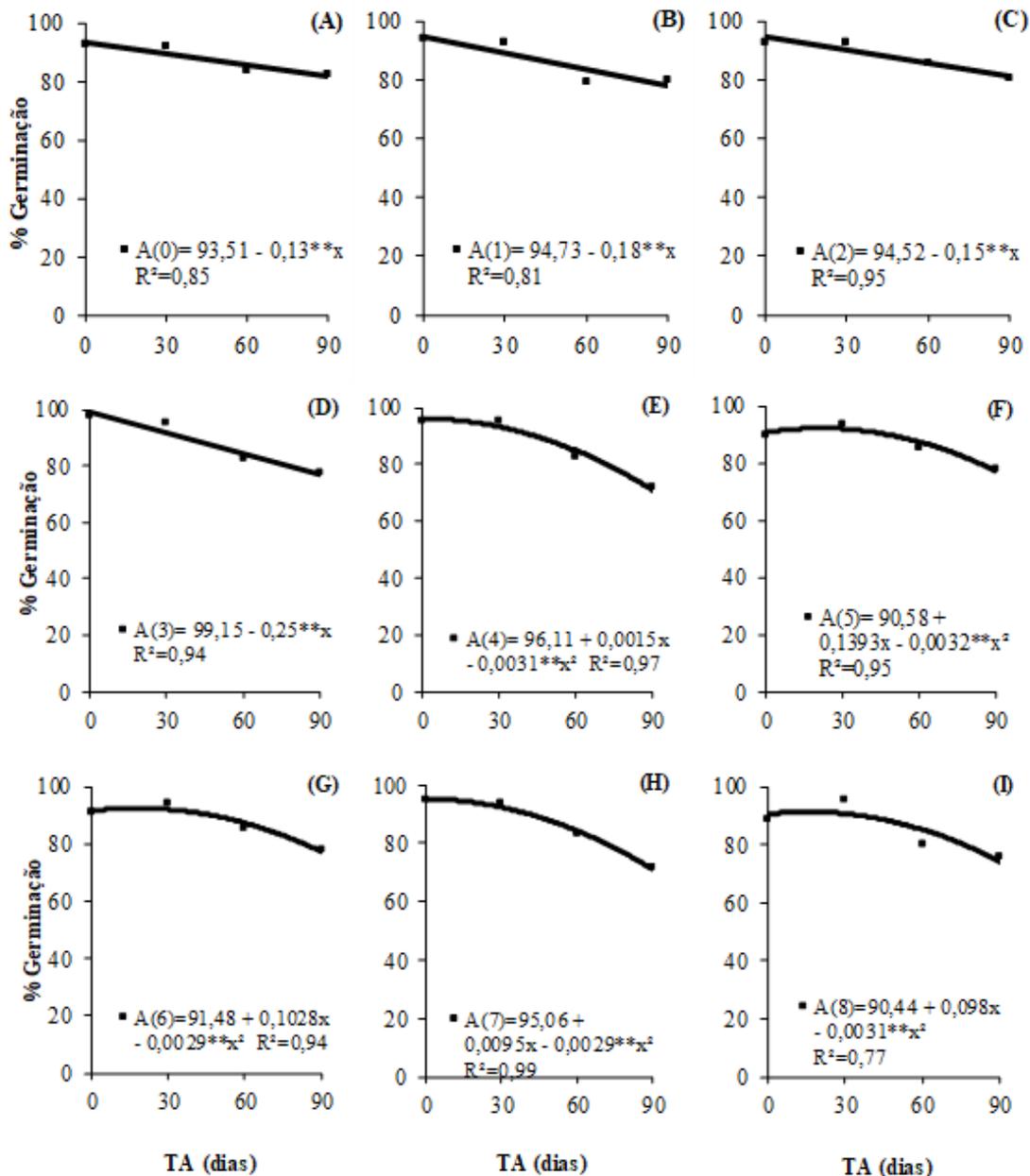


Fig. 2. A-I. Porcentagem de germinação de *Brassavola tuberculata* Hook. nas concentrações de ágar. A. 0 g L⁻¹; B. 1 g L⁻¹; C. 2 g L⁻¹; D. 3 g L⁻¹; E. 4 g L⁻¹; F. 5 g L⁻¹; G. 6 g L⁻¹; H. 7 g L⁻¹; I. 8 g L⁻¹, em função do tempo de armazenamento (TA).

De acordo com os resultados observados, as sementes de *B. tuberculata* germinaram em todas as concentrações de ágar e períodos de armazenamentos avaliados, apresentando germinação média acima de 70%. Para a semeadura *in vitro* dessa espécie recomenda-se, sementes armazenadas por até 30 dias, independente da concentração de ágar utilizada no meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- Abrão, M.C.R., Jorge, J., Pescador, R., Ferreira, W.M. & Suzuki, R.M. 2014. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya lodigesii* Lindl. (Orchidaceae). Revista Brasileira de Biociências 12(3):141-147.
- Barros, F., Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M., Forster, W., Menini Neto, L., Furtado, S.G., Nardy, C., Azevedo, C.O. & Guimarães, L.R.S. 2019. Orchidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>. Acessado em 16.12.2019.
- Cardoso, J.C. 2017. *Ionocidium* 'cerrado 101': intergeneric orchid hybrid with high quality of blooming. Ornamental Horticulture 23(1):351-356.
- Colville, L., Marks, T.R., Pritchard, H.W. & Custodio, C.C. 2016. Development of a reliable GC-MS method for fatty acid profiling using direct transesterification of minimal quantities of microscopic orchid seeds. Seed Science Research 26(1):84-91.
- Dowling, N. & Jusaitis, M. 2012. Asymbiotic *in vitro* germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. Australian Journal of Botany 60(7):592-601.

- Faria, R.T., Assis, A.M., Unemoto, L.K. & Carvalho, J.F.R.P. 2012. Produção de orquídeas em laboratório. Editora Mecenaz, Londrina. 124 p.
- Fajardo, C.G., Vieira, F.A., Felix, L.P. & Molina, W.F. 2017. Negligence in the Atlantic forest, northern Brazil: a case study of an endangered orchid. *Biodiversity and Conservation* 26(5):1047-1063.
- Gale, S.W., Fischer, G.A., Cribb, P.J. & Fay, M.F. 2018. Orchid conservation: bridging the gap between science and practice. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186(4):425-434.
- Hosomi, S.T., Custódio, C.C., Seaton, P.T. & Marks, T.R. 2012. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 48(1):127-136.
- Hosomi, S.T. Sementes de orquídeas: conservação e avaliação de viabilidade. 2017. 157 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2017.
- Macedo, M.C., Rosa, D.B.C.J., Soares, J.S., Tatara, M.B., Hoffmann, N.T.K., & Rosa, Y.B. C.J. 2014. Seed storage and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. *Semina: Ciências Agrárias* 35(6):2883-2894.
- Machado Neto, N.B. & Custódio, C.C. 2005. Orchid conservation through seed banking: ins and outs. *Selbyana* 25(2):229-235.
- Murashige, T. & Skoog, F.A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum* 15(1):473-497.
- Mweetwa, A.M., Welbaum, G.E. & Tay, D. 2008. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on *in vitro* germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Scientia Horticulturae* 117(3):257-262.
- Rosa, Y.B.C.J., Júnior, G.A.M., Soares, J.S., Rosa, D.B.C.J., de Macedo, M.C. & Cezar, A.M. A. 2013. Estudo da viabilidade de sementes de *Brassavola tuberculata* Hook. em função do período de armazenamento, tempo de cultivo e tratamento pré-germinativo. *Ornamental Horticulture* 19(2):155-160.
- Seaton, P.T., Hosomi, S.T., Custódio, C.C., Marks, T.R., Machado-Neto, N.B. & Pritchard, H.W. 2018. Orchid seed and pollen: a toolkit for long-term storage, viability assessment and conservation. *In Orchid propagation: from laboratories to greenhouses - methods and protocols* (Y. Lee & E.C. Yeung, eds.). Humana press, New York. p. 71-98.
- Silva, T.D.S., Felix, L.P., Melo, J.I.M.D. 2015. Bromeliaceae and Orchidaceae on rocky outcrops in the Agreste Mesoregion of the Paraíba State, Brazil. *Hoehnea* 42(2):345-365.
- Soares, J.S., Rosa, Y.B.C.J., Tatara, M.B., Sorgato, J.C. & Lemes, C.S.R. 2014. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. *Semina: Ciências Agrárias* 35(5):2275-2284.
- Vudala, S.M. & Ribas, L.L.F. 2017. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany* 108(1):01-07.
- Yang, F.S., Sun, A.H., Zhu, J., Downing, X.Q.S. & Liu, H. 2017. Impacts of host trees and sowing conditions on germination success and a simple *ex situ* approach to generate symbiotic seedlings of a rare epiphytic orchid endemic to Hainan Island, China. *The Botanical Review* 83(1):74-86.