

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOANA ROSAR CORBELLINI

GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E EFEITO DAS MICROALGAS NA PROPAGAÇÃO
IN VITRO DE *Cattleya labiata* Lindl.

CURITIBA

2020

JOANA ROSAR CORBELLINI

GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E EFEITO DAS MICROALGAS NA PROPAGAÇÃO
IN VITRO DE *Cattleya labiata* Lindl.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Érika Amano

Coorientadores: Prof(a). Dr(a). Luciana Lopes Fortes Ribas e Prof. Dr. Fabiano Rodrigo de Maia

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Corbellini, Joana Rosar.

Germinação assimbiótica e efeito de microalgas na propagação in vitro de *Cattleya labiata* Lindl. / Joana Rosar Corbellini. – Curitiba, 2020.
53 f. : il.

Orientadora: Érika Amano.

Coorientadora: Luciana Lopes Fortes Ribas.

Coorientador: Fabiano Rodrigo de Maia

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Carvão. 2. Plantas - Reguladores. 3. Orquídea. 4. Citocininas. I. Título. II. Amano, Érika. III. Ribas, Luciana Lopes Fortes. IV. Maia, Fabiano Rodrigo de. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

CDD (20.ed.) 584.15

TERMO DE APROVAÇÃO

JOANA ROSAR CORBELLINI

GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E EFEITO DAS MICROALGAS NA PROPAGAÇÃO
IN VITRO DE *Cattleya labiata* Lindl.

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BOTÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de JOANA ROSAR CORBELLINI intitulada: Germinação assimbiótica e efeito de microalgas na propagação in vitro de *Cattleya labiata* Lindl., sob orientação da Profa. Dra. ERIKA AMANO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação. Curitiba, 29 de Maio de 2020.

Assinatura Eletrônica

01/06/2020 06:56:16.0

ERIKA AMANO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/06/2020 09:23:34.0

AURÉLIO LOURENÇO RODRIGUES

Avaliador Externo (COMPANHIA DE SANEAMENTO DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/06/2020 09:46:02.0

LUIZ ANTONIO BIASI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À minha família, Rosena C. Rosar Corbellini e Luciano Corbellini, por todo apoio e incentivo à minha carreira, carinho, amor, ensinamentos, por disponibilizarem espaço, com muito orgulho, para cultivo das mudas de orquídeas. À Laura Rosar Corbellini, por me inspirar como bióloga, e por todo amor de uma pessoa que é muito mais que irmã, é minha melhor amiga. Ao Diogo Olive, Miguel Corbellini Olive e Manuela Corbellini Olive, por todos os momentos descontraídos e conselhos. Ao Dirceu Tedesco Neto, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis como mestrandia, por me dar apoio emocional e me ajudar tanto com a parte escrita, como com as etapas de laboratório, sempre com sorriso e muito carinho.

À Èrika Amano e Luciana Lopes Fortes Ribas, por toda a dedicação, paciência e conhecimento compartilhado, por me incentivarem a ser autodidata, por acreditarem e confiarem em mim. Ao Fabiano Rodrigo de Maia, pela paciência e por compartilhar seu conhecimento em estatística.

Ao Diego de Oliveira Corrêa e Miguel Daniel Nosedá, pela parceria e por todo o conhecimento compartilhado. Pela produção e mensuração da biomassa e extrato das microalgas.

Ao Luciano Felício Fernandes, por compartilhar seu conhecimento em análises de clorofila e por disponibilizar materiais e espaço de laboratório para os meus experimentos.

Ao Rogério Mamoru Suzuki, por disponibilizar as sementes das orquídeas e por todo conhecimento compartilhado.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Botânica, pela oportunidade e todo espaço e materiais concedidos para a pesquisa. À Capes, pela bolsa de estudos, durante todo o período do mestrado.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal, a Taxon line, e toda sua equipe, por disponibilizar espaço e materiais, essenciais para minha pesquisa.

Aos meus amigos da pós-graduação, Angela, Giulia, Luis, Andressa, Sthaylanny e Pamela, pelos momentos descontraídos, conselhos, por me apoiarem nos momentos mais difíceis. Por me ajudarem sempre quando eu precisei, desde lavar vidrarias como plantar as mudinhas de orquídeas, sempre alegres e fazendo tudo parecer leve e divertido.

Aos meus colegas de laboratório, Fabricia, Quezia, Eduardo, Gabriela e Leticia, por me ajudarem em vários momentos, desde auxiliar a fazer soluções dos meios de cultura à biometria das plantas, e por me fazerem companhia até de madrugada no laboratório.

Aos meus amigos, Anna, Kathleen, Letícia, Giorgea, Rafael, Nayara, Luiz, Stephani, Jéssica, Emerson, Eduardo, Carine, Andrei, por todas as risadas, jogos, conselhos, apoio emocional, momentos divertidos e descontraídos, que vou guardar sempre no coração com muito carinho.

E por todos que me auxiliaram em alguma etapa do mestrado, sintam-se agradecidos.

RESUMO

Cattleya labiata Lindl. é uma orquídea nativa que está ameaçada de extinção. Para a sua preservação é necessário a formulação de protocolos que otimizem sua produção em larga escala. O objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo eficiente para o cultivo *in vitro* de *C. labiata* e avaliar o uso de microalgas *Messastrum gracile* e *Chlorella vulgaris* como substitutas de reguladores vegetais (BAP, TDZ e ZEA) na micropropagação utilizando a técnica “thin cell layer” (TCL). Os meios de cultura MS, MS/2 e WPM, com ou sem adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado foram testados para a germinação *in vitro*. As plântulas obtidas foram subcultivadas para os mesmos meios para promover o alongamento e formação de raízes. O transplântio das mudas foi realizado testando diferentes substratos isolados ou combinados: fibra de coco (F), *Sphagnum* sp. (S), casca de *Pinus* sp. (C). As sementes cultivadas no meio MS/2C com os macronutrientes reduzidos pela metade e adição de carvão ativado, apresentaram maior porcentagem de germinação (71 %) e formação de plântulas (30 %), após 16 semanas de cultivo, em comparação com os outros meios de cultura (MS e WPM com ou sem carvão ativado). Na etapa de alongamento e desenvolvimento de raízes, os explantes cultivados em meio WPMC apresentaram maior comprimento da parte aérea e total (5,8 e 9 cm, respectivamente) em relação ao das cultivadas em outros meios, após 24 semanas de alongamento e após 24 semanas de transplântio (5,9 e 13 cm, respectivamente). Entretanto, as plantas cultivadas em meio WPMC apresentaram maior porcentagem de mortalidade (79,4 %). Recomenda-se o uso de MS/2C na germinação assimbiótica e no alongamento, pois as plantas cultivadas nesse meio apresentaram comprimento total e massa fresca elevados e alta porcentagem de sobrevivência, comparado com as cultivadas em outros meios. O substrato recomendado é o *Sphagnum* sp. Na técnica TCL, os protocormos obtidos da germinação *in vitro* foram testados inteiros ou secções transversais e longitudinais. Os explantes foram inoculados em meio MS/2 contendo extrato *Messastrum gracile* (EM), extrato de *Chlorella vulgaris* (EC), biomassa de *Messastrum gracile* (BM) ou biomassa de *Chlorella vulgaris* (BC), ou reguladores vegetais (BAP, TDZ e ZEA) em diferentes concentrações. Os explantes obtidos foram subcultivados para meio MS/2 com 2 g L⁻¹ de carvão ativado e as plantas foram transplântadas em bandejas de semeadura contendo *Sphagnum* sp. como substrato. Os explantes cultivados em meio suplementando com BM e BAP apresentaram maior porcentagem de regeneração de PLBs (59 e 48 % respectivamente) e alto número médio (4 e 10 PLBs por explante, respectivamente). Na etapa de alongamento, as melhores respostas de comprimento total ocorreram com os tratamentos de adição de BM (7 cm) e BAP (6 cm) e também elevada porcentagem de sobrevivência no transplântio (BM: 85 % e BAP: 90 %). O TDZ não é recomendado, pois os explantes apresentaram menor comprimento no alongamento (4 cm), levando mais tempo para formação de raízes e menor porcentagem de sobrevivência no transplântio (40 %). A suplementação com as microalgas *M. gracile* e *C. vulgaris* pode substituir os reguladores vegetais, e favorecer a formação de PLBs e plantas. Para a propagação de *C. labiata*, recomenda-se a suplementação do meio com concentrações de 4 g L⁻¹ de BM ou 4 mg L⁻¹ de BAP.

Palavras-chave: Carvão ativado. Citocininas. Orchidaceae. “Protocorm-like bodies”.

Reguladores vegetais.

ABSTRACT

Cattleya labiata Lindl. is an orchid that is in danger of extinction. Protocols are important to optimize their seedling production. The objective of this study was to establish an efficient protocol for *in vitro* cultivation of *C. labiata* and to evaluate the use of *Messastrum gracile* and *Chlorella vulgaris* microalgae as substitutes for regulators (BAP, TDZ and ZEA) in micropropagation using "thin cell layer" (TCL) technique. Asymbiotic germination was performed in MS, MS / 2 and WPM, with or without the addition of 2 g L⁻¹ of activated charcoal. The plants underwent a period of elongation in the same medium as the germination and transplantation in different substrates isolated or combined: Coconut fiber (F), *Sphagnum* sp. (S), *Pinus* sp. (C). In the TCL technique, the sections were inoculated into the MS / 2 medium including *M. gracile* extract (EM), *C. vulgaris* extract (CE), *M. gracile* biomass (BM) or *C. vulgaris* biomass (BC), or regulators (BAP, TDZ and ZEA) at different concentrations. The explants underwent a period of elongation in MS / 2C with 2 g L⁻¹ of activated charcoal and transplantation in *Sphagnum* sp. Explants cultivated in MS / 2C medium with macronutrients reduced by half and addition of activated charcoal presented higher percentage of germination (71 %) and plant formation (30 %), after 16 weeks of cultivation, in comparison to other culture media (MS and WPM with or without activated charcoal). The plants cultivated in the WPMC presented total and aerial part length superior (5.8 and 9 cm respectively) in relation to those cultivated in other medium, after 24 weeks of elongation and (5.9 and 13 cm respectively) after 24 weeks of transplantation. However, the plants cultivated in the WPMC medium showed the highest percentage of mortality. The use of MS / 2C in asymbiotic germination and elongation is recommended, as the plants cultivated in this medium presented high total length and fresh mass and high percentages of survival, compared to those cultivated in other media. The recommended substrate is *Sphagnum* sp. In the TCL technique, explants cultivated in medium supplemented with BM presented higher percentage of PLBs regeneration (59 %) and a high average number (4 PLBs per explant). In elongation, they presented high total length (7 cm) and high percentage of survival in the transplantation (85 %). TDZ is not recommended, because presented shorter length in elongation (4 cm), taking longer to form roots and lower percentage of survival in transplantation (40 %). Supplementation with microalgae *M. gracile* and *C. vulgaris* can replace regulators and favors the formation of PLBs and plants. For the propagation of *C. labiata*, medium supplemented with high concentrations of BM (4 g L⁻¹) or BAP (4 mg L⁻¹) is recommended.

Key-words: Charcoal. Cytokinins. Orchidaceae. Protocorm-like bodies. Regulators.

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

BAP	6-benzilaminopurina,
BC	Biomassa da alga <i>Chlorella vulgaris</i> ,
BM	Biomassa da alga <i>Messastrum gracile</i> ,
C	Carvão ativado,
CP	Casca de Pinus sp.,
CP+FC	Casca de Pinus sp. combinada com fibra de coco,
CP+S	Casca de Pinus sp. combinada com Sphagnum sp.,
CP+FC+S	Casca de Pinus sp., com fibra de coco, com Sphagnum sp.,
EC	Extrato da alga <i>Chlorella vulgaris</i> ,
EM	Extrato da alga <i>Messastrum gracile</i> ,
FC	Fibra de coco,
FC+S	Fibra de coco combinado com <i>Sphagnum</i> sp.,
MS/2	MS com macronutrientes reduzidos pela metade,
PLB	" <i>Protocorm-like bodies</i> ",
S	<i>Sphagnum</i> sp.,
TCL	" <i>Thin cell layer</i> "
TDZ	Thidiazuron,
ZEA	Zeatina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	4
2 CAPÍTULO I – GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E PRODUÇÃO DE MUDAS DE <i>CATTLEYA LABIATA</i> LINDL. (ORCHIDACEAE)	6
RESUMO	6
2.1 INTRODUÇÃO	7
2.2 METODOLOGIA	9
2.2.1 Material Vegetal	9
2.2.2 Germinação assimbiótica	9
2.2.3 Alongamento e formação de raízes	10
2.2.4 Transplântio e aclimatização de mudas	10
2.2.5 Análises anatômicas	11
2.2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	11
2.2.5.2 Fluorescência	12
2.2.5.3 Histoquímico	12
2.2.6 Análise de clorofila	12
2.2.7 Análise estatística	13
2.3 RESULTADOS	13
2.3.1 Germinação assimbiótica	13
2.3.2 Alongamento das plantas	14
2.3.3 Transplântio e aclimatização	15
2.3.4 Análises anatômicas	16
2.3.5 Análise de clorofila	17
2.4 DISCUSSÃO	18
REFERÊNCIAS	25
3 CAPÍTULO II – EFEITO DAS MICROALGAS <i>MESSASTRUM GRACILE</i> (REINSCH) T.S.GARCIA E <i>CHLORELLA VULGARIS</i> BEYERINCK [BEIJERINCK] NA PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>CATTLEYA LABIATA</i> LINDL.	16
RESUMO	16
3.1 INTRODUÇÃO	17
3.2 METODOLOGIA	19
3.2.1 Material Vegetal	19

3.2.2 Produção de biomassa e extração aquosa.....	20
3.2.3 Composição da biomassa e extratos microalgais	20
3.2.4 Aplicação da técnica Thin cell layer (TCL).....	21
3.2.5 Alongamento e formação de raízes	22
3.2.6 Transplântio e aclimatização	22
3.2.7 Análise estatística	23
3.3 RESULTADOS.....	24
3.3.1 Composição bioquímica microalgal	24
3.3.2 Thin cell layer	24
3.3.3 Alongamento e formação de raízes	26
3.3.4 Porcentagem de sobrevivência de plantas	28
3.4 DISCUSSÃO	28
REFERÊNCIAS	35
4 CONCLUSÕES GERAIS	49
ANEXO 1 – ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae é constituída de espécies com grande potencial ornamental, pela beleza de suas flores, que vem atraindo cada vez mais o interesse de colecionadores em cultivá-las (ROBERTS e DIXON, 2008). O cultivo de orquídeas vem crescendo ao longo dos anos, sendo uma atividade importante no país. *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, e *Phalaenopsis* são os gêneros mais comuns entre os comerciantes e colecionadores, movimentando a economia nesse ramo (LOPEZ e RUNKLE, 2005). O gênero *Cattleya* apresenta grande importância comercial e vem sendo procurado mundialmente por colecionadores, orquidófilos, decoradores e por admiradores (SOARES *et al.*, 2011).

Cattleya labiata Lindl. é uma orquídea epífita, que possui flores exuberantes, grandes e perfumadas (LOPEZ e RUNKLE, 2005), características que atraem comerciantes principalmente para a produção de híbridos (CNCFLORA, 2012), como por exemplo, híbridos formados a partir de *Cattleya labiata* e *Cattleya forbesii* Lindl. (KAORO YAMAKAMI *et al.*, 2006). Com isso, essa família vem sofrendo grandes ameaças de extinção devido à coleta indiscriminada para fins comerciais, o uso indevido da terra, como o desmatamento de grandes áreas utilizadas para agricultura, além das mudanças climáticas que vêm ocorrendo (SEATON *et al.*, 2010). *C. labiata* foi avaliada como espécie vulnerável (VU) no Livro Vermelho do Centro Nacional de Conservação da Flora, pois o local onde ela ocorre (Caatinga e Mata Atlântica) tem sofrido um histórico de devastação por conta da exploração da madeira, conversão do uso do solo (agricultura e pecuária) e à urbanização (CNCFLORA, 2012, FLORA do BRASIL 2020 em construção).

A germinação das espécies de orquídeas é difícil na natureza, por não possuírem um endosperma funcional e necessitam de associação com fungos (WAUD *et al.*, 2016). Com isso, é importante a otimização de protocolos eficazes para a produção de orquídeas em larga escala (JOHNSON *et al.*, 2007).

Na germinação assimbiótica, a formulação do meio de cultura é importante para garantir a eficiência da germinação (CHEN *et al.*, 2016). O meio mais utilizado para orquídeas foi o MS/2 (Murashige e Skoog, 1962) MS, com os macronutrientes reduzidos pela metade, com ou sem carvão ativado, como relatado para várias espécies de orquídeas (CHEN *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2017; SEON *et al.*, 2018). O carvão ativado pode inibir a liberação de substâncias tóxicas geradas pelo

explante ou pelo meio de cultura (PAN e VAN STADEN, 1998). Outras etapas além da germinação são importantes como o alongamento e o transplântio (DA SILVA *et al.*, 2017). Em *Cattleya labiata* o uso de casca de *Pinus* sp. e carvão ativado foram eficazes no transplântio (HOSHINO *et al.*, 2016), porém faltam estudos com *Sphagnum* e fibra de coco para a espécie.

A multiplicação de exemplares de espécies ameaçadas é essencial para a redução do risco de extinção, pois promove a propagação em larga escala, permitindo a comercialização de mudas. Técnicas de propagação *in vitro* de embriogênese e organogênese podem auxiliar essa necessidade (JOHNSON *et al.*, 2007; CHEN, 2016; IKEUCHI *et al.*, 2016).

As técnicas de propagação *in vitro* possibilitam a propagação massal de plantas em um curto período de tempo, são utilizadas diferentes partes de plantas, como gemas axilares e terminais, folhas, protocormos, entre outros, para serem cultivadas em meios de cultura em condições assépticas (BUSTAM *et al.*, 2014; IKEUCHI *et al.*, 2016). A propagação ocorre, por causa da totipotência das suas células vegetais, ou seja, elas apresentam competência celular em se diferenciar em outros tipos celulares (TEIXEIRA e DOBRÁNSZKI, 2013; HOSSAIN, 2015).

Uma dessas técnicas é a “thin cell layer” (TCL), em que são utilizadas secções finas transversais ou longitudinais de diferentes órgãos da planta, com o objetivo de obter mais exemplares da espécie em um curto período de tempo (HOSSAIN *et al.*, 2013; TRAN THANH VAN, 2003). Para que isso ocorra, os meios de cultura são suplementados com reguladores vegetais, como auxinas, e citocininas (ARDITTI e ERNST, 1993; TEIXEIRA E DOBRÁNSZKI, 2013).

Na TCL são formadas plantas idênticas, permitindo o uso comercial de várias espécies e para a produção com o objetivo de conservação de espécies ameaçadas, podendo reduzir o risco de extinção (NAING *et al.*, 2011). Porém, o uso de alguns reguladores vegetais eleva o custo da produção, sendo essencial a inovação de substitutos que possuem uma resposta fisiológica semelhante aos reguladores vegetais.

O uso de microalgas é uma alternativa para substituir os reguladores vegetais utilizados em técnicas de micropropagação, tendo em vista a sua ação auxínica e citocinínica que desencadeiam respostas fisiológicas semelhantes aos dos reguladores, reduzindo o custo para produção de mudas (MAZUR *et al.*, 2001; STIRK *et al.*, 2013 a; TEIXEIRA E DOBRÁNSZKI, 2013).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da formulação do meio de cultura, e da adição do carvão ativado na germinação assimbiótica, e testar os substratos no transplante e aclimatização de mudas, para estabelecer um protocolo eficiente para etapas *in vitro*. O efeito das microalgas *Messastrum gracile* e *Chlorella vulgaris* como substitutas dos reguladores vegetais BAP, ZEA e TDZ foi avaliado na propagação *in vitro* de *Cattleya labiata*, utilizando a técnica TCL, com o intuito de otimizar a produção de mudas da espécie.

REFERÊNCIAS

- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. Wiley, New York, 1993.
- BUSTAM, B.M.; DIXON, K.W.; BUNN, E. *In vitro* propagation of temperate Australian terrestrial orchids: revisiting asymbiotic compared with symbiotic germination. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 176, n. 4, p. 556-566, 2014.
- CHEN, C. Cost analysis of plant micropropagation of *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 126, n. 1, p. 167-175, 2016.
- CNCFlora. ***Cattleya labiata* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya labiata](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_labiata)>. Acesso em: 20 fev. 2019.
- HOSSAIN, M.M. *Ex vitro* seedling development from *in vitro* rhizome-like bodies in *Eulophia promensis* Lindl.: a new technique for orchid propagation. **Journal of Botany**, v.1, 2015.
- IKEUCHI, M.; OGAWA, Y.; IWASE, A.; SUGIMOTO, K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development**, v.143, n.9, p.1442-1451, 2016.
- JOHNSON, T.R.; STEWART, S.L.; DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.90, n.3, p.313, 2007.
- KAORO YAMAKAMI, J.; DE FARIA, R.T.; MARINHO DE ASSIS, A.; DO VALLE REGO-OLIVEIRA, L. Cultivo de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, n.4, p.523-526, 2006.
- LOPEZ, G.R.; RUNKLE, E.S. Environmental physiology of growth and flowering of orchids. **Hortscience**, v.40, p.1969-1973, 2005.
- MAZUR, H.; KONOP, A.; SYNAK, R. Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.35-42, 2001.
- NAING, A.H.; CHUNG, J.D.; PARK, I.S.; LIM, K.B. Efficient plant regeneration of the endangered medicinal orchid, *Coelogyne cristata* using protocorm-like bodies. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.659-666, 2011.
- ROBERTS, D.L.; DIXON, K.W. Orchids. **Current Biology**, v.18, n.8, p.325-329, 2008.
- SEATON, P.T.; HU, H.; PERNER, H.; PRITCHARD, H.W. Ex situ conservation of orchids in a warming world. **Botanical Review**, v.76, p.193-203, 2010.

SOARES, J.D.R.; PASQUAL, M.; ALMENDAGNA RODRIGUES, F.; VILLA, F.; GOMES DE ARAUJO, A. Fontes de silício na Micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v.33, n.3, p.503-507, 2011.

STIRK, W.A.; ÖRDÖG, V.; NOVÁK, O.; ROLČÍK, J.; STRNAD, M.; BÁLINT, P.; VAN, S.J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. **Journal of Phycology**, v.49, p.459–467, 2013a.

STIRK, W.A.; BÁLINT, P.; TARKOWSKÁ, D.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; ÖRDÖG, V.; VAN, S.J. Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.70, p.348–353, 2013b.

TEIXEIRA, DA S.J.A.; DOBRAŃSZKI, J. Plant thin cell layers: a 40-year celebration. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.32, p.922–943, 2013.

TRAN THANH VAN M. **Thin cell layer concept**. In: Nhut D.T., Van Le B., TRAN THANH VAN K., THORPE T. (Eds.) *Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, the Netherlands, p.1-16, 2003.

WAUD, M.; BUSSCHAERT, P.; LIEVENS, B.; JACQUEMYN, H. Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species. **Fungal Ecology**, v.20, p.155-165, 2016.

2 **CAPÍTULO I** – Germinação *in vitro* e produção de mudas de *Cattleya labiata* Lindl. (Orchidaceae)

RESUMO

Protocolos de produção de mudas são importantes para a produção de *Cattleya labiata* Lindl. uma orquídea epífita, ameaçada de extinção. O objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo eficiente para o cultivo *in vitro*, otimizando a germinação assimiótica e estudando aspectos morfológicos e fisiológicos para a produção de mudas de *C. labiata*. Foi realizada germinação assimiótica nos meios MS, MS/2 e WPM, com ou sem adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado. Os explantes foram subcultivados para os mesmos meios da germinação para promover alongamento e desenvolvimento de raízes. As plantas obtidas foram transplantadas em bandejas contendo diferentes substratos isolados ou combinados: fibra de coco (FC), *Sphagnum* sp. (S), casca de *Pinus* sp. (CP). Sementes cultivadas no meio MS com os macronutrientes reduzidos pela metade e adição de carvão ativado (MS/2C), apresentaram maior porcentagem de germinação (71,77 %) e maior formação de plântulas (30 %) após 16 semanas de cultivo, em comparação com os outros meios de cultura (MS e WPM com ou sem carvão ativado). Após 24 semanas de alongamento, o comprimento da parte aérea (5,8 cm) e total (9 cm) foi superior em plantas cultivadas em WPMC, comparadas com as cultivadas nos outros meios. Após 24 semanas de transplântio, as plantas obtidas no meio WPMC apresentaram alto comprimento da parte aérea (5,9 cm), da raiz (7 cm) e total (13 cm). Porém, as plantas cultivadas em meio WPMC apresentaram maior porcentagem de mortalidade (79,4 %), não sendo indicado esse meio para o cultivo *in vitro* de *C. labiata*. Recomenda-se o uso de MS/2C no cultivo *in vitro* de *C. labiata*, pois após 24 semanas do transplântio, as plantas cultivadas nesse meio apresentaram comprimento total (11 cm) e massa fresca (1,9 g) elevada, além de alta porcentagem de sobrevivência (90 %), quando comparadas com as cultivadas em outros meios. O substrato recomendado para o transplântio de *C. labiata* foi *Sphagnum* sp., pois as plantas cultivadas apresentaram alto comprimento de parte aérea (5 cm), de raízes (6 cm) e total (11 cm), maior massa fresca (1,9 g), número de folhas (3,2 folhas por planta) e apresentaram alta porcentagem de sobrevivência (90 %). *Cattleya labiata* pode ser produzida em larga escala, por germinação *in vitro*, sendo indicado o meio

MS/2 com adição de carvão ativado e para produção de mudas *ex vitro* é indicado o uso de *Sphagnum* sp. como substrato.

Palavras-chave: estudos anatômicos. germinação assimbiótica. carvão ativado. clorofila.

2.1 INTRODUÇÃO

Cattleya labiata Lindl. (Figura 2A) é uma orquídea epífita brasileira, mundialmente comercializada devido a sua beleza e perfume das suas flores (DE *et al.* 2014; SCHIFF 2018), sendo conhecida como “Rainha do Nordeste do Brasil” (MENEZES, 2002). Essa espécie é extremamente utilizada no melhoramento para a formação de híbridos, possui aproximadamente 12.000 híbridos, com importância comercial (CNCFLORA, 2012, FLORA do BRASIL 2020 em construção). *C. labiata* apresenta grande importância comercial, pois vem sendo cultivada desde o século XIX (LANDO *et al.*, 2016), e procurada mundialmente por colecionadores, orquidófilos, decoradores e por admiradores (SOARES *et al.*, 2011; EKMEKÇIGIL *et al.*, 2019). A espécie apresenta o status de vulnerável (VU) pela lista do Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI e MORAES 2013). Isso ocorre, pela sua coleta indiscriminada para fins ilegais e redução do seu local de ocorrência, Caatinga e Mata Atlântica, devido à exploração da madeira, à urbanização, e à conversão do uso do solo, como a agricultura e pecuária (ALMEIDA *et al.*, 2013; CNCFLORA, 2012, FLORA do BRASIL 2020 em construção).

As orquídeas possuem grande quantidade de sementes pequenas, sem endosperma funcional e necessitam de associação com fungos micorrízicos específicos dificultando sua propagação no meio ambiente (DRESSLER, 1981; WAUD *et al.*, 2016). A otimização da produção de orquídeas é fundamental para evitar a sua extinção, pois fornece mais exemplares para o comércio. Para isso, novos protocolos de germinação *in vitro* devem ser elaborados, para *Cattleya labiata*, visando garantir o sucesso do crescimento de plantas (JOHNSON *et al.*, 2007; HOSSAIN, 2015; CHEN, 2016). A formulação do meio de cultura pode influenciar a germinação, sendo que o mais utilizado para orquídeas foi o MS/2, com ou sem carvão ativado, como foi relatado para várias espécies de *Dendrobium* (DA SILVA *et al.*, 2017), *Paphiopedilum spicerianum* (CHEN *et al.*, 2016), *Thrixspermum japonicum* (SEON *et al.*, 2018) e para *Acianthera prolifera* (KOENE *et al.*, 2019).

Assim como a germinação *in vitro*, outras etapas são fundamentais para a formação de uma planta, como o alongamento, que favorece o crescimento da parte aérea, desenvolvimento de raízes, e o transplantio, em que a planta passa de uma condição *in vitro* para uma condição *ex vitro* (DA SILVA *et al.*, 2017). Para o transplantio vários tipos ou combinações de substratos são utilizados, como foi relatado para *Cattleya* que é recomendada a casca de *Pinus sp.*, a fibra de coco e o carvão, pois aumenta a porcentagem de sobrevivência das plantas (HOSHINO *et al.*, 2016). Para a produção de mudas de *Cattleya labiata*, foi utilizada casca de *Pinus sp.* e carvão ativado para o transplantio (HOSHINO *et al.*, 2016), sendo que *Sphagnum* e a fibra de coco, apesar de recomendados para outras espécies de orquídeas (DA SILVA *et al.*, 2017), ainda não foram testados para *C. labiata*. *Sphagnum sp.* tem maior capacidade de reter água, comparado com casca de *Pinus sp.* e fibra de coco, pois apresenta menor aeração e drenagem de água, permitindo o acúmulo de água nesse substrato (FIELDS *et al.*, 2014). A falta de água no substrato pode levar ao acúmulo de antocianina nas folhas das plantas (HUGHES *et al.*, 2010). Os níveis de antocianina foliar são induzidos pelo baixo potencial hídrico, baixa intensidade luminosa, alta salinidade e alta concentração de sacarose (HUGHES *et al.*, 2010). Espécies com níveis altos de antocianina geralmente vivem em ambientes com baixa umidade do solo (SPYROPOULOS e MAVORMMATIS, 1978, HUGHES *et al.*, 2010).

As condições do ambiente *in vitro* na sala de cultivo é diferente do ambiente *ex vitro* na casa de vegetação (KUMAR e RAO, 2012). No cultivo *in vitro*, as plantas tem maior acesso a água que está disponível no meio de cultura, e seu ambiente (placas de Petri ou frascos) são hermeticamente fechados, evitando a evaporação da água nesse ambiente (KUMAR e RAO, 2012). Testes de teor de clorofila são importantes para quantificar a clorofila no cultivo *in vitro* e *ex vitro*, e entender sua relação com o potencial hídrico e fotossíntese (HUGHES *et al.*, 2010).

A produção de mudas de *Cattleya* é pouco explorada, e é essencial a formulação de protocolos de germinação para garantir a produção em larga escala de plantas que serão posteriormente comercializadas ou reintroduzidas ao meio ambiente (JOHNSON *et al.*, 2007; CHEN, 2016). Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da formulação do meio de cultura, e da adição do carvão ativado na germinação assimiótica e no alongamento, e testar diferentes substratos no transplantio e aclimatização de mudas, estudando aspectos morfológicos e

fisiológicos para determinar um protocolo eficiente para etapas *in vitro* e produção de mudas *ex vitro*.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Material Vegetal

Foram coletadas quatro cápsulas maduras de três indivíduos que estão sendo cultivados no Instituto de Botânica de São Paulo, de uma população natural do Ceará. As cápsulas foram originadas de polinização cruzada. As sementes foram armazenadas durante sete semanas, em envelopes de papel em refrigerador a $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2.2 Germinação assimbiótica

As sementes foram submetidas ao teste do tetrazólio (cloreto 2,3,5-trifenil-tetrazólio) para avaliar a sua viabilidade, conforme a metodologia proposta por Hosomi *et al.* (2011).

A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, com imersão em solução de 1% de hipoclorito de sódio (NaOCl), acrescido de 0,1% de Tween® por dez minutos. Em seguida foram realizadas seis lavagens com água destilada esterilizada.

Após a desinfestação, as sementes foram cultivadas em placas de Petri contendo 40 ml de meio de cultura, sendo inoculadas no mínimo 300 sementes por placa de Petri e doze repetições. Foram testadas três formulações de meios de cultura com ausência ou presença de carvão ativado (2 g L^{-1}): MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS com os macronutrientes reduzidos pela metade (MS/2) e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980). As formulações de meio de cultura MS e MS/2 foram suplementadas com 30 g L^{-1} de sacarose e a do WPM com 20 g L^{-1} de sacarose. Em todos os meios foram adicionados $5,6 \text{ g L}^{-1}$ de ágar Himedia®. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

As sementes foram germinadas na sala de cultivo, durante 16 semanas com temperatura de 25 ± 2 °C/ 18 ± 2 °C (dia/noite), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $29,09 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas de LED).

A germinação assimbiótica foi avaliada a cada duas semanas, por um período de 16 semanas, considerando os seguintes estádios: 1: embrião clorofilado, 2: testa rompida com protocormo clorofilado (semente germinada), 3: protocormo com ápice e/ ou rizóide, 4: protocormo com folha e 5: planta (ABRÃO *et al.*, 2014). Foi avaliada a porcentagem de germinação de duas à dezesseis semanas, e total das plantas cultivadas em diferentes meios.

2.2.3 Alongamento e formação de raízes

As plantas obtidas da germinação após 20 semanas tiveram suas radículas cortadas e foram cultivadas de acordo com os respectivos meios de cultura (MS, MS/2 e WPM) com e sem a adição de 2 g L^{-1} de CA, propostos na germinação. Foram cultivadas dez plantas por frasco e doze repetições por tratamento, por um período de 12 semanas e mantidas em sala de cultivo, nas mesmas condições da germinação.

Outro experimento foi realizado para testar posteriormente diferentes substratos no transplantio. As plantas com 20 semanas tiveram suas radículas cortadas e foram cultivadas em frascos de vidro em meio MS/2 com adição de CA (2 g L^{-1}). Foram colocadas dez plantas por frasco em 120 repetições, por um período de 12 semanas em sala de cultivo, nas mesmas condições da germinação.

Foi realizado um subcultivo, para os dois experimentos, em que as plantas foram cultivadas nos mesmos meios de cultura propostos no alongamento, e permaneceram nas mesmas condições na sala de cultivo por 12 semanas.

As plantas passaram por uma análise biométrica, onde foram medidos comprimento médio da parte aérea, raízes e total (cm), e índice de crescimento da parte aérea, após 24 semanas do alongamento.

2.2.4 Transplantio e aclimatização de mudas

Após o subcultivo do alongamento, as tampas dos frascos foram abertas em sala de cultivo por dois dias e foram transplantadas em bandeja de semeadura de

polietileno de 6,5 x 34 x 21 cm e regadas todos os dias durante uma semana. A frequência da rega foi diminuída gradativamente, até atingir uma rega semanal durante 24 semanas. As plantas permaneceram em casa de vegetação com temperatura ambiente de 22 ± 10 °C, umidade de 85 % e luminosidade natural de $38,82 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no período entre abril e outubro de 2019.

As plantas cultivadas em diferentes meios de cultura (MS, MS/2 e WPM) com e sem a adição de carvão ativado no período do alongamento foram plantadas em bandejas de semeadura com *Sphagnum* sp.(S), constituída de três plantas por células e vinte repetições por tratamento. Foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas a cada quatro semanas, por um período de 12 semanas.

As plantas cultivadas em MS/2 com adição de C no período do alongamento foram plantadas em bandejas de semeadura com diversos tipos de substratos, isolados e combinados, totalizando sete tratamentos: 1- *Sphagnum* sp., 2- fibra de coco (FC), 3- casca de *Pinus* sp. (CP), 4- fibra de coco, *Sphagnum* sp., e casca de *Pinus* sp. (1:1:1) (FC+CP+S); 5- fibra de coco e casca de *Pinus* sp. (1:1) (FC+CP); 6- *Sphagnum* sp. e casca de *Pinus* sp. (1:1) (S+CP); 7- *Sphagnum* sp. e fibra de coco (1:1) (S+FC). Foram plantadas três plantas por células e vinte repetições por tratamento.

Todas as plantas passaram por análises biométricas, nas quais foram medidos o comprimento médio da parte aérea, raízes e total (cm), massa fresca (g), número de folhas e índice de crescimento de parte aérea após 24 semanas do transplântio e foi realizada avaliação da porcentagem de sobrevivência das plantas a cada quatro semanas por um período de 24 semanas.

2.2.5 Análises anatômicas

2.2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Todos os estádios da germinação (1: embrião clorofilado, 2: testa rompida com protocormo clorofilado (semente germinada), 3: protocormo com ápice e/ ou rizóide, 4: protocormo com folha e 5: planta) foram fixados em solução de Karnovsky's (modificado Kraus e Arduin, 1997) desidratados em série de etanol, passaram pelo ponto crítico em CO₂ líquido, montados em stubs e metalizados em

ouro. Os estádios foram visualizados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) TESCAN VEGA3 LMU.

2.2.5.2 Fluorescência

Foram realizadas secções transversais a mão, da porção mediana de folhas de *Cattleya labiata* após 24 semanas do transplântio nos diferentes substratos, *Sphagnum* sp., casca de *Pinus* sp., e fibra de coco, isolados ou combinados, foram infiltrados em 1M HCl e montados em sacarose 10 % (POOBATHY *et al.*, 2018). As secções foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51), equipado com sistema óptico composto de lentes de excitação ultravioleta, vermelha e verde, acoplado em câmera digital (Olympus DP72).

2.2.5.3 Histoquímico

Foram realizadas secções transversais a mão, 1 cm anterior ao ápice de raízes após 24 semanas do alongamento e após 24 semanas do transplântio. As secções foram submetidas a testes histoquímicos de sudan III (SASS, 1951) para detectar lipídios, floroglucinol acidificado (FOSTER, 1949) para detectar lignina. Foi realizada a dupla coloração das secções, as quais foram infiltradas em hipoclorito de sódio 10 %, seguido por azul de Astra, Safranina e ácido acético (LUQUE *et al.*, 1996). As secções foram observadas em microscópio de luz Olympus BX41 acoplado em câmera digital Olympus DC030.

2.2.6 Análise de clorofila

Foram selecionadas aleatoriamente plantas após 24 semanas de alongamento e após 24 semanas de transplântio, em diferentes meios (MS, MS/2 e WPM) com e sem a adição de CA, para quantificar o teor de clorofila. Três amostras com 0,1g de tecido foliar fresco de cada tratamento foram maceradas com pistilo em 10 ml de acetona 80%. As concentrações de clorofila foram determinadas utilizando espectrofotômetro (NOVA instruments NI2000), os comprimentos de onda utilizados foram 662, 645 e 470 nm para determinar clorofila a, clorofila b e clorofilas totais

(ARNON, 1949) das plantas cultivadas em diferentes meios de cultura e de plantas transplantadas em diferentes substratos.

2.2.7 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Na etapa da germinação foi analisada a frequência dos estádios. No período de alongamento foram analisados o comprimento médio da parte aérea, de raiz e total, o índice de crescimento da parte aérea, pela fórmula: $((\text{valor final} - \text{valor inicial} / \text{valor inicial}) * 100)$, e o teor de clorofila; No período de transplântio foram analisadas a massa fresca, o comprimento da parte aérea, raízes e total, o número de folhas, o índice de crescimento da parte aérea, raiz e total, a porcentagem de sobrevivência e o teor de clorofila. Os dados dos experimentos foram submetidos a análise de variância ANOVA e o teste Tukey a 5% de probabilidade pelo software estatístico Assistat versão 7.7.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Germinação assimbiótica

Os embriões clorofilados com a testa intacta (estádio 1, Figuras 1B, C) e protocormos clorofilados com a testa rompida (estádio 2) foram formados em todos os meios de cultura, com ou sem carvão, indicando o início da germinação, a partir da segunda semana da semeadura (Figura 1D, E, F, 5A). A partir da quarta semana os protocormos já apresentavam ápice (estádio 3, Figura 1G, 5B), e após a sexta semana apresentavam folhas (estádio 4, Figura 1I, J, 5C). A partir da décima segunda semana, os protocormos já apresentavam radículas, indicando a formação de plântulas (estádio 5, Figura 1K, L, 5E).

A frequência dos protocormos clorofilados (estádio 2) cultivados no meio MS/2C foi superior (70 %) aos cultivados em MS e MS/2, após duas semanas do cultivo (Figura 3A). A partir da quarta semana, constatou-se que melhor resposta do estágio de protocormo com ápice e/ou rizoide (estádio 3), no meio WPM (30 %) quando comparada aos cultivados em MS, MS/2 e WPMC (Figura 3B). A frequência dos protocormos com folhas (estádio 4) cultivados em WPM também foi superior aos

cultivados nos outros meios, a partir da sexta semana (10 %) até a décima sexta semana (40 %, Figura 3C ao 3F).

Os protocormos (estádios 2 e 3) começaram a morrer, independente do meio que estavam resultando na diminuição da frequência (10%), a partir da décima segunda semana de cultivo (Figuras 3E, F). Os protocormos cultivados no meio WPMC não formaram ápice e morreram após 12 semanas (Figura 3E). A frequência de formação de plantas foi superior no meio MS/2C (30 %, Figura 2B), em comparação com os outros meios, após 12 e 16 semanas do cultivo (estádio 5, Figuras 3E, F).

Na décima sexta semana pode-se observar outros estádios além de plantas (Figura 2B), como embrião clorofilado (10 % em todos os meios), protocormo clorofilado (5 % em todos os meios), protocormo com ápice e/ou rizoide (5 % em todos os meios), e protocormo com folha, com melhor resposta no meio WPM (45 %). As plantas foram observadas, com maior frequência do meio MS/2C (25%) e menor frequência em MS/2 e WPMC (5%) (Figura 2B, 3F).

A porcentagem total de germinação de sementes cultivadas no meio MS/2C foi superior (71,77 %) à dos meios MS (59,22 %) e MS/2 (60,44), após duas semanas de cultivo (Tabela 1). Ainda havia porcentagem de germinação (estádio de protocormo clorofilado) de sementes cultivadas em MS, MS/2, MS/2C e WPM, após 16 semanas de cultivo. Não houve diferença na porcentagem total de germinação entre os meios, após quatro e 16 semanas, formando em média 85,90 % de germinação após 16 semanas de cultivo (Tabela 1).

A porcentagem total de mortalidade de explantes cultivados em meio WPMC, foi superior (79,45 %) à dos cultivados em MS (29,35 %), MSC (46,44 %), MS/2C (54,25 %) e WPM (34,33 %), após 16 semanas do cultivo (Tabela 1).

2.3.2 Alongamento das plantas

Após 24 semanas do alongamento, o comprimento da parte aérea e total foi maior (5,8 e 9,0 cm respectivamente), em plantas cultivadas em WPMC, comparadas com as cultivadas nos outros meios (Figura 2E, 4A). O comprimento de raiz foi maior em plantas cultivadas em MSC (4,5 cm), comparadas com às cultivadas nos outros meios, após 24 semanas de alongamento (Figura 2E, 4A). O

índice de crescimento de plantas cultivadas em WPM foi maior do que o das cultivadas em MS, MSC, MS/2 e WPMC (Figura 4B).

2.3.3 Transplântio e aclimatização

Após o transplântio, as raízes das plantas provenientes do alongamento não continuaram seu crescimento e novas raízes foram formadas (Figuras 10A, B). O comprimento médio de parte aérea, de raiz e total foi maior em plantas cultivadas em meio WPMC (5,0, 7,0 e 12,5 cm respectivamente), quando comparadas com o das cultivadas nos outros meios, após 24 semanas de transplântio em *Sphagnum* sp. (Figura 2F, 5A). Não houve diferença significativa no índice de crescimento da parte aérea das plantas cultivadas nos diferentes meios (Figura 5B). A massa fresca foi superior em plantas cultivadas com carvão nos meios WPMC, MSC e MS/2C (2,2, 2,0 e 1,9 g) comparadas com as das cultivadas em MS e MS/2, após 24 semanas de transplântio em *Sphagnum* sp. (Figura 5C). Não houve diferença significativa no número de folhas das plantas cultivadas nos diferentes meios, as quais apresentaram em média quatro folhas por planta (Figura 5D).

Após 24 semanas do transplântio, as plantas cultivadas nos meios com carvão ativado (MSC, MS/2C e WPMC) apresentaram maior porcentagem (90%) de sobrevivência. As que cresceram no meio MS/2 apresentaram 77 %, e nos meios MS e WPM apresentaram 45% de sobrevivência, após esse período (Figura 6).

O comprimento médio da parte aérea das plantas cultivadas em MS/2C, transplântadas em diferentes tipos de substratos isolados ou combinados (*Sphagnum* sp., fibra de coco e casca de *Pinus* sp.), não apresentou diferença, formando em média 4,5 cm, após 24 semanas de transplântio (Figura 7A). O comprimento médio de raiz de plantas transplântadas em casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp. foi superior (7 cm) ao das cultivadas em casca de *Pinus* sp. isolada, casca de *Pinus* sp. combinada com fibra de coco, fibra de coco isolada e fibra de coco combinada com *Sphagnum* sp. O comprimento total de plantas transplântadas em casca de *Pinus* sp., com fibra de coco, com *Sphagnum* sp., casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp. e *Sphagnum* sp. isolado, foram superiores as transplântadas em casca de *Pinus* sp. isolada, casca de *Pinus* sp. combinada com fibra de coco e fibra de coco isolada, após 24 semanas de transplântio (Figura 7A).

O índice de crescimento de plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp. e fibra de coco combinada com *Sphagnum* sp., foi superior ao das transplantadas em fibra de coco isolada, após 24 semanas de transplântio (Figura 7B). A massa fresca foi superior em plantas transplantadas em *Sphagnum* sp. (1,9 g) comparadas com as com casca de *Pinus* sp. isolada, fibra de coco isolada, casca de *Pinus* sp. combinada com fibra de coco, fibra de coco combinada com *Sphagnum* sp., e casca de *Pinus* sp., com fibra de coco, com *Sphagnum* sp., após 24 semanas de transplântio (Figura 7C). O número de folhas foi superior em plantas transplantadas em *Sphagnum* sp. isolado, casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp. e casca de *Pinus* sp., com fibra de coco, com *Sphagnum* sp. (três folhas) comparadas com as transplantadas em outros substratos, após 24 semanas de transplântio (Figura 7D).

Há diferença significativa entre a porcentagem de sobrevivência de plantas transplantadas nos diferentes tipos de substratos. Todos os substratos apresentaram em média 90% de sobrevivência após 24 semanas de transplântio, exceto plantas transplantadas em fibra de coco que apresentaram 45% de sobrevivência após esse período (Figura 2H, 8). A porcentagem de sobrevivência de plantas transplantadas em fibra de coco começou a diminuir (55%) após quatro meses do transplântio (Figura 8).

2.3.4 Análises anatômicas

Foi observada a presença de antocianina em maior quantidade na face abaxial das folhas das plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. isolada (Figura 9A), e menor quantidade nas transplantadas em fibra de coco isolada (Figura 9E). Também foram encontradas antocianinas nas transplantadas em casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp. (Figura 9C), e casca de *Pinus* sp. combinada com fibra de coco (Figura 9I). Não foram visualizadas antocianinas nas folhas das plantas transplantadas em fibra de coco combinada com *Sphagnum* sp. (Figura 9G), casca de *Pinus* sp., com fibra de coco, com *Sphagnum* sp. (Figura 9K), e *Sphagnum* sp. isolado (Figura 9M).

As células com cloroplastos foram encontradas em maior abundância na face abaxial das folhas. As plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. isolada (Figura 9B), fibra de coco isolada (Figura 9F), casca de *Pinus* sp. combinada com fibra de

coco (Figura 9J) e casca de *Pinus* sp., com fibra de coco, com *Sphagnum* sp. (Figura 9L) apresentaram mais cloroplastos comparadas com as transplantadas em casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp. (Figura 9D), fibra de coco combinada com *Sphagnum* sp. (9H), e *Sphagnum* sp. isolado (Figuras 9N).

Os estômatos das folhas das plantas transplantadas em diferentes substratos estão concentrados na face abaxial (Figura 9P). A cutícula é mais espessa em plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. isolada (Figura 9B), fibra de coco isolada (Figura 9F) e fibra de coco combinada com *Sphagnum* sp. (Figuras 9H), comparadas com as transplantadas nos outros substratos.

As células do velame das raízes formadas no transplântio são maiores e mais arredondadas (Figura 10F), comparadas com as das raízes provenientes do alongamento (Figura 10D). As raízes formadas no transplântio apresentaram o velame com maior número de camadas (Figuras 10F) e presença de lignina no velame (Figura 10J, N) comparadas com as provenientes do alongamento, que apresentam velame menos espesso (Figuras 10D), e não apresenta lignina no velame (Figuras 10H, L).

As raízes formadas no transplântio apresentaram a exoderme com mais suberina (Figura 10P) e menos lignina (Figuras 10H, L), comparado com as provenientes do alongamento, que apresentam menos suberina (Figura 10R) e mais lignina na exoderme (Figuras 10J, N). As raízes provenientes do alongamento apresentaram mais fungos endofíticos (Figura 10D), comparadas com as formadas no transplântio (Figura 10F).

2.3.5 Análise de clorofila

Há diferença significativa no teor de clorofila em plantas cultivadas nos meios: MS, MS/2 e WPM, com e sem a adição de carvão ativado, do período de alongamento. O teor de clorofila a e de clorofilas totais de plantas cultivadas nos meios MSC foram superiores aos teores das cultivadas no meio MS. Entretanto, o teor de clorofila b das plantas cultivadas em meio MS/2 e WPM foi superior ao das cultivadas nos meios MS e WPMC (Tabela 2). O teor de clorofila a, b e totais, não apresentou diferença significativa entre plantas cultivadas nos diferentes meios de cultura após 24 semanas do transplântio (Tabela 2).

As plantas que foram transplantadas em diferentes tipos de substratos isolados ou combinados (*Sphagnum* sp., fibra de coco e casca de *Pinus* sp.), após 24 semanas apresentaram diferença significativa (Tabela 3). A concentração de clorofila a foi inferior em plantas transplantadas com casca de *Pinus* sp. isolada, quando comparada com a dos outros substratos e semelhante à de fibra de coco. A concentração de clorofila b foi superior em plantas transplantadas com *Sphagnum* sp. isolado, casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp., e fibra de coco isolada, quando comparada com à das transplantadas em casca de *Pinus* sp. isolada. As concentrações de clorofilas totais foram inferiores às de todos os substratos testados, com exceção do *Sphagnum* sp. (Tabela 3).

2.4 DISCUSSÃO

A germinação de *Cattleya labiata* iniciou na primeira semana de semeadura, com embriões clorofilados e após 16 semanas a porcentagem total obtida foi superior a 80% em todos os meios de cultura testados, indicando ser um período suficiente para avaliação da germinação dessa espécie.

Após duas semanas, contatou-se uma média de 65 % de protocormos clorofilados com a testa rompida, indicando a germinação. Nesse período, porcentagens inferiores foram obtidas nos meios MS e MS/2 (59,22 e 60,44%, respectivamente). HOANG *et al.* (2017) obtiveram resposta semelhante para *Dendrophylax lindenii*, cultivada em meio de cultura MS/2, com 60 % de protocormos clorofilados com a testa rompida, após uma semana de cultivo. A partir da quarta semana, observou-se protocormos com ápice e/ou rizoide, com maior frequência meio WPM (30 %), quando comparada com à dos meios MS, MS/2 e WPMC. Em estudo com a micro-orquídea *Acianthera prolifera*, as porcentagens de protocormos com ápice e/ou rizoide cultivados no meio MS/2 foram superiores às do WPM e do MS (KOENE *et al.*, 2019), indicando com isso, que a melhor formulação de meio de cultura pode variar conforme o estágio e a espécie.

A frequência de formação de plântulas foi superior no meio MS/2C, em comparação com à dos outros meios, após 12 e 16 semanas do cultivo. Os protocormos cultivados em WPM levaram mais tempo para a formação de radículas quando comparada com à dos outros meios. Resultado contrário foi obtido para *Acianthera prolifera*, com maior formação de plântulas no meio WPM em comparação com à do MS e MS/2, após o mesmo período de cultivo (KOENE *et al.*,

2019). A formulação do meio de cultura pode influenciar na germinação, o MS é atualmente o meio de cultura mais utilizado para angiospermas, pois é constituído de maior concentração de macro e micronutrientes em comparação ao WPM (RAMESH *et al.*, 2019), porém muitas espécies de orquídeas são sensíveis às altas concentrações de macronutrientes, sendo que, o meio MS/2 vem sendo recomendado para algumas espécies de Orchidaceae (DA SILVA *et al.*, 2017; SEON *et al.*, 2018).

A porcentagem total de mortalidade de explantes cultivados em meio WPMC, foi superior (79,45 %) à dos cultivados em MS, MSC, MS/2C e WPM, após 16 semanas do cultivo, evidenciando novamente que essa formulação não é indicada para o cultivo de *C. labiata*. O WPM apesar de ter sido proposto para plantas lenhosas, tem sido eficiente para a germinação de algumas orquídeas, como: *Cattleya loddigesii* Lindl. (DE ARAÚJO *et al.*, 2009), *Hadrolaelia grandis* (VUDALA e RIBAS, 2017) e *Schomburgkia crispa* Lindley (PEREIRA *et al.*, 2018). Além disso, a concentração do nitrogênio presente no meio de cultura é essencial para o crescimento das plantas, pois faz parte da molécula de clorofila (JURAS *et al.*, 2019), sendo que o meio MS é o que apresenta maior concentração de nitrogênio, quando comparado com WPM e MS/2 (RAMESH *et al.*, 2019).

Os explantes que estavam em meios sem adição de carvão ativado apresentaram uma resposta mais lenta quando comparada com os que estavam em meios com carvão. Foram formadas 25 % de plântulas no meio MS/2C apenas 5 % no meio MS/2, após 16 semanas da sementeira. O carvão ativado é utilizado para complementar o meio de cultura de muitas espécies, incluindo orquídeas, pois retém substâncias tóxicas que podem estar presentes no meio (PAN e VAN STADEN, 1998; THOMAS, 2008). O carvão, por ter coloração escura, diminui a intensidade luminosa do meio de cultura, promovendo um acúmulo de auxinas endógenas nas plantas, favorecendo a porcentagem de enraizamento e o comprimento das raízes (PAN e VAN STADEN, 1998). Entretanto, foi verificado no presente estudo, uma taxa de 79,45 % de mortalidade em explantes cultivados no meio WPMC. O carvão ativado pode adsorver componentes do meio de cultura, reduzindo a concentração de nutrientes, podendo levar a mortalidade dos explantes (WANG e HUANG, 1976; PAN e VAN STADEN, 1998).

A porcentagem total de germinação de *C. labiata*, foi em média 85,90 % após 16 semanas de cultivo. Em outro estudo com a mesma espécie, a porcentagem de

germinação foi de 53 % em meio MS/2 (MELO *et al.*, 2015). Essa porcentagem foi inferior a obtida no presente estudo, e isso pode ser explicado pelo uso de cápsulas imaturas, que pode ter interferido negativamente na porcentagem de germinação (RODRÍGUEZ *et al.*, 2003). Uma orquídea do mesmo gênero, *Cattleya walkeriana*, apresentou 70 % de germinação, em meio sólido de Kyoto, após 70 dias de cultivo (ISLAM *et al.*, 1999). Resultado semelhante ocorreu para *Cattleya loddigesii* Lindl., com 78% de germinação no meio MS e 71% no meio MS/2 (ABRÃO *et al.*, 2014). Segundo Markovina e Mcgee (2000), a germinação assimiótica pode sofrer influência da espécie, da idade das sementes, do tipo de meio de cultura e da adição ou não de reguladores vegetais. No nosso estudo com *C. labiata* não foi necessária a adição de reguladores vegetais, pois as porcentagens finais de plântulas obtidas em todos os meios de cultura foram superiores a 80%, independente do meio de cultura.

No período de alongamento, o comprimento da parte aérea e o total foram superiores em plantas cultivadas no meio WPMC (5,8 e 9,0 cm respectivamente), comparadas com as do MS. No entanto, o comprimento de raízes foi maior (4,5 cm) no meio MSC, devido à presença do carvão ativado. Resultados inferiores foram obtidos com *Cattleya loddigesii* Lindl., em que as plantas apresentaram comprimento de caule e raiz com 3 cm no meio MS, e de caule e raiz com 2,8 cm no meio MS/2 (ABRÃO *et al.*, 2014).

No presente estudo, foram necessários 280 dias para formar mudas, ou seja, plantas com raízes de *C. labiata* para o transplântio. No entanto, para outras espécies de *Cattleya* (*Cattleya aelandiae* Lindl., *Cattleya bowringiana* Veitch, *Cattleya granulosa* Lindl., *Cattleya percivaliana* O'Brien, *Cattleyopsis lindenii* (Lindl.) Cogn.), foi necessário quase o dobro do período (média 500 dias) para formação de mudas para o transplântio (BUYUN *et al.*, 2004). O comprimento total de plantas transplântadas em casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp. e *Sphagnum* sp. isolado após 24 semanas de transplântio, foi em média 9 cm. Resultado inferior foi obtido para *Cattleya xanthia* utilizando os mesmos substratos, o comprimento total de plantas transplântadas em *Sphagnum* sp. combinado com casca de *Pinus* sp. foi de 4,6 cm, e em *Sphagnum* sp. isolado foi de 3,4 cm (JURAS *et al.*, 2019). No presente estudo, o número de folhas foi superior em plantas transplântadas em *Sphagnum* sp. isolado, casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp. e casca de *Pinus* sp. com fibra de coco, com *Sphagnum* sp. (três folhas) comparadas com as

transplantadas em outros substratos. No entanto, o número de folhas das plantas de *Cattleya xanthia* foi superior ao de *C. labiata*, com sete folhas em plantas transplantadas em *Sphagnum* sp. e seis folhas utilizando *Sphagnum* sp. combinado com casca de *Pinus* sp. (JURAS *et al.*, 2019). A casca de *Pinus* sp. tem em sua composição monoterpenos e fenóis que podem ser prejudiciais para as plantas, principalmente no cultivo de plantas jovens (NAASZ *et al.*, 2009).

A porcentagem de sobrevivência das plantas de *C. labiata* transplantadas nos diferentes tipos de substratos apresentou em média 90% de sobrevivência após 24 semanas de transplântio, exceto plantas transplantadas em fibra de coco que apresentaram 45% de sobrevivência. A fibra de coco retém menos água comparada com o *Sphagnum* sp., fazendo com que as plantas absorvam menor quantidade de água, influenciando negativamente em sua sobrevivência (FIELDS *et al.*, 2014). Taxas de sobrevivência inferiores foram obtidas para *Cattleya xanthia*, com 64 % de sobrevivência em *Sphagnum* sp. e 68 % em *Sphagnum* sp. combinado com casca de *Pinus* sp., após 25 semanas (JURAS *et al.*, 2019).

Na germinação assimbiótica o açúcar é fornecido pelo meio de cultura, e substitui a associação com simbioses, facilitando a germinação de orquídeas, pois não é necessário encontrar e inocular o simbionte específico para a espécie no meio de cultura (ALGHAMDI, 2019). As plantas são mantidas em frascos ou placas de Petri hermeticamente fechadas, não podendo fazer trocas gasosas com o meio externo, acumulando CO₂ e etileno (KOZAI, 2010). O acúmulo desses gases junto com a baixa intensidade luminosa e a adição de sacarose, faz com que as plantas apresentem taxa de fotossíntese reduzida ou ausente (KOZAI, 2010). Isso foi relatado para plantas de *Fragaria x ananassa* Duch. cv Kent, cultivadas com baixas porcentagens de sacarose apresentaram menor taxa de fotossíntese (HDIDER e DESJARDINS, 1994). A sacarose adicionada no meio de cultura, pode inibir a atividade do Rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase), uma enzima que atua no processo da fotossíntese (HDIDER e DESJARDINS, 1994). No presente estudo foi visualizado que as plantas após 24 semanas de alongamento apresentaram teor de clorofila maior comparado com as plantas após 24 semanas do transplântio. Isso deve ter ocorrido porque após o transplântio, as plantas que eram heterotróficas no cultivo *in vitro* se tornam autotróficas nas condições *ex vitro*, passando a realizar fotossíntese. Com isso, a clorofila é utilizada nas reações fotoquímicas da fotossíntese apresentando valores menores (KOZAI, 2010). Em um

estudo com uma orquídea do mesmo gênero, *Cattleya aurantiaca*, o teor de clorofila para foi maior após 21 semanas do transplântio, quando comparado com 14 semanas (HARRISON e ARDITTI, 1978). Resultado semelhante ao obtido para *C. labiata* ocorreu com *Cattleya xanthina*, para a qual, o teor de clorofila nas folhas foi maior em plantas *in vitro* comparadas com plantas após o transplântio. Porém, a taxa fotossintética foi baixa, pois os tilacóides de plantas *in vitro* não formavam grana, somente após a aclimatização os tilacóides foram recuperados, e aumentaram a taxa fotossintética (LANDO *et al.*, 2016).

O baixo teor de clorofila encontrado após o transplântio no presente estudo, pode estar relacionado com o potencial hídrico (ERYILMAZ, 2006; HUGHES *et al.*, 2010). As plantas do cultivo *in vitro* no período de alongamento, tinham maior acesso a água do meio de cultura, quando comparada com as plantas no cultivo *ex vitro* no período do transplântio (KUMAR e RAO, 2012). Com a baixa umidade nos substratos no período do transplântio (FIELDS *et al.*, 2014) pode ocorrer a degradação da clorofila nas folhas (ERYILMAZ, 2006). Quando foram testados os diferentes substratos, percebeu-se que o teor de clorofila foi menor em plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. isolada, substrato que retém menor quantidade de água comparado com *Sphagnum* sp. (FIELDS *et al.*, 2014). Além disso, também foi observada a presença de antocianina na face abaxial das folhas das plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. Isolada (em maior quantidade), casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp., fibra de coco isolada, casca de *Pinus* sp. combinada com fibra de coco. Existe uma correlação entre níveis de antocianina e estresse osmótico, quanto maior o nível de antocianina, menor o potencial hídrico presente nas folhas (HUGHES *et al.*, 2010). A antocianina foi encontrada nas plantas transplantadas em fibra de coco e casca de *Pinus* sp., esses substratos possuem maior aeração e drenagem hídrica, não podendo acumular e nem liberar água para as plantas (FIELDS *et al.*, 2014).

Foi observada cutícula espessa em plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. isolada, fibra de coco isolada e fibra de coco combinada com *Sphagnum* sp. Constatou-se que no presente estudo, as plantas que apresentaram cutícula espessa foram cultivadas nos substratos que retém menor quantidade de água, como fibra de coco e casca de *Pinus* sp. (FIELDS *et al.*, 2014). Resultado semelhante foi obtido para orquídea do mesmo gênero, *Cattleya xanthina*, que também apresentou cutícula espessa (LANDO *et al.*, 2016), sendo que isso está

relacionado com uma adaptação da planta em evitar a perda excessiva de água (ZHANG *et al.*, 2018).

As raízes formadas no transplântio apresentaram o velame mais espesso, com células maiores e mais arredondadas, comparadas com às das raízes provenientes do alongamento. Também foi visualizada a presença de lignina no velame das raízes formadas no transplântio. Wen *et al.* (2013) relataram em estudo com *Dendrobium nobile*, que a espessura do velame está relacionada com a proteção e absorção de água na aclimatização *ex vitro*, pois quanto maior o velame maior proteção e absorção de água, permitindo maior sobrevivência das plantas no cultivo *ex vitro* (WEN *et al.*, 2013; POREMBSKI *et al.*, 1995).

No presente estudo, foi estabelecido um protocolo eficiente para germinação assimbiótica e produção de mudas de *C. labiata*. Sendo assim, recomenda-se o uso do meio MS/2C para o cultivo *in vitro* dessa espécie, pois as sementes apresentaram maior porcentagem de germinação (71,77 %) e maior formação de plântulas (30 %), após 16 semanas da germinação, em comparação com os outros meios de cultura (MS e WPM com ou sem carvão ativado). Após 24 semanas de alongamento o comprimento da parte aérea (5,8 cm) e total (9,0 cm) foi superior em plantas cultivadas em WPMC, comparadas com as cultivadas nos outros meios. No transplântio e aclimatização, as plantas cultivadas em meio MS/2C apresentaram maior comprimento total (11 cm) e massa fresca (1,9 g), no entanto, o índice de crescimento e o número de folhas não diferiu das plantas cultivadas em outros meios de cultura. Além disso, plantas cultivadas em MS/2C apresentaram alta porcentagem de sobrevivência (90 %), comparado com as cultivadas em outros meios. A adição de carvão ativado no meio de cultura é indicada para o cultivo de *Cattleya labiata*, pois as plantas apresentaram maior comprimento total (10 cm), quando comparadas com as cultivadas sem carvão. Recomenda-se o uso de *Sphagnum* sp. como substrato de *C. labiata*, pois as plantas transplantadas apresentaram alto comprimento de parte aérea (5 cm), de raízes (6 cm) e total (11 cm), maior massa fresca (1,9 g), número de folhas (3,2 folhas por planta), e apresentaram alta porcentagem (90 %) de sobrevivência. Após 24 semanas de transplântio, o WPMC apresentou alto comprimento de parte aérea (5,9 cm), raiz (7 cm) e total (13 cm). Porém, plantas cultivadas em meio WPMC apresentaram maior porcentagem de mortalidade (79,4 %), não sendo indicada para o cultivo *in vitro* de *C. labiata*.

Pode-se concluir que o uso de carvão ativado é indicado para o cultivo *in vitro* de *Cattleya labiata*, recomendando-se o meio MS/2C nas etapas de germinação e alongamento. Os substratos que retêm maior quantidade de água são mais eficientes para a produção de mudas da espécie, recomendando-se o uso de *Sphagnum* sp. como substrato no transplântio de mudas. As análises de clorofila e antocianina auxiliaram no entendimento do processo de transição das plantas do cultivo *in vitro* para o cultivo *ex vitro*. As análises morfofisiológicas auxiliaram no entendimento das causas de mortalidade no transplântio de mudas, devido à pouca disponibilidade hídrica da casca de *Pinus* sp. e fibra de coco como substrato.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, M.C.R.; JORGE, J.; PESCADOR, R.; FERREIRA, M.W.; SUZUKI, R.M. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl.(Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, 2014.
- ALGHAMDI, S.A. Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. **Saudi journal of biological sciences**, v.26, n.3, p.495-502, 2019.
- ALMEIDA, P.R.M.; LÓPEZ-ROBERTS, M.C.; VIGNA, B.B.Z.; SOUZA, A.P.; GÓES-NETO, A.; VAN DEN BERG, C. Microsatellite markers for the endangered orchids *Cattleya labiata* Lindl. And *C. warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Conservation genetics resources**, v.5, n.3, p.791-794, 2013.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol.** V.24, n.1, p.1–15, 1949.
- BUYUN, L.; LAVRENTYEVA, A.; KOVALSKA, L.; IVANNIKOV, R. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. **Acta Universitatis Latviensis Biology**, v.676, n.1, p.159-162, 2004.
- CHEN, Y.; GOODALE, U.M.; FAN, X.L.; GAO, J.Y. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. **Global Ecology and Conservation**, v.3, p.367-378, 2015.
- CHEN, C. Cost analysis of plant micropropagation of *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 126, n. 1, p. 167-175, 2016.
- CNCFlora. ***Cattleya labiata* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya labiata](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_labiata)>. Acesso em: 9 mar. 2018.
- DRESSLER, R.L. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge: Harvard Universit., p.332, 1981.
- DA SILVA, J.A.T.; HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J.C.; SONGJUN, Z.E.N.G. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v.3, n.3, p.110-124, 2017.
- DA SILVA, A.R.; DE MELO, N.F.; YANO-MELO, A.M. Acclimatization of micropropagated plants of *Etilingera elatior* (Jack) RM Sm. Inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **South African Journal of Botany**, v.113, p.164-169, 2017.
- DE ARAÚJO, A.G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; DE CARVALHO, J.G.; ZARRAGA, D.Z.A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de

Cattleya loddigesii Lindl.(Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.31, n.1, p.35-39, 2009.

DE, L.C.; KUMAR, R.; KHAN, A.M.; SANGMA, R.; SAILO, N.; BARMAN, D. Tropical and subtropical orchids. **IJSAR**, v.1, n.2, p.1–9, 2014.

DICKISON, C. **Integrative plant anatomy**. Academic press, 2000.

EKMEKÇİGİL, M.; BAYRAKTAR, M.; AKKUŞ, Ö.; GÜREL, A. High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v.136, n.3, p.451-464, 2019.

ERYILMAZ, F. The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.20, n.1, p.47-52, 2006.

FIELDS, J.S.; FONTENO, W.C.; JACKSON, B.E.; HEITMAN, J.L.; OWEN, J.S. Hydrophysical properties, moisture retention, and drainage profiles of wood and traditional components for greenhouse substrates. **HortScience**, v.49, n.6, p.827-832, 2014.

FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. D. van Nostrand Company Inc., Princeton, 1949.

HARRISON, C.R.; ARDITTI, J. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette**, v.139, n.2, p.180-189, 1978.

HARLEY, J.L. Recent progress in the study of endotrophic mycorrhiza (Abstract). **American Orchid Society Bulletin**, v.20, p.5, 1951.

HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, n.1, p.27-33, 1994.

HOANG, N.H.; KANE, M.E.; RADCLIFFE, E.N.; ZETTLER, L.W.; RICHARDSON, L.W. Comparative seed germination and seedling development of the ghost orchid, *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae), and molecular identification of its mycorrhizal fungus from South Florida. **Annals of botany**, v.119, n.3, p.379-393, 2017.

HOCH, W.A.; SINGSAAS, E.L.; MCCOWN, B.H. Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in Autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. **Plant Physiology**. 2003; v.133, n.3, p.1296-1305, 2003.

HOSHINO, R.T.; ALVES, G.A.C.; BARZAN, R.R.; FREGONEZI, G.A.F.; FARIA, R.T. Fertilizantes agrícolas aplicados via solução nutritiva em *Cattleya labiata* Lindl. **Ornamental Horticulture**, v.22, n.2, p.208-214, 2016.

HOSSAIN, M.M. *Ex vitro* seedling development from *in vitro* rhizome-like bodies in *Eulophia promensis* Lindl.: a new technique for orchid propagation. **Journal of Botany**, v. 2015, 2015.

HOSOMI, S.T.; SANTOS, R.B.; CUSTÓDIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARKS, T.R.; MACHADO, N.N.B. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science Technology**, v.39, n.1, p.178-189, 2011.

HUGHES, N.M.; REINHARDT, K.; FEILD, T.S.; GERARDI, A.R.; SMITH, W.K. Association between winter anthocyanin production and drought stress in angiosperm evergreen species. **Journal of experimental botany**, v.61, n.6, p.1699-1709, 2010.

ISLAM, O.M.; MATSUI, 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**, v.68, n.6, p.1132-1138, 1999.

JOHNSON, T.R.; STEWART, S.L.; DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v.90, n.3, p.313, 2007.

JURAS, M.C.R.; JORGE, J.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W.D.M.; TAMAKI, V.; SUZUKI, R.M. *In vitro* culture and acclimatization of *Cattleya xanthina* (Orchidaceae), an endangered orchid of the Brazilian Atlantic Rainforest. **Rodriguésia**, v.70, 2019.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997.

KOENE, F.M.; AMANO, É.; RIBAS, L.L.F. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v.121, p.83-91, 2019.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v.10, n.4, p.188-204, 2010.

KUMAR, K.; RAO, I.U. **Morphophysiologicals problems in acclimatization of micropropagated plants in-ex vitro conditions-A Reviews**. 2012.

LANDO, A.P.; WOLFART, M.R.; FERMINO, P.C.P.; SANTOS, M. Structural effects on *Cattleya xanthine* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. **Biologia Plantarum**, v.60, n.2, p.219-225, 2016.

LLOYD, G.; McCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v.30, p.421-427, 1980.

LUQUE, R.L.; SOUSA, H.C.; KRAUS, J.E. Métodos de coloração de Roeser (1972)-modificado- e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de Alciação 8GS ou 8GX. **Acta Botanica Brasilica**, v.10, n.2, p.199-212, 1996.

MARKOVINA, A.L.; MCGEE, P.A. Comparison of symbiotic and asymbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus* (Vandaeae; Orchidaceae). **Lindleyana**, v.15, n.2, p.68-72, 2000.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. **Livro vermelho da flora do Brasil**, Rio de Janeiro, 2013.

MAHESHWARI, P.; NARAYANASWAMI, S. Embryological studies on *Spiranthes australis* Lindl. **Botanical Journal Linnean Society London**, v.53, p.474-484, 1952.

MELO, G.M.; PAULINO, P.M.S.; WILLADINO, L.G.; CAMARA, T.R.; ULISSES, C. Asymbiotic germination of the genus *Cattleya* in different nutritive media. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.11, n.1, p.19-26, 2015.

MENEZES, L.C. **Orquideas/Orchids: *Cattleya labiata autumnalis***. Edicoes Ibama, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NAASZ, R.; CARON, J.; LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Efficiency factors for bark substrates: biostability, aeration, or phytotoxicity. **Soil Science Society of America Journal**, v. 73, n. 3, p. 780-791, 2009.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, Mi.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-373, 1964.

OKSANEN, J.F.; BLANCHET, G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P.R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; HENRY, M.; STEVENS, H.; SZOECs, E.; WAGNER, H. Package 'vegan'. **Community ecology package, version**, v.2, n.9, 2013.

PAN, M.J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture—A review. **Plant growth regulation**, v.26, n.3, p.155-163, 1998.

PEREIRA, N.S.; FERREIRA, B.R.R.; DE CARVALHO, E.M.; DAMIANI, C.R. Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the *in vitro* cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). **Journal of Applied Phycology**, p.1-12, 2018.

PINHEIRO, L.R.; RABBANI, A.R.C.; DA SILVA, A.V.C.; DA SILVA L.A.; PEREIRA, K.L.G.; DINIZ, L.E.C. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, v.298, n.10, p.1815-1825, 2012.

POOBATHY, R.; ZAKARIA, R.; MURUGAIYAH, V.; SUBRAMANIAM, S. Autofluorescence study and selected cyanidin quantification in the Jewel orchids *Anoectochilus* sp. And *Ludisia discolor*. **PloS one**, v. 13, n. 4, 2018.

POREMBSKI, S.; BROWN, G.; BARTHLOTT, W. On the occurrence of a velamen radicum in *Cyperaceae* and *Velloziaceae*. - **Nord. J. Bot.** v.16, p.239-245, 1995.

RAMESH, T.; RENGANATHAN, P.; PRABHAKARAN, M. Tissue culture studies on *Cymbidium ensifolium* (L.) Swartz. **Journal of Applied and Advanced Research**, v.4, n.4, p.104-107, 2019.

RODRÍGUEZ, L.; GONZÁLEZ, R.; DÍAZ, A.; FAJARDO, E.; SÁNCHEZ, E.; HERNÁNDEZ, J.; CASTAÑEIRA, M.; CRUZ, G.; GONZÁLEZ, J. Influencia de diferentes factores © la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya labiata*. **Biología Vegetal**, v.3, n.2, p.119-121, 2003.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2a. eu. I-XI, 1-228: The Iowa State College, Iowa. 1951.

SCHIFF, J.L. **Rare and exotic orchids: their nature and cultural significance**. Springer, New York. 2018.

SEON, K.M.; KIM, D.H.; KANG, K.W.; SIVANESAN, I. Highly competent *in vitro* propagation of *Thrixspermum japonicum* (Miq.) Rchb. F., a rare epiphytic orchid. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, p.1-7, 2018.

SOARES, J.D.R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; VILLA, F.; ARAUJO, A.G. D. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.33, n.3, p.503-507, 2011.

SPYROPOULOS, C.G.; MAVROMMATIS, M. Effect of water stress on pigment formation in *Quercus* species. **Journal of Experimental Botany**, v.29, n.2, p.473-477, 1978.

THOMAS, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology advances**, v.26, n.6, p.618-631, 2008.

VUDALA, S.M.; RIBAS, L.L.F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v.108, p.1-7, 2017.

WANG, P.J.; HUANG, L.C. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. **In vitro**, v. 12, n. 3, p. 260-262, 1976.

WAUD, M.; BUSSCHAERT, P.; LIEVENS, B.; JACQUEMYN, H. Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species. **Fungal Ecology**, v.20, p.155-165, 2016.

WEN, Z.Z.; LIN, Y.; LIU, Y.Q.; WANG, M.; WANG, Y.Q.; LIU, W. Effects of paclobutrazol *in vitro* on transplanting efficiency and root tip development of *Dendrobium nobile*. **Biologia plantarum**, v.57, n.3, p.576-580, 2013.

ZHANG, S.; YANG, Y.; LI, J.; QIN, J.; ZHANG, W.; HUANG, W.; HU, H. Physiological diversity of orchids. **Plant diversity**, v.40, n.4, p.196-208, 2018.

Tabela 1. Efeitos dos meios de cultura: MS, MS/2 (MS com macronutrientes reduzidos pela metade) e WPM, com e sem a adição de carvão ativado (C), na porcentagem de germinação de *Cattleya labiata*, após 2, 4, 8, 12, e 16 semanas do cultivo e porcentagem total de germinação. Os valores foram avaliados com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.

Meios de cultura	Germinação (%)					Porcentagem total de germinação após 16 sem	Porcentagem total de mortalidade após 16 sem
	2 sem	4 sem	8 sem	12 sem	16 sem		
MS	59,22 Ba	19,94 Ab	0,50 ABc	0,94 ABc	0,27 Acd	81,77 A	29,35 C
MSC	65,88 ABa	20,66 Ab	0,05 Bd	0,27 Bcd	0,00 Ad	87,88 A	46,44 BC
MS/2	60,44 Ba	16,94 Ab	0,11 Bd	1,55 Ac	0,44 Acd	82,88 A	64,91 AB
MS/2C	71,77 Aa	17,05 Ab	0,16 ABcd	0,16 Bcd	0,11 Ad	90,77 A	54,25 B
WPM	64,77 ABa	20,72 Ab	0,77 Ac	0,05 Bd	0,44 Ac	87,61 A	34,33 C
WPMC	64,33 ABa	17,33 Ab	0,50 ABc	0,55 Bc	0,00 Ad	84,44 A	79,45 A

Letras maiúsculas indicam comparação entre os meios. Letras minúsculas indicam comparação entre as semanas. Letras

iguais significam que não há diferença par a par.

Tabela 2 Teste de Clorofilas a, b e totais do período de 24 semanas de Alongamento, de 12 e 24 semanas de transplântio de *Cattleya labiata* em diferentes meios de cultura: MS, MS/2 (MS com macronutrientes reduzidos pela metade) e WPM, com e sem a adição de carvão ativado (C) (2 g L⁻¹). Os valores foram avaliados com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.

Meio	Alongamento após 24 semanas			Transplântio após 24 semanas		
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofilas totais	Clorofila a	Clorofila b	Clorofilas totais
MS	4.70560 b	2.55236 b	7.25796 b	2.95828 a	1.33133 a	4.28961 a
MSC	7.22168 a	3.55138 ab	10.77306 a	3.59909 a	1.80267 a	5.40176 a
MS/2	6.63384 ab	4.01586 a	10.64970 ab	2.86769 a	1.44258 a	4.31027 a
MS/2C	6.87900 ab	3.51771 ab	10.39671 ab	3.75207 a	1.96516 a	5.71723 a
WPM	6.70433 ab	3.92502 a	10.62935 ab	2.66055 a	1.20988 a	3.87043 a
WPMC	5.25777 ab	2.61770 b	7.87547 ab	2.76856 a	1.38914 a	4.15770 a

Letras indicam comparação entre os meios. Letras iguais significam que não há diferença par a par.

Tabela 3. Teste de Clorofilas a, b e totais do período de 24 de Transplântio de *Cattleya labiata* em diferentes tipos de substratos isolados ou combinados: FC (fibra de coco), S (*Sphagnum* sp.), CP (casca de *Pinus* sp.). Os valores foram avaliados com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.

Substratos	Teor de Clorofilas		
	Transplântio após 24 semanas		
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofilas totais
S	4.93483 a	2.46045 a	7.39528 a
FC + S	3.91520 a	1.81396 ab	5.72916 a
CP + S	4.36667 a	2.51729 a	6.88396 a
CP + FC + S	3.43075 a	1.40055 ab	4.83130 ab
CP + FC	3.42820 a	2.35061 ab	5.77881 a
FC	3.27049 ab	2.37712 a	5.64761 a
CP	1.46764 b	1.09931 b	2.56695 b

Letras indicam comparação entre os substratos. Letras iguais significam que não há diferença par a par.

Fig. 1 Estádios da germinação de *Cattleya labiata*. A, B, D, F, H, J e L – Microscopia eletrônica de varredura (MEV); C, E, G, I e K – Microscópio estereoscópio; A, B - semente, antes da germinação; C - embrião clorofilado (estádio 1), após uma semana de cultivo; D -testa rompida com protocormo clorofilado (estádio 2), após uma semana de cultivo; E, F - protocormo clorofilado, após duas semanas de cultivo; G, H - protocormo com ápice e rizoides (estádio 3), após quatro semanas de cultivo; I, J - protocormo com uma folha (estádio 4), após seis semanas de cultivo; K, L – plântula (estádio 5), após doze semanas da cultivo.

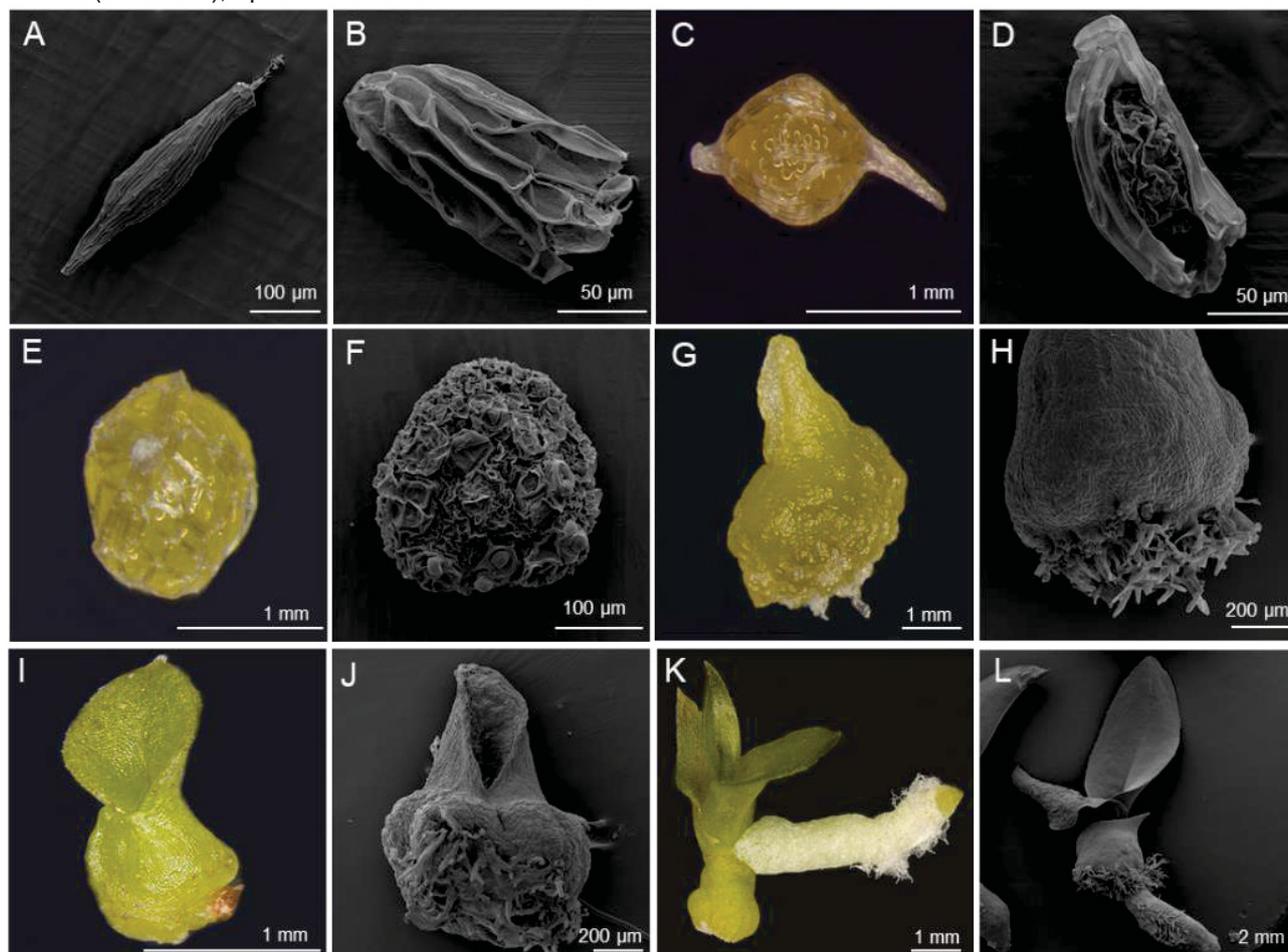
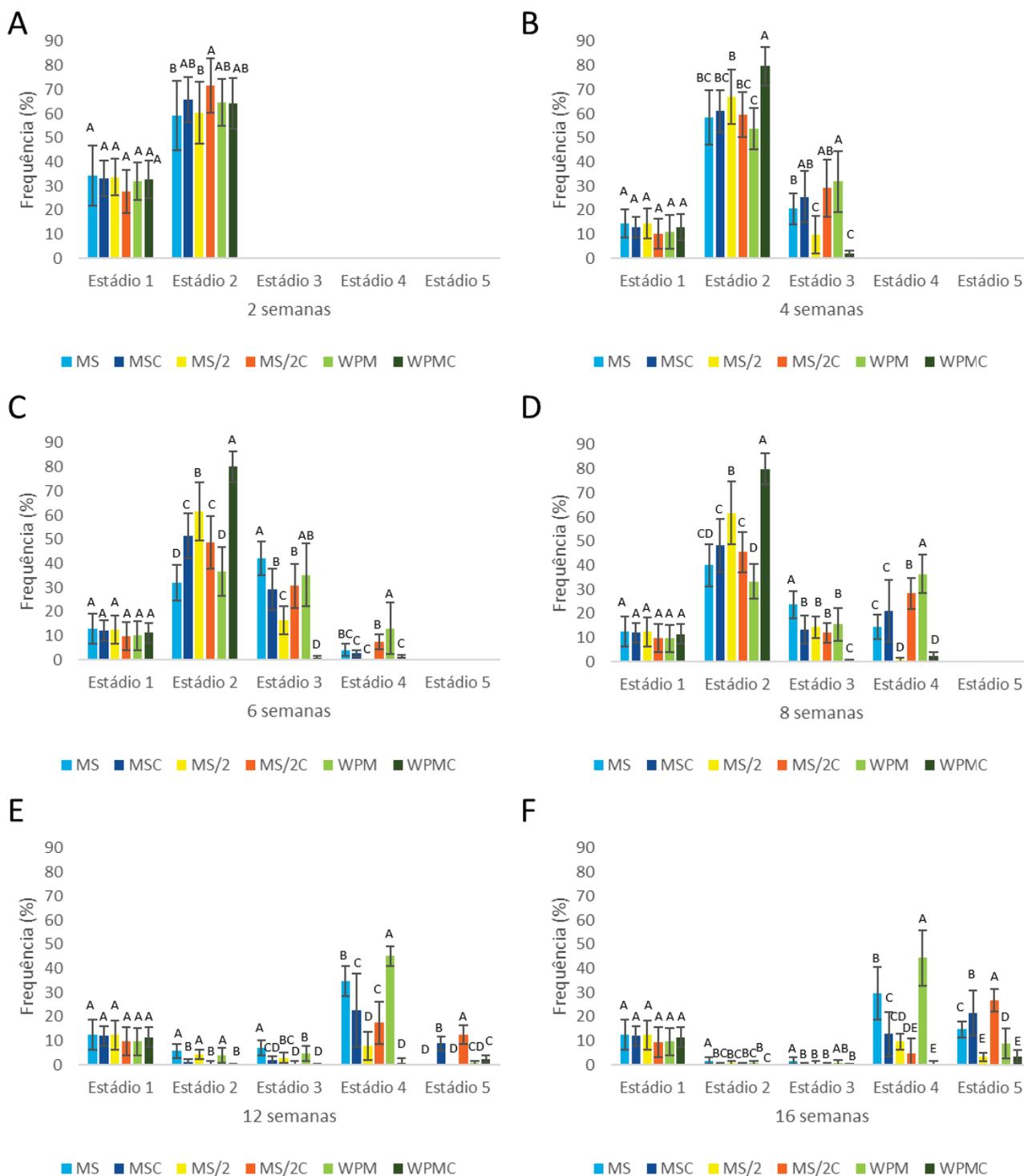


Fig. 2 Etapas de desenvolvimento de *Cattleya labiata*. A- Planta adulta; B – germinação, após 16 semanas, em diferentes meios de cultura MS, MS/2 (MS com macronutrientes reduzidos pela metade) e WPM sem e com a adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado (C); C – explante após 12 semanas do alongamento, cultivado em WPM; D - explante após 12 semanas do alongamento, cultivado em WPMC; E - plantas com 24 semanas de alongamento nos meios MS, MSC, MS/2, MS/2C, WPM e WPMC; F- plantas com 24 semanas de transplântio nos meios MS, MSC, MS/2, MS/2C, WPM e WPMC; G - Plantas com 24 semanas em *Sphagnum* sp.; H- Plantas com 24 semanas em fibra de coco; I - Plantas com 24 semanas em casca de *Pinus* sp.

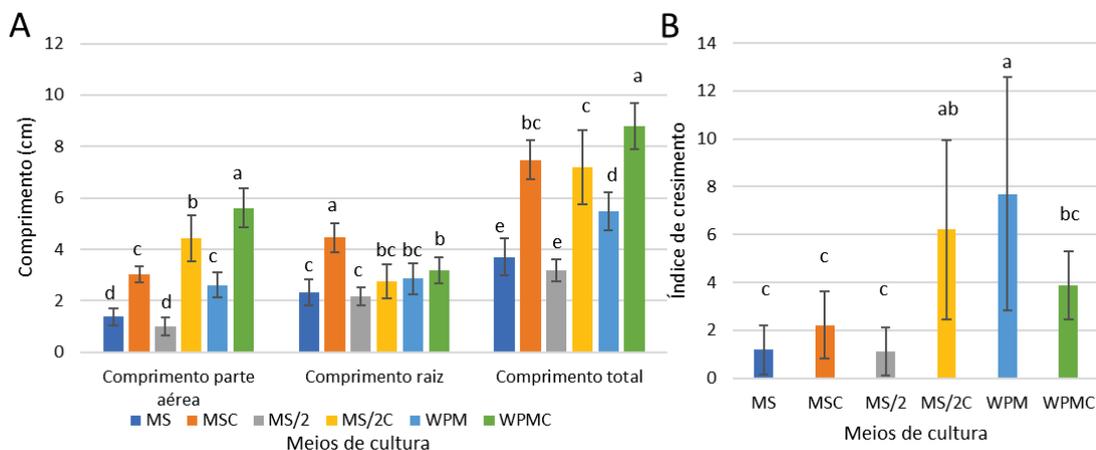


Figura 3. Efeitos dos meios de cultura: MS, MS/2 (MS com macronutrientes reduzidos pela metade) e WPM sem e com a adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado (C), na porcentagem de germinação assimbiótica de *Cattleya labiata*. A, B, C, D, E, F - após 2, 4, 6, 8, 12 e 16 semanas de cultivo consecutivamente. Estádios de germinação: 1: embrião clorofilado, 2: testa rompida com protocormo clorofilado (semente germinada), 3: protocormo com ápice e/ ou rizoide, 4: protocormo com folha e 5: planta. Os valores foram avaliados com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.



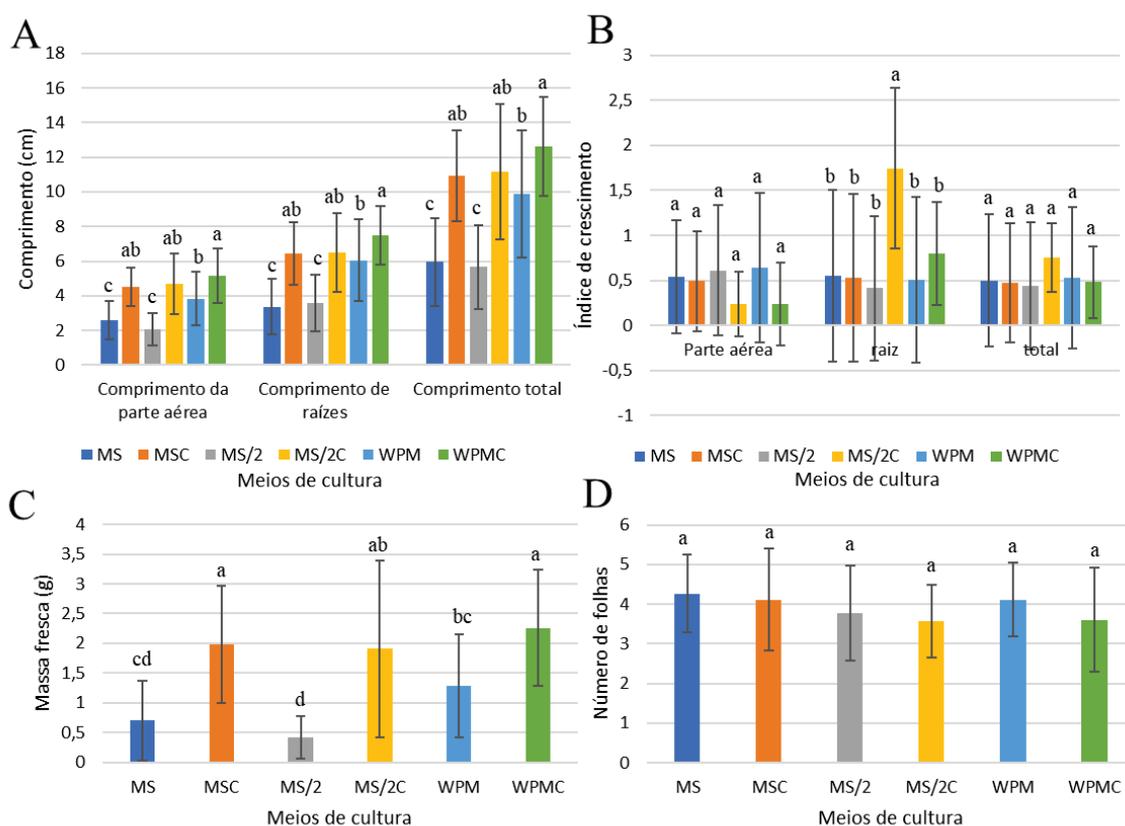
Letras indicam a comparação entre os meios. Letras iguais significam que não há diferença par a par.

Figura 4. Plantas de *Cattleya labiata*, após 24 semanas do cultivo do período do alongamento, em diferentes meios de cultura: MS, MS/2 (MS com macronutrientes reduzidos pela metade) e WPM, com e sem a adição de carvão ativado (2 g L⁻¹). A - Comprimento parte aérea, raiz e total; B – Índice de crescimento da parte aérea. Os valores foram avaliados com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.



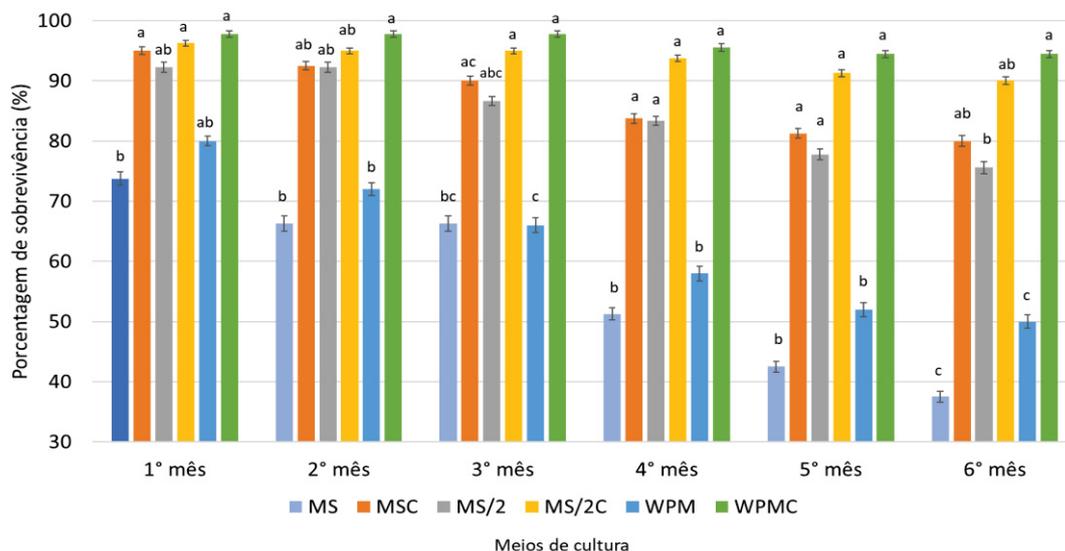
Letras indicam comparação entre os meios de cultura. Letras iguais significam que não há diferença par a par.

Figura 5. Plantas de *Cattleya labiata*, após 24 semanas do transplântio, que cresceram em diferentes meios de cultura durante a germinação e alongamento, MS, MS/2 (MS com macronutrientes reduzidos pela metade) e WPM, com e sem a adição de carvão ativado (2 g L⁻¹) que foram plantados em *Sphagnum sp.* A - Comprimento parte aérea, raiz e total; B – Índice de crescimento da parte aérea. Os valores foram avaliados com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.



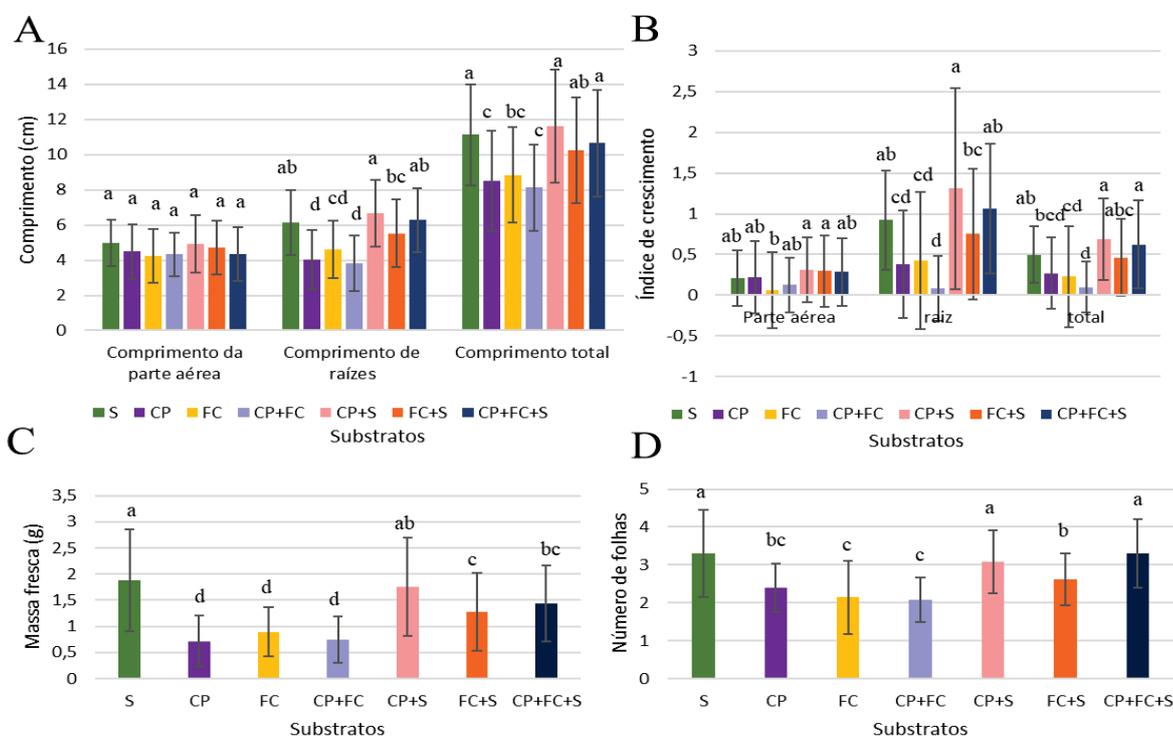
Letras indicam comparação entre os meios de cultura. Letras iguais significam que não há diferença par a par.

Figura 6. Porcentagem de sobrevivência de *Cattleya labiata*, após 6 meses (24 semanas) do transplante, que cresceram em diferentes meios de cultura durante a germinação e alongamento: MS, MS/2 (MS com macronutrientes reduzidos pela metade) e WPM, com e sem a adição de carvão ativado (C) (2 g L⁻¹). Os valores foram avaliados com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.



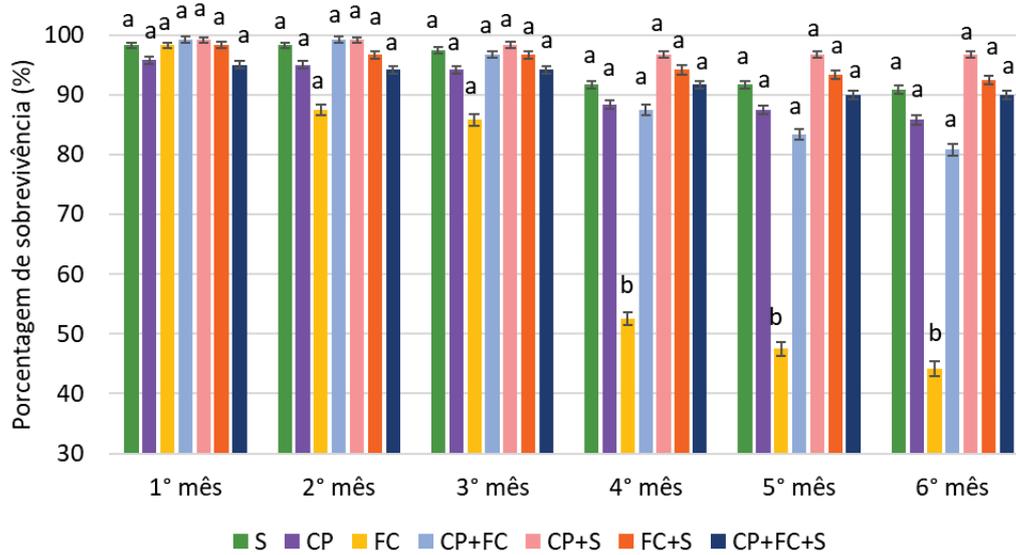
Letras indicam comparação entre os substratos. Letras iguais significam que não há diferença par a par.

Figura 7. Plantas de *Cattleya labiata*, após 24 semanas do transplante, em diferentes tipos de substratos isolados ou combinados: FC (fibra de coco), S (*Sphagnum* sp.), CP (casca de *Pinus* sp.). A - Comprimento parte aérea, raiz e total; B - Índice de crescimento da parte aérea. Os valores foram avaliados com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.



Letras indicam comparação entre os substratos. Letras iguais significam que não há diferença par a par.

Figura 8 - Porcentagem de sobrevivência de *Cattleya labiata*, após 6 meses (24 semanas) do transplântio, em diferentes tipos de substratos isolados ou combinados: F (fibra de coco), S (*Sphagnum* sp.), C (casca de *Pinus* sp.). Os valores foram avaliados com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.



Letras indicam comparação entre os substratos. Letras iguais significam que não há diferença par a par.

Figura 9. Aspectos anatômicos de folhas de *Cattleya labiata*, após 24 semanas do transplântio, em diferentes tipos de substratos isolados ou combinados: fibra de coco, *Sphagnum* sp. e casca de *Pinus* sp. A e B – folhas de plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. isolada; C, D e P – folhas de plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. combinada com *Sphagnum* sp.; E, F e O – folhas de plantas transplantadas em fibra de coco isolada; G e H – folhas de plantas transplantadas em fibra de coco combinada com *Sphagnum* sp.; I e J – folhas de plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp. combinada com fibra de coco; K e L – folhas de plantas transplantadas em casca de *Pinus* sp., com fibra de coco, com *Sphagnum* sp.; M e N – folhas de plantas transplantadas em *Sphagnum* sp. isolado. A, C, E, G, I, K, M – Microscópio óptico. B, D, F, H, J, L, N, O e P – Microscópio de fluorescência. (fab – face abaxial; cut – cutícula; es – estômato; ant – antocianina; pc – parênquima clorofiliano; fv – feixe vascular; setas indicam cloroplasto).

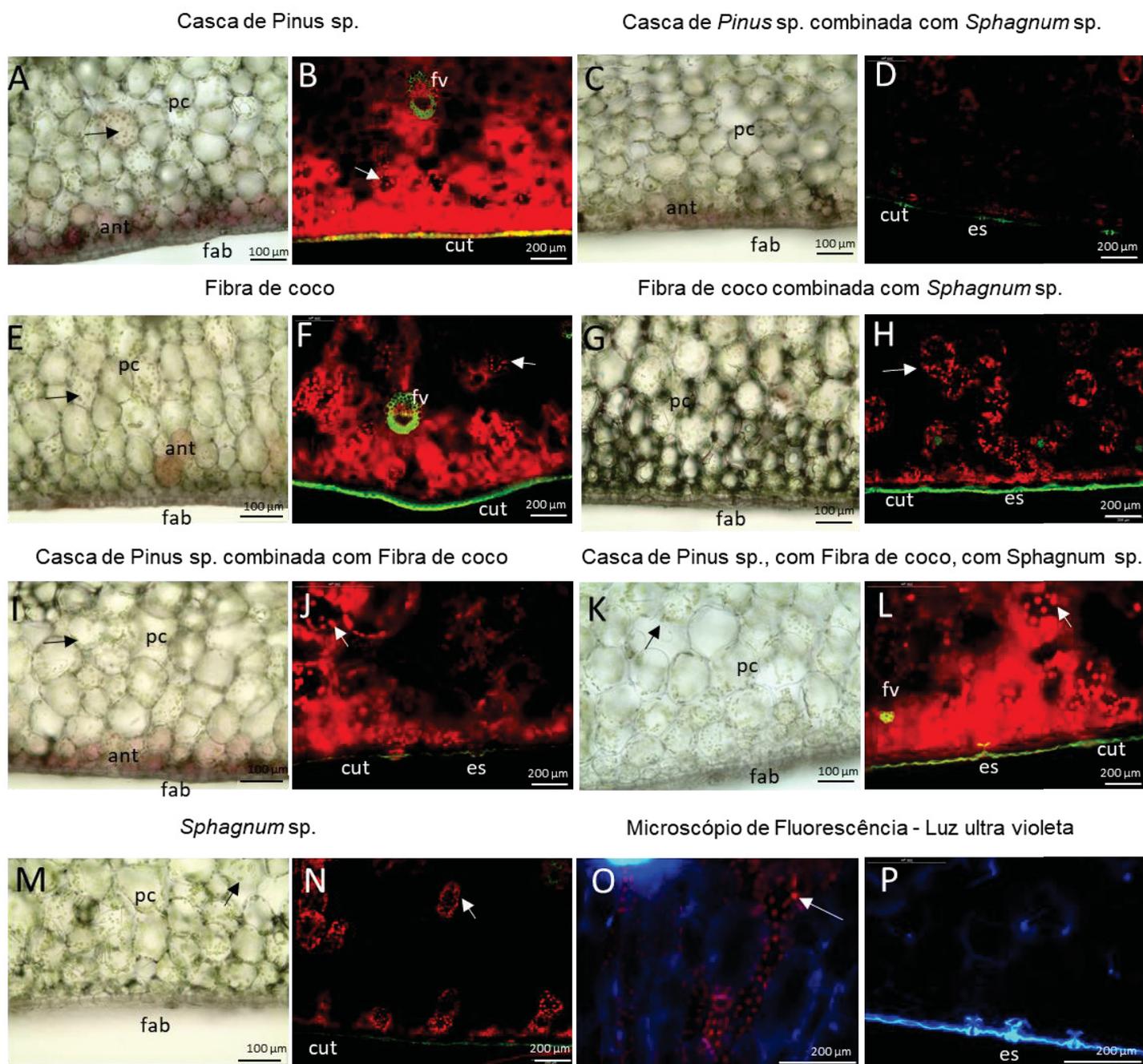
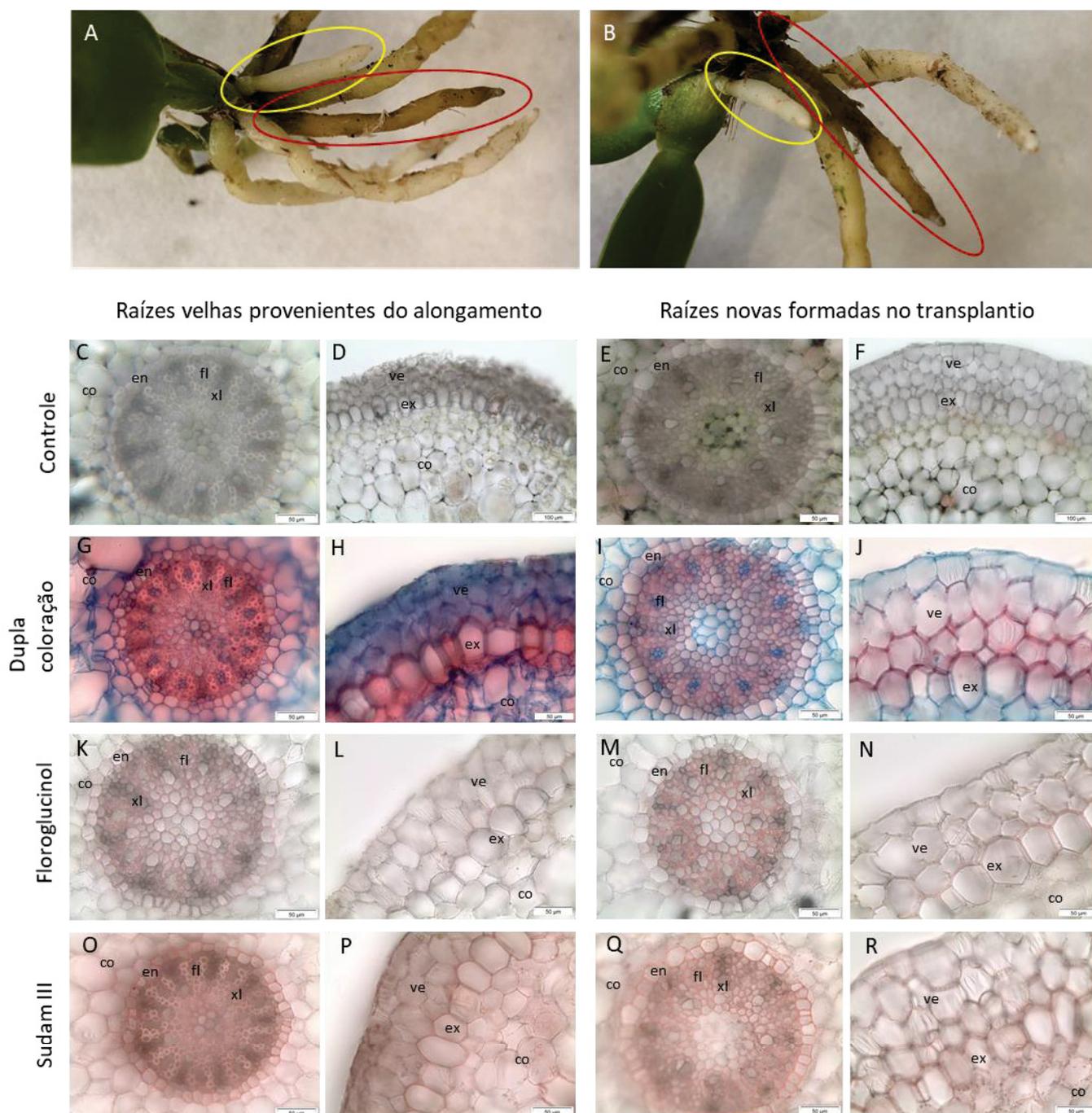


Figura 10. Testes histoquímicos aplicados em raízes de *Cattleya labiata*, após 24 semanas do transplântio, visualizados em microscópio óptico. A e B – planta após 24 semanas de transplântio, (círculo vermelho – raiz velhas provenientes do alongamento; círculo amarelo - raiz nova formadas no transplântio). A – vista superior; B – vista inferior. C, D, G, H, K, L, O e P – raízes velhas provenientes do alongamento; E, F, I, J, M, N, Q e R – raízes novas formadas no transplântio; C ao F raízes que não foram submetidas à reagentes (controle); G ao J – reação da dupla coloração nas raízes; K ao N – reação do floroglucinol nas raízes; O ao R – reação do sudam III nas raízes. (ve – velame; ex – exoderme; co – córtex; em – endoderme; fl – floema; xl – xilema).



3 **CAPÍTULO II** – EFEITO DAS MICROALGAS *Messastrum gracile* (REINSCH)
T.S.GARCIA E *Chlorella vulgaris* BEYERINCK [BEIJERINCK] NA
PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Cattleya labiata* LINDL.

RESUMO

As microalgas são uma alternativa mais barata e eficaz na propagação *in vitro* de orquídeas ameaçadas de extinção, como *Cattleya labiata*, pois podem possuir ação citocinínica similar aos reguladores vegetais, quando utilizada a “*thin cell layer*” (TCL). O objetivo foi testar a o efeito das microalgas *Messastrum gracile* e *Chlorella vulgaris* como substitutas de reguladores vegetais (BAP, TDZ e ZEA) na propagação *in vitro* de *C. labiata*. Foi realizada a produção e a quantificação da composição de biomassa e extrato das microalgas, as secções de TCL foram inoculadas em meio MS/2 contendo extrato *M. gracile* (EM), extrato de *C. vulgaris* (EC), biomassa de *M. gracile* (BM) ou biomassa de *C. vulgaris* (BC), ou reguladores vegetais (BAP, TDZ e ZEA) em diferentes concentrações. Os explantes passaram por um período de alongamento, inoculados em meio MS/2 com carvão ativado, e foram transplantados em bandejas contendo *Sphagnum* sp. Explantes de TCL apresentaram maior formação de PLBs quando comparados com protocormos inteiros. Explantes cultivados em meio suplementando com BM apresentaram maior porcentagem de regeneração de PLBs (59 %) e número médio de 4 PLBs por explante, e apresentaram comprimento de 7 cm no alongamento e 85 % de sobrevivência no transplântio e aclimatização de mudas. A suplementação com BAP também apresentou resultados similares ao BM. Explantes cultivados em meio com TDZ apresentaram maior número médio de PLBs (18 PLBs), porém apresentaram menor comprimento (4 cm) no alongamento, levando mais tempo para formação de raízes e menor porcentagem (40 %) de sobrevivência no transplântio comparado com os outros tratamentos. A suplementação com as microalgas *M. gracile* e *C. vulgaris* pode substituir os reguladores vegetais, pois possuem zeatina em sua composição e favorecem a formação de PLBs e plantas. Para a propagação de *C. labiata*, utilizando a TCL, recomenda-se a suplementação do meio com concentrações altas de BM (4 g L⁻¹) ou BAP (4 mg L⁻¹).

Palavras-chave: Biomassa de microalgas. Citocininas. Extrato de microalgas. Micropropagação. Protocorm-like bodies. Thin cell layer.

3.1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é o maior grupo em número de espécies entre as monocotiledôneas. Possui ampla distribuição, e é abundante em regiões tropicais (Li *et al.*, 2016). Muitas espécies dessa família são comercializadas no mundo (Roberts e Dixon 2008; Schiff 2018), e muitas são de origem extrativista e coletadas em época de floração (De *et al.* 2016). Além disso, sua germinação é difícil na natureza, pois não possuem cotilédone e endosperma funcional e necessitam de associação com fungos micorrízicos (Yeung 2017). A extração ilegal e a dificuldade na germinação, ocasionam a redução no número de indivíduos que pode levar a extinção de algumas espécies (Fay 2018; Schiff 2018).

Técnicas de propagação *in vitro* são essenciais para auxiliar na produção em larga escala de plantas, e em um curto período possibilitar o uso comercial de várias espécies com menor impacto em suas populações naturais e consequentemente evitar o extrativismo (Johnson *et al.* 2007; Chen 2016). A “*thin cell layer*” (TCL) é uma das técnicas mais promissoras para a propagação de muitas espécies de angiospermas, inclusive de orquídeas em grande escala (Bose *et al.* 2017; Ekmekçigil *et al.* 2019). Essa técnica consiste em realizar secções finas que apresentam uma melhor absorção dos componentes do meio de cultura (Tran Thanh Van, 2003) em diferentes órgãos da planta (Hossain *et al.* 2013; Bhattacharyya *et al.* 2018).

Na técnica TCL em orquídeas são formadas estruturas chamadas de *protocorm-like bodies* (PLB) (Figura 1B), que podem ser originadas de explantes de secções transversais ou longitudinais, ou a partir de protocormos inteiros (Arditti, 1979, Lee *et al.*, 2013; Teixeira e Silva 2014). A utilização de TCL tem sido bem-sucedida no cultivo de orquídeas, tanto os TCL transversais (tTCL) quanto os TCL longitudinais (ITCL) são muito utilizados e apresentam bons resultados. Os tTCL possibilitaram a formação de 2237 PLBs a partir de segmentos nodais, em *Cattleya forbesii* Lindl. (Ekmekçigil *et al.* 2019) e os ITCL promoveram 83,3 % de regeneração e 34,4 PLBs por explante em *Hadrolaelia grandis* (Vudala *et al.*, 2019). Porém, o plano de corte do TCL pode apresentar respostas diferentes dependendo da espécie de orquídea e do meio de cultura utilizado (Tran Thanh Van 2003; Da Silva, 2013)

Na utilização da técnica TCL os meios de cultura são suplementados com citocininas que promovem a divisão celular, estimulam a indução e crescimento de

brotações axilares e adventícias, e podem induzir a embriogênese somática (Arditti e Ernst 1993; George *et al.* 2008; Teixeira e Dobránszki 2013). As citocininas mais utilizadas são: 6-benzilaminopurina (BAP) e tidiazuron (TDZ), combinadas ou não com auxinas: ácido α -naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Chugh *et al.* 2009; Teixeira e Dobránszki 2013). A zeatina (ZEA), outra citocinina, tem o custo elevado (US\$ 5,730.00 por grama) e, provavelmente, por isso é pouco utilizada no cultivo *in vitro*.

Os extratos de microalgas, como os da família Chlorophyceae, podem ter ação citocinínica e auxínica, ocasionando as mesmas respostas fisiológicas dos reguladores vegetais (Mazur *et al.* 2001; Stirk *et al.* 2013a, b; Teixeira e Dobránszki 2013) além, de também conter lipídios (Cazzaniga *et al.* 2014), proteínas e carboidratos (Singh e Olsen 2011), essenciais para o crescimento vegetal (Cazzaniga *et al.* 2014). A ZEA é uma citocinina que já foi encontrada em cepas de 17 espécies de microalgas da família Chlorophyceae (Stirk *et al.* 2013a). O uso das microalgas é uma alternativa para substituir a adição de reguladores vegetais, reduzindo o custo de produção de mudas (Chugh *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2018) e podendo aprimorar os protocolos de propagação *in vitro* para espécies comerciais e/ou ameaçadas de extinção. As algas vem sendo utilizadas em várias etapas da propagação, como estímulo da germinação (Aymen *et al.* 2014; Bumandalai e Tserennadmid 2019), multiplicação e enraizamento (Pereira *et al.* 2018), e como biofertilizantes no transplântio (Araghian *et al.* 2015; Saadaoui *et al.* 2019).

Dentre as espécies de Chlorophyceae estão *Messastrum gracile* (Reinsch) T.S.Garcia e *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Beijerinck). *Messastrum gracile* é uma espécie estreita semilunada, possui uma camada fina de mucilagem, mede entre 19 a 55 por 1 a 6 μm , possui modo de vida unicelular ou colonial, é encontrada em água doce (Reinsch 1867; Korshikov 1953; Silva *et al.* 2016). *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] é uma microalga cocóidal, seu diâmetro mede entre 2 a 10 μm , possui modo de vida unicelular ou colonial, é encontrada em água doce ou terrestre, e é cosmopolita (Beijerinck 1890; Shihira e Krauss 1965; Safi *et al.* 2014; Nurachman *et al.* 2015).

Cattleya labiata Lindl. (Fig 1A) é uma orquídea com alto interesse comercial e que corre risco de extinção na natureza, atualmente considerada como espécie vulnerável (VU) pela lista do Livro Vermelho da Flora do Brasil (Martinelli e Moraes 2013) pois sofre com coletas indiscriminadas e o local onde ela ocorre possui um

histórico de exploração da madeira, urbanização, e conversão do uso do solo, como a agricultura e pecuária (Flora do Brasil 2020 em construção). A espécie apresenta flores exuberantes, e é altamente comercializada e propagada para fins ornamentais (Lopez e Runkle 2005; Caballero-Villalobos *et al.* 2017), além de ser a espécie mais utilizada para a formação de híbridos (Flora do Brasil 2020 em construção; Schiff 2018).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo testar o efeito das microalgas *Messastrum gracile* e *Chlorella vulgaris* como substitutas de reguladores vegetais (BAP, TDZ e ZEA) na propagação *in vitro* de *Cattleya labiata*, e especificamente responder as perguntas: As microalgas podem substituir os reguladores vegetais no cultivo *in vitro* de orquídeas? Existem diferenças entre a aplicação de biomassa ou extrato das microalgas no meio de cultura? Qual a semelhança entre a composição das microalgas e dos reguladores vegetais? Qual a melhor concentração de microalga para o cultivo *in vitro* de orquídeas?

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Material Vegetal

Foram coletadas quatro cápsulas maduras de três indivíduos (um indivíduo com duas cápsulas e dois indivíduos com uma cápsula cada) de *Cattleya labiata* de uma coleção viva do Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil. Foi realizada a desinfestação das sementes, com imersão em solução de 1% (v v⁻¹) de hipoclorito de sódio (NaOCl), acrescido de 0,1% (v v⁻¹) de Tween® 20.

As sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo 40 ml de meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) com macronutrientes reduzidos pela metade, contendo 2 g L⁻¹ de carvão ativado. Em cada placa foram semeadas 300 ± 50 sementes e 12 repetições. A germinação das sementes ocorreu, durante oito semanas. As condições de cultivo foram: o meio foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,6 g L⁻¹ de ágar (Himedia, Mumbai, Índia), sacarose a 3% (p / v) e o pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N antes da adição de ágar. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120 ° C. As culturas foram mantidas em temperatura de 25 ± 2 °C/ 18 ± 2 °C (dia/noite), fotoperíodo de 16

horas e intensidade luminosa de $29,09 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, essas condições foram as mesmas para a etapa de aplicação da técnica de TCL e alongamento.

3.2.2 Produção de biomassa e extração aquosa

A espécie *Messastrum gracile* foi obtida da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar). As microalgas foram cultivadas em um fotobiorreator durante 14 dias em sala climatizada ($23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), em regime fotoautotrófico com iluminação contínua e intensidade luminosa de $155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ usando meio de cultivo BBM (NICHOLS; BOLD, 1965). A biomassa de *M. gracile* produzida foi recuperada por floculação utilizando quitosana como agente floculante (Corrêa *et al.*, 2018), concentrando a biomassa microalgal em até 5 % do volume original. Após floculação o concentrado de microalgas foi separado do meio de cultivo residual através de centrifugação a $2600 \times g$ por 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, seguido de congelamento e liofilização. A biomassa seca de *Chlorella vulgaris* foi adquirida em uma loja especializada em produtos naturais na cidade de Curitiba, Brasil.

A biomassa de ambas as espécies foi utilizada para obtenção dos extratos aquosos, com suspensão da biomassa em água ultrapura a 10 % (m v^{-1}), sob agitação mecânica e temperatura ambiente por 1 h. Após a extração, a amostra foi centrifugada a $2600 \times g$ por 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante (extrato aquoso) foi reservado e o precipitado (biomassa residual) suspenso novamente em igual volume de água para repetição do procedimento, a fim de maximizar a eficiência de extração. Após a segunda etapa de extração os dois volumes de extrato aquoso foram reunidos, congelados e secos por liofilização, originando extratos EM e EC de *M. gracile* e *C. vulgaris*, respectivamente.

3.2.3 Composição da biomassa e extratos microalgais

Vinte miligramas de biomassa liofilizada de ambas as espécies foram submetidas à hidrólise com 1 mL de H_2SO_4 (80%, v v^{-1}) por 20 h, seguido de adição de 9 mL de água e centrifugação para a 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação dos carboidratos totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). As proteínas foram determinadas pelo método

colorimétrico de Bradford (1976), com hidrólise prévia da biomassa liofilizada utilizando NaOH 1 M, de acordo com metodologia descrita por Ma *et al.* (2016). Lipídeos totais foram extraídos usando uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v v), (Bligh e Dyer 1959).

Os fitormônios presentes no extrato aquoso foram determinados por HPLC-MS, usando padrões analíticos de auxinas, citocininas, giberelinas e do ácido abscísico para referência e comparação dos tempos de retenção. Ácido fórmico (85%, v v⁻¹), acetonitrila (99,9%, v v⁻¹) e água ultrapura foram utilizados para compor a fase móvel, que consistia de dois solventes: (A) acetonitrila e ácido fórmico (0,1%, v v⁻¹); (B) água ultrapura e ácido fórmico (0,01%, v v⁻¹). A análise foi realizada em um HPLC (Shimadzu), equipado com coluna cromatográfica Ascentis® C18 (15 cm x 2,1 mm, 3 µm), acoplado a espectrômetro de massas Bruker MicrOTOF-Q II XL, com fonte de ionização por eletrodispersão (eletrospray – 100 eV) e gás nebulizador nitrogênio (4 Bar, 200 °C), utilizando os seguintes parâmetros cromatográficos: volume de injeção (10 µL); fluxo (0,4 L min⁻¹); temperatura (40 °C) e fase móvel com gradiente de solventes A e B. (0 min - 3%: 97%; 8 min - 30%: 70%; 10 min - 50%: 50%; 14 min - 80% : 20%; 20 min - 3%: 97%).

3.2.4 Aplicação da técnica Thin cell layer (TCL)

Foram realizadas secções transversais e longitudinais (1 mm de espessura) dos protocormos (com dois meses de idade). Os explantes foram inoculados no meio de cultura MS/2 (explantes apicais com a região da secção em contato com o meio, explantes basais, longitudinais e inteiros com a região basal do protocormo em contato com o meio), contendo: 1- extrato da alga *Messastrum gracile* (EM), 2- biomassa da alga *Messastrum gracile* (BM), 3- extrato da alga *Chlorella vulgaris* (EC), 4- biomassa da alga *Chlorella vulgaris* (BC), em concentrações de 0, 0,5, 1,0, e 4,0 g L⁻¹, 5- Zeatina (ZEA), 6- Thidiazuron (TDZ) e 7- 6-benzilaminopurina (BAP) em concentrações de 0, 0,5, 1,0, e 4,0 mg L⁻¹. Foram inoculados quatro explantes de cada secção (apical, basal, longitudinal e inteiro) por placa de Petri e 15 repetições por tratamento.

Foi realizado um subcultivo após 12 semanas do cultivo inicial, os explantes foram inoculados nos mesmos meios de cultura contendo as mesmas concentrações do extrato e biomassa das microalgas e dos reguladores vegetais, e permaneceram

por mais 12 semanas em sala de cultivo nas mesmas condições anteriores. As avaliações da porcentagem de explantes regenerando estruturas semelhantes a protocormos (PLBs), o número médio de PLBs por explante, e a porcentagem de formação de plantas, foi realizada após 24 semanas.

3.2.5 Alongamento e formação de raízes

Os PLBs regenerados ou plantas obtidas tiveram suas raízes cortadas e passaram para etapa de alongamento, onde foram cultivadas em frascos (6,2 cm x 12,5 cm, com 40 ml de meio de cultura), contendo meio MS/2, somente com 2 g L⁻¹ de carvão ativado. As siglas dos tratamentos (BAP, TDZ, ZEA, EM, EC, BM e BC) foram mantidas do cultivo da TCL, para facilitar a identificação no período de alongamento. Foram inoculados cinco explantes em cada frasco e cinco repetições por tratamento. Após 12 semanas, foram selecionadas aleatoriamente 10 plantas de cada tratamento e foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento médio da parte aérea, das raízes e comprimento total da planta, índice de crescimento da parte aérea, foi calculado usando a fórmula comprimento final - comprimento inicial / comprimento inicial.

Foi realizado um subcultivo para os explantes longitudinais que estavam em meios suplementados com BAP, TDZ e ZEA, na concentração de 4,0 mg L⁻¹, pois os explantes cultivados com TDZ apresentavam menor comprimento total comparado com a suplementação de microalgas (Figura 6A). As raízes, quando presentes, foram cortadas. Foram cultivados cinco frascos com cinco explantes individuais por frasco e outros cinco frascos com cinco grupos com 3 PLBs por frasco. Foram testados meios MS/2, com e sem a adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado. Foi avaliada a porcentagem de explantes que formaram raízes em seis semanas e 12 semanas, o comprimento de parte aérea, raiz e total após 12 semanas.

3.2.6 Transplântio e aclimatização

Após 12 semanas do alongamento e desenvolvimento de raízes, as tampas dos frascos foram abertas na sala de cultivo por dois dias. As plantas, foram plantadas em bandeja de semeadura de polipropileno, (52,5 x 26,5 x 5,1 cm), com

112 células, contendo *Sphagnum* sp. como substrato. Foram plantados três indivíduos por célula da bandeja.

As plantas foram regadas todos os dias durante uma semana. A frequência da rega foi diminuída gradativamente, até atingir uma rega semanal durante 12 semanas. As plantas permaneceram em casa de vegetação com temperatura ambiente de 22 ± 10 °C, umidade de 85 % e luminosidade natural de $38,82 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas a cada quatro semanas, por um período de 12 semanas.

3.2.7 Análise estatística

Na técnica TCL *in vitro*, o delineamento experimental foi em blocos casualizados com tratamentos EM, BM, EC, BC, ZEA, BAP, TDZ em esquema fatorial (4 x 4), resultante da combinação de quatro tipos de explantes (apical, basal, longitudinal e inteiro), e do meio de cultura MS/2, contendo extratos ou biomassas de duas microalgas em quatro concentrações: 0, 0,5, 1,0, e 4,0 g L⁻¹, e outros três blocos (3 x 4): 4- ZEA, 5- BAP e 6- TDZ nas concentrações de: 0, 0,5, 1,0, e 4,0 mg L⁻¹.

Para explorar os resultados das variáveis respostas (porcentagem de explantes que regeneraram PLBs, e número médio de PLBs por explante) e variáveis preditoras (meios de cultura com extrato ou biomassa de microalgas, ou reguladores vegetais, tipos de secções e concentrações) os dados foram ajustados por Modelos Lineares Generalizados (GLM) e as diferentes variáveis foram analisadas usando a distribuição Poisson.

No alongamento o delineamento experimental foi em blocos casualizados com tratamentos EM, BM, EC, BC em esquema fatorial (4 x 4), BAP, ZEA e TDZ em esquema fatorial (3 x 4), as variáveis respostas foram: comprimento da parte aérea, comprimento de raízes e comprimento total. No subcultivo do alongamento em esquema fatorial (3 x 3), as variáveis respostas foram: porcentagem de plantas que formaram raízes e comprimento da parte aérea, comprimento de raízes e comprimento total. Os dados foram ajustados para Modelos Lineares Generalizados (GLM) e as diferentes variáveis foram analisadas usando a distribuição Poisson.

Todas as análises estatísticas foram feitas na plataforma R, versão 3.5, com os pacotes vegan (Oksanen *et al.* 2016), car (Fox e Weisberg, 2011), lme4 (Bates *et*

al. 2015) e nlme (Pinheiro *et al.* 2016). Os testes *post-hoc* (teste de Tukey com $p < 0,01$) foram feitos com o pacote glht (Hothorn *et al.* 2016).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Composição bioquímica microalgal

Na análise da biomassa e dos extratos aquosos de ambas as espécies de microalgas foram observados que os teores de carboidratos totais foram semelhantes entre as biomassas e extratos microalgais, sendo superior na espécie *M. gracile*, tanto nas análises realizadas na biomassa quanto nos extratos aquosos. Para o teor de proteínas hidrossolúveis totais, a biomassa de *C. vulgaris* apresentou teor mais elevado do que o observado na biomassa de *M. gracile*, entretanto, essa tendência é invertida na análise dos extratos aquosos. Os teores de lipídeos totais foram determinados utilizando somente as biomassas, uma vez que os extratos aquosos foram obtidos sem o uso de solventes orgânicos, favorecendo a extração apenas de moléculas polares. A biomassa de *M. gracile* apresentou teor de lipídeos aproximadamente 10% superior a *C. vulgaris*. As análises de HPLC-MS para determinação dos fitormônios somente permitiu a identificação da citocinina zeatina, com o maior teor registrado no extrato aquoso de *M. gracile* (Tabela 1).

3.3.2 Thin cell layer

No cultivo *in vitro*, as secções de TCL formaram PLBs a partir de quatro semanas, independente da adição de microalga ou regulador vegetal. O TCL apical apresentou maior porcentagem de explantes que regeneraram PLBs ($X^2 = -0,51$; $df = 1423$; $p = 0,001$, Fig 2). O tipo de secção de TCL apical, basal e TCLI não influenciou no número médio de PLBs ($X^2 = 1,16$; $df = 1255$; $p = 0,50$, Fig 2). No entanto, nos protocormos inteiros só foram visualizados PLBs após 16 semanas de cultivo e apresentaram menores porcentagens de explantes que regeneraram PLBs ($X^2 = -1,32$; $df = 1423$; $p < 0,0001$) e o menor número médio de PLB por explante ($X^2 = -4,33$; $df = 1255$; $p < 0,0001$, Figs 2A e 2B). A principal resposta obtida com protocormos inteiros foi a de formação de plantas. A adição de BM e ZEA apresentou resultado

significativamente superior na formação de plantas ao obtido com suplementação de BC, EC ou TDZ ($X^2= 1,80$; $df= 419$; $p<0,0001$, Fig 3).

A adição de extrato ou biomassa de microalgas e de reguladores vegetais promoveram respostas de regeneração de PLBs (Fig 4A). Explantes cultivados em meio suplementado com BM apresentaram maior porcentagem de regeneração de PLBs (59 %), quando comparada com a obtida com adição de EC, BC e ZEA, ($X^2= 0,77$; $df= 1423$; $p=0,004$, Fig 4A). O número médio de PLBs, obtido no meio suplementado com TDZ (18 PLBs por explante), foi significativamente superior ao do meio com outros reguladores vegetais (BAP e ZEA), ou de extratos e biomassas de microalgas (EM, EC, BM e BC), ($X^2= 11,55$; $df= 1255$; $p<0,0001$, Fig 4B).

As concentrações testadas para avaliar a porcentagem de regeneração de PLBs não apresentaram diferenças entre as concentrações de reguladores ($X^2= 0,48$; $df= 299$; $p=0,94$) e microalgas ($X^2= 0,19$; $df= 299$; $p=0,29$) e entre a mesma concentração de diferentes reguladores ($X^2= 0,07$; $df= 299$; $p=0,09$, Fig 5A). Há diferença da porcentagem de regeneração de PLBs quando comparamos a mesma concentração de diferentes microalgas, a porcentagem obtida no meio com 1 g L⁻¹ de BM foi superior à do EC, e com adição de 4 g L⁻¹ de BC a porcentagem foi inferior à das outras microalgas (EM, EC e BM, $X^2= 1,92$; $df= 299$; $p<0,0001$, Fig 5A).

Em relação ao número médio de PLBs por explantes, as concentrações de TDZ (0,5, 1 e 4 mg L⁻¹) não apresentaram diferença significativa entre si ($X^2= -2,09$; $df= 127$; $p<0,0001$), e para BAP e ZEA a melhor concentração foi a de 4 mg L⁻¹ (BAP: $X^2= -7,43$; $df= 127$; $p<0,0001$, ZEA: $X^2= -5,29$; $df= 207$; $p<0,0001$, Fig 5B). Os números médios de PLBs obtidos com 0,5 e 1 mg L⁻¹, TDZ foram superiores aos dos meios com BAP e ZEA, e para a concentração de 4 mg L⁻¹ não houve diferença entre os reguladores. As microalgas apresentaram diferença do número médio de PLBs por explante, para EM a concentração de 0,5 g L⁻¹ foi superior a de 4 g L⁻¹, para BC a concentração de 4 g L⁻¹ foi inferior as outras (0, 0,5 e 1 g L⁻¹), e para EC e BM não há diferença entre as concentrações (BC: $X^2= -9,50$; $df= 271$; $p<0,0001$, EC: $X^2= 5,87$; $df= 271$; $p=0,001$). O número médio de PLBs do meio com 1 g L⁻¹ de BC foi superior ao do meio com a mesma concentração de BM ($X^2= 8,91$; $df= 271$; $p=0,005$), enquanto que com 4 g L⁻¹ de BM, o número de PLBs foi superior ao de EC e BC ($X^2= 5,69$; $df= 721$; $p<0,0001$, Fig 5B).

3.3.3 Alongamento e formação de raízes

Explantos dos tratamentos BM e BC apresentaram maior comprimento total (BM: 7,2 cm, $X^2= 1,33$; $df= 972$; $p<0,0001$, BC: 6,5 cm, $X^2= -1,46$; $df= 972$; $p<0,0001$) em comparação ao do meio com TDZ ($X^2= -1,48$; $df= 972$; $p<0,0001$, Fig 6A). O comprimento total apresentou diferença entre as concentrações do mesmo tratamento para reguladores, para BAP a ausência de regulador foi superior ao dos meios contendo 0,5 e 1 mg L⁻¹, mas não diferiu da concentração de 4 mg L⁻¹ ($X^2= 3,39$; $df= 242$; $p<0,0001$), para TDZ a ausência de regulador foi superior a todas as concentrações (0,5, 1 e 4 mg L⁻¹, $X^2= 5,89$; $df= 242$; $p<0,0001$, Fig 6B). Entre as concentrações de diferentes reguladores, os comprimentos totais dos meios com BAP e ZEA foram superiores ao dos meios com TDZ ($X^2= -1,39$; $df= 242$; $p<0,0001$, Fig 6B). Para o comprimento total em meios suplementados com microalgas, com 4 g L⁻¹ de BM o comprimento foi superior ao do controle e de 0,5 g L⁻¹ ($X^2= 1,47$; $df= 242$; $p<0,0001$, Fig 6B). Há diferença de comprimento total em meio com a mesma concentração de microalgas, com 4 g L⁻¹ de BM, o comprimento foi superior ao da mesma concentração de outras microalgas (EM, EC e BC, $X^2= 2,65$; $df= 242$; $p<0,0001$), e na concentração de 1 g L⁻¹ BM foi superior ao comprimento total de 1 g L⁻¹ de EM e EC ($X^2= -0,04$; $df= 242$; $p=0,03$, Fig 6B). Os meios suplementados com ZEA, EC e BM apresentaram o comprimento de raiz superior ao de BAP e TDZ ($X^2= 0,91$; $df= 243$; $p<0,0001$, Fig 6C).

O índice de crescimento da parte aérea do meio que continha BAP e BC foi superior ao dos meios com TDZ, ZEA e EM (BAP: $X^2= 0,58$; $df= 972$; $p=0,003$, BC: $X^2= -0,45$; $df= 972$; $p<0,0001$, Fig 6D). As melhores respostas ocorreram com 0,5 e 1 mg L⁻¹ de BAP ($X^2= -0,69$; $df= 242$; $p<0,0001$, $X^2= -1,28$; $df= 242$; $p<0,0001$, respectivamente, Fig 6E). Há diferença entre concentração de diferentes reguladores, nas concentrações de 0,5 e 1 mg L⁻¹ BAP, o índice de crescimento foi superior ao de ZEA e TDZ ($X^2= -1,11$; $df= 242$; $p=0,002$, $X^2= -0,99$; $df= 242$; $p<0,0001$, respectivamente), na concentração de 4 mg L⁻¹ de BAP e ZEA, os índices foram superiores ao de TDZ ($X^2= -0,39$; $df= 242$; $p<0,0001$, Fig 6E). Para microalgas, o maior índice de crescimento foi com 0,5 g L⁻¹ de EM foi superior ao das outras concentrações (0, 1 e 4 g L⁻¹, EM: $X^2= -0,27$; $df= 242$; $p=0,01$), para EC a concentração de 4 g L⁻¹ foi superior ao controle, o índice de crescimento de 4 g L⁻¹ de BM foi superior ao das outras concentrações (0, 0,5 e 1 g L⁻¹, $X^2= 2,10$; $df= 242$;

$p < 0,0001$), e o índice de crescimento de BC não apresentou diferença entre as concentrações ($X^2 = 1,91$; $df = 242$; $p = 1,000$, Fig 6E). Há diferença entre concentração de diferentes microalgas, com adição de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e de BC, o índice de crescimento foi superior ao das outras microalgas (EM, EC e BM, $X^2 = -1,19$; $df = 242$; $p < 0,0001$), na concentração de 1 g L^{-1} o índice de BC foi superior ao de EM ($X^2 = -0,07$; $df = 242$; $p = 0,02$) e na concentração de 4 g L^{-1} BM foi superior ao EM ($X^2 = -0,38$; $df = 242$; $p < 0,0001$).

Explantos cultivados na TCL em meio com 4 mg L^{-1} de TDZ, 57,5 % não formaram raízes no período de doze semanas de alongamento. No subcultivo do alongamento sem os reguladores, as raízes só foram formadas após seis semanas. A porcentagem de explantes que formaram raízes apresentou diferença significativa entre as semanas, com exceção de explantes vindos de meio com BAP ($X^2 = 13,42$; $df = 59$; $p = 0,85$), e entre os tratamentos ($X^2 = 44,67$; $df = 59$; $p < 0,0001$) (Tabela 2). Na presença do carvão ativado, os brotos provenientes de meio com BAP e ZEA apresentaram formação de raízes superior ao tratamento prévio com TDZ após seis e doze semanas se cultivo (BAP: $X^2 = -35,11$; $df = 59$; $p < 0,0001$, ZEA: $X^2 = -7,28$; $df = 59$; $p < 0,0001$). Os brotos subcultivados para meio na ausência do carvão, as porcentagens de enraizamento dos explantes provenientes de meio com BAP foram superiores às de ZEA e TDZ após seis semanas ($X^2 = -6,28$; $df = 59$; $p < 0,0001$, Tabela 2). Não houve diferença significativa de porcentagens de enraizamento entre explantes individuais cultivados na presença ou ausência de carvão, ($X^2 = 41,79$; $df = 59$; $p = 0,99$, Fig 7A). Após seis semanas de subcultivo, tufos com 3 PLBs cultivados em meio com carvão provenientes de tratamentos com ZEA e BAP apresentaram maior porcentagem de raízes comparado com os cultivados em meio sem carvão (TDZ: $X^2 = -37,17$; $df = 59$; $p < 0,0001$, ZEA: $X^2 = 2,62$; $df = 59$; $p < 0,0001$, Fig 7B).

Não há diferença entre explantes individuais ou em tufos com 3 PLBs quando foi avaliado o comprimento de parte aérea, de raiz e total das plantas após 12 semanas do subcultivo ($X^2 = 0,91$; $df = 59$; $p = 0,199$, Tabela 3). Explantes cultivados em meio com adição de carvão, apresentaram maior comprimento de parte aérea para BAP e comprimento total para ZEA ($X^2 = 1,53$; $df = 59$; $p < 0,0001$, Tabela 3). Brotos formados em meios com BAP apresentaram maior comprimento da parte aérea (4,19 cm), de raízes (4,11 cm) e comprimento total (8,30 cm) na presença de carvão ativado do que os brotos formados em meio com TDZ e ZEA ($X^2 = 2,55$; $df = 59$; $p < 0,0001$, Tabela 3). O menor comprimento total (3,62 cm) foi obtido com

plantas cultivadas previamente em meio com BAP e ZEA ($X^2= -0,93$; $df= 59$; $p<0,0001$, Tabela 3).

3.3.4 Porcentagem de sobrevivência de plantas

Na etapa de transplântio e aclimatização, as plantas cultivadas na etapa de TCL com BAP e com as microalgas (EM, EC, BM e BC) apresentaram maiores porcentagens de sobrevivência, quando comparadas com às de TDZ e ZEA ($X^2= -2,32$; $df= 215$; $p<0,0001$, Fig 8A).

Para plantas provenientes de tratamento com TDZ, as cultivadas na ausência de regulador apresentaram maior porcentagem de sobrevivência quando comparadas com à de outras concentrações (0,5, 1 e 4 mg L⁻¹, $X^2= 6,00$; $df= 54$; $p=0,02$), para as tratadas com 1 mg L⁻¹ ZEA a porcentagem de sobrevivência foi maior do que com 0,5 mg L⁻¹ ($X^2= 3,70$; $df= 54$; $p=0,04$), e o tratamento prévio com BAP não interferiu na porcentagem de sobrevivência das plantas ($X^2= 0,98$; $df= 54$; $p=0,64$, Fig 8B). Há diferença entre a concentração de diferentes reguladores, na concentração de 0,5 e 4 mg L⁻¹, a porcentagem de sobrevivência de plantas provenientes de meio com BAP foi superior a de meio com TDZ e ZEA ($X^2= -2,33$; $df= 54$; $p<0,0001$, $X^2= -4,11$; $df= 54$; $p<0,0001$), na concentração de 1 mg L⁻¹ porcentagem de sobrevivência de plantas provenientes de meio com BAP foi superior a de meio com TDZ ($X^2= -1,05$; $df= 54$; $p<0,0001$, Fig 8B). A porcentagem de sobrevivência de plantas provenientes de meio com 1 g L⁻¹ de EM foi superior a do meio com 4 g L⁻¹ ($X^2= 2,60$; $df= 54$; $p=0,02$) e não há diferença entre a porcentagem de sobrevivência das diferentes concentração de microalgas ($X^2= 1,31$; $df= 54$; $p=0,99$, Fig 8B).

3.4 DISCUSSÃO

A ação das microalgas no cultivo de *C. labiata*, está relacionada com a presença da zeatina nos extratos e biomassas de *C. vulgaris* e *M. gracile*. O maior nível de zeatina (56,6 µg g⁻¹) foi encontrado no extrato de *M. gracile*, possibilita a utilização em meios de cultura para promover o crescimento de plantas (Reinsch 1867; Korshikov 1953; Silva *et al.* 2016). A ZEA é uma citocinina que foi encontrada em linhagens de 17 espécies de microalgas da família Chlorophyceae (Stirk *et al.* 2013).

Além da citocininas, também foram encontrados níveis altos (444 e 221 mg g⁻¹) de proteínas e de lipídios (145 e 159 mg g⁻¹) nas biomassas das microalgas (BM e BC) (Lv *et al.*, 2010), já os níveis de carboidratos foram maiores (281 e 272 mg g⁻¹) em *M. gracile*. Foram encontrados em espécies de *Chlorella* compostas principalmente por 60 % de proteínas, 18 % de carboidratos e 10 % de lipídeos. Além disso, as microalgas apresentam em sua composição minerais, vitaminas, aminoácidos e polipeptídeos, componentes que auxiliam o cultivo de plantas *in vitro* (Henrikson, 2009). A composição complexa de microalgas poderia promover o crescimento das plantas com resultados semelhantes de reguladores sintéticos, como resultados com *C. labiata* com suplementação de BM. Os melhores resultados da biomassa comparados ao extrato de *M. gracile* mostram que o procedimento de extração tem menor custo nas etapas do processo. As aplicações de uso dos bioativos de microalgas podem incentivar a produção em larga escala e reduzir os custos das substâncias bioativas em uma propagação em massa.

A suplementação de 0,5 g L⁻¹ de BM no meio de cultura apresentou maior porcentagem de regeneração de PLBs (59 %) e número médio de 4 PLBs por explante e a suplementação com *C. vulgaris* (BC e EC) formou em média 35 % de regeneração e número médio de 8 PLBs por explante. Quando comparado com estudo similar ao nosso, *Chlorella sorokiniana* apresentou número médio de 2,2 PLBs por explantes, sendo superior quando comparado com a adição de BAP, na multiplicação de *Schomburgkia crispera*, devido a composição de macro e micronutrientes e fito-hormônios como as citocininas presentes nas algas (Pereira *et al.* 2018), no presente estudo as microalgas estimularam a formação de número médio de PLBs superior ao número médio de PLBs de *Schomburgkia crispera*, porém como são espécies diferentes o número médio de PLBs pode apresentar diferença.

A técnica de TCL aplicada a protocormos, obtidos da germinação *in vitro* de sementes, é uma alternativa eficiente para a propagação *in vitro* de plantas de *C. labiata*. As secções de TCL apresentaram maior capacidade de regeneração de PLBs e maior número médio de PLBs por explante, quando comparado com protocormos inteiros, pois os explantes apresentam maior contato com o meio e por isso tem a capacidade de absorver nutrientes do meio de cultura, possibilitando melhor resposta de regeneração e propagação massal da espécie (Tran Thanh Van 2003; Da Silva, 2013). As divisões rápidas ocorrem naturalmente na zona meristemática de protocormos, permitindo melhores respostas aos reguladores de

crescimento de plantas aplicados exogenamente (Yeung 2017). Sua maior produtividade em comparação com os explantes convencionais tornou os TCLs continuamente relevantes e úteis na pesquisa básica e aplicada das plantas (Teixeira da Silva e Dobránszki 2019). Outro estudo evidenciou o sucesso no uso do TCLt quando comparado com protocormos inteiros de *Cymbidium*, apresentando 83 % de regeneração e 5 PLBs por explante (Vyas *et al.* 2010).

No presente estudo, os protocormos inteiros formaram porcentagem inferior de PLBs, quando comparados com as secções de TCL, pois utilizam a energia para formação de raízes, tornando-se plantas (Teixeira e Silva, 2014). A maior porcentagem de formação de plantas, a partir de protocormos inteiros, ocorreu em meio suplementados com *M. gracile* (EM e BM) ou com reguladores BAP e ZEA. Quando a produção de plantas é o objetivo principal e não a propagação em massa, o cultivo de protocormos inteiros em meio de cultura MS/2 com a adição de BM de *M. gracile* permite uma alta porcentagem de formação de plantas e é vantajoso quando comparado com a adição de ZEA, que é uma citocinina muito cara. Além disso, a produção de mudas de orquídeas na natureza é muito difícil, as sementes possuem baixa germinação (menos de 1%) (Mondal e Banerjee 2017); portanto, a germinação assimétrica é a melhor alternativa, o embrião primeiro se transforma em um protocormo antes de formar uma planta (Yeung 2017).

A suplementação de 1 mg L⁻¹ de BAP no meio de cultura favoreceu maior porcentagem de regeneração (45 %) entre os reguladores testados e apresentou elevado número médio de PLBs (11 PLBs por explante), comparado com TDZ e ZEA. Resultados inferiores foram obtidos com BAP em mesma concentração para *Cattleya forbesii*, no meio semi-sólido, formando número médio de 2,1 PLBs por explante (Ekmekçigil *et al.* 2019). Em *Cymbidium finlaysonianum* Lindl apresentou número médio de 5,2 PLBs, porém a regeneração foi superior (85,7 %) a *C. labiata* (RITTIRAT *et al.*, 2018). Essa diferença de resultados pode ter relação ao meio de cultura utilizado, meio líquido, Vacin and Went (VW), que apresenta composição de macro e micronutrientes diferente quando comparado ao MS/2 utilizado em *C. labiata*.

O uso de reguladores de crescimento na técnica TCL indicou que a adição de BAP ao meio de cultura para protocormos de *C. labiata* foi benéfica, pois permitiu a formação de um alto número de PLBs por explante (20 PLBs) e um aumento desse número em concentrações altas de BAP (4 mg L⁻¹). Os TCLs cultivados em meio

suplementado com a mesma concentração de TDZ (4 mg L⁻¹) apresentaram o maior número médio de PLBs por explante (27 PLBs), apesar de não haver diferença significativa entre esse resultado e o número médio de PLBs obtidos com a mesma concentração de BAP. Resultado semelhante foi obtido por Pereira et al. (2018), que recomendaram a adição de 5 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura WPM para induzir brotações de *Schomburgkia crispa*. Entretanto, neste estudo, a microalga *Chlorella sorokiniana* não apresentou efeito positivo nessa etapa, enquanto que com *C. labiata*, a adição de BM ou BAP ao meio de cultura MS / 2 é uma alternativa para otimizar a produção de PLBs. Sendo assim, a melhor concentração de BAP pode variar de acordo com a espécie, idade ou tipo de explante e meio de cultura utilizado. As protocormos de *C. labiata* também mostraram uma boa resposta no meio MS/2, sem reguladores de crescimento ou bioestimulantes e ocorreu regeneração de PLBs (40% e 3,5 PLBs por explante). A capacidade das células protocormos apicais se dividirem os torna explantes ideais para micropropagação (Yeung 2017) e protocormos de diferentes idades (de um mês a seis meses) foram explantes responsivos para espécies de orquídeas, conforme relatado para outras espécies, como *Brasilidium forbesii* (Gomes et al. 2015) e *Hadrolaelia grandis* (Vudala et al. 2019).

O meio suplementado com TDZ apresentou 18 PLBs por explante, o maior número médio de PLBs entre os tratamentos, e com baixa porcentagem de regeneração (37 %). Esse regulador também foi eficaz na formação de PLBs em estudos com outros gêneros, como em *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*, que apresentou 3,3 PLBs por explante e 46 % de regeneração (Wattanapan et al., 2018), e em *Dendrobium aqueum* Lindley, que apresentou 2,4 PLBs por explante e 100 % de regeneração (Parthibhan et al., 2015). Apesar da regeneração ser superior, o número médio foi inferior ao de *C. labiata*.

Por causa da baixa porcentagem de formação de raízes e menor comprimento aéreo e total de explantes cultivados com TDZ na etapa de TCL, foi realizado um subcultivo do alongamento, para comparar a porcentagem de formação de raízes entre os reguladores. Explantes individuais que cresceram em um meio contendo TDZ tiveram 20% de enraizamento após seis semanas e 64% após 12 semanas, enquanto foram de 76 e 88% para aqueles cultivados na presença de ZEA e BAP no estágio TCL, respectivamente, após 6 semanas e 96%, após 12 semanas. Além disso, o comprimento total das plantas provenientes de um meio com TDZ foi

reduzido, indicando um efeito inibitório do TDZ, mesmo após a subcultura em um meio suplementado com carvão ativado. De acordo com Dewir et al. (2018) a perda da capacidade de enraizamento é devida aos efeitos de transição do TDZ quando usado no estágio de multiplicação da parte aérea que depende da concentração de TDZ. O TDZ é altamente estável devido ao seu metabolismo lento e resistência à citocinina oxidase, e melhora a síntese de citocininas do tipo adenina, modula hormônios endógenos e exibe atividades auxinas e citocininas. A concentração adequada e ideal de TDZ é específica da espécie (Dewir et al. 2018). Em nosso estudo com *C. labiata*, foram testadas concentrações de 0,5, 1,0 e 4,0 mg L⁻¹ de TDZ e a inibição de processos morfogênicos ocorreu independentemente da concentração. É possível que o uso de TDZ em baixas concentrações, tratamento com pulso e curtos períodos de exposição sejam estratégias eficazes para evitar anormalidades induzidas por TDZ, conforme recomendado por Dewir et al. (2018).

No alongamento, os explantes cultivados na etapa de TCL com BM ou BC apresentaram maior comprimento de raiz (3,0 e 2,5 cm, respectivamente) e total da planta (7,0 e 6,5 cm, respectivamente), comparados com TDZ que apresentou comprimento inferior (1,7 cm de raiz e 4 cm de comprimento total). Outro estudo com orquídea mostra ótimos resultados, promovendo maior crescimento de raiz (1,5 cm) e total (2,2) de *Schomburgkia crispera*, quando o meio foi suplementado com a microalga *Chlorella sorokiniana* (Pereira et al. 2018).

As plantas de *C. labiata* não precisam de auxinas para o enraizamento e o meio de cultura contendo carvão ativado (2 g L⁻¹) promoveu simultaneamente o alongamento e o enraizamento. Resultados semelhantes foram relatados para espécies de orquídeas como *Brasilidium forbesii* (Gomes et al. 2015) e *Hadrolaelia grandis* (Vudala et al. 2019), para as quais a auxina não era necessária para o enraizamento e a concentração recomendada de carvão ativado variou entre 1 e 3 g L⁻¹. Segundo Thomas (2008), o efeito do carvão ativado no enraizamento tem sido bem-sucedido em muitas espécies, tanto na ausência quanto na presença de auxina. Em nosso estudo, mesmo sem a adição de auxina, as plantas obtidas foram vigorosas. Como o carvão ativado é mais barato que o regulador de crescimento, isso é vantajoso porque reduz o custo do protocolo de micropropagação.

As plantas de *C. labiata* apresentaram alta porcentagem de sobrevivência (superior a 85%) quando foram cultivadas na etapa de TCL em meio suplementado com EC, EM, BC, BM e BAP. A menor porcentagem (40 %), foi de plantas cultivadas

com TDZ, pois 57,7 % dos explantes não possuíam raízes, ou quando possuíam apresentavam comprimento inferior comparado com outros tratamentos, e por causa disso apresentavam dificuldades em absorver água e nutrientes do substrato (Dhiman *et al.*, 2018). É provável que o efeito residual do TDZ, que contém uréia em sua composição, impeça a degradação dessa citocinina, permanecendo nos tecidos das plantas e causando esse efeito indesejável em vários processos morfogênicos (Dhiman *et al.* 2018). *C. labiata* apresentou maior porcentagem de sobrevivência quando comparada com *Cattleya xanthine* (Juras *et al.*, 2019) e gênero diferente de *Anoectochilus elatus* Lindl. (Sherif *et al.*, 2017), que apresentaram 64 % e 68 % de sobrevivência respectivamente, isso pode ter acontecido pela suplementação com microalgas no cultivo *in vitro* (Kumar e Rao, 2012) podem ter favorecido a sobrevivência de *C. labiata*. Outro fator que pode ter influenciado é que plantas de *Cattleya xanthine* foram fertilizadas, a cada 15 dias, com NPK (20:20:20), e plantas de *Anoectochilus elatus* Lindl. foram fertilizadas, a cada três dias, com meio MS líquido, o excesso de nutrientes pode diminuir a porcentagem de sobrevivência do transplântio (Mantovani *et al.*, 2018).

A adição de biomassa e extrato de microalgas teve efeitos positivos em muitas respostas morfogênicas. Maiores porcentagens de regeneração de PLB foram obtidas com BM (52%) e EM (43%), bem como porcentagens de formação de plantas (76% e 60%, respectivamente). O maior comprimento total de plantas foi alcançado na presença de BM (7 cm) e BC (6 cm). O maior índice de crescimento da parte aérea foi obtido com BC (1,9). Os explantes cultivados com extratos e biomassa das microalgas *C. vulgaris* e *M. gracile* nos estádios de TCL apresentaram melhores respostas ao crescimento radicular (> 2,5 cm) e sobrevivência das plantas em casa de vegetação (> 83%). Após análise de todas as variáveis, recomendamos a adição de BM de *M. gracile* no meio de cultura MS/2, tanto para a produção de plantas de protocormos inteiros quanto para a propagação em massa de TCLs de *C. labiata*.

Concentrações mais altas de reguladores (4 mg L⁻¹) favoreceram maior número de PLBs por explante, porém não é recomendado o uso de ZEA ou TDZ, pois além de apresentarem custo mais elevado, comparado com BAP, precisam de mais tempo para a formação de raízes, e após 12 semanas de alongamento não formam plantas capazes de sobreviver ao transplântio, devido ao seu menor comprimento de parte aérea e porcentagem de enraizamento. As microalgas

testadas (EM, EC, BM e BC) podem substituir o uso de reguladores vegetais como (BAP, TDZ e ZEA), não há diferença entre extrato e biomassa, com exceção da biomassa de *M. gracile* que apresentou maior comprimento total no alongamento comparada com o extrato.

Para o cultivo *in vitro* de *Cattleya labiata* é recomendado o uso de BAP ou BM, pois os explantes cultivados com esses suplementos apresentaram maior porcentagem de regeneração e alto número médio de PLBs, resultando em maior quantidade de plantas no final do experimento. Além disso, BAP e BM são similares e apresentaram alto índice de crescimento e comprimento total no período do alongamento e as plantas apresentaram porcentagem de sobrevivência alta no transplântio. Recomenda-se a utilização da concentração de 4 g L⁻¹ para BM e 4 mg L⁻¹ para BAP, pois apresentaram maior porcentagem de regeneração e número médio de PLBs, maior comprimento total no alongamento e maior porcentagem de sobrevivência no transplântio, permitindo no final do experimento a formação do maior número de plantas para a comercialização.

Assim, concluímos que a suplementação de microalgas no meio de cultura é uma alternativa orgânica e eficaz para substituir reguladores sintéticos de plantas. Não há diferença entre extrato e biomassa das microalgas como suplemento nos meios de cultura. Hormônios e compostos orgânicos encontrados nos extratos e biomassa das microalgas otimizam a formação de PLBs nas plantas, pois desencadeiam respostas fisiológicas como os reguladores das plantas. Recomenda-se concentrações altas (4 g L⁻¹) de microalgas para o cultivo *in vitro* de *C. labiata*.

REFERÊNCIAS

- Ahamed Sherif N, Senthil Kumar T, Rao M V. (2017) *In vitro* propagation and genetic stability assessment of an endangered terrestrial jewel orchid *Anoectochilus elatus* Lindl. Indian J Exp Biol 55:853–863
- Araghian S, Bagherzadeh A, Sadrabadi R (2015) Effect of brown algae and vermicompost application on some cherry tomato traits in hydroponic system. Agroecol J 10:77–83
- Arditti J, Michaud JD, Healey PL (1979) Morphometry of Orchid Seeds. I. *Paphiopedilum* and Native California and Related Species of *Cypripedium*. Am J Bot 66:1128–1137. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1979.tb06332.x>
- Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. J Stat Softw. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Beyerinck [Beijerinck] MW (1890) Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Bot Zeitung
- Bhattacharyya P, Paul P, Kumaria S, Tandon P (2018) Transverse thin cell layer (t-TCL)-mediated improvised micropropagation protocol for endangered medicinal orchid *Dendrobium aphyllum* Roxb: an integrated phytomolecular approach. Acta Physiol Plant 40:1–14. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2703-y>
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bose B, Kumaria S, Choudhury H, Tandon P (2017) Insights into nuclear DNA content, hydrogen peroxide and antioxidative enzyme activities during transverse thin cell layer organogenesis and *ex vitro* acclimatization of *Malaxis wallichii*, a threatened medicinal orchid. Physiol Mol Biol Plants 23:955–968. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0474-3>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bumandalai O, Tserennadmid R (2019) Effect of *Chlorella vulgaris* as a biofertilizer on germination of tomato and cucumber seeds. Int J Aquat Biol 7:95–99. <https://doi.org/10.22034/ijab.v7i2.582>
- Caballero-Villalobos L, Silva-Arias GA, Buzatto CR, *et al* (2017) Generalized food-deceptive pollination in four *Cattleya* (Orchidaceae: Laeliinae) species from Southern Brazil. Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants 234:195–206. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.07.014>
- Cazzaniga S, Dall'Osto L, Szaub J, *et al* (2014) Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. Biotechnol Biofuels 7:1–13
- Chen C (2016) Cost analysis of plant micropropagation of *Phalaenopsis*. Plant Cell Tissue Organ Cult 126:167–175. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0987-4>

- Chugh S, Guha S, Rao IU (2009) Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Sci Hortic (Amsterdam)* 122:507–520. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016>
- Da Silva TG, Bock C, Sant'Anna CL, *et al* (2017) *Selenastraceae* (Sphaeropleales, Chlorophyceae): RbcL, 18s rDNA and ITS–2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. *Fottea* 17:1–19. <https://doi.org/10.5507/fot.2016.010>
- De LC, Rao AN, Singh DR (2016) Endangered Orchids and Their Conservation in North East India. In: Purkayastha J (ed) *Bioprospecting of Indigenous Bioresources of North-East India*. Springer Singapore, Singapore, pp 61–75
- Dewir YH, Nurmansyah, Naidoo Y, Teixeira da Silva JA (2018) Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue culture. *Plant Cell Rep* 37: 1451-1470. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2326-1>
- Dhiman N, Gautam N, Sareen B, *et al* (2018) *In vitro* morphogenesis of some himalayan flora using TDZ: A potential plant growth regulator. In: *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, *et al* (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem*. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Ekmekçigil M, Bayraktar M, Akkuş Ö, Gürel A (2019) High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 136:451–464. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1526-2>
- Ernst R, Arditti J (1993) *Micropropagation of Orchids*
- Fay MF (2018) Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Bot Stud* 59:. <https://doi.org/10.1186/s40529-018-0232-z>
- Flora do Brasil 2020 (2019) *Flora do Brasil 2020*. In: *Jard. Botânico do Rio Janeiro*
- Fox J, Weisberg S, Adler D, *et al* (2018) *car: Companion to Applied Regression*. R Packag. Version 2.0-21
- Gomes LRP, Franceschi CRB, Ribas LLF (2015) Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. *Acta Sci Biol Sci* 37:143-149. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v37i2.27276>
- George EF, Hall MA, Klerk GJ De (2008) *Plant propagation by tissue culture* 3rd edition
- Henrikson R (2009) *Earth Food Spirulina - The Complete Guide To A Powerful New Food That Can Help Rebuild Our Health and Restore Our Environment*
- Hossain MM, Kant R, Van PT, *et al* (2013) The Application of Biotechnology to Orchids. *CRC Crit Rev Plant Sci* 32:69–139. <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.715984>
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P, Heiberger RM (2016) Package “multcomp” Title Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical J*

- Johnson TR, Stewart SL, Dutra D, *et al* (2007) Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) - Preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 90:313–323. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9270-z>
- Juras MCR, Jorge J, Pescador R, *et al* (2019) *In vitro* culture and acclimatization of *Cattleya xanthina* (Orchidaceae), an endangered orchid of the Brazilian Atlantic Rainforest. *Rodriguesia* 70:. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970014>
- Kumar K, Rao IU (2012) Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in *ex vitro* conditions - A review. *J Ornament Horticult Plants*
- Lee YI, Hsu S Te, Yeung EC (2013) Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. *Am J Bot* 100:2121–2131. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300193>
- Lopez RG, Runkle ES (2005) Environmental physiology of growth and flowering of orchids. *HortScience* 40:1969–1973. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.7.1969>
- Ma X, Hovy E (2016) End-to-end sequence labeling via bi-directional LSTM-CNNs-CRF. In: 54th Annual Meeting of the Association for Computational Linguistics, ACL 2016 - Long Papers
- Majumder M, Maiti SS, Banerjee N (2010) Direct and Callus-mediated Protocorm-like Body Induction and High Frequency Adventitious Shoot Regeneration in an Endangered Orchid – *Dendrobium farmeri* Paxt . (Orchidaceae)
- Mantovani C, Prado RM, Pivetta KFL (2018) Impact of nitrate and ammonium ratio on nutrition and growth of two epiphytic orchids. *An Acad Bras Cienc*. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820171008>
- Martinelli G, de MM-R de JAJE, (2013) Livro vermelho da flora brasileira
- Mazur H, Konop A, Synak R (2001) Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *J Appl Phycol* 13:35–42. <https://doi.org/10.1023/A:1008199409953>
- Molnár Z, Virág E, Ördög V (2011) Natural substances in tissue culture media of higher plants. *Acta Biol Szeged* 55:123–127
- Mondal T, Banerjee N. (2017) Micropropagation and *in vitro* conservation of threatened orchids: a brief review. *CIBTech J of Biotech* 6:1-12.
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nhut DT, da Silva JA, Van Le B, Van KTT (2003) Thin Cell Layer Morphogenesis as a Powerful Tool in Ornamental Plant Micropropagation and Biotechnology. In: Nhut DT, Van Le B, Tran Thanh Van K, Thorpe T (eds) *Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 247–284
- Nichols HW, Bold HC (1965) *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *J Phycol* 1:34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x>

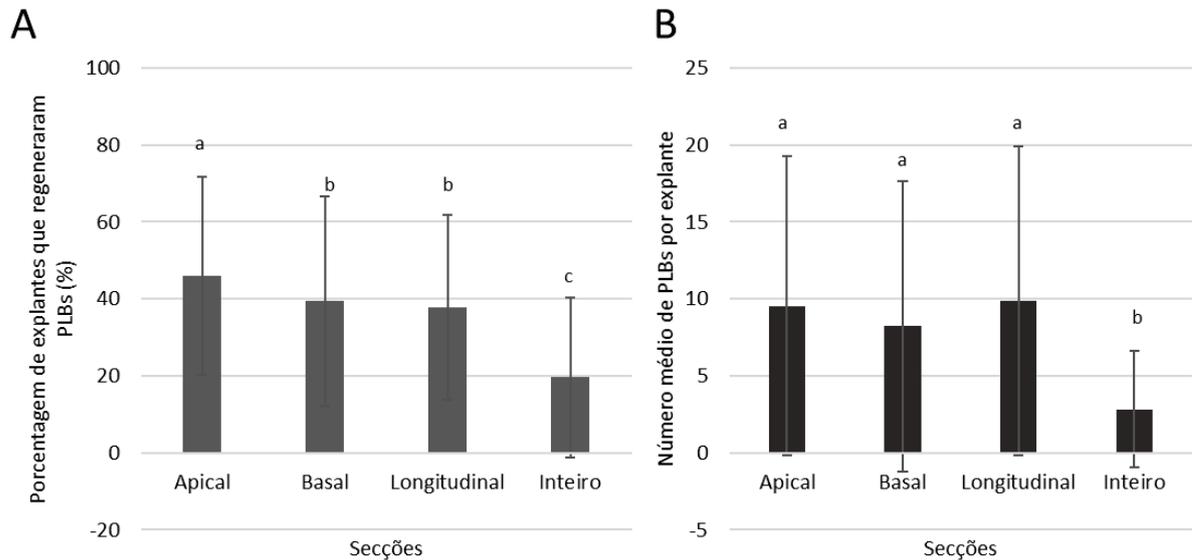
- Nurachman Z, H H, Rahmaniyah WR, *et al* (2015) Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. *Algal Res* 10:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.009>
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, *et al* (2017) Community Ecology Package “vegan”. Version 2.4-3. R Packag.
- Parthibhan S, Rao MV, Teixeira da Silva JA, Senthil Kumar T (2018) Somatic embryogenesis from stem thin cell layers of *Dendrobium aequum*. *Biol Plant* 62:439–450. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0769-4>
- Patterson GW, Krauss RW (1965) Sterols of chlorella. I. The naturally occurring sterols of *Chlorella vulgaris*, *C. ellipsoidea*, and *C. saccharophila*. *Plant Cell Physiol.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a079095>
- Pereira NS, Ferreira BRR, de Carvalho EM, Damiani CR (2018) Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the *in vitro* cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). *J Appl Phycol* 30:2347–2358. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1441-2>
- Pinheiro PO, Lin TY, Collobert R, Dollár P (2016) Learning to refine object segments. In: *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*
- Reinsch P (1867) *Die Algenflora des mittleren Theiles von Franken (des Keupergebietes mit den angrenzenden Partien des jurassischen Gebietes), enthaltend die vom Autor* books.google.com
- Rittirat S, Klaocheed S, Thammasiri K, Prasertsongskun S (2018) *In vitro* propagation and forest reestablishment of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Walailak J Sci Technol* 15:711–724. <https://doi.org/10.14456/vol15iss6pp>
- Roberts DL, Dixon KW (2008) Orchids. *Curr Biol* 18:325–329. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.026>
- Saadaoui I, Sedky R, Rasheed R, *et al* (2019) Assessment of the algae-based biofertilizer influence on date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivation. *J Appl Phycol* 31:457–463. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1539-6>
- Safi C, Zebib B, Merah O, *et al* (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 35:265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Salma L, Aymen EM, Maher S, *et al* (2014) Effect of seaweed extract of *Sargassum vulgare* on germination behavior of two bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L) under salt stress. *IOSR J Agric Vet Sci* 7:116–120. <https://doi.org/10.9790/2380-0721116120>
- Schiff JL (2018) What Are Orchids? In: *Rare and Exotic Orchids*. pp 29–50
- Singh A, Olsen SI (2011) A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. *Appl Energy* 88: 3548-3555. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.012>

- Stirk WA, Bálint P, Tarkowská D, *et al* (2013a) Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiol Biochem* 70:348–353. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.037>
- Stirk WA, Ördög V, Novák O, *et al* (2013b) Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains¹. *J Phycol* 49:459–467. <https://doi.org/10.1111/jpy.12061>
- Teixeira da Silva JA (2013) The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 113:149–161. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0274-y>
- Teixeira da Silva JA, Dobránszki J (2014) Dissecting the Concept of the Thin Cell Layer: Theoretical Basis and Practical Application of the Plant Growth Correction Factor to Apple, *Cymbidium* and *Chrysanthemum*. *J Plant Growth Regul* 33:881–895. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9437-x>
- Teixeira da Silva JA, Dobránszki J (2013) Plant Thin Cell Layers: A 40-Year Celebration. *J Plant Growth Regul* 32:922–943. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9336-6>
- Teixeira da Silva JA, Dobránszki J (2019) Recent advances and novelties in the thin cell layer-based plant biotechnology – a mini-review. *BioTechnologia* 100: 89-96. <https://doi.org/10.5114/bta.2019.83215>
- Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv* 26:618-631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>
- Vudala SM, Padial AA, Ribas LLF (2019) Micropropagation of *Hadrolaelia grandis* through transverse and longitudinal thin cell layer culture. *South African J Bot* 121:76–82. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.017>
- Vyas S, Guha S, Kapoor P, Rao IU (2010) Micropropagation of *Cymbidium Sleeping Nymph* through protocorm-like bodies production by thin cell layer culture. *Sci Hortic (Amsterdam)* 123:551–557. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.020>
- Wattanapan N, Nualsri C, Meesawat U (2018) *In vitro* propagation through transverse thin cell layer (Ttcl) culture system of lady's slipper orchid: *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*. *Songklanakarin J Sci Technol* 40:306–313. <https://doi.org/10.14456/sjst-psu.2018.48>
- Waud M, Busschaert P, Lievens B, Jacquemyn H (2016) Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species. *Fungal Ecol* 20:155–165. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.12.008>
- Yeung EC (2017) A perspective on orchid seed and protocorm development. *Bot Stud* 58:33. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0188-4>

Fig 1 Propagação *in vitro* de *Cattleya labiata*. **a** Indivíduo adulto que cresceu em casa de vegetação. **b-k** Protocorm-like bodies (PLBs) de secções de thin cell layer (TCL), em meio MS/2, suplementados com: **b** 4 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP) após 6 semanas. **c** 4 g L⁻¹ de extrato de *Chlorella vulgaris* (EC), após 8 semanas de cultivo (formação de raízes). **d** 0.5 g L⁻¹ biomass of *Messastrum gracile* (BM), após 24 semanas. **e** 4 mg L⁻¹ BAP, após 24 semanas. **f** 1 mg L⁻¹ thidiazuron (TDZ), após 24 semanas. **g-j** Explantes cultivados após 12 semanas do alongamento e cultivados na etapa de TCL em meio de cultura suplementado com: **g** BM. **h** BAP **i** 4 mg L⁻¹ TDZ **j** Planta cultivada com 4 g L⁻¹ de BM **k** Transplântio das plantas após 12 semanas utilizando *Sphagnum* sp.

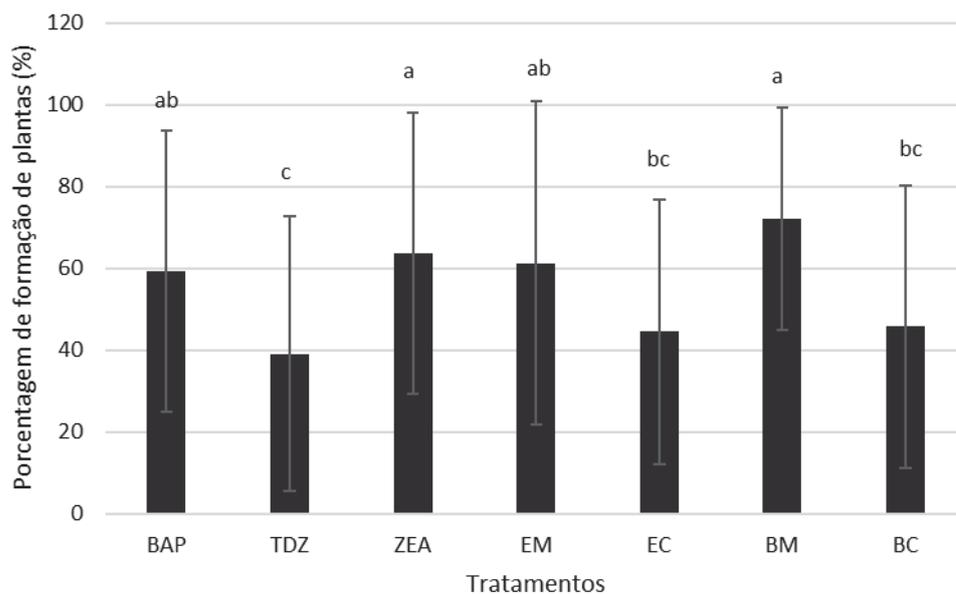


Fig 2 Thin cell layer de *Cattleya labiata*, após 24 semanas de cultivo. **a** Porcentagem de explantes que regeneraram PLBs; **b** Número médio de PLBs por explante, com diferentes tipos de secções de TCL (apical, basal, longitudinal) ou protocormos inteiros. Os valores são significativos pelo Teste Tukey a nível 5% de probabilidade



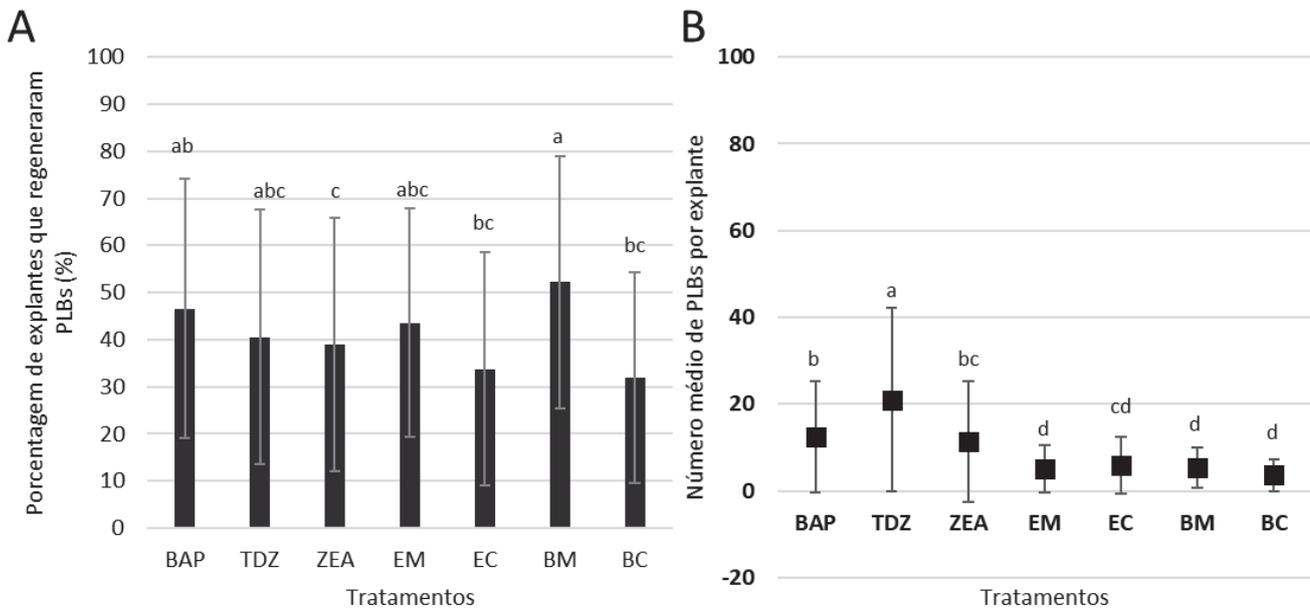
Letras indicam a comparação entre as secções. Letras iguais indicam que não há diferença significativa após comparação par a par.

Fig 3 Porcentagem de formação de plantas a partir de protocormos inteiros de *Cattleya labiata*, após 24 semanas de cultivo, inoculados em meio MS/2 contendo diferentes reguladores: BAP - 6-benzilaminopurina; TDZ- tiazuron e ZEA – zeatina, e microalgas: EM – Extrato de *Messastrum gracile*; EC - Extrato de *Chlorella vulgaris*; BM - Biomassa de *Messastrum gracile* e BC – Biomassa de *Chlorella vulgaris*. Os valores são significativos pelo Teste Tukey a nível 5% de probabilidade



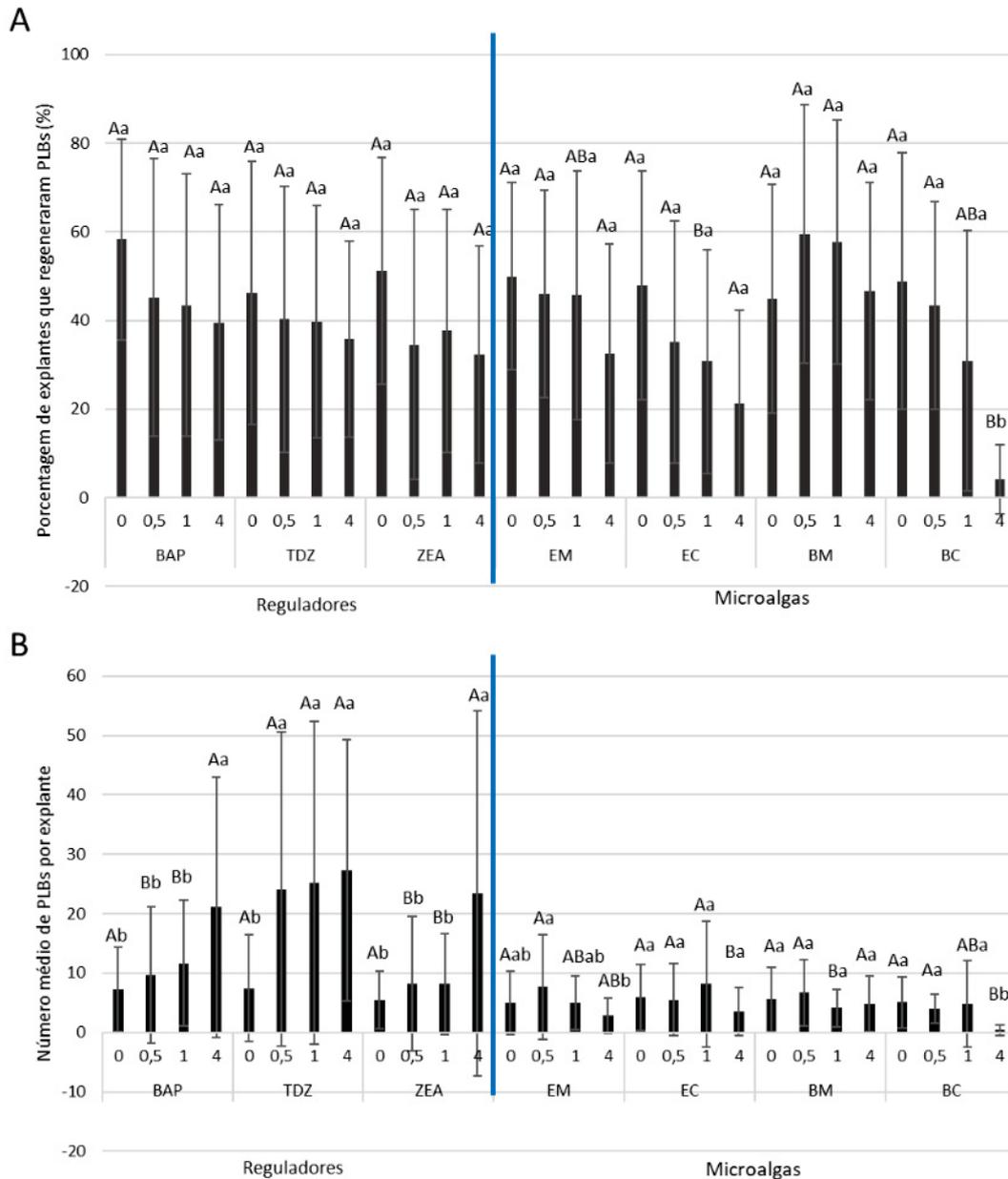
Letras indicam a comparação entre os tratamentos. Letras iguais indicam que não há diferença significativa após comparação par a par.

Fig 4 Thin cell layer de *Cattleya labiata*, após 24 semanas de cultivo, diferença entre os tratamentos. **a** Porcentagem de explantes que regeneraram PLBs; **b** Número médio de PLBs por explante de *Cattleya labiata*, após 24 semanas de cultivo do TCL, em meio MS/2, contendo diferentes reguladores e micoralgas: BAP - 6-benzilaminopurina; TDZ - tiazuron; ZEA – zeatina; EM – Extrato de *Messastrum gracile*; EC - Extrato de *Chlorella vulgaris*; BM - Biomassa de *Messastrum gracile*; BC – Biomassa de *Chlorella vulgaris*. Os valores são significativos pelo Teste Tukey a nível 5% de probabilidade



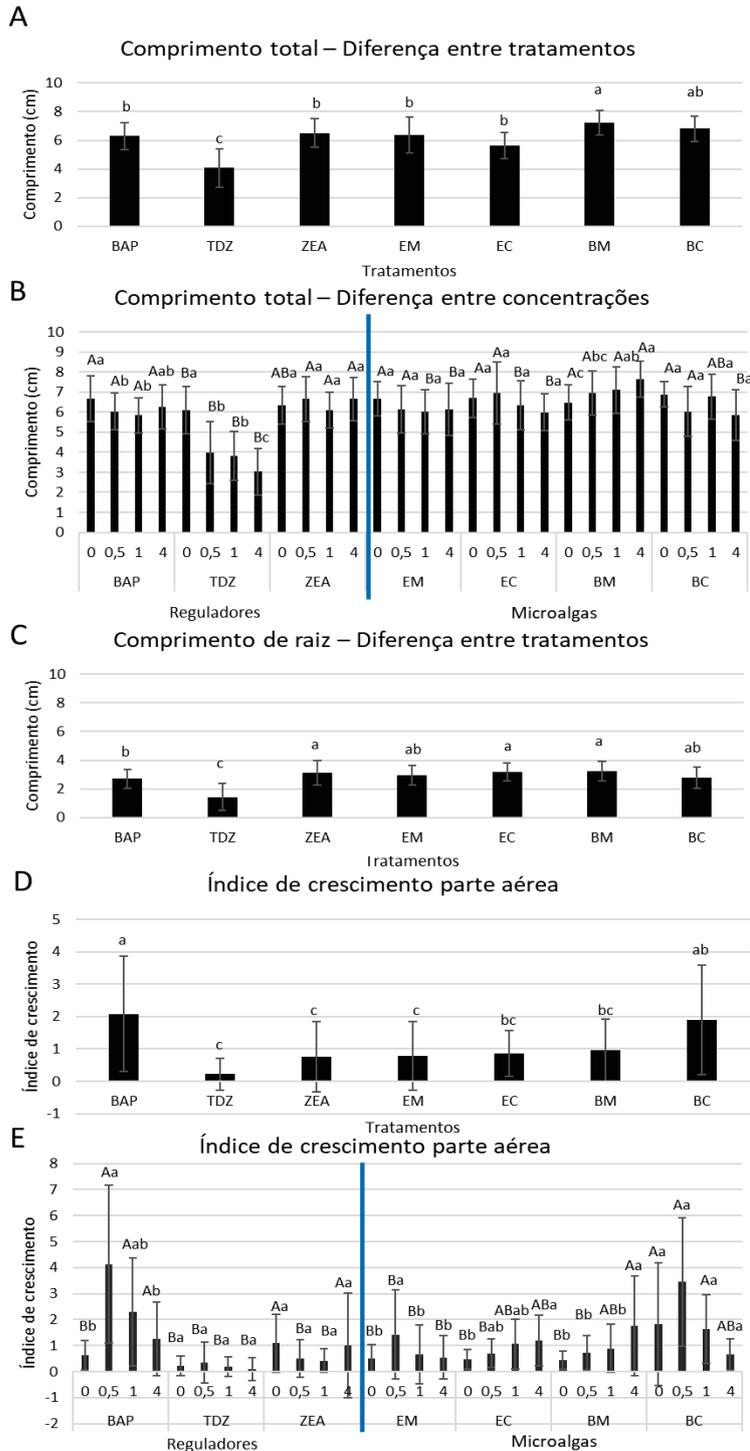
Letras indicam a comparação entre os tratamentos. Letras iguais indicam que não há diferença significativa após comparação par a par.

Fig 5 Thin cell layer de *Cattleya labiata*, após 24 semanas de cultivo, diferença entre as concentrações. **a** Porcentagem de explantes que regeneraram PLBs; **b** Número médio de PLBs por explante de *Cattleya labiata*, após 24 semanas de cultivo, inoculados em meio MS/2 contendo diferentes reguladores: BAP - 6-benzilaminopurina; TDZ- tiazuron e ZEA – zeatina, nas concentrações: 0, 0,5, 1 e 4 mg L⁻¹ e microalgas: EM – Extrato de *Messastrum gracile*; EC - Extrato de *Chlorella vulgaris*; BM - Biomassa de *Messastrum gracile* e BC – Biomassa de *Chlorella vulgaris*, nas concentrações 0, 0,5, 1 e 4 g L⁻¹. Os valores são significativos pelo Teste Tukey a nível 5% de probabilidade



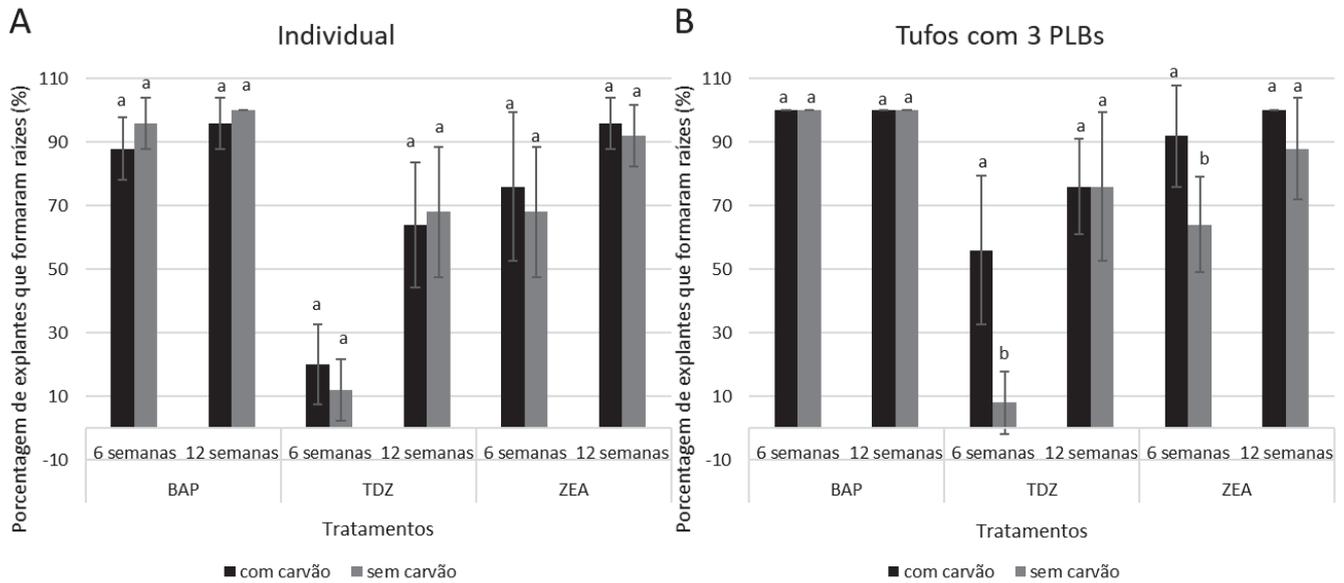
Letras maiúsculas indicam a comparação entre as mesmas concentrações de diferentes tratamentos. Letras minúsculas indicam a comparação das concentrações do mesmo tratamento. Letras iguais indicam que não há diferença significativa após comparação par a par.

Fig 6 Alongamento de *Cattleya labiata*, após 12 semanas. **a, b** Comprimento total; **c** Comprimento de raiz; **d, e** Índice de crescimento da parte aérea de explantes de *Cattleya labiata*, após 12 semanas da etapa de alongamento, inoculados em meio MS/2 contendo diferentes reguladores: BAP - 6-benzilaminopurina; TDZ- tiazuron e ZEA – zeatina, nas concentrações: 0, 0,5, 1 e 4 mg L⁻¹ e microalgas: EM – Extrato de *Messastrum gracile*; EC - Extrato de *Chlorella vulgaris*; BM - Biomassa de *Messastrum gracile* e BC – Biomassa de *Chlorella vulgaris*, nas concentrações 0, 0,5, 1 e 4 g L⁻¹. **a, c, d** Diferença entre os tratamentos; **b, e** Diferença entre as concentrações dos tratamentos. Os valores são significativos com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.



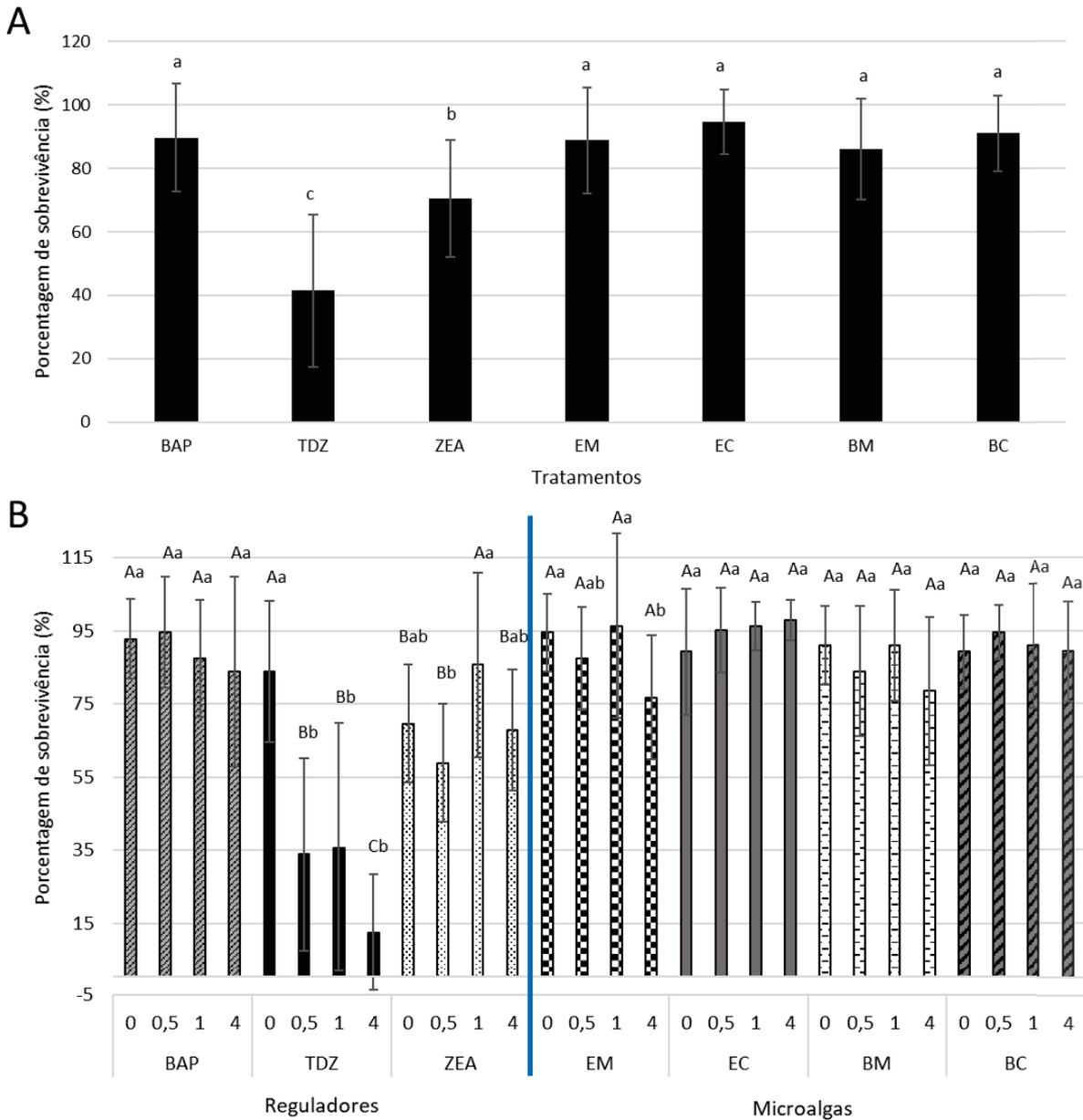
Letras maiúsculas indicam a comparação entre as mesmas concentrações de diferentes tratamentos. Letras minúsculas indicam a comparação das concentrações do mesmo tratamento. Letras iguais indicam que não há diferença significativa após comparação par a par.

Fig 7 Porcentagem de explantes de *Cattleya labiata* que formaram raízes. **a** Explantes individuais, **b** Tufos com 3 PLBs na presença ou ausência de 2 g L⁻¹ de carvão ativado, após seis e doze semanas de alongamento em diferentes reguladores: BAP - 6-benzilaminopurina; TDZ- tidiazuron e ZEA – zeatina, na concentração de 4 mg L⁻¹. Os valores são significativos com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.



Letras indicam a comparação entre a presença e ausência de carvão ativado. Letras iguais indicam que não há diferença significativa após comparação par a par.

Fig 8 Porcentagem de sobrevivência de plantas de *Cattleya labiata*, após 12 semanas de transplanto, em *Sphagnum* sp. **a** Diferença entre os tratamentos, **b** Diferença entre as concentrações. O cultivo *in vitro* das plantas foi em diferentes reguladores e microalgas: BAP - 6-benzilaminopurina; TDZ- tiazuron e ZEA – zeatina, nas concentrações: 0, 0,5, 1 e 4 mg L⁻¹ e microalgas: EM – Extrato de *Messastrum gracile*; EC - Extrato de *Chlorella vulgaris*; BM - Biomassa de *Messastrum gracile* e BC – Biomassa de *Chlorella vulgaris*, nas concentrações 0, 0,5, 1 e 4 g L⁻¹. Os valores são significativos pelo Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.



Letras maiúsculas indicam a comparação entre as mesmas concentrações de diferentes tratamentos. Letras minúsculas indicam a comparação das concentrações do mesmo tratamento. Letras iguais indicam que não há diferença significativa após comparação par a par.

Tabela 1 – Composição bioquímica das biomassas e extratos aquosos microalgais. CHO – carboidratos; PTN – Proteínas; LPD – Lipídeos; ZEA – Zeatina; EM – Extrato de *Messastrum gracile*; EC - Extrato de *Chlorella vulgaris*; BM - Biomassa de *Messastrum gracile*; BC – Biomassa de *Chlorella vulgaris*.

Amostra	CHO (mg/g)	PTN (mg/g)	LPD (mg/g)	ZEA ($\mu\text{g/g}$)
BC	236 \pm 6.1	444 \pm 5.6	145 \pm 3.4	0.6 \pm 0.02
BM	281 \pm 5.3	221 \pm 3.9	159 \pm 3.1	9.1 \pm 0.6
EC	221 \pm 5.8	132 \pm 3.8	nd	4.1 \pm 0.2
EM	272 \pm 5.6	154 \pm 2.8	nd	56.6 \pm 0.9

nd: não determinado

Tabela 2 – Porcentagem de explantes de *Cattleya labiata* que formaram raízes. Diferença entre explantes individuais e explantes com 3 PLBs na presença ou ausência de 2 g L⁻¹ de carvão ativado, após seis e doze semanas de alongamento em diferentes reguladores: BAP - 6-benzilaminopurina; TDZ- tidiazuron e ZEA – zeatina, na concentração de 4 mg L⁻¹. Os valores são significativos com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.

Porcentagem de explantes que formaram raízes (%)								
Reguladores	Individual				3 PLBs			
	Com carvão		Sem carvão		Com carvão		Sem carvão	
	6 semanas	12 semanas	6 semanas	12 semanas	6 semanas	12 semanas	6 semanas	12 semanas
BAP	88,00 Aa	96,00 Aa	96,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa
TDZ	20,00 Bb	64,00 Ab	12,00 Bc	68,00 Ab	56,00 Bb	76,00 Ab	8,00 Bc	76,00 Aa
ZEA	76,00 Ba	96,00 Aa	68,00 Bb	92,00 Aab	92,00 Aa	100,00 Aa	64,00 Bb	88,00 Aa

Os valores representam as médias. Letras minúsculas indicam a comparação entre os reguladores e letras maiúsculas indicam a comparação entre as semanas. Letras iguais indicam que não há diferença significativa após comparação par a par.

Tabela 3 – Comprimento da parte aérea, raiz e total (cm) de plantas de *Cattleya labiata*, após 12 semanas do subcultivo do alongamento, inoculados em meio MS/2 contendo diferentes reguladores: BAP - 6-benzilaminopurina; TDZ- tidiazuron e ZEA – zeatina, de secção longitudinal, na concentração de 4 mg L⁻¹. Na presença ou ausência de carvão ativado, com PLBs individuais ou tufos com 3 PLBs. Os valores são significativos com base no Teste Tukey a nível 5% de probabilidade.

Regulador vegetal	Presença/Ausência de carvão ativado	PLBs individuais/ tufos com 3 PLBs	comprimento parte aérea (cm)	comprimento raiz (cm)	comprimento total (cm)
BAP	COM CARVÃO	INDIVIDUAL	4,19 ± 1,2 AB	4,11 ± 1,1 A	8,30 ± 1,7 A
		3 PLBS	4,58 ± 1,2 A	3,23 ± 0,8 AB	7,81 ± 1,6 A
	SEM CARVÃO	INDIVIDUAL	3,17 ± 0,8 BCD	3,74 ± 1,2 AB	6,91 ± 1,2 AB
		3 PLBS	2,84 ± 0,5 CDE	1,87 ± 0,5 CD	4,71 ± 0,4 CD
TDZ	COM CARVÃO	INDIVIDUAL	2,04 ± 0,7 DE	1,80 ± 0,9 CD	3,84 ± 1,5 DE
		3 PLBS	2,7 ± 0,9 CDE	1,49 ± 0,5 D	4,19 ± 1,0 DE
	SEM CARVÃO	INDIVIDUAL	1,97 ± 0,6 E	1,01 ± 0,6 D	2,98 ± 0,9 E
		3 PLBS	2,12 ± 0,5 DE	1,38 ± 0,7 D	3,50 ± 1,0 DE
ZEA	COM CARVÃO	INDIVIDUAL	3,26 ± 0,5 BC	3,92 ± 1,0 AB	7,18 ± 1,1 AB
		3 PLBS	3,34 ± 0,7 BC	2,75 ± 0,9 BC	6,09 ± 1,2 BC
	SEM CARVÃO	INDIVIDUAL	2,37 ± 0,6 CDE	1,67 ± 0,7 CD	4,04 ± 0,7 DE
		3 PLBS	2,53 ± 0,6 CDE	1,03 ± 0,5 D	2,85 ± 0,6 E

Os valores representam as médias e desvios padrão. Letras indicam a comparação entre os reguladores, presença ou ausência de carvão ativado e PLBs individuais ou em tufos com 3 PLBs. Letras iguais indicam que não há diferença significativa após comparação par a par.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Recomenda-se o uso do meio MS/2C para o cultivo *in vitro* de *Cattleya labiata*, pois obteve maior porcentagem de plantas após 16 semanas da germinação, apresentou índice de crescimento elevado na etapa de alongamento. No transplantio, plantas cultivadas em MS/2C apresentaram comprimento total e massa fresca elevados, o índice de crescimento e o número de folhas não diferiu das plantas em outros meios de cultura. Plantas cultivadas em MS/2C apresentaram alta porcentagem de sobrevivência. A utilização do carvão ativado é indicada para o cultivo de *Cattleya labiata*, pois as plantas apresentaram maior comprimento comparadas com as plantas cultivadas sem carvão. Recomenda-se o uso de *Sphagnum* sp. isolado ou combinado com fibra de coco e casca de *Pinus* sp., como substrato de *C. labiata*, pois as plantas transplantadas nesse substrato apresentaram maior comprimento total, maior massa fresca e número de folhas, e apresentaram alta porcentagem de sobrevivência.

As microalgas testadas (EM, EC, BM e BC) podem substituir o uso de reguladores vegetais como (BAP, TDZ e ZEA). Para o cultivo *in vitro* de *Cattleya labiata* é recomendado o uso de BAP ou BM, pois os explantes cultivados com esses suplementos apresentaram maior porcentagem de regeneração e alto número médio de PLBs, resultando em maior quantidade de plantas no final do experimento. Além disso, BAP e BM são similares e apresentaram alto índice de crescimento e comprimento total no período do alongamento e as plantas apresentaram porcentagem de sobrevivência alta no transplantio. Recomenda-se a utilização da concentração de 4 g L⁻¹ para BM e 4 mg L⁻¹ para BAP, pois apresentaram maior porcentagem de regeneração e número médio de PLBs, maior comprimento total no alongamento e maior porcentagem de sobrevivência no transplantio, permitindo no final do experimento a formação do maior número de plantas para a comercialização.

ANEXO 1 – ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA

Figura 1 – Cromatograma dos padrões de fitormônios utilizados para quantificação por HPLC-MS. ZEA – Zeatina; ZER – Zeatina ribosídeo; K – Cinetina; KR – Cinetina ribosídeo; BAP - 6-benzilaminopurina; BAR – 6-Benziladenosina; GA3 Ácido Giberélico; AIA – Ácido 3-Indol-acético; ABA – Ácido abscísico.

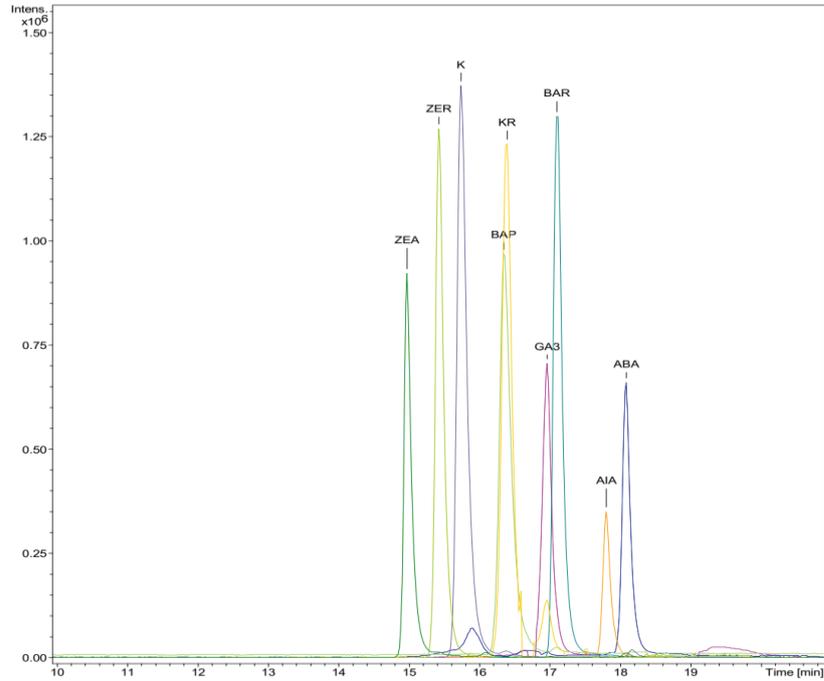


Figura 2 – Cromatograma do extrato aquoso de *Chlorella vulgaris* e pico referente à Zeatina – ZEA.

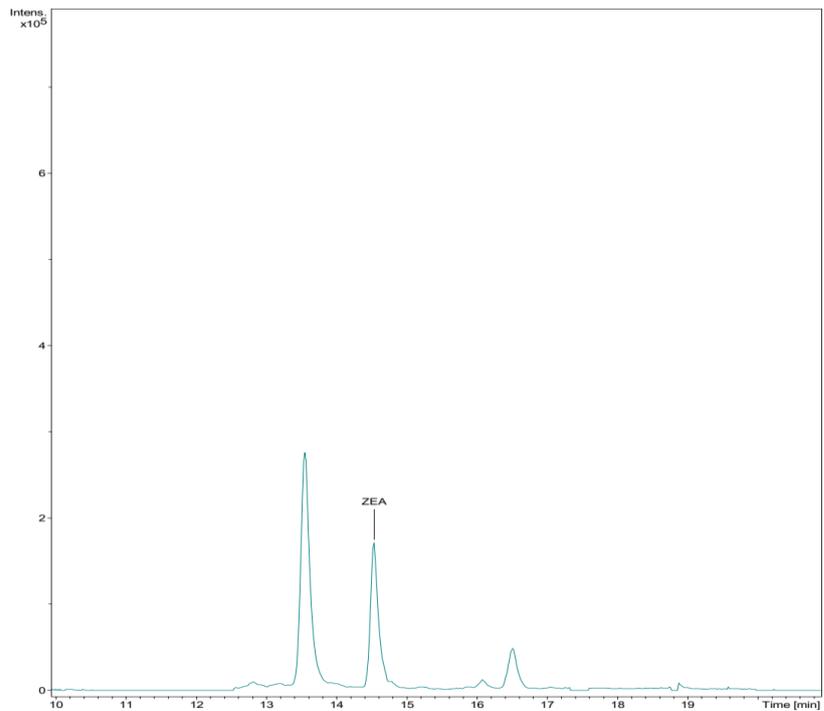


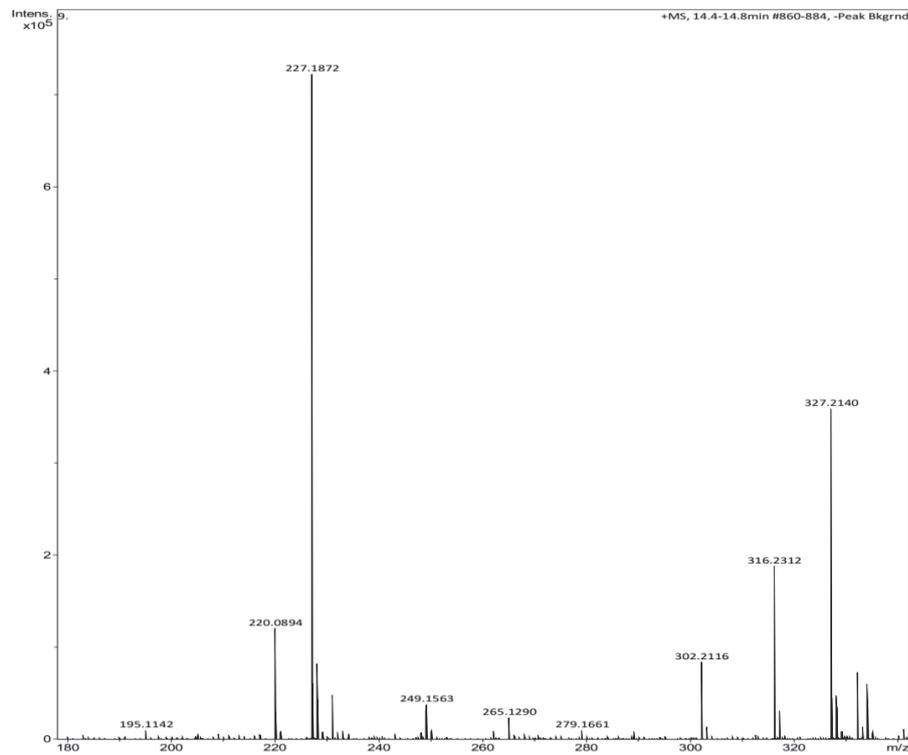
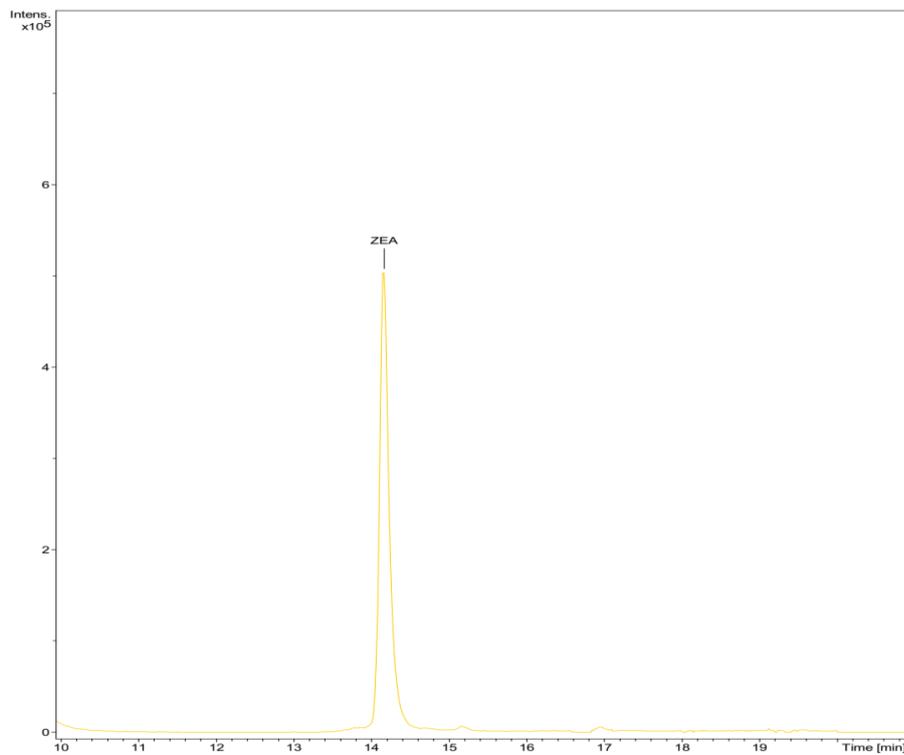
Figura 3 – Espectro de massas do pico referente à Zeatina – ZEA no extrato aquoso de *Chlorella vulgaris*.Figura 4 – Cromatograma do extrato aquoso de *Messastrum gracile* e pico referente à Zeatina – ZEA.

Figura 5 – Espectro de massas do pico referente à Zeatina – ZEA no extrato aquoso de *Messastrum gracile*.