

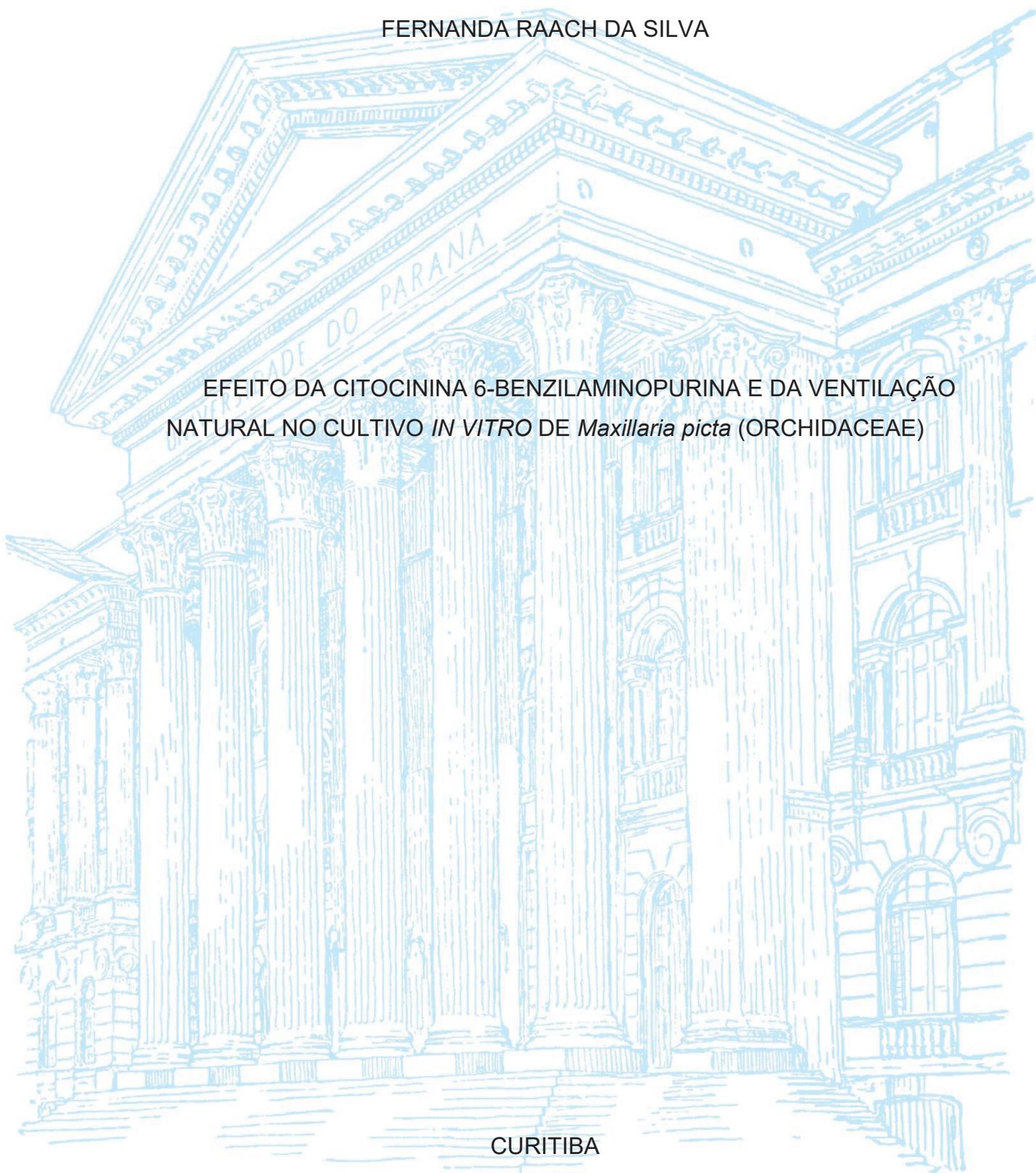
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA RAACH DA SILVA

EFEITO DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA E DA VENTILAÇÃO  
NATURAL NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Maxillaria picta* (ORCHIDACEAE)

CURITIBA

2025



FERNANDA RAACH DA SILVA

EFEITO DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA E DA VENTILAÇÃO  
NATURAL NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Maxillaria picta* (ORCHIDACEAE)

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.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga.

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Silva, Fernanda Raach da

Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina e da ventilação natural no cultivo *in vitro* de *Maxillaria picta* (Orchidaceae) / Fernanda Raach da Silva. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga.

1. Orquídea - Cultivo. 2. Propagação vegetativa. 3. Plantas - Reguladores. 4. Pigmentos. I. Fraga, Hugo Pacheco de Freitas, 1987-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BOTÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA RAACH DA SILVA**, intitulada: **Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina e da ventilação natural no cultivo *in vitro* de *Maxillaria picta* (Orchidaceae)**, sob orientação do Prof. Dr. HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA, 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 mestra 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, 06 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica

10/03/2025 10:09:54.0

HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/03/2025 10:25:12.0

LUCIANA LOPES FORTES RIBAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/03/2025 16:19:02.0

YOHAN FRITSCHÉ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Aos meus amores Valmir, Marines, Vinicius e Felipe dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar à Deus, por me conceder saúde e sabedoria para a conclusão desse trabalho.

Aos meus pais, Valmir e Marines por todo incentivo ao estudo de uma vida inteira, tudo o que eu sou e tenho devo a vocês.

Ao amor da minha vida e meu noivo Vinicius, por todo apoio e carinho nesses anos todos.

Ao meu irmão Felipe, pelo incentivo e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga, por aceitar gentilmente ser meu orientador, gratidão por todos os conselhos, correções e ensinamentos.

À Universidade Federal do Paraná e toda a sua estrutura pela possibilidade de realizar o mestrado, foi um sonho estudar nessa instituição.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica e todo o seu corpo docente, em especial aos professores, Marcelo Pedrosa Gomes, Luciana Lopes Fortes Ribas e Patrícia Soffiatti pelos ensinamentos, contribuições e correções ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

À Clarissa Alves Stefanello, por gentilmente ceder as sementes, germiná-las e principalmente por todo apoio ao longo desse trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o período desta pesquisa;

A todos os meus colegas pesquisadores do Laboratório de Micropropagação Vegetal, Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal e da pós pelo auxílio durante o desenvolvimento desse projeto e acima de tudo pela amizade.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para que eu completasse essa etapa tão importante na minha vida, gratidão.

A natureza não faz nada em vão (ARISTÓTELES).

## RESUMO

*Maxillaria picta* é uma orquídea nativa da América do Sul, encontrada principalmente na Mata Atlântica, com flores perfumadas de alto potencial ornamental. Em razão do intenso extrativismo e fragmentação dos ecossistemas, as orquídeas apresentam tendência de redução da biodiversidade e ameaça à extinção de espécies. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica amplamente utilizada para a conservação *ex situ* de espécies, com numerosos trabalhos disponíveis na literatura. No entanto, os aspectos anatômicos e bioquímicos das plântulas expostas a fitorreguladores e seus efeitos residuais, além de estudos fisiológicos comparativos das plantas cultivadas *in vitro* convencionalmente e sob ventilação natural em *M. picta* ainda não foram estabelecidos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar como a suplementação de 6-benzilaminopurina (BAP) e o cultivo sob a ventilação natural afetam o desenvolvimento *in vitro* e aclimatização de *M. picta*. Plantas obtidas a partir da germinação *in vitro* em meio de alongamento e desenvolvimento foram submetidas a diferentes concentrações de BAP (0, 3, 6, 9, 12 e 15  $\mu\text{M}$ ) em meio de cultura WPM por 60 dias. Ápice radicular e porção mediana da terceira folha foram coletadas em diferentes tempos de exposição ao fitorregulador (0, 15, 30 e 45 dias) e analisadas em microscopia de luz. Após 60 dias de cultivo foram avaliados: sobrevivência (%), escurecimento (%), número e comprimento de brotos, folhas e raízes. Em seguida, as plantas foram enraizadas *in vitro* em meio de cultura com 1  $\mu\text{M}$  AIB por 30 dias e aclimatizadas em substrato vermiculita em casa de vegetação. Após 90 dias, foi avaliado a concentração de pigmentos fotossintéticos. Para aprimorar o protocolos de cultivo *in vitro*, plantas foram submetidas a dois tipos de sistemas de cultivo: convencional e ventilação natural em meio de cultura WPM suplementado com 9  $\mu\text{M}$  de BAP. Após 30 e 50 dias *in vitro* foram avaliados número e comprimento dos brotos e análises de trocas gasosas. Todas as plantas foram aclimatizadas, após 30 dias *ex vitro* foi avaliado a concentração de pigmentos fotossintéticos e após 50 dias foram realizadas análises de fluorescência da clorofila *a*, quantificação da massa fresca e seca e sobrevivência. O tratamento suplementado com 9  $\mu\text{M}$  de BAP é recomendado para a fase de multiplicação *in vitro*, uma vez que apresenta maior tendência de formação de brotos (1.9) e folhas (11). Entretanto, concentrações acima de 9  $\mu\text{M}$  de BAP causam escurecimento do tecido e diminuem a concentração de todos os pigmentos fotossintéticos em plantas aclimatizadas, acarretando possivelmente em diminuição da eficiência do aparelho fotossintético dessas plantas. Anatômica e fisiologicamente, a suplementação de 9 e 12  $\mu\text{M}$  de BAP proporcionou maior desenvolvimento do cilindro vascular das raízes. A ventilação natural promoveu aumento de 58% no número de brotações e maior concentração de todos os pigmentos fotossintéticos. Esses resultados sugerem aumento na produtividade e na capacidade fotossintética dessas plantas. As análises de trocas gasosas revelaram que a ventilação natural promoveu médias com distribuição mais homogênea dos dados para plantas cultivadas nessa condição e também maiores médias de taxa de transporte de elétrons e *quenching* fotoquímico, indicando padronização das mudas e incremento da atividade de fotossistema II. Este estudo contribui para o conhecimento acerca do cultivo *in vitro* de *M. picta*, mostrando o impacto da suplementação de BAP e seu efeito residual nas plantas aclimatizadas. Além disso, também permite compreender a fisiologia das plantas sob ventilação natural a fim de otimizar a propagação da espécie.

Palavras-chave: micropropagação; orquídea; BAP; fitorregulador; pigmentos fotossintéticos; sistema de cultivo.

## ABSTRACT

*Maxillaria picta* is an orchid native to South America, primarily found in the Atlantic Forest, with fragrant flowers and high ornamental potential. Due to intense extractivism and ecosystem fragmentation, orchids face a trend of biodiversity reduction and the threat of species extinction. *In vitro* culture is a widely used biotechnological tool for the *ex-situ* conservation of species, with numerous published studies. However, the anatomical and biochemical aspects of seedlings exposed to phytohormones and their residual effects, as well as comparative physiological studies of plants conventionally cultivated *in vitro* and under natural ventilation in *M. picta*, have not yet been established. In this context, the objective of this study was to evaluate how the supplementation of 6-benzylaminopurine (BAP) and culture under natural ventilation affect the *in vitro* development and acclimatization of *M. picta*. Plants obtained from *in vitro* germination in elongation and development medium were subjected to different concentrations of BAP (0, 3, 6, 9, 12 and 15  $\mu\text{M}$ ) in WPM culture medium for 60 days. Roots and leaves were collected for anatomical analysis. Root apex and median portion of the third leaf were collected at different times of exposure to the phytohormone (0, 15, 30 and 45 days) and analyzed under light microscopy. Then, the plants were *in vitro* rooted in culture medium supplemented with 1  $\mu\text{M}$  IBA for 30 days and acclimatized in a vermiculite substrate in a greenhouse. After 90 days, the concentration of photosynthetic pigments was evaluated. To improve the *in vitro* culture protocols, plants were subjected to two types of cultivation systems: conventional and natural ventilation, in WPM culture medium supplemented with 9  $\mu\text{M}$  of BAP. After 30 and 50 days *in vitro*, the number and length of shoots and gas exchange analyses were evaluated. All plants were acclimatized, after 30 days *ex vitro*, the concentration of photosynthetic pigments was evaluated. After 50 days *ex vitro*, chlorophyll *a* fluorescence analyses, quantification of fresh and dry mass, and survival (%) were performed. The treatment supplemented with 9  $\mu\text{M}$  of BAP is recommended for the *in vitro* multiplication phase as it shows a higher tendency for shoot (1.9) and leaves (11) formation. However, concentrations above 9  $\mu\text{M}$  of BAP cause tissue darkening and reduce the concentration of all photosynthetic pigments in acclimatized plants, possibly leading to a decrease in the efficiency of their photosynthetic apparatus. Anatomically, supplementation with 9 and 12  $\mu\text{M}$  of BAP promoted greater development of the vascular cylinder in the roots. Natural ventilation promoted a 58% increase number of shoots and a higher concentration of all photosynthetic pigments. These results suggest an increased productivity and photosynthetic capacity in these plants. Gas exchange analyses revealed that natural ventilation promoted means with a more homogeneous distribution of data for plants grown under this condition and also higher means of electron transport rate and photochemical quenching, indicating standardization of seedlings and increased activity of photosystem II. This study contributes to the knowledge of *M. picta in vitro* culture, demonstrating the impact of BAP supplementation and its residual effect on acclimatized plants. Additionally, it provides insights into the physiology of plants under natural ventilation to optimize the propagation of the species.

Keywords: micropropagation; orchid; BAP; phytohormone; photosynthetic pigments; cultivation system.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem da espécie-alvo, *Maxillaria picta*. Fotografia: C. A. Stefanello.....24
- Figura 2.** Porcentagem de escurecimento tecidual de plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina.....42
- Figura 3.** Aspectos morfológicos das plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina.....43
- Figura 4.** Número médio de brotos a) e comprimento médio de brotos b) de plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina.. .....44
- Figura 5.** Número médio de folhas a) e comprimento médio de folhas b) de plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. ....45
- Figura 6.** Número médio de raízes a) e comprimento médio de raízes b) de plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina.. .....46
- Figura 7.** Aspectos anatômicos das plantas de *Maxillaria picta* em meio de cultura WPM sem a adição de 6-benzilaminopurina.....47
- Figura 8.** Aspectos anatômicos das raízes das plantas de *Maxillaria picta* com secções transversais em microscopia de luz após 15, 30 e 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina.....49
- Figura 9.** Aspectos anatômicos das folhas das plantas de *Maxillaria picta* após 15, 30 e 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina.....51
- Figura 10.** Aspecto geral das plantas de *Maxillaria picta* durante a aclimatização em casa de vegetação.....51
- Figura 11.** Concentração de pigmentos fotossintetizantes (Carotenoides, clorofila *a*, clorofila total (*a+b*) e clorofila *b*) em folhas de *Maxillaria picta*

aclimatizadas, submetidas anteriormente à diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina.....	52
<b>Figura 12.</b> Efeito da ventilação natural no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Maxillaria picta</i> em meio de cultura WPM, suplementado com 9 µM de BAP.....	73
<b>Figura 13.</b> Distribuição dos dados fisiológicas de trocas gasosas em plantas de <i>Maxillaria picta</i> após 50 dias de cultivo <i>in vitro</i> e após 50 dias de aclimatização. ....	76
<b>Figura 14.</b> Aclimatização de mudas de <i>Maxillaria picta</i> cultivadas <i>in vitro</i> em sistema de cultivo sob ventilação natural (à esquerda) e convencional (à direita). ....	76
<b>Figura 15.</b> Análise de componentes principais (PCA) dos parâmetros fisiológicos de plantas de <i>Maxillaria picta</i> , submetidas a diferentes sistemas de cultivo. ....	78
<b>Figura 16.</b> Efeito da ventilação natural na concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas de <i>Maxillaria picta</i> 30 dias aclimatizadas.....	79

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RAZÃO CLOROFILA <i>a/b</i> EM FOLHAS DE <i>Maxillaria picta</i> ACLIMATIZADAS, SUBMETIDAS ANTERIORMENTE À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA. MÉDIA DOS VALORES $\pm$ DESVIO PADRÃO.....	52
TABELA 2. DADOS FISIOLÓGICOS RELATIVOS A TROCAS GASOSAS APÓS 50 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> E 50 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE <i>Maxillaria picta</i> , SUBMETIDAS A DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO. <i>E</i> – TRANSPIRAÇÃO, <i>g<sub>s</sub></i> – CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA, <i>A</i> – TAXA DE FOTOSSÍNTESE LÍQUIDA, <i>C<sub>i</sub></i> – CONCENTRAÇÃO INTERNA DE CO <sub>2</sub> . .....	75
TABELA 3. DADOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS À FOTOSSÍNTESE APÓS 50 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> E 50 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE <i>Maxillaria picta</i> , SUBMETIDAS A DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO. YIELD, ETR – TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS, <i>q<sub>P</sub></i> – <i>QUENCHING</i> FOTOQUÍMICO.....	77
TABELA 4. DADOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS À FOTOSSÍNTESE DAS PLANTAS DE <i>Maxillaria picta</i> , APÓS 50 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO, SUBMETIDAS A DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO. <i>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></i> - RENDIMENTO QUÂNTICO MÁXIMO DO FOTOSSISTEMA II, <i>q<sub>N</sub></i> – COEFICIENTE DE <i>QUENCHING</i> NÃO FOTOQUÍMICO E NPQ – <i>QUENCHING</i> NÃO FOTOQUÍMICO.....	77
TABELA 5. MASSA FRESCA E SECA DE PLANTAS DE <i>Maxillaria picta</i> , APÓS 50 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

A – Taxa de fotossíntese líquida – $\mu\text{mol}$ de $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	IRGA – <i>Infrared gas analyser</i>
AIA – Ácido indolacético	M – Molar
AIB – Ácido indol butírico	mg – miligramas
ANA – Ácido 1-naftalenoacético	mL – Mililitros
BAP – 6-Benzilaminopurina	MS – Murashige e Skoog, 1962
c – córtex	MS/2 – Murashige e Skoog, 1962 (metade da concentração de sais)
Car – Carotenoides	nc – nervura central
Ci – concentração interna de carbono – $\mu\text{mol}$ de $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	NPQ – <i>quenching</i> não fotoquímico
Cl <i>a</i> – Clorofila <i>a</i>	nu – núcleo
Cl <i>b</i> – Clorofila <i>b</i>	VW – Vacin e Went, 1949
Total cl Clorofila Total	MF – Massa fresca
cm – centímetro	PTFE – politetrafluoroetileno
cv – cilindro vascular	qN – coeficiente de <i>quenching</i> não fotoquímico
<i>E</i> – Transpiração – $\text{mmol}$ de $\text{H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	qP – <i>quenching</i> fotoquímico
ETR – taxa de transporte de elétrons	ra – ráfide
ep – epiderme	TDZ – Thidiazuron
es – estômato	v – velame
ex – exoderme	WPM – Woody Plant Medium (LLOYD e MCCOWN, 1980)
F <sub>0</sub> – Fluorescência basal	xi – xilema
fb – fibras	
fl – floema	
Fm – Fluorescência máxima	
fv – feixe vascular	
FSII – Fotossistema II	
Fv/Fm – Rendimento quântico máximo do fotossistema II	
g - gramas	
<i>g</i> <sub>s</sub> – Condutância estomática – $\text{mol}$ de $\text{H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	

## LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

μ – Micro

°C – Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
3.1	FAMÍLIA ORCHIDACEAE .....	22
3.1.1	GÊNERO: <i>Maxillaria</i> RUIZ & PAVÓN .....	23
3.1.2	<i>Maxillaria picta</i> Hook.....	23
3.2	TÉCNICAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	24
3.3	MEIO DE CULTURA.....	25
3.4	REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL .....	26
3.5	VENTILAÇÃO NATURAL .....	27
3.6	TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO .....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO I: EFEITO DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA NO DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>MAXILLARIA PICTA</i> (ORCHIDACEAE)</b> .....	<b>34</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	36
4.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.2.1	MATERIAL VEGETAL .....	38
4.2.2	Germinação <i>in vitro</i> .....	38
4.2.3	Alongamento e desenvolvimento de plântulas .....	38
4.3	MULTIPLICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP .....	39
4.4	ANÁLISE ANATÔMICA .....	39
4.5	ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO .....	40
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	40
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
5.1	MULTIPLICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP .....	42
5.2	ANÁLISE ANATÔMICA .....	46
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	51
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
6.1	MULTIPLICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP .....	53

6.2	ANÁLISE ANATÔMICA .....	55
6.3	QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	58
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>CAPÍTULO II: INFLUÊNCIA DA VENTILAÇÃO NATURAL NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> E DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO DE <i>MAXILLARIA PICTA</i> (ORCHIDACEAE) .....</b>	<b>65</b>
8.1	INTRODUÇÃO.....	67
8.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	69
8.2.1	MATERIAL VEGETAL .....	69
8.2.2	Germinação de sementes.....	69
8.2.3	Alongamento e desenvolvimento <i>in vitro</i> .....	69
8.3	VENTILAÇÃO NATURAL <i>IN VITRO</i> .....	70
8.4	ACLIMATIZAÇÃO.....	70
8.5	TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.....	71
8.6	QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	71
8.7	MASSA FRESCA E SECA .....	72
8.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	72
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
9.1	VENTILAÇÃO NATURAL <i>IN VITRO</i> .....	73
9.2	TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.....	74
9.3	QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	78
9.4	MASSA FRESCA E SECA .....	79
<b>10.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
10.1	VENTILAÇÃO NATURAL <i>IN VITRO</i> .....	80
10.2	TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.....	81
10.3	QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	84
10.4	MASSA FRESCA E SECA .....	84
<b>11.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>12.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae é a maior família de monocotiledôneas e a segunda maior família de angiospermas, com aproximadamente 28 mil espécies e 763 gêneros (FAY, 2018). As orquídeas possuem grande importância econômica, ecológica e medicinal. Muitas espécies são cultivadas para o uso comercial, algumas são utilizadas pela medicina tradicional com o objetivo de tratar doenças, além da importância ecológica das orquídeas como bioindicadores do ambiente (GUTIÉRREZ, 2010; PANT, 2013).

Apesar de possuir ampla diversidade morfológica, formas de crescimento e habitat, esse grupo taxonômico é também um dos que mais sofrem ameaças à perda da biodiversidade (ZHANG et al., 2018). No Brasil, ocorrem aproximadamente 2.679 espécies de orquídeas, porém, cerca de 183 estão na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2022). As principais causas da perda da biodiversidade das orquídeas são: fragmentação e perda de habitat, mudanças climáticas e a exploração insustentável (FAY, 2018; SOBREIRO et al., 2019).

A Mata Atlântica é um *hotspot* de biodiversidade, porém, devido à intensa exploração do bioma, existem cerca de 26% da sua cobertura, a maioria proveniente de pequenas ilhas de vegetação secundária e desconectadas de grandes fragmentos (CARLUCCI et al., 2021). *Maxillaria picta* Hook é uma orquídea nativa da América do Sul e uma das espécies mais encontradas na Mata Atlântica. O alto potencial ornamental de suas flores acarreta em exploração comercial da espécie. Suas características são pseudobulbos bifoliados, folhas finas, flores perfumadas com fragrância semelhante à do mel e coloração creme ou amarelada com manchas roxas. Estudos recentes descreveram que a espécie apresenta compostos ativos com propriedades medicinais de atividades anti-inflamatórias, antitumoral, antibacteriana, antioxidantes e entre outras propriedades, que potencialmente podem ser exploradas (LIPÍŃSKA et al., 2023).

As orquídeas produzem uma grande quantidade de sementes, o que propicia altas taxas de dispersão. Porém, elas são minúsculas, frágeis e praticamente não possuem tecido de reserva. Em virtude das baixas ou inexistentes reservas nutritivas nas sementes, as orquídeas são dependentes de nutrientes fornecidos por fungos micorrízicos para que ocorra a germinação e o desenvolvimento das plântulas (SWARTS e DIXON, 2009). Além disso, em condições naturais as sementes possuem

baixa taxa de germinação e crescimento lento (CHUGH et al., 2009). Neste sentido, a utilização da cultura de tecidos vegetais é um método que permite a propagação de espécies de forma eficiente, e em larga escala, e a manutenção e preservação do material genético para fins de conservação (DUTRA et al., 2008).

O sucesso da propagação *in vitro* de orquídeas depende principalmente da composição do meio de cultura e dos reguladores de crescimento vegetais adicionados (CHUGH et al., 2009). O meio de cultura Woody Plant Medium (WPM) apresentou as maiores taxas de germinação das sementes de *Brasiliorchis picta* (Hook.) R. Singer, S. Koehler & Carnevali, sinonímia de *Maxillaria picta*, em comparação com a outras formulações salinas (Dos SANTOS et al., 2016). O tratamento com a suplementação de 5 µM da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) apresentou as maiores taxas de regeneração de estruturas semelhantes à protocormos a partir de folhas inteiras de *M. picta* em comparação com a citocinina thidiazuron (TDZ) (Dos SANTOS et al., 2016). No entanto, estudos voltados para a indução de brotações laterais com uso de BAP avaliando aspectos anatômicos e seus efeitos residuais em plantas aclimatizadas ainda não foram realizados.

As citocininas são reguladores do crescimento vegetal amplamente utilizadas no cultivo *in vitro* para a indução e diferenciação de brotações. O BAP é uma citocinina comumente utilizada na multiplicação *in vitro*, seus efeitos propiciam respostas positivas para a formação de brotos e para o crescimento da parte aérea em diversas espécies vegetais (PANT e THAPA, 2012). Análises anatômicas em microscopia de luz são importantes ferramentas para descrever os efeitos dos fitorreguladores em plantas cultivadas *in vitro*. Além disso, elas complementam as análises de morfologia externa, e permitem visualizar o desenvolvimento de tecidos e desordens que impactam diretamente na propagação *in vitro* (SOARES et al., 2012).

Apesar do impacto positivo das citocininas na formação de brotações, o BAP pode afetar negativamente o aparato fotossintético de plantas *in vitro*. O efeito residual do BAP acarretou em decréscimo na concentração de pigmentos fotossintéticos de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) (MARTINS et al., 2020). Neste sentido, estudos que visam analisar a concentração de pigmentos fotossintéticos são úteis para verificar o potencial fotossintético e conseqüentemente, o estado fisiológico das plantas.

Além dos fitorreguladores, as condições do cultivo *in vitro* também afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. O cultivo *in vitro* convencional é

caracterizado pela ausência de trocas gasosas, alta umidade relativa, acúmulo de gases dentro do frasco, possíveis anormalidades estomáticas e baixas taxas de fotossíntese (SILVEIRA et al., 2019). O uso de membranas que permitem as trocas gasosas entre ambientes é denominado ventilação natural. Esse sistema de cultivo proporciona melhores condições para a fotossíntese e melhores taxas de desenvolvimento de brotos (FRITSCHÉ et al., 2022). Estudos desenvolvidos por Silveira et al. (2019) observaram maior número de brotos e folhas e aumento na concentração de pigmentos fotossintetizantes em plantas de *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) cultivadas sob ventilação natural. Sabe-se que a ventilação natural afeta positivamente a estrutura e funcionalidade dos estômatos, possivelmente impactando o sucesso na etapa de aclimatização, evitando perdas e contribuindo para a redução de distúrbios anatômicos e fisiológicos do cultivo *in vitro* convencional (Da SILVA et al., 2014). No entanto, estudos fisiológicos de plantas cultivadas *in vitro* sob ventilação natural de *M. picta* e seus impactos em plantas aclimatizadas ainda não foram avaliados.

O ambiente *in vitro* propicia às plantas estabilidade ambiental, disponibilidade hídrica e temperaturas amenas (PAULILO et al., 2013). No entanto, durante a aclimatização, as plantas necessitam se adaptar a novas condições nas quais foram expostas como alta luminosidade e baixo recurso hídrico. Neste sentido, as análises de troca gasosas e a fluorescência da clorofila *a* são parâmetros fisiológicos que possibilitam visualizar e acompanhar as respostas das plantas em seu ambiente. Essas análises são não destrutivas, permitem diagnosticar a integridade do aparato fotossintético frente às adversidades ambientais, indicam agentes ou condições estressantes e elucidam possíveis melhorias durante o cultivo das espécies (CHA-UM et al., 2010).

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina na indução das brotações aéreas, investigar o efeito residual da citocinina na concentração de pigmentos fotossintéticos e analisar o desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* das plantas de *M. picta* cultivadas em sistema convencional e ventilação natural.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar como os efeitos da suplementação da citocinina 6-benzilaminopurina e da ventilação natural influenciam no desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* de *Maxillaria picta*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de BAP na indução de brotações *in vitro*, com base na morfologia externa e anatomia foliar e radicular das plantas;

b) Investigar o efeito residual da citocinina na concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas aclimatizadas de *Maxillaria picta*.

c) Analisar como os sistemas de cultivo convencional e ventilação natural afetam os aspectos morfológicos e fisiológicos das plantas de *Maxillaria picta* durante o cultivo *in vitro* e aclimatização.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

A família Orchidaceae é considerada a segunda maior família de angiospermas, possuindo aproximadamente 28.000 espécies arranjadas em cerca de 763 gêneros (JAIN et al., 2021). As orquídeas apresentam grande distribuição geográfica, com a maior diversidade de espécies concentrada nas regiões neotropicais (CHASE et al., 2015). No Brasil existem 2.679 espécies das quais 55% são endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2023).

O grupo é reconhecido em virtude de diversas características morfológicas: flores trímeras, raízes com velame, modificação de uma pétala em labelo, caule dividido em rizoma e cauloma, esse intumescido em pseudobulbo, ovário ínfero, apenas uma antera fértil geralmente, filete e estilete unidos formando estrutura colunar, denominada coluna ou ginostêmio, pólen fundido em polínias, sementes minúsculas e em grande quantidade, geralmente tunicadas (BARROS et al., 2018; GAMA et al., 2022).

As orquídeas são consideradas importantes bioindicadores da situação ambiental, devido sua ocupação em nichos especializados e as suas interações bióticas necessárias com os polinizadores e com os fungos micorrízicos para a germinação de sementes (MORAES et al., 2010; CINTRA et al., 2023). Alguns gêneros de orquídeas apresentam propriedades farmacológicas que são utilizadas pela medicina tradicional para tratar diversas doenças, as propriedades são: anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, a atuação ocorrem em problemas de pele, doenças infecciosas, problemas digestivos, respiratórios, circulatórios e cardíacos (CHEN et al., 2011; LIPÍŃSKA et al., 2023).

A atratividade de suas flores e beleza ornamental gera grande interesse econômico e conseqüentemente coletas ilegais são realizadas para a comercialização o que provoca risco de extinção das espécies (GALDIANO JÚNIOR et al., 2012). Apesar dos esforços em conservação das orquídeas, no final de 2017, 1000 espécies foram para a lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) (FAY, 2018). A extração ilegal de espécies, supressão da vegetação, desmatamento e conversão de terras em um mosaico de agricultura e pastagens tornam as orquídeas uma das famílias botânicas

que mais sofrem com os impactos ambientais causados principalmente pelo homem (CINTRA et al., 2023).

### 3.1.1 GÊNERO: *Maxillaria* RUIZ & PAVÓN

O gênero *Maxillaria* foi primeiramente descrito por H. Ruiz e J. Pavón em 1794, pertence a subfamília Epidendroideae, tribo Maxillarieae, subtribo Maxillariinae (SILVA e SILVA, 2010). É o maior gênero da subtribo com 634 espécies (SCHUITEMAN e CHASE, 2015), amplamente distribuído na região neotropical (LIPÍŃSKA e KOWALKOWSKA, 2018). No Brasil são citadas 115 espécies sendo 43 endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2023).

São poucos os gêneros de orquídeas que exibem tamanha diversidade morfológica. A maioria das espécies do gênero são epífitas, mas há, também, litofíticas e terrestres. (DETTKE et al., 2007; SCHUITEMAN e CHASE, 2015). São herbáceas com crescimento monopodial, simpodial ou dimórfico. Possui hábito de vida cespitosa ou rizomatosa, ereta, ou menos frequente, pendente (LIPÍŃSKA e KOWALKOWSKA, 2018). O gênero é conhecido por suas folhas coriáceas não plicadas, com a base das sépalas laterais formando mento na união do pé da coluna e viscídio bem desenvolvido. Além disso, as inflorescências de flor única são características taxonômicas importantes para diferenciar o gênero de outros de Maxillariinae (SCHUITEMAN e CHASE, 2015). A diferenciação entre as espécies do gênero *Maxillaria* ocorre por meio da distinção dos pseudobulbos, apesar disso, nem todas as espécies desenvolvem essa estrutura. As flores apresentam grande variação no tamanho, forma e cor (HOLTZMEIER et al., 1998; SINGER e KOEHLER, 2004; SILVA e SILVA, 2010).

### 3.1.2 *Maxillaria picta* Hook.

*Maxillaria picta* Hook é uma orquídea epífita nativa da América do Sul. No Brasil sua distribuição ocorre no estado da Bahia, em todos os estados da Região Sudeste e Sul. (FLORA DO BRASIL, 2023). A espécie também ocorre no nordeste da Argentina, em Misiones (SINGER e KOEHLER, 2004).

Sua principal característica são as flores brancas ou amareladas maculadas, também é facilmente identificada pela presença de seus pseudobulbos bifoliados e

labelo trilobado. As polínias estão ligadas diretamente ao viscídio, este é largo e arqueado, suas flores são bem perfumadas, com fragrância semelhante ao mel. *M. picta* não produz néctar ou outras recompensas florais aos polinizadores (Figura 1) (SINGER e KOEHLER, 2004; LIPÍŃSKA e KOWALKOWSKA, 2018; GAMA et al., 2022).



**Figura 1.** Imagem da espécie-alvo, *Maxillaria picta*. Fotografia: C. A. Stefanello. Barra: 5 cm.

### 3.2 TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO*

A propagação *in vitro* ou cultura de tecidos vegetais utiliza materiais vegetais (células, tecidos ou órgãos) advindos de uma planta matriz, para serem cultivados em meio nutritivo sob condições assépticas e ambiente controlado. Essa ferramenta biotecnológica possibilita a multiplicação de plantas em larga escala, produção de

plantas livres de doenças e de metabólitos de interesse comercial (GEORGE et al., 2008; ESPINOSA-LEAL et al., 2018).

A propagação de orquídeas por meio do cultivo *in vitro* tem sido amplamente usada para a multiplicação de orquídeas como uma alternativa aos métodos lentos de regeneração convencionais na natureza (LAL e SINGH, 2020). As técnicas da cultura de tecidos vegetais para as orquídeas têm o objetivo de conservar sua biodiversidade, melhorar a qualidade das flores e conferir resistência aos estresses bióticos e abióticos (HOSSAIN et al., 2013). Apesar do cultivo *in vitro* de orquídeas ter se desenvolvido nos últimos anos, a técnica ainda é limitada devido aos problemas com compostos fenólicos dos explantes, transplante para o campo e variação somaclonal, (LAL e SINGH, 2020).

Foram desenvolvidos diferentes protocolos para a propagação em larga escala de espécies de orquídeas, como a germinação assimbiótica por sementes, ou a utilização de diferentes explantes, incluindo ápices caulinares, nós de caules, brotos, ápice das raízes, folhas, gemas axilares e segmentos de rizoma (CHUGH et al., 2009; LAL e SINGH, 2020). A escolha correta do explante e método utilizado tem efeito no sucesso da cultura de tecidos (GEORGE et al., 2008).

A germinação assimbiótica tem sido o método mais utilizado para a multiplicação de diferentes espécies de orquídeas, uma vez que esse método obtém as maiores taxas de germinação das sementes e grande quantidade de mudas, em comparação com as condições naturais. As plantas produzidas por meio da germinação assimbiótica possuem variabilidade genética e são estabelecidas em condições assépticas com alta capacidade de propagação (DUTRA et al., 2008; ZENG et al., 2012).

### 3.3 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura fornece as substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas no cultivo *in vitro* (GEORGE et al., 2008). Cada meio de cultura consiste de basicamente sais minerais (macronutrientes e micronutrientes), açúcar, vitaminas, reguladores de crescimento e água. Existem diversas formulações de meio de cultura, a escolha do meio mais adequado é dependente dos requisitos nutricionais necessários de cada espécie, e conseqüentemente, o sucesso da técnica

de cultivo *in vitro* também é altamente dependente da escolha correta do meio de cultura (GAMBORG et al., 1976).

Os meios de cultura mais comumente usados para a propagação *in vitro* de orquídeas são os meios: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) VW (VACIN e WENT, 1949) e o meio KC (PANT, 2013). No entanto, o meio de cultura WPM tem apresentado os melhores resultados para a germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas encontradas na Mata Atlântica (FRANCESCHI et al., 2019; KOENE et al., 2019). Alguns meios são projetados para sua utilização por gêneros específicos, enquanto outros para um amplo espectro (PANT, 2013).

### 3.4 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

Os reguladores de crescimento vegetal são usados na cultura de tecidos e tem como função controlar o desenvolvimento e diferenciação *in vitro* das orquídeas. As auxinas e citocininas, são adicionadas ao meio de cultura e promovem aumento do crescimento das mudas (ROBERTS e DIXON, 2008). Esses reguladores do crescimento vegetal podem estimular de maneira adicional a regulação da proliferação dos tecidos e o desenvolvimento das plantas (AUNG et al., 2022).

As citocininas são responsáveis pela divisão celular e são amplamente utilizadas para a indução de brotações, sendo o BAP a mais comumente usada, uma vez que esse fitorregulador promove a formação de maior número de brotos e maior comprimento dos brotos (PANT e THAPA, 2012). Além disso, a citocinina BAP também é comumente utilizada em combinação com a auxina ácido 1-naftalenoacético (ANA), sendo esses, os fitorreguladores mais utilizados na propagação *in vitro* de orquídeas, uma vez que a combinação desses reguladores pode ser efetiva para a regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e multiplicação de brotos (PRADHAN et al., 2013; BAKER et al., 2014).

Assim como em outras plantas, o surgimento de novas raízes em orquídeas pode ser induzido com a adição de reguladores de crescimento vegetal como as auxinas (HEW e CLIFFORD, 1993; PANT, 2013). Essa classe de fitorregulador é considerada eficiente em acelerar os processos de indução radicular e diferenciação dos pólos de xilema e floema (ASGHAR et al., 2011). Ácido 1-naftalenoacético (ANA) é uma das auxinas mais utilizadas, porém o ácido indol butírico (AIB) e ácido indolacético (AIA) foram mais eficazes em muitas espécies de orquídeas para a

formação de raízes (NOVAK et al., 2014). Além do uso de auxinas, a redução pela metade da concentração de sais minerais do meio de cultura desempenha papel benéfico no enraizamento das orquídeas (TAO et al., 2011).

### 3.5 VENTILAÇÃO NATURAL

A ventilação natural é um sistema de cultivo que utiliza membranas que permitem trocas gasosas entre o ambiente *in vitro* e *ex vitro*. As membranas geralmente são instaladas nas tampas dos frascos de cultivo e propiciam troca de gases do ambiente interno do frasco de cultivo com o ambiente externo, sem que haja contaminações (KOZAI, 2010). Os benefícios são: melhores condições para a fotossíntese, aumento das taxas de crescimento, e favorecimento da formação e funcionalidade dos estômatos (FRITSCHE et al., 2022).

O cultivo *in vitro* convencional impede as trocas gasosas com o ambiente externo, acarretando em maior teor de umidade, flutuações nos níveis de CO<sub>2</sub>, acúmulo de etileno que diminuem as taxas de fotossíntese e menor absorção de água e nutrientes (ZOBAYED, 2005; SALDANHA et al., 2012).

Em sistemas de cultivo sob ventilação natural ocorre diminuição da umidade relativa dentro dos frascos e aumento da aeração, o que proporciona plantas possivelmente mais adaptadas para as condições *ex vitro* (Da SILVA et al., 2014).

O uso da ventilação natural tem favorecido o cultivo *in vitro* de diversas espécies de orquídeas, proporcionando aumento da altura, diâmetro e comprimento das plantas de *Cattleya nobilior* (FREITAS et al., 2021). Melhora do crescimento e qualidade das mudas, incluindo a concentração de pigmentos fotossintéticos e características indicadoras de maior resistência a estresses bióticos e abióticos em *Epidendrum fulgens* (FRITSCHE et al., 2022) e maior crescimento em plantas *in vitro*, bem como maior espessura foliar e estômatos possivelmente mais funcionais em *Cattleya walkeriana* (Da SILVA et al., 2014).

### 3.6 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

O sucesso da cultura de tecidos vegetais é dependente da capacidade de sobrevivência das plantas quando transferidas para o ambiente *ex vitro*. O ambiente do cultivo *in vitro* resulta na formação de mudas com morfologia externa, anatomia e

fisiologia alteradas. As plantas micropropagadas convencionalmente possuem cutícula e cera epicuticular pouco desenvolvidas, aparato estomático disfuncional e, capacidade fotossintética pouco desenvolvida, além das plantas serem incapazes de lidar com patógenos. Quando são transplantadas para o ambiente natural, estão sujeitas à condições diferentes das quais estavam acostumadas no cultivo *in vitro*, como: alta intensidade luminosa, grande variação térmica e baixa umidade relativa, além disso, as mudas também são expostas a estresses bióticos como a microbiota do solo, sendo necessário acostumar as plantas micropropagadas às condições naturais, geralmente em casa de vegetação, por um processo chamado de aclimatização (CHANDRA et al., 2010).

A aclimatização é uma etapa crítica pois a transferência das plantas da sala de cultivo para o ambiente externo as torna sujeitas à desidratação e murcha permanente em virtude da mudança de ambiente, caso não sejam tomadas precauções para adaptar as mudas ao novo ambiente. Nesse sentido, estudos são necessários com o objetivo de reduzir as perdas nesta etapa. A escolha correta do substrato para a aclimatização tem influência nas taxas de sobrevivência das plantas (SILVA et al., 2017).

Neste contexto, o presente trabalho é composto por dois capítulos. O primeiro capítulo buscou avaliar os efeitos do BAP na indução de brotações *in vitro* com base em aspectos morfoanatômicos, e investigar o efeito residual da citocinina na concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas aclimatizadas de *Maxillaria picta*. O segundo capítulo teve como objetivo analisar o desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* da *Maxillaria picta* em sistema de cultivo convencional e sob ventilação natural, principalmente através de avaliações de morfologia externa e fisiológicas. Todas essas atividades buscaram avançar no conhecimento a respeito da morfoanatomia, bioquímica e fisiologia da espécie cultivadas *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ASGHAR, S. et al. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 16, p. 3097–3103, 2011.
- AUNG, W. T. et al. Effects of Different Natural Extracts and Plant Growth Regulators on Plant Regeneration and Callus Induction from Pseudobulbs Explants through *in vitro* Seed Germination of Endangered Orchid *Bulbophyllum auricomum* Lindl. **Journal of BioEnvironment Control**, v. 31, n. 2, p. 133–141, 2022.
- BAKER, A. et al. Micropropagation of *Orchis catasetum* – a rare and endangered orchid. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 13, n. 2, p. 197–205, 2014.
- BARROS, F. et al. Check-list das Orchidaceae do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, p. 287–296, 2018.
- CARLUCCI, M. B.; MARCILIO-SILVA, V.; TOREZAN, J. M. The southern Atlantic Forest: use, degradation, and perspectives for conservation. **The Atlantic Forest: History, biodiversity, threats and opportunities of the mega-diverse Forest**, p. 91–111, 2021.
- CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology letters**, v. 32, p. 1199–1205, 2010.
- CHASE, M. W. et al. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, n. 2, p. 151–174, 2015.
- CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDMANEE, C. Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. **Australian journal of crop science**, v. 4, n. 9, p. 750–756, 2010.
- CHEN, J. et al. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1009–1016, 2011.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507–520, 2009.
- CINTRA, M. C. S. et al. Filling the gap to avoid extinction: Conservation status of Brazilian species of *Epidendrum* L. (Orchidaceae). **Journal for Nature Conservation**, v. 71, p. 126–328, 2023.
- DA SILVA, A. B. et al. *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, v. 61, p. 883–890, 2014.

DETTKE, G. A.; SANCHES-MARQUES, A. M. M.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Anatomia vegetativa de três espécies de *Maxillaria* Ruiz et Pavón (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 531–533, 2007.

DOS SANTOS, Silvia Almeida et al. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Brasiliorchis picta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 134–144, 2016.

DUTRA, D. et al. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 94, p. 11–21, 2008.

ESPINOSA-LEAL, C.A.; PUENTE-GARZA, C.A.; GARCÍA-LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 1–18, 2018.

FAY, M. F. Orchid conservation: How can we meet the challenges in the twenty-first century? **Botanical Studies**, v. 59, n.1, p.16, 2018.

FLORA DO BRASIL. (2020). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em 19 Abril 2023

FRANCESCHI, C. R. B et al. Storage and *in vitro* germination of orchids (Orchidaceae) seeds from Atlantic Forest–Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 03, p. e20180439, 2019.

FRITSCHÉ, Y.; PINHEIRO, M. V. M.; GUERRA, M. P. Light quality and natural ventilation have different effects on protocorm development and plantlet growth stages of the *in vitro* propagation of *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 146, p. 864–874, 2022.

FREITAS, K. G. de et al. *In vitro* growth of *Cattleya nobilior* Rchb. f.: culture media, sealing systems and irradiance. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. e67131, 2021.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. et al. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 801–807, 2012.

GAMA, P.G. et al. Gênero *Maxillaria* - uma revisão. **Ciências agrárias e meio ambiente: pesquisas, desafios e inovações tecnológicas**, p. 36–53, 2022.

GAMBORG, O. L. et al. Plant tissue culture media. **In vitro**, v. 12, n. 7, p. 473-478, 1976.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. Micropropagation: uses and methods. **Plant Propagation by Tissue Culture, The Background**, v.1, p. 29–64, 2008.

GUTIÉRREZ, R. M. P. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 8, p. 592–638, 2010.

HEW, C. S.; CLIFFORD, P. E. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. **Plant growth regulation**, v. 13, p. 231-239, 1993.

HOLTZMEIER, M. A.; STERN, W. L.; JUDD, W. S. Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of *Maxillaria* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 127, n. 1, p. 43–82, 1998.

HOSSAIN, M. Musharof et al. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, n. 2, p. 69–139, 2013.

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.

JAIN, A. et al. Changes in global Orchidaceae disease geographical research trends: recent incidences, distributions, treatment, and challenges. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 13–29, 2021.

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

LAL, N.; SINGH, M. - Prospects of Plant Tissue Culture in Orchid Propagation: A Review. **Indian Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. 103–110, 2020.

LIPÍŃSKA, M. M.; KOWALKOWSKA, A. K. Floral morphology and micromorphology of selected *Maxillaria* species (Maxillariinae, Orchidaceae). **Wulfenia**, v. 25, p. 242–272, 2018.

LIPÍŃSKA, M. M. et al. Active Compounds with Medicinal Potential Found in Maxillariinae Benth. (Orchidaceae Juss.) Representatives - A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 739, 2023.

MARTINS, J. P. R. et al. Modulation of the anatomical and physiological responses of *in vitro* grown *Alcantarea imperialis* induced by NAA and residual effects of BAP. **Ornamental Horticulture**, v. 26, p. 283–297, 2020.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade. Lista nacional oficial de espécies da flora ameaçadas de extinção. **Diário Oficial da União**. v. 108, p. 74, 2022.

MORAES, C. et al. Florística e fitossociologia da família Orchidaceae no Centro de Educação Ambiental “Francisco Mendes”, município de Mogi Guaçu, SP, Brasil. **Scientia Plena**, v. 6, n. 1, 2010.

NOVAK, S. D.; LUNA, L. J.; GAMAGE, R.N. Role of auxin in orchid development. **Plant signaling & behavior**, v. 9, n. 10, p. e972277, 2014.

PANT, B.; THAPA, D. *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 42, p. 9970–9974, 2012.

PANT, B. Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. **African Journal of Plant Science**, v. 7, n. 10, p. 448–467, 2013.

PAULILO, M. T. S.; VIANA, A. M.; RANDI, Á. M. Fisiologia vegetal. **CED/LANTEC/UFSC**, 2010.

PRADHAN, S.; PAUDEL, Y. P.; PANT, B. Efficient regeneration of plants from shoot tip explants of *Dendrobium densiflorum* Lindl., a medicinal orchid. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 12, 2013.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, v. 18, n. 8, p. R325–R329, 2008.

SALDANHA, C. W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, p. 413–422, 2012.

SILVA, M. F. F.; SILVA, J. B. F. Orquídeas Nativas da Amazônia Brasileira II. **Rev. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi**, 518 p, 2010.

SILVA, J. A. T. et al. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 110–124, 2017.

SILVEIRA, A. A. C. et al. Shoot proliferation, leaf anatomy and pigment content of *Eugenia dysenterica* growing in conventional and natural ventilation systems. **Revista Ceres**, v. 66, p. 363–371, 2019.

SINGER, R. B.; KOEHLER, S. Pollinarium Morphology and Floral Rewards in Brazilian Maxillariinae (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 93, n. 1, p. 39–51, 2004.

SOBREIRO, A. I. et al. Continuous Micro-Environments Associated Orchid Bees Benefit from an Atlantic Forest Remnant, Paraná State, Brazil. **Sociobiology**, v. 66, n. 2, p. 293–305, 2019.

SCHUITEMAN, A.; CHASE, M. A reappraisal of *Maxillaria* (Orchidaceae). **Phytotaxa**, v. 225, n. 1, p. 1–78, 2015.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of botany**, v. 104, n. 3, p. 543–556, 2009.

TAO, J. et al. Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.69, p. 15639–15646, 2011.

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

ZENG, S. et al. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 198–209, 2012.

ZHANG, S. et al. Physiological diversity of orchids. **Plant diversity**, v. 40, n. 4, p. 196–208, 2018.

ZOBAYED, S. M. A. Ventilation in micropropagation. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**, p. 147-186, 2005.

#### 4. CAPÍTULO I: EFEITO DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Maxillaria picta* (ORCHIDACEAE)

##### RESUMO

*Maxillaria picta* é uma orquídea nativa da América do Sul com ocorrência natural na Mata Atlântica, um hotspot de biodiversidade altamente ameaçado e fragmentado. O cultivo *in vitro* é uma excelente alternativa para conservação *ex situ* de orquídeas e permite propagação eficiente de plantas em larga escala. O BAP é frequentemente utilizado no cultivo *in vitro*, uma vez que estimula a formação de brotos. No entanto, os aspectos morfoanatômicos de plântulas expostas ao BAP e seus efeitos residuais ainda permanecem obscuros. Assim, avaliamos os efeitos morfoanatômicos do BAP no cultivo *in vitro* e a concentração de pigmentos fotossintéticos de plantas aclimatizadas de *M. picta*. Mudanças obtidas por germinação de sementes *in vitro* foram submetidas a diferentes concentrações de BAP (0, 3, 6, 9, 12 e 15  $\mu\text{M}$ ), em meio de cultura WPM por 60 dias. O ápice radicular e a porção mediana das folhas foram coletadas em diferentes tempos de exposição ao BAP (0, 15, 30 e 45 dias) e avaliadas anatomicamente por microscopia de luz. Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as variáveis: sobrevivência (%), escurecimento dos tecidos (%), número de brotos, folhas e raízes e comprimento dos brotos, folhas e raízes. Em seguida os explantes foram enraizados *in vitro* em meio de cultura WPM suplementado com 1  $\mu\text{M}$  de AIB por 30 dias, e aclimatizados em substrato vermiculita em casa de vegetação. Após 90 dias de aclimatização, a concentração de pigmentos fotossintéticos foi quantificada. Nossos achados indicam que a suplementação de 9  $\mu\text{M}$  de BAP melhora significativamente a formação de brotos (1.9) e folhas (11). No entanto, concentrações acima de 9  $\mu\text{M}$  de BAP aumentaram o escurecimento dos explantes e diminuíram significativamente a concentração de todos os pigmentos fotossintéticos em plantas aclimatizadas, acarretando possivelmente em diminuição da eficiência do aparato fotossintético dessas plantas. O BAP também afetou negativamente a iniciação da raiz e o seu comprimento médio. A microscopia de luz revelou que explantes cultivados com 9 e 12  $\mu\text{M}$  de BAP apresentaram maior desenvolvimento do cilindro vascular das raízes. Portanto, este estudo mostrou o efeito da suplementação do BAP nas mudas durante o cultivo *in vitro* e na aclimatização, de maneira geral, recomenda-se o seu uso em concentração não superior a 9  $\mu\text{M}$ . Os dados apresentados fornecem novos insights sobre o cultivo *in vitro* de *M. picta* e outras espécies correlacionadas.

Palavras-chave: micropropagação; fitorregulador; pigmentos fotossintéticos.

## ABSTRACT

*Maxillaria picta* is a native South American orchid that naturally occurs in the Atlantic Forest, a highly threatened and fragmented biodiversity hotspot. The *in vitro* culture is an excellent alternative for *ex-situ* orchid conservation and allows efficient large-scale plant propagation. BAP is often used in *in vitro* culture to stimulate shoot formation. However, the morphoanatomical aspects of seedlings exposed to BAP and its residual effects still remain unclear. Thus, we evaluated the morphoanatomical effects of BAP on *in vitro* culture and on the concentration of photosynthetic pigment of *M. picta* acclimatized plants. Seedlings were obtained by *in vitro* seed germination were subjected to different concentrations of BAP (0, 3, 6, 9, 12 and 15  $\mu\text{M}$ ) in WPM culture medium for 60 days. Root apex and median portions of leaves were collected at different times of exposure to BAP (0, 15, 30 and 45 days) and anatomically evaluated by light microscopy. After 60 days in culture, the following variations were evaluated: survival (%), tissue browning (%), number of shoots, leaves and roots and length of shoots, leaves and roots. Then, the explants were rooted *in vitro* in WPM culture medium supplemented with 1  $\mu\text{M}$  indole butyric acid (IBA) for 30 days, and acclimatized in vermiculite substrate in a greenhouse. After 90 days of acclimatization, the concentration of photosynthetic pigments was quantified. Our findings indicate that supplementation of 9  $\mu\text{M}$  BAP significantly improved the formation of shoots (1.9) and leaves (11). However, concentrations above 9  $\mu\text{M}$  BAP increased tissue browning and significantly decreased the concentration of all photosynthetic pigments in acclimatized plants, possibly resulting in a decrease in the efficiency of the photosynthetic apparatus of these plants. BAP negatively affected root initiation and its average length. Light microscopy revealed that explants grown with 9 and 12  $\mu\text{M}$  of BAP presented greater development of the vascular cylinder of the roots. Therefore, this study showed the effect of BAP supplementation on seedlings during *in vitro* culture and acclimatization, in general, its use is recommended at a concentration not exceeding 9  $\mu\text{M}$ . The data presented provide new insights into the *in vitro* culture of *M. picta* and other related species.

Keywords: micropropagation; phytohormone; photosynthetic pigments.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A *Maxillaria picta* Hook. é uma orquídea epífita nativa da América do Sul, encontrada principalmente na Mata Atlântica, um bioma que apresenta alta biodiversidade, no entanto amplamente ameaçado e fragmentado (TABARELLI et al., 2005). A espécie é identificada pela presença de pseudobulbos bifoliados e labelo trilobado. As flores de *M. picta* são fortemente perfumadas, emitindo fragrância semelhante a mel, porém elas não produzem néctar ou qualquer outra recompensa. A espécie possui interesse comercial devido suas flores apresentarem alto potencial ornamental. Além disso, a espécie possui compostos ativos de ação anti-inflamatórias, antibacteriana, antioxidantes e outras propriedades (LIPÍŃSKA et al., 2023). Esse conjunto de fatores demonstra a importância de estudos relacionados ao cultivo e conservação da *M. picta*.

No geral, as orquídeas produzem muitas sementes em suas cápsulas, no entanto esse grupo apresenta dificuldades para propagação na natureza, sendo dependentes da associação com fungos micorrízicos para germinação e posterior desenvolvimento das plântulas (SWARTS e DIXON, 2009).

Nesse sentido, o cultivo *in vitro* a partir da germinação assimbiótica é uma alternativa que permite a propagação em larga escala de espécies em ambiente asséptico (DUTRA et al., 2008). O meio de cultura e os fitorreguladores utilizados são os principais componentes que determinam o sucesso da propagação *in vitro* de orquídeas (CHUGH et al., 2009). Estudos desenvolvidos por Dos Santos et al. (2016) indicaram que o meio WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) mais basal e a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), apresentaram os melhores resultados para a germinação de sementes e para a regeneração de estruturas semelhantes a protocormos, respectivamente, no cultivo *in vitro* de *Brasiliorchis picta* (Hook.) R. Singer, S. Koehler & Carnevali, sinônimo de *Maxillaria picta*. No entanto, estudos voltados para a indução de brotações laterais com uso de BAP avaliando aspectos morfoanatômicos e seus efeitos residuais na concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas aclimatizadas de *M. picta* ainda não foram realizados.

As citocininas são reguladores de crescimento vegetal que atuam na divisão celular e são amplamente utilizadas durante a etapa de multiplicação *in vitro*, uma vez que induzem e diferenciam brotos. O BAP é a citocinina mais comumente utilizada no cultivo *in vitro*, uma vez que apresenta respostas positivas para a formação de brotos

e crescimento em diversas espécies vegetais (PANT e THAPA, 2012). Entretanto, alguns aspectos anatômicos e bioquímicos das plantas cultivadas *in vitro* podem ser alterados devido às condições de cultivo, à exposição ao BAP e ao efeito residual deste regulador do crescimento vegetal.

A análise anatômica de plantas cultivadas *in vitro* é uma importante ferramenta para caracterizar o desenvolvimento vegetal, principalmente sob o efeito de fitorreguladores e diferentes condições de cultivo. O número de estudos que incorporam a análise da anatomia de raízes e folhas em microscopia de luz vem aumentando nos últimos anos, sobretudo, com o objetivo de complementar as análises morfológicas, visualizar o desenvolvimento de tecidos e desordens que impactam diretamente na propagação *in vitro* (SOARES et al., 2012). Dos Santos Anjos et al. (2021) visualizaram dados anatômicos que corroboraram com os dados de morfologia externa para *Dryadella zebrina*.

Apesar do impacto positivo das citocininas na formação de brotos, o BAP pode afetar negativamente o aparato fotossintético das plantas cultivadas *in vitro*. O efeito residual do BAP diminuiu a concentração de pigmentos fotossintéticos em *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) mesmo após 120 dias da exposição ao fitorregulador (MARTINS et al., 2020). Nesse sentido, estudos que visem analisar a concentração de pigmentos fotossintéticos são úteis para verificar o potencial fotossintético e, conseqüentemente, o estado fisiológico das plantas.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de BAP na indução de brotações *in vitro*, com base em aspectos morfoanatômicos, e investigar o efeito residual da citocinina na concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas aclimatizadas de *Maxillaria picta*.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado nos experimentos consistiu em sementes de *M. picta*, obtidas a partir de cruzamento controlado em planta mantida em casa de vegetação. A planta foi previamente coletada em Mata nativa de Pinhais, Paraná (25°24'05.0"S 49°06'58.9"W) e mantidas em cultivo protegido *ex situ*. Os espécimes foram depositados no Herbário UPCB (UFPR) sob o número de tombo: 110182.

### 4.2.2 Germinação *in vitro*

Cápsulas maduras de *M. picta* foram lavadas em água corrente e submetidas à assepsia em etanol 70% por 10 minutos, seguida de lavagem em água destilada e imersão em solução de hipoclorito de sódio 2%, acrescida de 0,1% de Tween® 20 por 30 minutos, na capela de fluxo laminar. Posteriormente, as cápsulas foram submetidas a tríplice lavagem com água destilada autoclavada e abertas com um corte longitudinal.

As sementes foram excisadas das cápsulas e suspensas em água destilada autoclavada. Alíquotas de 500 µL da solução de sementes foram inoculadas em placas de Petri (10 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo 25 mL de meio de cultura.

As sementes foram inoculadas em meio WPM suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 g L<sup>-1</sup> de glutamina. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de 2 g L<sup>-1</sup> do agente geleificante Phytigel® e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. O material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por quatro meses.

### 4.2.3 Alongamento e desenvolvimento de plântulas

Após a germinação *in vitro*, os explantes foram transferidos para frascos (8,5 cm de altura x 5,8 cm de diâmetro) contendo 30 mL de meio de cultura WPM com a mesma composição descrita acima, com o objetivo de realizar o alongamento e

desenvolvimento das mudas. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

As mudas foram mantidas por cinco meses em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 ° C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### 4.3 MULTIPLICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP

As mudas alongadas e desenvolvidas de nove meses da etapa anterior foram utilizadas como fonte de explante para este experimento. O meio de cultura utilizado foi o WPM com os mesmos componentes descritos acima e suplementado com diferentes concentrações de BAP (0, 3, 6, 9, 12 e 15 μM). O meio de cultura teve pH ajustado para 5,8 antes da adição de 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Os explantes (plantas inteiras contendo em média três folhas de 4 cm e quatro raízes com 3 cm) foram transferidos para frascos de vidro (12,5 cm de altura x 5,8 cm de diâmetro) contendo 30 mL de meio de cultura. Foram inoculadas cinco plantas por frasco, com 15 frascos por tratamento. As culturas foram transferidas para uma sala de crescimento a uma temperatura de 25 ± 2 ° C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz sob lâmpadas LED brancas (40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Após 60 dias do cultivo, avaliadas as seguintes variáveis: sobrevivência (%), escurecimento tecidual (%), número médio e comprimento médio dos brotos, folhas e raízes.

#### 4.4 ANÁLISE ANATÔMICA

Para as análises morfoanatômicas foram coletadas amostras da porção mediana da terceira folha mais alongada e amostras de ápices radiculares de plantas de todos os tratamentos em diferentes tempos de exposição ao BAP (0, 15, 30 e 45 dias) totalizando 38 amostras.

O material foi fixado em solução de tampão fosfato 0,2 M e paraformaldeído 2,5% a 4°C por 24 h. Em seguida, o material foi lavado duas vezes por 15 minutos com tampão fosfato 0,1 M e desidratado em série etílica com concentrações crescentes (30, 50, 70 e 90%) duas vezes por 15 minutos, seguido de duas lavagens

de 30 min em etanol absoluto. Em seguida, as amostras foram infiltradas em Histoiresina (Leica Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Esse processo foi realizado por progressão da proporção Histoiresina:Etanol, sendo essas 1:2, 1:1 e 2:1, cada etapa com duração de duas horas. Por fim, as amostras foram infiltradas com solução de Histoiresina pura e colocadas em estufa à vácuo por 24 horas.

Após esse período, as amostras foram emblocadas em Histoiresina e endurecedor na proporção de 15:1 e mantidas em estufa à 40°C por 3 dias. Os blocos foram submetidos à secção no micrótomo de rotação Olympus (CUT 4055) em secções transversais de 5 µm. As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina 0,05% em solução de tampão fosfato pH 6.8, conforme o protocolo descrito por O'Brien et al. (1964). As microfotografias com o microscópio óptico Olympus BX51 acoplado à câmera digital Olympus DP72.

#### 4.5 Enraizamento e aclimatização

Plantas obtidas na etapa de indução das brotações foram transferidas para frascos de vidro (12,5 cm de altura x 5,8 cm de diâmetro) contendo 30 mL de meio de cultura WPM suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 g L<sup>-1</sup> de glutamina e 1 µM de AIB com o objetivo de realizar o enraizamento *in vitro* das plantas. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de 2 g L<sup>-1</sup> do agente geleificante Phytigel® e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 2 ° C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Após 30 dias, as plantas foram transferidas para casa de vegetação e plantadas em bandeja sementeira (5 cm de altura X 3 cm cada célula) no substrato vermiculita com granulometria média e mantidas por 90 dias em iluminação artificial (intensidade luminosa de 80 µmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), fotoperíodo de 12 horas e temperatura média de 20 ± 5 °C. Foram feitas irrigações manuais, três vezes por semana.

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

As plantas aclimatizadas dos tratamentos 0, 3, 6, 9 e 12 µM de BAP foram utilizadas para essa análise. Em microtubos foram adicionados 1,5 ml de acetona pura

e mantidos por 24h em refrigeração a 4°C. Foram coletados 50 mg da região mediana das folhas mais desenvolvidas de todos os tratamentos e adicionados nos microtubos com acetona. Os microtubos foram mantidos em refrigeração por 24h no escuro e sob agitação por 7h a 1100 rpm em um Finemixer SH2000 (FINEPCR, Coreia). Foram coletados 150 µL do sobrenadante resultante para quantificação dos pigmentos. Foram realizadas três repetições por tratamento e cinco replicatas técnicas por repetição.

A quantificação dos pigmentos foi realizada em espectrofotômetro LMR FLEX UV-VIS, onde foram coletados dados de absorbância nos comprimentos de onda de 661, 644, 470 nm (LICHTENTHALER, 1987). Os cálculos da concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenoides foram realizados de acordo com LICHTENTHALER (1987). A concentração dos pigmentos foi expressa em microgramas de pigmento por grama de massa fresca ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

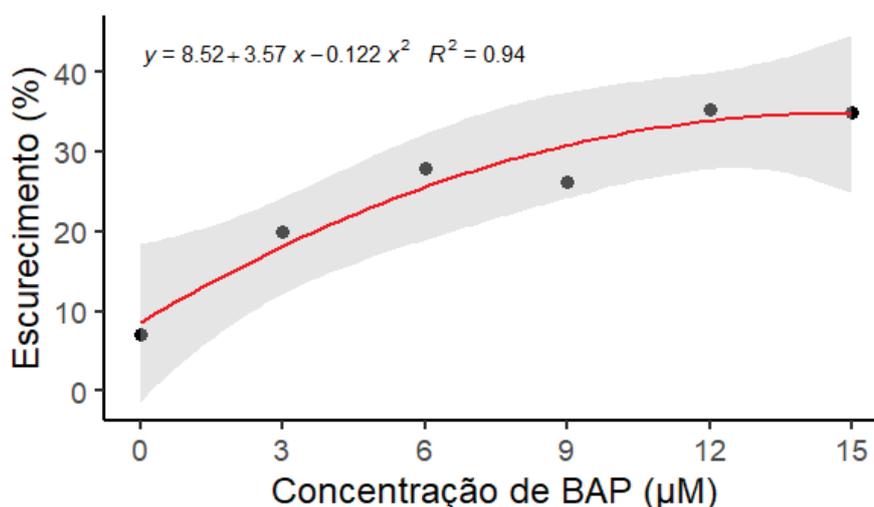
Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão testando modelo linear ou não-linear, as análises foram realizadas em ambiente R utilizando a interface gráfica Rstudio, versão 12.0+467. Para os dados dos experimentos de indução de brotações e quantificação de pigmentos fotossintéticos foram realizados o teste pós-hoc de separação de médias de Tukey (95%).

## 5. RESULTADOS

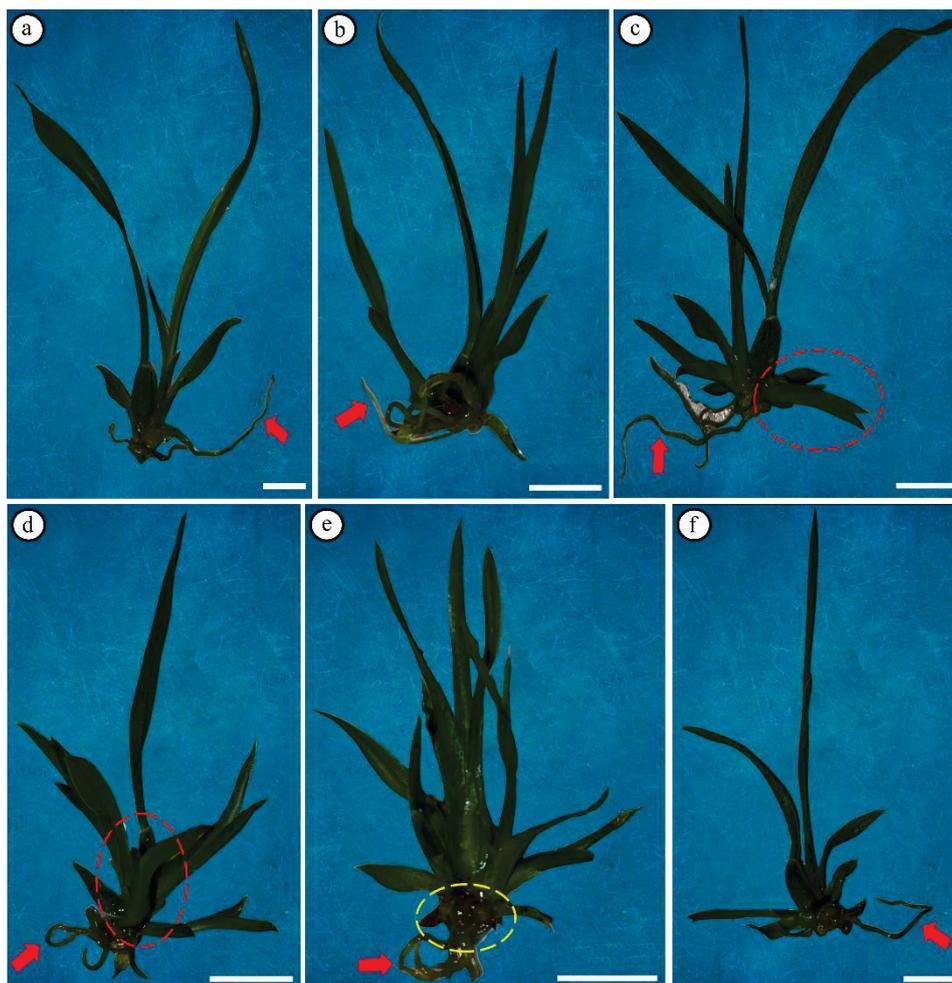
### 5.1 MULTIPLICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP

Os explantes cultivados em meio com as concentrações de BAP testadas apresentaram diferenças significativas para todos os parâmetros analisados, exceto para o comprimento médio de brotos.

As plantas de todos os tratamentos sobreviveram após 60 dias de cultivo, porém com o aumento da concentração de BAP as plantas apresentaram maior porcentagem de escurecimento dos tecidos. As concentrações de 12 e 15  $\mu\text{M}$  apresentaram maiores tendências ao escurecimento dos tecidos, com média de 35%. (Figura 2). O escurecimento dos tecidos ocorreu principalmente nas raízes jovens tornando-as com coloração marrom (Figura 3e). O tratamento controle apresentou a menor média de escurecimento dos tecidos (7%). Houve um aumento de 28% em média, entre o tratamento controle e os tratamentos 12 e 15  $\mu\text{M}$  de BAP. Portanto, foi possível observar que concentrações superiores a 12  $\mu\text{M}$  de BAP são potencialmente prejudiciais para o desenvolvimento *in vitro* de *M. picta*.



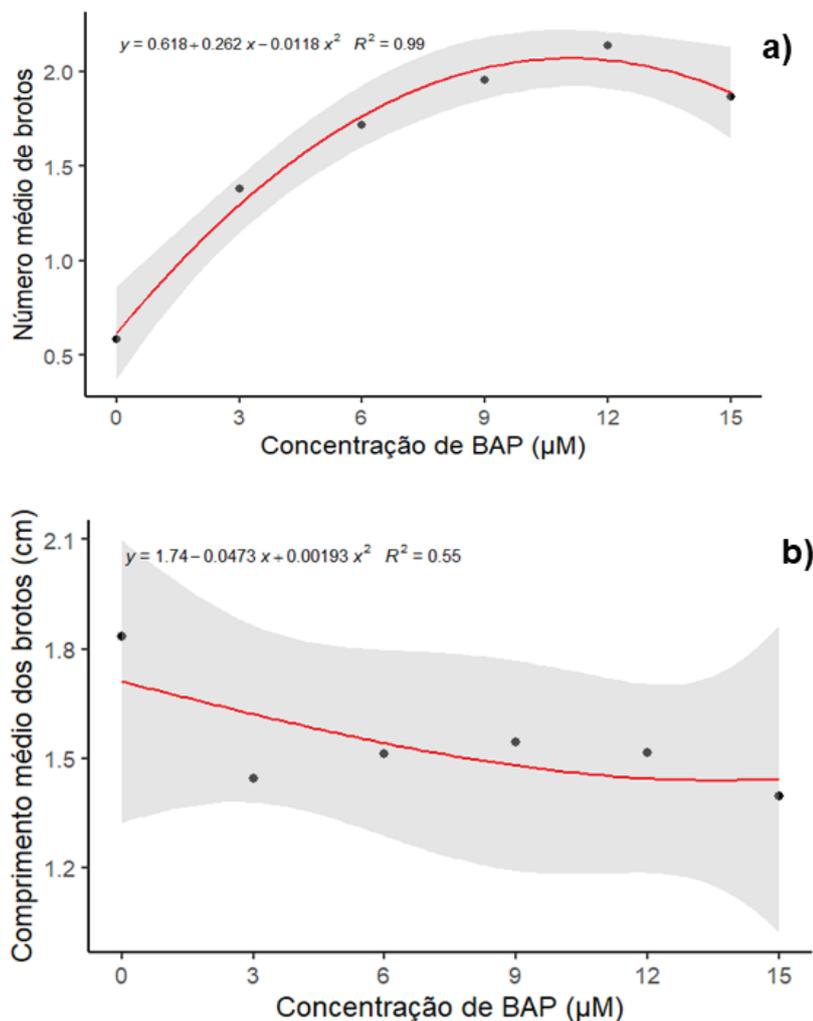
**Figura 2.** Porcentagem de escurecimento tecidual de plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. Bandas sombreadas indicam desvio padrão na média.



**Figura 3.** Aspectos morfológicos das plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. a) tratamento controle. b) 3  $\mu\text{M}$  de BAP. c) 6  $\mu\text{M}$  de BAP. d) 9  $\mu\text{M}$  de BAP. e) 12  $\mu\text{M}$  de BAP. f) 15  $\mu\text{M}$  de BAP. seta vermelha indica raiz. círculo vermelho indica broto formado. círculo amarelo indica escurecimento do tecido na base das raízes. Barra = 10 mm.

Com relação a formação de brotos, houve um aumento no número de brotos formados em resposta ao aumento na concentração de BAP avaliada. As concentrações de 9 e 12  $\mu\text{M}$  de BAP apresentaram as maiores tendências no número de brotos com 1,9 e 2,1 brotos em média, respectivamente (Figura 4a). O tratamento controle apresentou o menor número médio de brotos, com 0,6 brotos por planta. A concentração de 15  $\mu\text{M}$  de BAP demonstrou uma tendência de diminuição na formação de brotos, sugerindo um efeito prejudicial do BAP em altas concentrações. O número médio de folhas se correlacionou positivamente com o número médio de brotos.

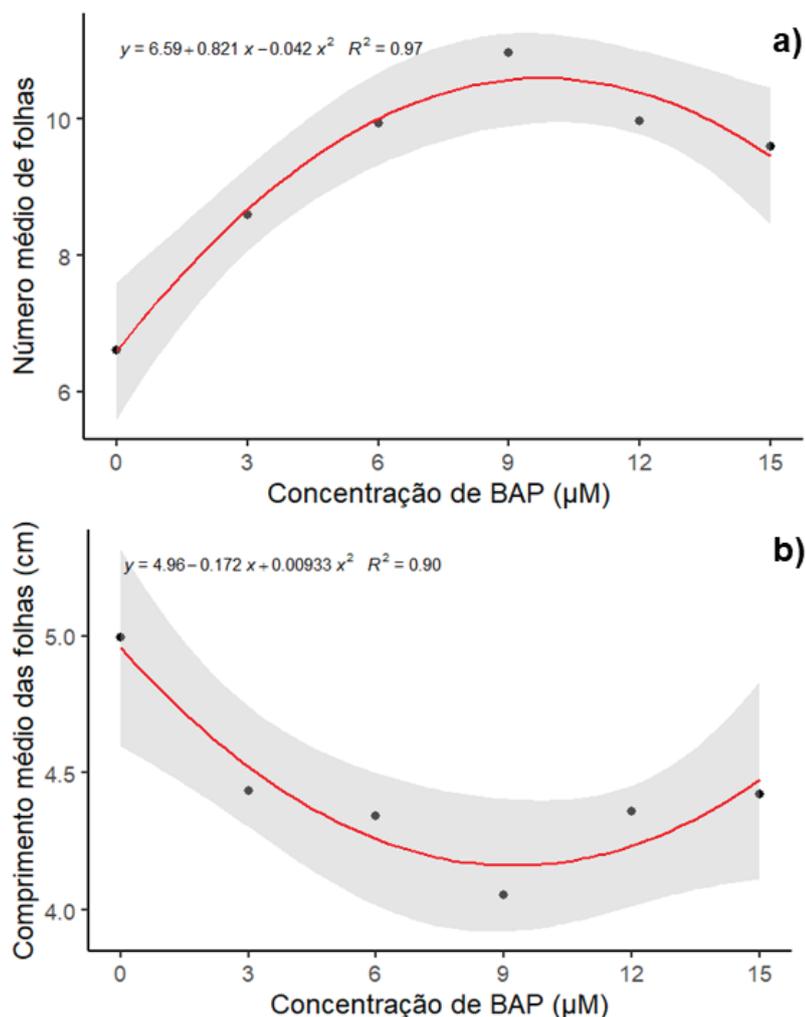
O comprimento médio dos brotos não apresentou diferença significativa entre as concentrações de BAP testadas (Figura 4b).



**Figura 4.** Número médio de brotos a) e comprimento médio de brotos b) de plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. Bandas sombreadas indicam desvio padrão na média.

Houve um aumento no número médio de folhas em virtude do aumento da concentração de BAP. Os explantes cultivados em meio contendo 6 e 9  $\mu\text{M}$  de BAP apresentaram as maiores tendências de número de folhas. O presente estudo observou uma média de 9,9 e 11 folhas por planta no tratamento suplementado com 6 e 9  $\mu\text{M}$  de BAP, respectivamente. O tratamento controle apresentou menor número médio de folhas (6,6) (Figura 5a). O tratamento com 15  $\mu\text{M}$  de BAP indicou uma tendência de diminuição do número de folhas.

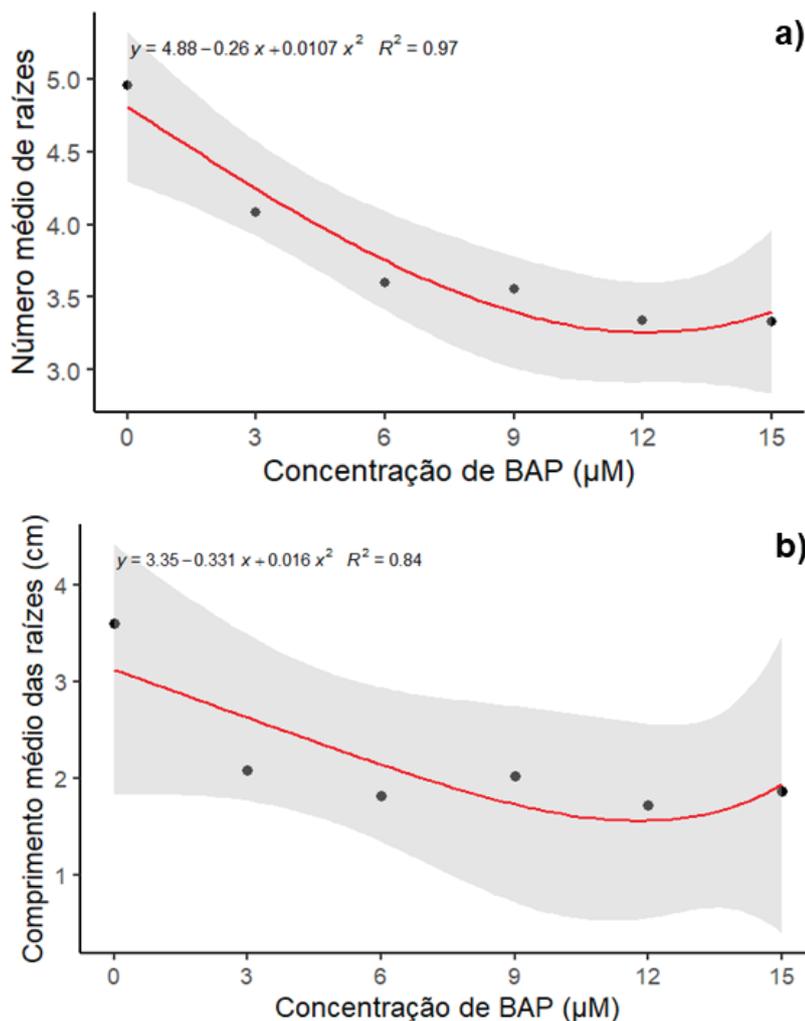
Em relação ao comprimento médio das folhas, houve diferença significativa no tratamento controle (média de 5 cm) comparado com todas as outras concentrações de BAP testadas (Figura 5b). Portanto, é possível concluir que a suplementação com BAP causou decréscimo no comprimento médio das folhas.



**Figura 5.** Número médio de folhas a) e comprimento médio de folhas b) de plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. Bandas sombreadas indicam desvio padrão na média.

Com relação a formação de raízes, o número médio de raízes formadas por planta de *M. picta* diminuiu com o aumento da concentração de BAP (Figura 6a). O maior número de raízes foi observado no tratamento controle, com média de 4,9 raízes por planta. Houve redução de 33% no número de raízes do tratamento controle para o tratamento com 15  $\mu\text{M}$  de BAP. O comprimento médio das raízes foi o parâmetro que mais se correlacionou positivamente com o número médio de raízes.

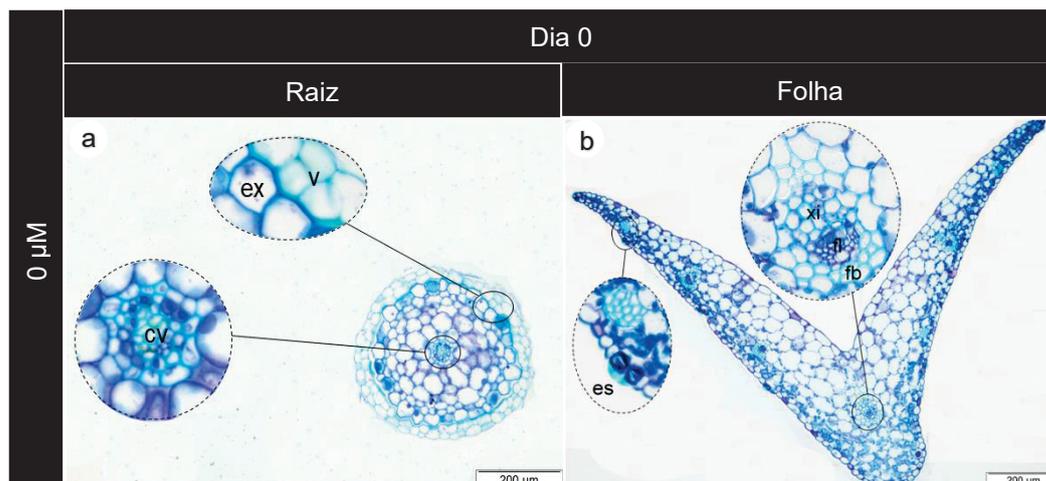
Houve redução no comprimento médio das raízes com o aumento da concentração da citocinina (Figura 6b). O tratamento controle apresentou o maior comprimento médio das raízes com 3,5 centímetros. O comprimento das raízes correlacionou-se fortemente de maneira positiva com número das raízes e comprimento dos brotos.



**Figura 6.** Número médio de raízes a) e comprimento médio de raízes b) de plantas de *Maxillaria picta* após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. Bandas sombreadas indicam desvio padrão na média.

## 5.2 ANÁLISE ANATÔMICA

As secções transversais das raízes de todos os tratamentos têm características típicas da família Orchidaceae, possuindo velame, córtex e cilindro vascular bem definidas. O cilindro vascular, endoderme e o velame apresentaram-se pouco desenvolvidos em plantas cultivadas no tratamento controle, em comparação com plantas cultivadas de outros tratamentos suplementados com BAP (Figura 7a). As folhas do tratamento controle não apresentam diferenças anatômicas nos tecidos em comparação com as folhas dos outros tratamentos (Figura 7b).



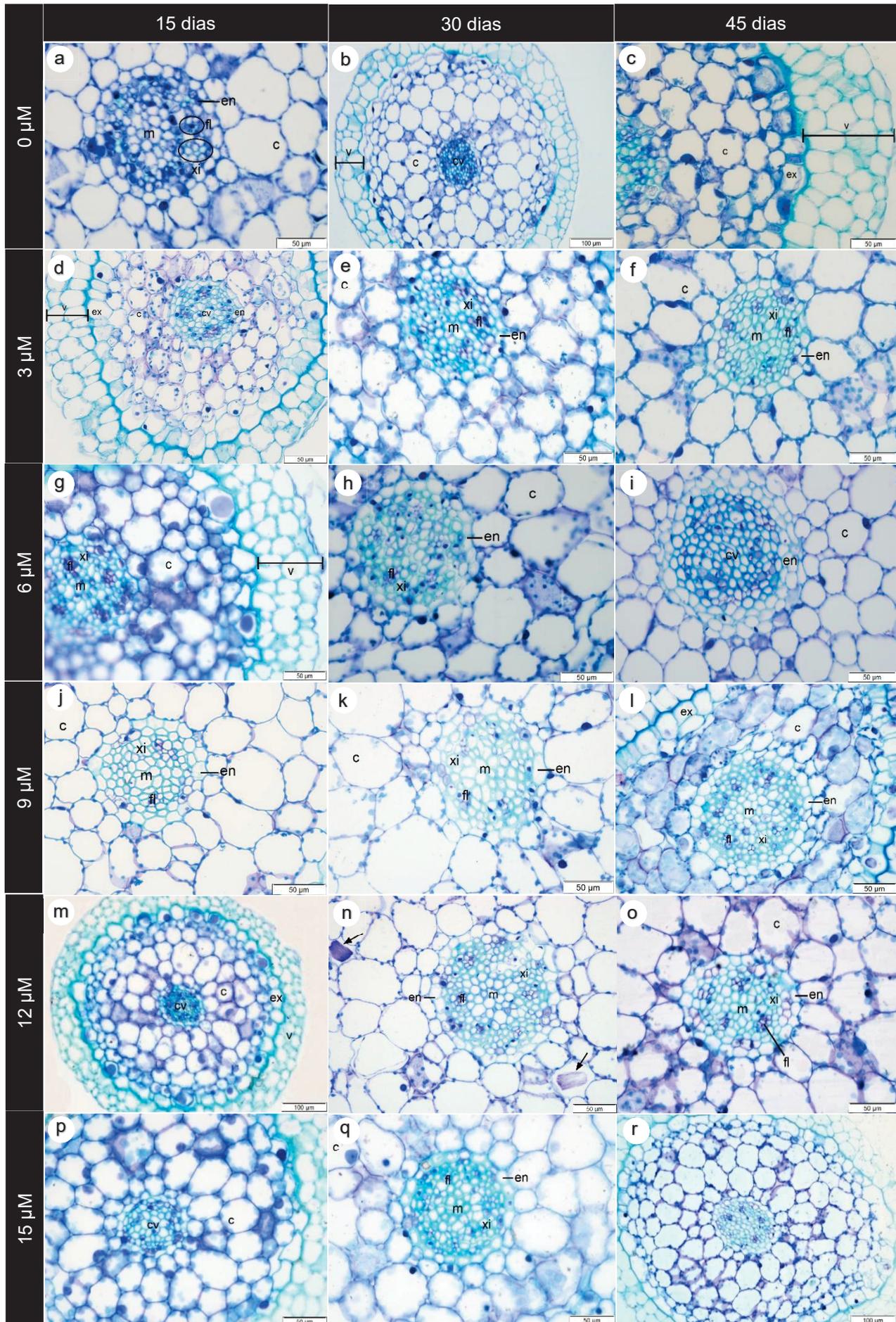
**Figura 7.** Aspectos anatômicos das plantas de *Maxillaria picta* em meio de cultura WPM sem a adição de 6-benzilaminopurina. a – Raiz. b – Folha. cv = cilindro vascular. ex = exoderme. v = velame. es = estômato. xi = xilema. fl = floema. fb = fibra.

Em relação a anatomia das raízes, a quantidade de camadas de células do velame variou entre duas a três camadas entre todos os tratamentos. Também foram observados espessamento em espiral nas paredes das células do velame (Figura 8c).

O córtex é formado de células parenquimáticas com aproximadamente cinco camadas de células, para todos os tratamentos. Foi possível observar idioblastos com ráfides e núcleo e nucléolo bem evidentes no tecido cortical (Figura 8n). A endoderme possui células pouco definidas nas concentrações mais baixas de BAP (0 e 3  $\mu\text{M}$ ).

No tratamento 9  $\mu\text{M}$  de BAP foi possível observar maior diferenciação das células da endoderme e da região medular no interior do cilindro vascular, nos diferentes tempos de exposição ao BAP, porém, em nenhum tratamento foi possível identificar as células do periciclo e a quantidade de pólos do xilema e floema formados (Figura 8a-r).

O cilindro vascular apresentou diâmetro reduzido e pouca diferenciação dos tecidos. Os explantes cultivados no tratamento controle indicaram o menor grau de diferenciação do cilindro vascular. Para todos os tratamentos, 45 dias de exposição ao BAP apresentou maior diferenciação dos tecidos do cilindro vascular em comparação com o mesmo material após 15 dias de exposição ao BAP, especialmente as plantas cultivadas em meio de cultura nas concentrações 9 e 12  $\mu\text{M}$  de BAP propiciaram visualizar melhor a diferenciação dos tecidos vasculares do cilindro vascular (Figura 8l-o).

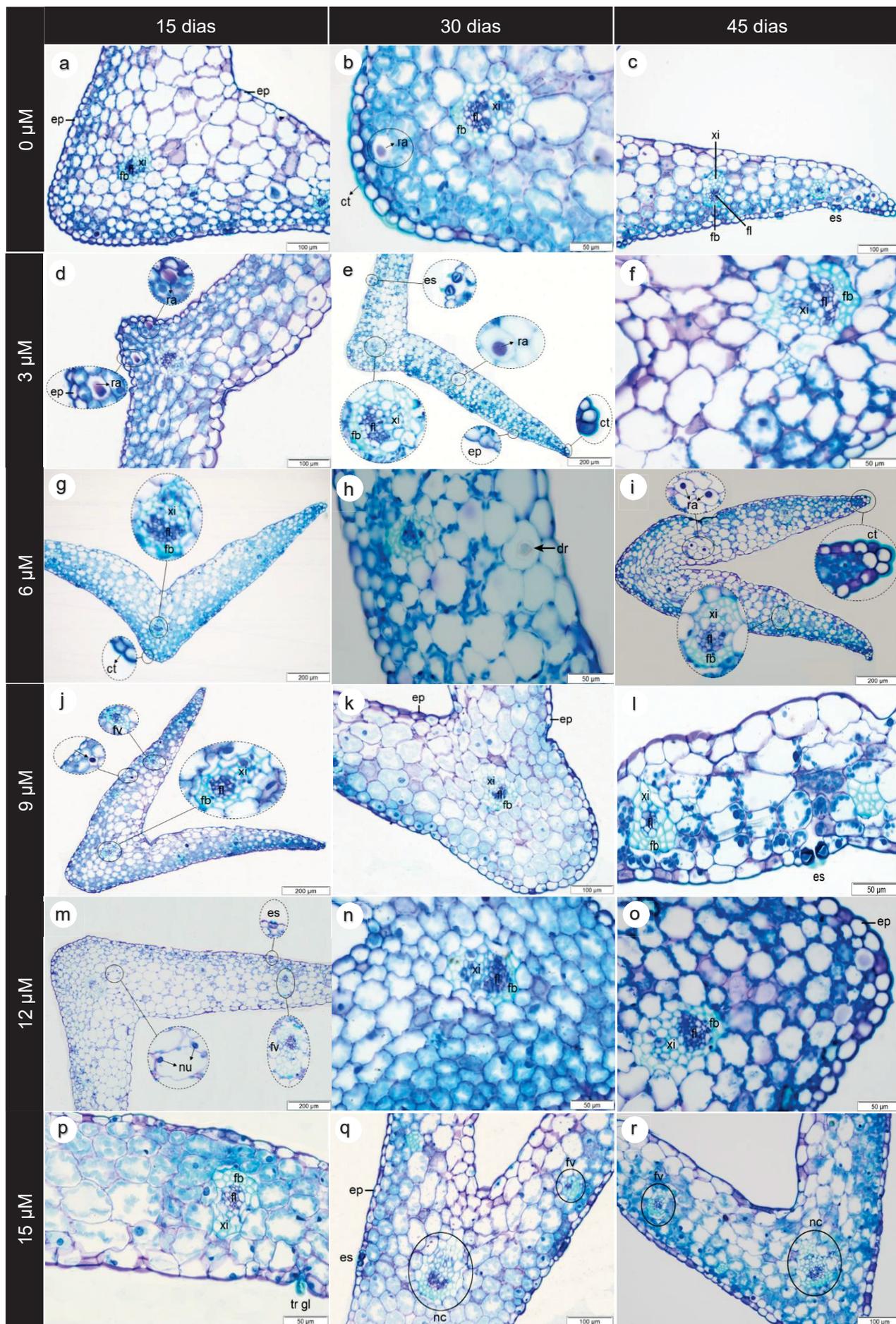


**Figura 8.** Aspectos anatômicos das raízes das plantas de *Maxillaria picta* com secções transversais em microscopia de luz após 15, 30 e 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. (a - c) tratamento controle. (d - f) 3  $\mu$ M de BAP. (g - i) 6  $\mu$ M de BAP. (j - l) 9  $\mu$ M de BAP. (m - o) 12  $\mu$ M de BAP. (p - r) 15  $\mu$ M de BAP. c = córtex. cv = cilindro vascular. ex = exoderme. v = velame. en = endoderme. m = medula. xi = xilema. fl = floema. ra = ráfide.

Em relação a anatomia das folhas, o mesofilo é homogêneo com células arredondadas e de maior diâmetro nas regiões centrais da folha. A epiderme é uniestratificada e possui uma fina camada de cutícula, principalmente na face abaxial das folhas (Figura 9a-r). As folhas são hipoestomáticas e a maioria dos estômatos foram encontrados abertos. Nos feixes vasculares e na nervura central são encontrados feixes de fibras localizados abaixo do floema do tipo colateral. (Figura 9b).

Foi possível observar que as células da epiderme adaxial são maiores que as células da face abaxial, e não possuem anexos epidérmicos associados (Figura c, l e q). Em apenas um tratamento, foi possível observar a presença de drusas no mesofilo da folha (Figura 9h), bem como um possível tricoma glandular secretor de mucilagem (Figura 9p). Abundância de cloroplastos foi observada no mesofilo das folhas. Idioblastos com ráfides são observados em grande quantidade nas folhas de *M. picta*, principalmente, próximas a epiderme das folhas (Figura d e j).

Anatomicamente foi possível observar que o BAP estimulou a diferenciação do cilindro vascular das raízes nos tratamentos 9 e 12  $\mu$ M de BAP. Porém para as folhas não foi possível verificar efeitos pronunciados do BAP na anatomia.



**Figura 9.** Aspectos anatômicos das folhas das plantas de *Maxillaria picta* após 15, 30 e 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. (a - c) tratamento controle. (d - f) 3  $\mu\text{M}$  de BAP. (g - i) 6  $\mu\text{M}$  de BAP. (j - l) 9  $\mu\text{M}$  de BAP. (m - o) 12  $\mu\text{M}$  de BAP. (p - r) 15  $\mu\text{M}$  de BAP. ep = epiderme. es = estômato. nc = nervura central. fv = feixe vascular. fb = fibra. fl = floema. xi = xilema. nu = núcleo. ra = ráfide (seta). ct = cutícula. tr gl = tricoma glandular.

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

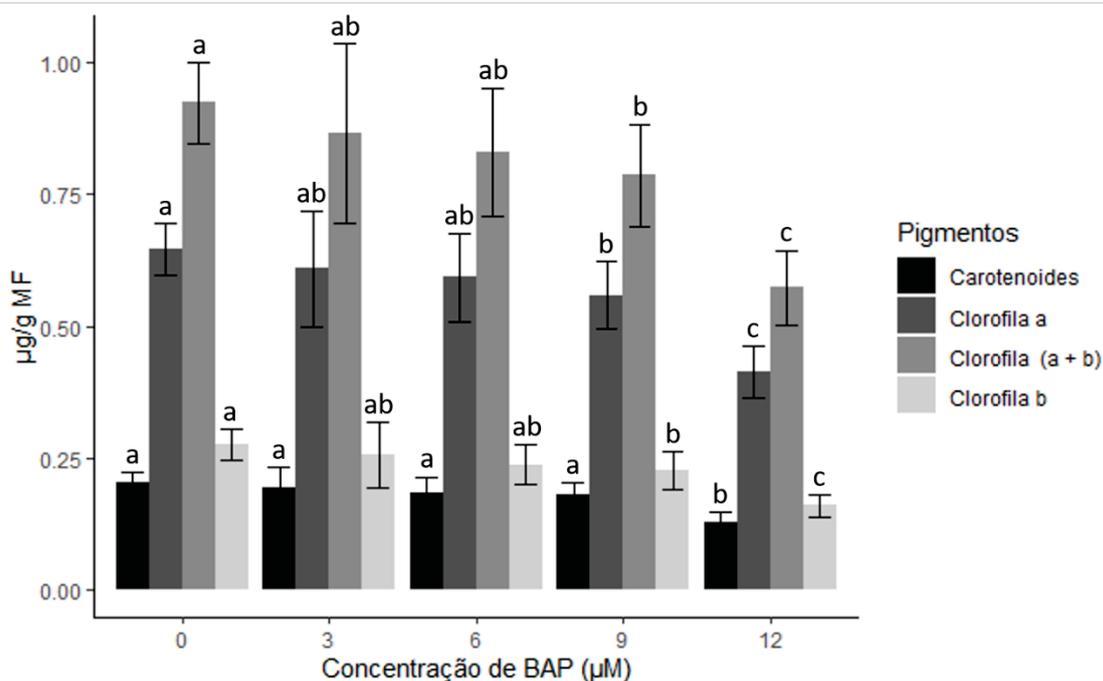
Alta taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização em todos os tratamentos avaliados foram observados (Figura 10).



**Figura 10.** Aspecto geral das plantas de *Maxillaria picta* durante a aclimatização em casa de vegetação. Barra: 3 cm.

A concentração de pigmentos fotossintéticos nas folhas de *M. picta* aclimatizadas apresentaram diferenças significativas em função das concentrações de BAP suplementadas no meio de cultura. Apesar da alta taxa de sobrevivência das plantas cultivadas com BAP, todos os pigmentos analisados tiveram decréscimo na sua concentração com o aumento da concentração de BAP suplementada (Figura 11).

Os maiores níveis de clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*) e clorofila total (Total cl) foram observados em plantas previamente cultivadas no tratamento controle e em meio suplementado com 3 e 6  $\mu\text{M}$  de BAP. O tratamento suplementado com 12  $\mu\text{M}$  de BAP apresentou as menores concentrações de carotenoides (Car).



**Figura 11.** Concentração de pigmentos fotossintetizantes (Carotenoides, clorofila *a*, clorofila total (*a+b*) e clorofila *b*) em folhas de *Maxillaria picta* aclimatizadas, submetidas anteriormente à diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. Barras de erro representam o desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, de acordo com o teste de separação de médias Tukey (95%).

Houve aumento da razão clorofila *a/b* com o aumento da concentração de BAP aplicada. A menor razão foi observada no tratamento controle e a maior razão nas plantas anteriormente submetidas ao tratamento suplementado com 12 µM de BAP (Tabela 1).

**TABELA 1.** RAZÃO CLOROFILA *a/b* EM FOLHAS DE *Maxillaria picta* ACLIMATIZADAS, SUBMETIDAS ANTERIORMENTE À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA. MÉDIA DOS VALORES ± DESVIO PADRÃO. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS, DE ACORDO COM O TESTE DE SEPARAÇÃO DE MÉDIAS TUKEY (95%).

Concentração de BAP (µM)	Razão clorofila <i>a/b</i>	CV (%)
0	2,34 ± 0,08 c	3,53
3	2,41 ± 0,16 bc	6,84
6	2,51 ± 0,06 ab	2,58
9	2,48 ± 0,16 ab	6,53
12	2,58 ± 0,04 a	1,57

FONTE: O autor (2025).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 MULTIPLICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP

Nossos resultados mostraram que todas as plantas de *M. picta* produzidas via cultivo *in vitro* sobreviveram aos tratamentos com aplicação de BAP, indicando plasticidade fenotípica, ou seja, alta capacidade de adaptação às condições às quais foram submetidas. No entanto, elevadas concentrações de BAP (acima de 9  $\mu\text{M}$ ) apresentaram maiores tendências de escurecimento dos tecidos, principalmente das raízes das plantas de *M. picta*. O escurecimento dos tecidos é uma desordem fisiológica que resulta no escurecimento da planta e na coloração marrom escura do meio de cultura. Diversos fatores podem ser causadores de dessa desordem, porém, o uso de reguladores do crescimento, especialmente altas concentrações de BAP, é tido como uma das principais causas para o escurecimento tecidual *in vitro* (BHALLA et al., 2009; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2020).

No presente trabalho, plantas cultivadas em meio de cultura suplementado com as concentrações 12 e 15  $\mu\text{M}$  de BAP apresentaram as maiores tendências para escurecimento dos tecidos. Medina et al. (2009) também observaram um aumento da porcentagem de escurecimento dos explantes de *Habenaria bractescens* nas concentrações mais elevadas de BAP. Os tratamentos cultivados com 44.4  $\mu\text{M}$  de BAP causaram nas plantas 14.9% de escurecimento dos tecidos.

Dos Santos Anjos et al. (2021) trabalhando com o cultivo *in vitro* de *Dryadella zebrina* tiveram um aumento significativo do escurecimento das plantas em meio de cultura contendo as concentrações mais elevadas de BAP testadas (9  $\mu\text{M}$  até a concentração 15  $\mu\text{M}$  de BAP). Os autores reportaram que as plantas possuíam coloração castanha e inibição do crescimento. Altas concentrações de citocinina exógena estimulam a atividade da enzima citocinina oxidase, levando à redução dos níveis de citocinina endógena. Esse processo, por sua vez, retarda o desenvolvimento das plantas e inibe a formação de novos brotos (MOTYKA et al., 1996).

O BAP possui influência na proliferação de brotos a partir do estímulo de divisões celulares rápidas (GOSWAMI et al., 2015). Concentrações apropriadas de BAP quebram a dominância apical e induzem a formação de novas gemas laterais. No presente trabalho, as plantas cultivadas nas concentrações 9 e 12  $\mu\text{M}$  de BAP apresentaram as maiores tendências para formação de brotos (1,9) e (2,1)

respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Asghar et al. (2011) em *Dendrobium nobile*, que relataram um aumento na quantidade de brotos por planta no meio de cultura suplementado com BAP, onde foi observado que a concentração 8.8  $\mu\text{M}$  de BAP induziu a formação do maior número de brotos por explante (4,33). Além disso, concentrações muito elevadas de BAP (11 e 13  $\mu\text{M}$ ) propiciaram redução para 2,5 e 1,9 brotos formados, respectivamente.

Plantas cultivadas com a concentração 15  $\mu\text{M}$  de BAP tiveram decréscimo significativo na formação de brotos, indicando efeitos deletérios do BAP em concentrações elevadas. Esses resultados são apoiados pelas descobertas de Asghar et al. (2011) e Dos Santos Anjos et al. (2021) que reportaram redução na quantidade de brotos formados acima da concentração ótima de BAP. A aplicação de citocininas exógenas em níveis acima do ideal causa impactos inibitórios na formação de brotos e afeta o desenvolvimento das plantas e raízes, uma vez que, elevam a produção de etileno, provocando senescência em tecidos vegetais (ROY e BANERJEE, 2003).

Os resultados referentes ao comprimento médio dos brotos não indicaram diferenças entre os tratamentos avaliados. No entanto, o BAP frequentemente, tem sido reconhecido como uma citocinina que estimula a proliferação de brotos, ao mesmo tempo inibe o seu alongamento (PURKAYASTHA et al., 2010).

No presente trabalho, as mudas de *M. picta* cultivadas nas concentrações 6 e 9  $\mu\text{M}$  de BAP apresentaram maior tendência para formação de folhas (9,9) e (11) respectivamente, porém plantas submetidas ao tratamento com 15  $\mu\text{M}$  indicaram tendência de diminuição no número de folhas formadas (9,6). Resultados semelhantes foram observados por Talukder et al. (2003) que obtiveram o maior número de folhas por plantas (2,5) no meio de cultura suplementado com a concentração 11  $\mu\text{M}$  de BAP em *Dendrobium* sp. Além disso, os autores também observaram que concentrações altas de BAP (20  $\mu\text{M}$ ), acarretaram em diminuição no número médio de folhas para 0,7 folhas por plantas. Concentrações supraótimas de BAP provoca efeitos deletérios como a diminuição da formação de brotos e folhas e aumento do escurecimento tecidual.

Em relação ao comprimento médio das folhas, observou-se no presente trabalho uma diminuição no seu comprimento com o aumento da concentração de BAP testada. O tratamento controle apresentou o maior comprimento das folhas (5 cm) em comparação com todos os outros tratamentos suplementados com BAP.

Dos Santos Anjos et al. (2021) também observaram decréscimo no comprimento médio das folhas de *Dryadella zebrina* cultivadas em meio de cultura WPM nos tratamentos suplementados com BAP. Esta diminuição no comprimento das folhas é possivelmente um reflexo das divisões celulares rápidas estimuladas pelo BAP, que como consequência desenvolve células menos alongadas.

O presente trabalho observou que o número e o comprimento das raízes de *M. picta* diminuíram com a aplicação da citocinina BAP. Esses resultados estão de acordo com Mondal et al. (2013) que encontraram efeito inibitório do BAP na formação de raízes em todas as concentrações testadas (4.4, 8.87 e 17.74  $\mu\text{M}$ ) em *Doritis pulcherrima*. Resultados semelhantes foram descritos por Pant e Shrestha (2011) que tiveram menor desenvolvimento das raízes em meio de cultura com BAP em *Phaius tankervilleae*. O efeito negativo do BAP na formação das raízes durante a multiplicação *in vitro* era previamente esperado, uma vez que as citocininas são reguladores vegetais que atuam na inibição do sistema radicular (PURKAYASTHA et al., 2010; HABIBA, 2014). Nos casos em que altas concentrações de BAP são aplicadas, posteriormente são sugeridas a administração de auxinas exógenas para estimular a formação do sistema radicial (MARTINS et al., 2020). Desta maneira no presente trabalho, posteriormente, foi realizado uma fase de enraizamento *in vitro*, com a adição de uma auxina para a obtenção do maior número de plantas enraizadas e garantir a uniformidade na formação das raízes.

## 6.2 ANÁLISE ANATÔMICA

A anatomia de *M. picta* está de acordo com as descrições de Holtzmeier et al. (1998). O número de camadas do velame variou entre dois a três para todos os tratamentos, na natureza a espécie possui em média seis camadas de células de velame. Essa estrutura atua na proteção, absorção de água e minerais e evita a perda de água por evaporação, porém plantas *in vitro* vivem em ambiente protegido com alta umidade relativa e com disponibilidade suficiente de água e nutrientes, portanto, o número de camadas do velame se torna reduzido em virtude da redução da função do velame no ambiente *in vitro* (RIVERÓN-GIRÓ et al., 2017). Mustika e Semiarti (2021) também observaram duas camadas de velame em *Dendrobium lineale* cultivadas *in vitro*.

No velame de *M. picta* foi possível observar espessamento em espiral das células, além disso, a espécie é descrita contendo tilossomos do tipo baculado. Os tilossomos, também conhecidos como, corpos fibrosos, são estruturas lignificadas que se projetam das paredes celulares das camadas mais internas do velame, adjacente às células de passagem da exoderme (YUKAWA e STERN, 2002). Para Benzing et al. (1982) os tilossomos atuam como tampões protetores e barreiras à transpiração, essas estruturas promovem a retenção de água permitindo o maior acesso hídrico às células de passagem e impedem a transpiração em situações de seca.

Foram encontrados idioblastos com ráfides nos tecidos radiciais e foliares. Porém, foram observados maiores quantidades de idioblastos com ráfides nas folhas de todas as plantas cultivadas com diferentes concentrações de BAP em comparação com a quantidade observada nas raízes. Além disso, os feixes de ráfides concentraram-se próximos a epiderme das folhas. Essas estruturas são constituídas de cristais de oxalato de cálcio que atuam em diversas funções como: defesa contra herbivoria, suporte mecânico, troca iônica, controle osmótico e regulação dos níveis de cálcio (RIVERÓN-GIRÓ et al., 2017; BAZZICALUPO et al., 2021). Mayer et al. (2008) também observaram maior proporção de ráfides nas plantas *in vitro* em comparação com plantas matriz e plantas aclimatizadas em *Cymbidium*. A explicação parece estar associada a quantidade de sais de cálcio presentes no meio de cultura. O meio WPM é rico em sais de cálcio, contendo 3 mM de sais  $Ca^{2+}$  a cada litro de meio de cultura, sugere-se que a grande quantidade de idioblastos com ráfides pode estar relacionada com o acúmulo de componentes do meio de cultura. Riverón-Giró et al. 2017 encontraram resultados semelhantes em *Oeceoclades maculata*, na qual os feixes de ráfides se concentraram próximos a epiderme das folhas o que evidencia a função de suporte mecânico dessas estruturas.

O córtex apresentou em média cinco camadas de células para todos os tratamentos, esse é o mesmo número de camadas celulares do córtex, em média, que a espécie possui na natureza (HOLTZMEIER et al., 1998).

O cilindro vascular apresentou diâmetro reduzido, para todos os tratamentos, em comparação com o diâmetro do tecido observado na natureza. Em ambiente natural, o cilindro vascular possui, de 14 a 16 pólos de xilema, porém não foi possível observar a formação de pólos de xilema em nenhum dos tratamentos analisados. Isso ocorreu em virtude da redução da estrutura anatômica das raízes no ambiente *in vitro*. Além disso, a modulação no crescimento radicial exercida pelo BAP pode ter

influenciado para a baixa diferenciação do tecido radicial (MARTINS et al., 2020; MAYER et al., 2008). Mani et al. (2021) também observaram pólos de xilema subdesenvolvidos e indistinguíveis em raízes de plântulas desenvolvidas *in vitro* de *Vanda tessellata*.

Houve um aumento na diferenciação dos tecidos de condução do cilindro vascular com o aumento do tempo de exposição ao BAP. Apesar do diâmetro reduzido do cilindro vascular, as concentrações 9 e 12  $\mu\text{M}$  de BAP com 45 dias de exposição ao fitorregulador propiciaram maior diferenciação dos tecidos de condução do cilindro vascular em comparação com outras concentrações administradas. A formação dos tecidos vasculares é regulada pela sinalização de auxina-citocinina, sendo assim, a suplementação de citocinina sozinha no meio de cultura produz células vasculares, no entanto, essas células têm tamanho reduzido (MANI et al., 2021). Martins et al. (2020) relataram um aumento no diâmetro das raízes e no número de vasos condução do cilindro vascular ao suplementar ANA no meio de cultura após ter administrado BAP na etapa de multiplicação *in vitro* de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae). Vale salientar que esses resultados eram esperados, uma vez que o BAP estimulou a proliferação de brotos *in vitro*, uma etapa posterior de enraizamento *in vitro* é suficiente para obter raízes maiores e mais desenvolvidas.

Os cortes transversais das folhas evidenciaram a presença de pouca cutícula na epiderme das folhas de todos os tratamentos, com estômatos, em sua maioria abertos. Em ambiente natural a espécie é descrita contendo cutícula espessa, porém plantas cultivadas *in vitro* normalmente possuem cutícula muito fina e estômatos não funcionais (KANT et al., 2016).

Nas folhas de todos os tratamentos analisados, foi possível observar a presença de fibras associadas somente ao pólo de floema em todos os feixes vasculares. Em plantas maduras sob condições naturais, os feixes vasculares maiores são totalmente envoltos por fibras e somente os feixes vasculares menores tem fibras associadas apenas ao pólo de floema. (HOLTZMEIER et al., 1998; DETTKE et al., 2007). Feixes vasculares rudimentares é um exemplo das alterações anatômicas que ocorrem em plantas micropropagadas em resposta às condições de cultivo (SOARES et al., 2012).

No tratamento suplementado com 15  $\mu\text{M}$  de BAP após 15 dias de exposição ao fitorregulador foi possível observar a presença de um possível tricoma glandular na epiderme adaxial da folha de coloração azulada, em virtude da presença de

compostos fenólicos. Holtzmeier et al. (1998) reportaram que a espécie não apresenta tricomas glandulares, porém Solereder & Meyer (1930) relataram a presença de quatro células pedunculadas secretoras de mucilagem na superfície adaxial das folhas de *M. picta*. Mayer et al. (2011) observaram a presença de tricomas glandulares secretores de mucilagem em *Oncidium flexuosum*. Apesar da semelhança estrutural do possível tricoma de *M. picta* com outros tricomas de orquídeas, novas investigações são necessárias para entender e descrever essa estrutura.

### 6.3 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

No presente estudo, a aclimatização de *M. picta* ocorreu de maneira eficiente em substrato de vermiculita. Em estudos anteriores, Dos Santos et al. (2016) obtiveram uma taxa de sobrevivência de 97% para mudas de *M. picta* cultivadas *in vitro* no mesmo substrato. No entanto, o efeito residual do BAP influenciou negativamente a concentração de pigmentos fotossintéticos de *M. picta*, mesmo após 120 dias da exposição ao fitorregulador. Todos os pigmentos fotossintéticos analisados apresentaram decréscimo na sua concentração com o aumento da concentração de BAP.

A clorofila é um importante pigmento para o processo de fotossíntese, e sua concentração é normalmente correlacionado com a eficiência do aparato fotossintético das plantas cultivadas *in vitro* (LIM et al., 2017). A redução do teor de clorofila em plantas previamente cultivadas com BAP pode ser atribuída ao aumento da atividade antioxidante. Essas plantas, geralmente possuem diminuição na concentração de pigmentos em virtude da ação de espécies reativas de oxigênio, além do acúmulo de compostos fenólicos (MARTINS et al., 2018 e 2020). A oxidação fenólica é responsável pelo escurecimento dos tecidos e também contribui para a degradação de clorofila (KAEWUBON et al., 2015). Martins et al. (2020) relataram diminuição no teor de todos os pigmentos fotossintéticos analisados (Cl *a*, Cl *b*, Total cl e Car) mesmo após 120 dias de exposição ao BAP realizado na fase de multiplicação *in vitro* de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae). Entretanto, ao cultivar as plantas em meio de cultura com 2 µM de ANA, os autores relataram a obtenção dos maiores níveis de pigmentos fotossintéticos, independentemente dos tratamentos prévios com BAP. Esses resultados indicam a importância de se realizar uma etapa de enraizamento *in vitro* com adição de uma auxina, visto que a suplementação com ANA no meio de

cultura pode reverter parcialmente os efeitos negativos induzidos pela exposição prévia ao BAP. No presente estudo, foi realizada uma etapa de enraizamento *in vitro* com 1  $\mu\text{M}$  de AIB, após exposição ao BAP, o que pode ter contribuído para reverter parcialmente os efeitos negativos da exposição ao BAP. Uma vez que a redução significativa de pigmentos ocorreu principalmente a partir da concentração de 9  $\mu\text{M}$  de BAP. Além disso, outro fator que deve ser considerado é a alta capacidade de adaptação e recuperação da *M. picta* diante das condições estressantes a qual foi submetida. Martins et al. (2018) também relataram diminuição do teor de todos os pigmentos fotossintéticos analisados (Cl *a*, Cl *b*, Total cl e Car) com concentrações altas de BAP (10, 15 e 20  $\mu\text{M}$ ) em *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). Além disso, os autores relataram um distúrbio no aparato fotossintético de plantas que foram cultivadas em concentrações de 10, 15 e 20  $\mu\text{M}$  BAP. Konôpková et al. (2020) relataram que o aumento da concentração de BAP diminuiu a concentração de clorofila total em *Magnolia*.

Nossos resultados indicaram que concentrações elevadas de BAP podem reduzir a concentração de carotenoides e isso contribui para a degradação de clorofila e conseqüentemente diminuição da eficiência no aparato fotossintético.

Os carotenoides atuam em diversas funções no metabolismo vegetal, como diretamente na fotossíntese e na defesa contra o estresse oxidativo. Sob estresse oxidativo, os carotenoides são importantes pigmentos que atuam na eliminação de espécies reativas de oxigênio, promovendo proteção celular contra a degradação de membrana e prevenindo a degradação de clorofila medida por espécies reativas de oxigênio (MARTINS et al., 2020).

Houve aumento significativo da razão clorofila *a/b* em virtude do aumento da concentração de BAP aplicada. Resultados semelhantes foram observados por Dobránszki e Mandler-Drienyovszki (2014), que obtiveram um aumento na razão clorofila *a/b* com o aumento da concentração de BAP aplicado em folhas de macieira cultivadas *in vitro*. O aumento na razão clorofila *a/b* pode ser resultado da conversão de clorofila *b* para clorofila *a*, sendo uma interconversão necessária em plantas durante a adaptação às condições de estresse e também indica diminuição da coleta de luz pelo fotossistema II (FSII) (ZRIG et al., 2015). O aumento da razão clorofila *a/b* pode indicar ainda redução de moléculas clorofila *b* (ou seja, quebra biológica) no FSII (GANIEVA et al., 1998).

## 7. CONCLUSÕES

Com base em nossas observações experimentais, foi possível descrever os efeitos da citocinina BAP durante o desenvolvimento *in vitro* de *M. picta* em termos morfológicos e anatômicos. Além disso, demonstramos que a suplementação de BAP durante a multiplicação *in vitro* apresenta efeitos residuais nas mudas aclimatizadas quanto a concentração de pigmentos fotossintéticos, mesmo após 120 dias do uso. Os dados obtidos indicam que a suplementação de 9  $\mu\text{M}$  BAP melhora significativamente a formação de brotos e folhas, sendo recomendada essa concentração. Por outro lado, como esperado, o BAP afetou negativamente a iniciação da raiz e o seu comprimento médio. Concentrações de BAP acima de 9  $\mu\text{M}$  apresentaram efeitos nocivos, como aumento do escurecimento do tecido e redução na concentração de pigmentos.

Em relação aos aspectos anatômicos, as raízes de *M. picta* foram afetadas positivamente pela suplementação de BAP, apresentando maior diferenciação do cilindro vascular nos tratamentos com 9 e 12  $\mu\text{M}$  de BAP após 45 dias de exposição. A suplementação de BAP mostrou uma correlação negativa com a concentração de pigmentos fotossintéticos de plantas de *M. picta* aclimatizadas. Embora as plantas de todos os tratamentos tenham apresentado altas taxas de sobrevivência à aclimatização, essa diminuição na concentração de pigmentos fotossintéticos, após 90 dias, possivelmente indica uma maior dificuldade das plantas se tornarem fotoautotróficas no ambiente *ex vitro*. No entanto, avaliar a atividade fotossintética das plantas é necessário para confirmar essa hipótese.

Este estudo contribui para o conhecimento acerca do cultivo *in vitro* de *M. picta*, mostrando o impacto da suplementação de BAP em brotações laterais e seu efeito residual nas plantas aclimatizadas. No entanto, novas investigações sobre os aspectos anatômicos de plantas aclimatizadas podem ser úteis para descrever estruturas observadas e caracterizar a adaptação das plantas ao novo ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ASGHAR, S. et al. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 16, p. 3097–3103, 2011.
- BAZZICALUPO, M. et al. Seed micromorphology, *in vitro* germination, and early-stage seedling morphological traits of *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Van den Berg. **Horticulturae**, v. 7, n. 11, p. 480, 2021.
- BENZING, D. H.; OTT, D. W.; FRIEDMAN, W. E. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 4, p. 608–614, 1982.
- BHALLA, Sunil et al. Shoots induction from *Hibiscus rosa-sinensis* nodal explant using N6-benzylaminopurine (BAP). **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 403–410, 2009.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507–520, 2009.
- DETTKE, G. A.; SANCHES-MARQUES, Â. M. M.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Anatomia vegetativa de três espécies de *Maxillaria* Ruiz et Pavón (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 531–533, 2007.
- DOBRÁNSZKI, J.; MENDLER-DRIENYOVSKZI, N. Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of *in vitro* apple leaves. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 16, p. 1472–1478, 2014.
- DOS SANTOS, Silvia Almeida et al. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Brasiliorchis picta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 134–144, 2016.
- DOS SANTOS ANJOS, J. et al. The cytokinin 6-benzylaminopurine improves the formation and development of *Dryadella zebrina* (Orchidaceae) *in vitro* shoots. **Brazilian Journal of Botany**, v. 44, p. 811–819, 2021.
- DUTRA, D. et al. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 94, p. 11–21, 2008.
- GANIEVA, R. A. et al. Effect of Salt Stress and Synthetic Hormone Polystimuline K on The Photosynthetic Activity of Cotton (*Gossypium hirsutum*). **Turkish Journal of Botany**, v. 22, n. 4, p. 217–222, 1998.
- GOSWAMI, K. et al. *In vitro* regeneration of *Dendrobium* sp. of orchid using leaf tip as explant. **J. Environ. Sci. Nat. Resour**, v. 8, n. 2, p. 75–78, 2015.
- HABIBA, S. U. et al. Effect of 6-benzylaminopurine (BA) and hyaluronic acid (HA) under white light emitting diode (LED) on organogenesis in protocorm-like bodies

(PLBs) of *Dendrobium kingianum*. **Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci**, v. 14, p. 605–609, 2014.

HOLTZMEIER, M. A.; STERN, W. L.; JUDD, W. S. Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of *Maxillaria* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 127, n. 1, p. 43–82, 1998.

KAEWUBON, P. et al. Ultrastructural and biochemical alterations during browning of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Swartz) callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 121, p. 53–69, 2015.

KANT, R.; GUPTA, A.; HOSSAIN, M. Musharof. Micropropagation of orchids through leaf culture. **In vitro**, p. 31–65, 2016.

KONÔPKOVÁ, J.; KOŠÚTOVÁ, D.; FERUS, P. Genotype-specific requirements for culture initiation and multiplication of *Magnolia* taxa. **Folia Oecologica**, v. 47, n. 1, p. 34–44, 2020.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 350-382, 1987.

LIM, M. S. et al. Effects of Melatonin on Colchicine-Treated PLBs of *Dendrobium sonia*-28 Orchid. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 181, p. 15–31, 2017.

LIPÍŇSKA, M. M. et al. Active Compounds with Medicinal Potential Found in Maxillariinae Benth. (Orchidaceae Juss.) Representatives - A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 739, 2023.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. 1980.

MANI, M. et al. Micro-morpho-anatomical mechanisms involve in epiphytic adaptation of micropropagated plants of *Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. ex G. Don. **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 4, p. 712–722, 2021.

MARTINS, J. P. R. et al. Effects of 6-benzylaminopurine on photosystem II functionality and leaf anatomy of *in vitro* cultivated *Aechmea blanchetiana*. **Biologia Plantarum**, v. 62, p. 793–800, 2018.

MARTINS, J. P. R. et al. Modulation of the anatomical and physiological responses of *in vitro* grown *Alcantarea imperialis* induced by NAA and residual effects of BAP. **Ornamental Horticulture**, v. 26, p. 283–297, 2020.

MAYER, J. L. S.; RIBAS, L. L. F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, 22, 323–332, 2008.

MAYER, J. L. S.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims

(Orchidaceae). Flora-Morphology, Distribution, **Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 6, p. 601–609, 2011.

MEDINA, R. D. et al. *In vitro* tuberization and plant regeneration from multinodal segment culture of *Habenaria bractescens* Lindl., an Argentinean wetland orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 97, p. 91–101, 2009.

MONDAL, T.; ADITYA, S.; BANERJEE, N. *In vitro* Axillary Shoot Regeneration and Direct Protocorm-like Body Induction from Axenic Shoot Tips of *Doritis pulcherrima* Lindl. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, 23(2), 251–261, 2013.

MOTYKA, V. et al. Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. **Plant Physiology**, v. 112 (3), p. 1035–1043, 1996.

MUSTIKA, N. D.; SEMIARTI, E. *In vitro* culture of *Dendrobium lineale* Rolfe orchid for plant breeding and propagation. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2021. p. 012066.

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

PANT, B; SHRESTHA, S. *In vitro* mass propagation of a ground orchid-*Phaius tankervilleae* (L'Her.) Blume through shoot tip culture. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, 21 (2), p. 181–188, 2011.

PANT, B.; THAPA, D. *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 42, p. 9970–9974, 2012.

PURKAYASTHA, J. et al. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. **Biologia Plantarum**, 54, p. 13–20, 2010.

RIVERÓN-GIRÓ, F. B. et al. Anatomy of the invasive orchid *Oeceoclades maculata*: ecological implications. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 184, n. 1, p. 94–112, 2017.

ROY, J.; BANERJEE, N. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f. **Scientia Horticulturae**, 97, 3-4, p. 333-340, 2003.

SOARES, J. D. R. et al. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, p. 413-421, 2012.

SOLEREDER H.; MEYER F.J. Systematic anatomy of the monocoryledons. VI. Microspermae. (Golek B, ed.; translated from the German, Systematische Anatomie der Monokoryledonen. VI. Microspermae, by Herzberg A, 1969). Washington, D.C.: Israel Program for Scientific Translations, **Smithsonian Institution**, 1930.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of botany**, v. 104, n. 3, p. 543–556, 2009.

TABARELLI, M. et al. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695–700, 2005.

TALUKDER, S. K. et al. Shoot proliferation of *Dendrobium* orchid with BAP and NAA. **J. Biol. Sci.**, v. 3, n. 11, p. 1058–1062, 2003.

TEIXEIRA DA SILVA, Jaime A. et al. Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. **Planta**, v. 252, p. 1–35, 2020.

YUKAWA, T.; STERN, W. L. Comparative vegetative anatomy and systematics of *Cymbidium* (Cymbidieae: Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 138 (4), p. 383–419, 2002.

ZRIG, A. et al. Differential responses of antioxidant enzymes in salt-stressed almond tree grown under sun and shade conditions. **J. Plant Sci. Res.**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2015.

## 8. CAPÍTULO II: INFLUÊNCIA DA VENTILAÇÃO NATURAL NO CULTIVO *IN VITRO* E DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO DE *Maxillaria picta* (ORCHIDACEAE)

### RESUMO

As orquídeas apresentam tendência de perda da biodiversidade e ameaça à extinção de espécies. Desta forma, o cultivo *in vitro* é uma alternativa para a conservação *ex situ* de espécies. No entanto, as condições ambientais da micropropagação convencional desenvolvem plantas com baixas taxas de fotossíntese, anormalidades estomáticas e diminuição da adaptabilidade durante o período de aclimatização. Neste sentido, a ventilação natural é um sistema de cultivo que proporciona melhores condições para a fotossíntese e melhores taxas de formação de brotos. Apesar dos estudos crescentes relacionados ao sistema de cultivo sob ventilação natural, os aspectos fisiológicos das plantas cultivadas *in vitro* sob ventilação natural e, posteriormente, durante a aclimatização, ainda não estão estabelecidos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar como a ventilação natural afeta a fisiologia das plantas de *Maxillaria picta* durante o cultivo *in vitro* e aclimatização. Plantas obtidas a partir da germinação das sementes em meio de alongamento e desenvolvimento foram submetidas a dois tipos de sistema de cultivo: convencional e ventilação natural, em meio de cultura WPM suplementado com 9  $\mu\text{M}$  de BAP. Após 30 e 50 dias *in vitro* foram avaliados número e comprimento dos brotos e análises de trocas gasosas. As plantas foram aclimatizadas, após 30 dias *ex vitro* foi avaliado a concentração de pigmentos fotossintéticos e após 50 dias foram realizadas análises de fluorescência da clorofila *a*, análise de massa fresca e seca do material e sobrevivência. Os resultados demonstraram que a ventilação natural promoveu maior número de brotos e maior concentração de todos os pigmentos fotossintéticos analisados, promovendo aumento da produtividade de brotos e indicando maior potencial fotossintético. A análise fisiológica de trocas gasosas indicou médias com distribuição mais homogênea dos dados para plantas cultivadas sob ventilação natural em comparação com as plantas cultivadas convencionalmente em ambiente *in vitro*. A aclimatização também teve papel importante na uniformidade da distribuição dos dados de ambos os tratamentos. Plantas cultivadas sob ventilação natural apresentaram maior taxa de transporte de elétrons e maior energia de excitação, indicando aumento da atividade do fotossistema II. Este estudo fornece uma melhor compreensão das respostas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas de *M. picta* durante o cultivo *in vitro* em condição de ventilação natural, e serve de base para novos estudos de propagação *in vitro* de orquídeas.

Palavras-chave: micropropagação; trocas gasosas; pigmentos fotossintéticos; membranas.

## ABSTRACT

Orchids are experiencing a trend of biodiversity loss and species extinction. Thus, *in vitro* culture is an alternative for the *ex situ* conservation of species. However, the environmental conditions of conventional micropropagation lead to plants with low photosynthesis rates, stomatal abnormalities, and reduced adaptability during the acclimatization period. In this context, natural ventilation is a cultivation system that can provide better conditions for photosynthesis and higher shoot formation rates. Despite the increasing number of studies related to the cultivation system under natural ventilation, the physiological aspects of plants grown *in vitro* under natural ventilation and subsequently during acclimatization have not yet been established. Therefore, the objective of this study was to evaluate how natural ventilation affects the physiology of *Maxillaria picta* plants during *in vitro* culture and acclimatization. Plants obtained from seed germination were subjected to two types of cultivation systems: conventional and natural ventilation, in WPM culture medium supplemented with 9  $\mu\text{M}$  of BAP. After 30 and 50 days *in vitro*, the number and length of shoots and gas exchange analyses were evaluated. The plants were acclimatized, and after 30 days *ex vitro*, the concentrations of photosynthetic pigments were evaluated, and after 50 days, chlorophyll a fluorescence analyses, fresh and dry mass analyses of the material, and survival were performed. The results demonstrated that natural ventilation promoted a greater number of shoots and a greater concentration of all photosynthetic pigments analyzed, promoting an increase in shoot productivity and indicating a greater photosynthetic potential. The physiological analysis of gas exchange indicated means with a more homogeneous distribution of data for plants grown under natural ventilation compared to plants grown conventionally in an *in vitro* environment. Acclimatization also played an important role in the uniformity of data distribution for both treatments. Plants cultivated under natural ventilation showed a higher electron transport rate and greater excitation energy, indicating an increase in photosystem II activity. This study provides a better understanding of the morphological, biochemical and physiological responses of *M. picta* during *in vitro* cultivation under natural ventilation conditions, and serves as a basis for further studies on *in vitro* propagation of orchids.

Keywords: micropropagation; gas exchange; photosynthetic pigments; membranes.

## 8.1 INTRODUÇÃO

As orquídeas sofrem ameaças à perda da biodiversidade em virtude da fragmentação, perda de habitat, mudanças climáticas e exploração insustentável (FAY, 2018; SOBREIRO et al., 2019). Isso acontece porque esse grupo taxonômico possui plantas ornamentais altamente valorizadas comercialmente (ROBERTS e DIXON, 2008).

*Maxillaria picta* Hook é uma espécie encontrada principalmente na Mata Atlântica brasileira, altamente explorada devido seu potencial ornamental. Suas flores são brancas ou amareladas maculadas, com pseudobulbos bifoliados. Além disso, recentemente a espécie foi descrita com propriedades medicinais de atividades anti-inflamatórias, antitumoral, antibacteriana, e antioxidantes que potencialmente podem ser exploradas (LIPÍŃSKA et al., 2023).

A propagação vegetativa das orquídeas pode ocorrer pela divisão de touceiras, divisão de pseudobulbos ou pequenas mudas formadas a partir do rizoma e em hastes florais, enquanto a propagação sexuada ocorre por meio da disseminação de sementes (LEE, 2018). No entanto, na natureza, as taxas de germinação das sementes são baixas e o crescimento das plântulas é lento (CHUGH et al., 2009). As sementes das orquídeas são desprotegidas, praticamente sem tecido de reserva e dependentes dos nutrientes fornecidos pela associação com fungos micorrízicos (SWARTS e DIXON, 2009). Neste sentido, o cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica que permite a propagação da espécie de forma eficiente, em larga escala, e possibilita a manutenção e preservação do material genético para fins de conservação e reintrodução de espécies (DUTRA et al., 2008).

Os ambientes *in vitro* e *ex vitro* são bem diferentes, sendo a composição da atmosfera o principal fator físico que pode afetar o crescimento e o desenvolvimento da planta *in vitro* (ZOBAYED, 2005). A micropropagação convencional é caracterizada pela ausência de trocas gasosas, alta umidade relativa, acúmulo de gases dentro do frasco, temperaturas constantes, baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos, elevadas concentrações de açúcar, sais e reguladores de crescimento no meio de cultivo (KOZAI et al., 2005). Essas condições costumam causar nas plantas baixas taxas de transpiração e fotossíntese, anormalidade estomática, cutículas finas e diminui a adaptabilidade durante o período de aclimatização (XIAO et al., 2011; SILVEIRA et al., 2019).

O uso de membranas que permitem a troca gasosa entre ambientes, é denominado ventilação natural. Esse sistema de cultivo proporciona melhores condições para a fotossíntese e melhores taxas de desenvolvimento de brotos (FRITSCHÉ et al., 2022). Estudos desenvolvidos por Silveira et al. (2019) mostraram maior número de brotos e folhas e aumento na concentração de pigmentos fotossintetizantes em plantas cultivadas sob ventilação natural. Sabe-se que a ventilação natural afeta positivamente a estrutura e funcionalidade dos estômatos, sendo assim, pode servir de preparo para a aclimatização, evitando perdas e contribuindo para a redução de distúrbios anatômicos e fisiológicos da micropropagação convencional (Da SILVA et al., 2014).

No entanto, o uso do sistema de ventilação natural no cultivo de *M. picta* ainda não foi relatado na literatura, bem como os mecanismos fisiológicos desenvolvidos pelas plantas cultivadas *in vitro* sob ventilação natural e, posteriormente, durante a aclimatização, que possivelmente conferem vantagens para essas plantas, ainda não foram estabelecidos.

Deste modo, a fluorescência da clorofila *a*, e às medições de troca gasosas, são análises fisiológicas não destrutivas que possibilitam a obtenção de uma imagem completa da resposta das plantas ao seu ambiente (HANELT, 2018). Além disso, essas análises são capazes de diagnosticar a integridade do aparato fotossintético frente às condições ambientais expostas, permitindo a ampliação do conhecimento sobre a adaptabilidade das plantas às condições de cultivo e posteriormente durante a aclimatização, além de auxiliar no aprimoramento da produção dessas plantas (CASSOL et al., 2007).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar como os sistemas de cultivo convencional e ventilação natural afetam os aspectos morfofisiológicos das plantas de *M. picta* durante o cultivo *in vitro* e na aclimatização.

## 8.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 8.2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado foram sementes de *M. picta* obtidas da cápsula madura de plantas adultas coletadas em Mata nativa de Pinhais, Paraná (25°24'05.0"S 49°06'58.9"W) e mantidas em cultivo protegido *ex situ*, submetidas à polinização cruzada manual, com cruzamento controlado. Os espécimes foram depositados no Herbário UPCB (UFPR) sob o número de tomo 110182.

### 8.2.2 Germinação de sementes

Cápsulas maduras de *M. picta* foram lavadas em água corrente e submetidas à assepsia em etanol 70% por 10 minutos, seguida de lavagem em água destilada e imersão em solução de hipoclorito de sódio 2%, acrescida de 0,1% de Tween® 20 por 30 minutos, na capela de fluxo laminar. As cápsulas foram submetidas a tríplice lavagem com água destilada autoclavada e abertas com um corte longitudinal.

As sementes foram excisadas e suspensas em água destilada autoclavada. Alíquotas de 500 µL da solução de sementes foram inoculadas em placas de Petri (10 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo 25 mL de meio de cultura WPM.

O meio de cultura WPM foi suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 g L<sup>-1</sup> de glutamina, com pH ajustado para 5,8 antes da adição de 2 g L<sup>-1</sup> do agente geleificante Phytigel® e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. O material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por quatro meses.

### 8.2.3 Alongamento e desenvolvimento *in vitro*

Após a germinação *in vitro*, os explantes foram transferidas para frascos (8,5 cm de altura x 5,8 cm de diâmetro) contendo 30 mL de meio de cultura WPM com a mesma composição descrita acima. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

As plantas foram mantidas por 14 meses em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  ° C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 8.3 VENTILAÇÃO NATURAL *IN VITRO*

Plantas em meio de alongamento foram utilizadas para esse experimento. O meio de cultura utilizado foi o WPM, suplementado com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $1 \text{ g L}^{-1}$  de glutamina e a melhor concentração de BAP encontrada no experimento anterior ( $9 \mu\text{M}$  BAP). O meio de cultura teve pH ajustado para 5,8 antes da adição de  $2 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel® e esterilizado em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

Os explantes com 18 meses *in vitro* (cinco folhas de 5 cm e seis raízes com 5 cm) foram transferidos para frascos de vidro (12,5 cm de altura x 5,8 cm de diâmetro) contendo 30 mL de meio de cultura. Foram realizados dois tratamentos: a) frascos com tampa rosqueável completamente vedada de polipropileno para evitar trocas gasosas; b) frascos com tampa rosqueável de polipropileno perfurada com filtro de ar autoadesivo de politetrafluoroetileno (PTFE) com 20 mm de diâmetro e  $0,45 \mu\text{m}$  de tamanho de poro, permitindo trocas gasosas. Foram inoculadas três plantas por frasco, com 12 frascos por tratamento. As culturas foram transferidas para sala de crescimento a uma temperatura de  $25 \pm 2$  ° C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz sob lâmpadas LED brancas ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Após 30 dias do cultivo, foram avaliados o número médio e comprimento médio dos brotos. Em seguida, as plantas foram transferidas para a mesma composição de meio de cultura acrescido de  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado, para auxiliar na formação de raízes e mesmas condições de cultivo (frascos com a tampa rosqueável completamente vedada e frascos com tampa rosqueável perfurada com filtro de ar autoadesivo), por mais 20 dias.

Após 50 dias de cultivo *in vitro*, os mesmos parâmetros descritos acima e análises de trocas gasosas foram avaliadas.

### 8.4 Aclimatização

Após 50 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram transplantadas e aclimatizadas em casa de vegetação e plantadas em bandeja sementeira (5 cm de altura X 3 cm

cada célula) no substrato vermiculita com granulometria média. O material foi mantido por 50 dias em iluminação artificial (intensidade luminosa de  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), fotoperíodo de 12 horas e temperatura média de  $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Foram feitas irrigações manuais, três vezes por semana.

## 8.5 TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

Após 50 dias de cultivo *in vitro* foram realizadas as análises de trocas gasosas e após 50 dias de aclimatização foi realizada a análise de fluorescência da clorofila *a* (adaptação prévia de 20 minutos ao escuro) nas mesmas folhas completamente expandidas, usando um analisador de troca gasosa infravermelho (IRGA, modelo GFS-3000, Walz, Alemanha). O fluxo de ar foi definido de  $750 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com luminosidade controlada de  $60 \mu\text{mol fóton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para as plantas ao final do cultivo *in vitro* e  $100 \mu\text{mol fóton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para as plantas durante a aclimatização e concentração de  $\text{CO}_2$  do ar de 400 ppm para ambas. As variáveis de trocas gasosas avaliadas foram: taxa de fotossíntese líquida (*A*) ( $\mu\text{mol de CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), concentração interna de carbono (*C<sub>i</sub>*) ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) ( $\text{mol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e transpiração (*E*) ( $\text{mmol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Os valores de fluorescência basal (*F<sub>0</sub>*), fluorescência máxima (*F<sub>m</sub>*) (pulso de luz saturante  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), rendimento quântico máximo do fotossistema II (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*), coeficiente de *quenching* não fotoquímico (*q<sub>N</sub>*) e *quenching* não fotoquímico (*NPQ*) foram obtidos através da fluorescência da clorofila *a*. Os parâmetros Yield, taxa de transporte de elétrons (*ETR*), *quenching* fotoquímico (*q<sub>P</sub>*) foram coletados e analisados. Para todas as análises foram utilizadas 17 plantas de cada tratamento, totalizando 34 plantas.

## 8.6 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Após 30 dias de aclimatização das plantas em casa de vegetação foram quantificadas as concentrações de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenoides dos dois tratamentos.

Em microtubos foram adicionados 1,5 ml de acetona pura e mantidos por 24h em refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ . Foram coletados 50 mg da região mediana das folhas mais desenvolvidas de todos os tratamentos e adicionados nos microtubos com acetona.

Os microtubos foram mantidos em refrigeração por 24h no escuro e sob agitação por 7h a 1100 rpm em um Finemixer SH2000 (FINEPCR, Coreia). Foram coletados 150  $\mu\text{L}$  do sobrenadante resultante para quantificação dos pigmentos. Foram realizadas três repetições por tratamento e cinco replicatas técnicas por repetição.

A quantificação dos pigmentos foi realizada em espectrofotômetro LMR FLEX UV-VIS, onde foram coletados dados de absorbância nos comprimentos de onda de 661, 644, 470 nm (LICHTENTHALER, 1987). Os cálculos da concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenoides foram realizados de acordo com LICHTENTHALER (1987). A concentração dos pigmentos foi expressa em microgramas de pigmento por grama de massa fresca ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF).

## 8.7 MASSA FRESCA E SECA

Após 50 dias de aclimatização as plantas de todos os tratamentos foram pesadas em balança analítica Celtac FA2104N para quantificação da massa fresca e seca. Para a quantificação da massa seca, as mesmas plantas foram desidratadas em estufa de secagem Solab SL -100 a 65°C e pesadas até atingir massa constante, processo que levou cerca de 72 horas. Ao atingir massa constante, obteve-se a massa seca. Cinco réplicas biológicas foram usadas por tratamento, totalizando dez amostras.

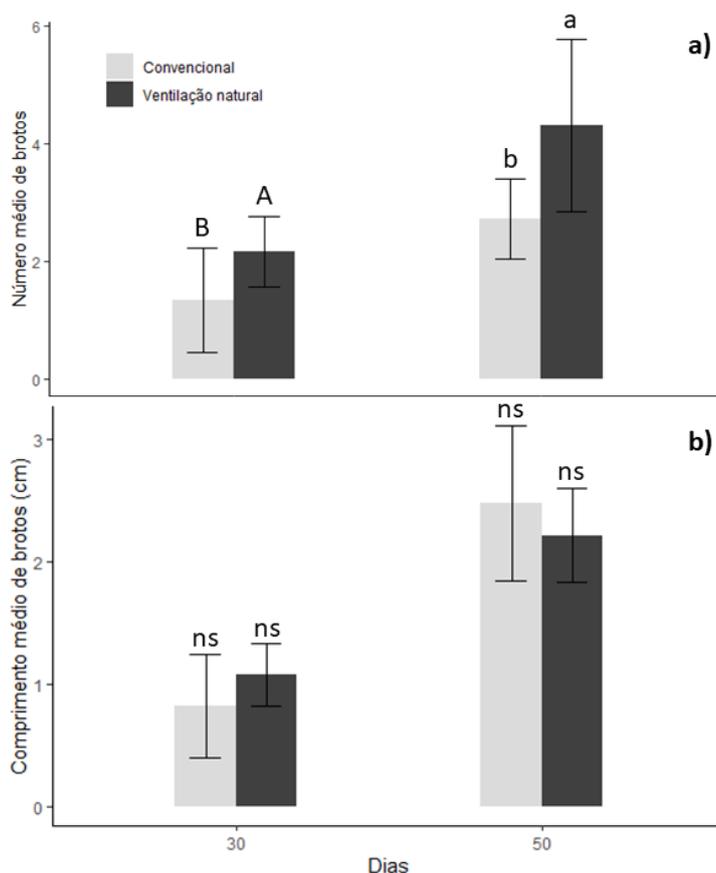
## 8.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão modelo linear, em ambiente R utilizando a interface gráfica Rstudio, versão 12.0+467. Foi realizado teste T para comparação de médias para todos os experimentos e análise de componentes principais (PCA) com os dados fisiológicos de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* comparativos de plantas *in vitro* e aclimatizadas.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 VENTILAÇÃO NATURAL *IN VITRO*

Após 30 e 50 dias de cultivo *in vitro*, o número médio de brotos foi significativamente afetado pelo sistema de fechamento dos frascos. O número de brotos foi maior em plantas cultivadas sob ventilação natural, proporcionando aumento médio de 58% no número de brotos em comparação com plantas cultivadas em frascos com tampa convencional, após 50 dias de cultivo (Figura 12a). A ventilação natural proporcionou a formação de 4,3 brotos em média, por planta, enquanto o sistema de cultivo convencional desenvolveu 2,7 brotos em média, por planta. O comprimento médio dos brotos não apresentou diferença significativa entre os tratamentos em nenhum dos dias de avaliação (30 ou 50 dias de cultivo) (Figura 12b).



**Figura 12.** Efeito da ventilação natural no desenvolvimento *in vitro* de *Maxillaria picta* em meio de cultura WPM, suplementado com 9  $\mu$ M de BAP. Número médio de brotos (a) e (b) comprimento médio de brotos. Barras de erro representam o desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, de acordo com o teste T (95%).

## 9.2 TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A

Em relação aos resultados das trocas gasosas de plantas ao final do cultivo *in vitro*, não foi possível observar diferenças estatísticas entre os tratamentos testados para nenhuma das variáveis analisadas: transpiração ( $E$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ), taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ) e concentração interna de carbono ( $C_i$ ) (Tabela 2). No entanto, o coeficiente de variação dos dados foi maior em plantas cultivadas em sistema de cultivo convencional em comparação com o coeficiente de variação dos dados das plantas cultivadas em sistema de cultivo sob ventilação natural, em cultivo *in vitro* (Figura 13a-d).

Todas as plantas de *M. picta* foram aclimatizadas com sucesso em casa de vegetação. Em ambos os tratamentos, foi observada 100% de sobrevivência das mudas em 50 dias *ex vitro* (Figura 14).

Os dados das trocas gasosas durante o período de aclimatização tiveram menor coeficiente de variação para ambos os tratamentos. As plantas durante a aclimatização apresentaram menores médias de transpiração ( $E$ ) para ambos os tratamentos e maior condutância estomática ( $g_s$ ) para o tratamento de ventilação natural em comparação com os dados em cultivo *in vitro* (Tabela 2).

Em relação aos parâmetros relacionados à fotossíntese das plantas em ambiente *in vitro*, a taxa de transporte de elétrons (ETR) foi o único parâmetro que apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, sendo maior em plantas cultivadas sob ventilação natural, em comparação com plantas cultivadas convencionalmente (Tabela 3).

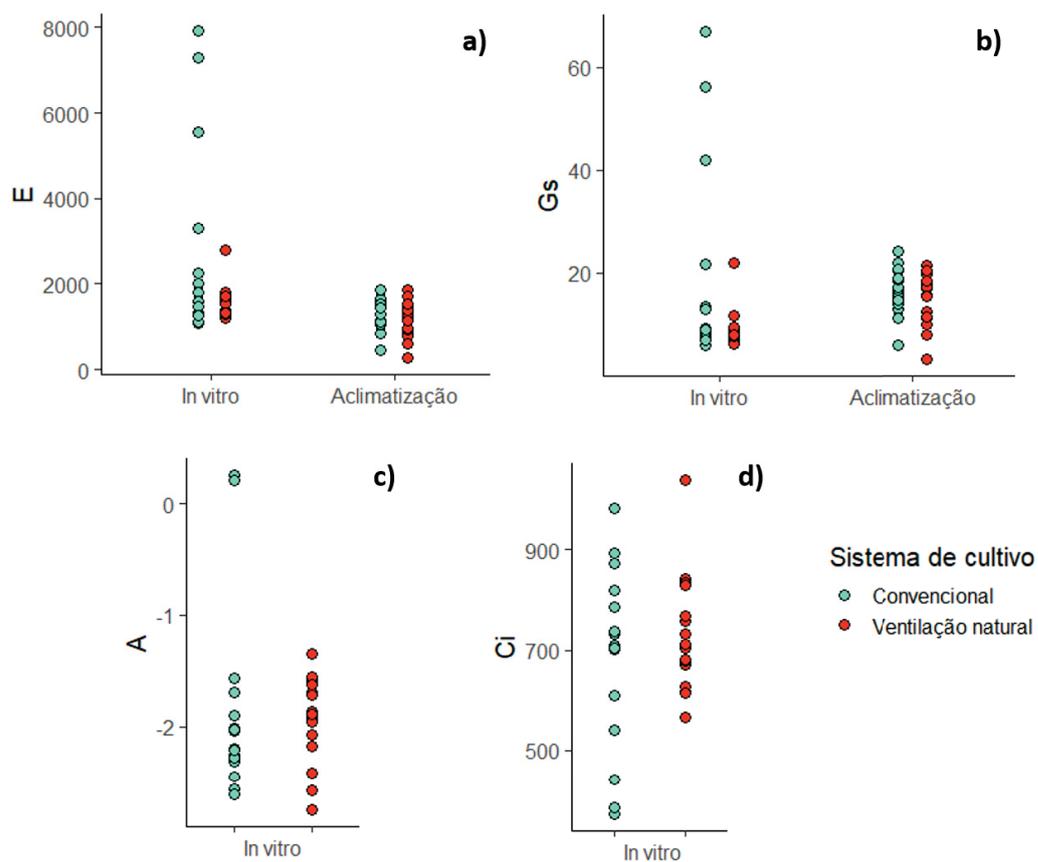
Os parâmetros fisiológicos relacionados à fotossíntese das plantas durante a aclimatização tiveram valores maiores em comparação com as plantas durante o cultivo *in vitro*. Entre os tratamentos o *quenching* fotoquímico ( $qP$ ) foi significativamente afetado pelo sistema de fechamento de frascos, com maiores valores nas plantas, anteriormente, cultivadas sob ventilação natural.

Os parâmetros relacionados à fotossíntese,  $F_v/F_m$ ,  $qN$  e  $NPQ$ , avaliados somente durante a aclimatização não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 4).

TABELA 2. DADOS FISIOLÓGICOS RELATIVOS A TROCAS GASOSAS APÓS 50 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* E 50 DIAS DE ACCLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Maxillaria picta*, SUBMETIDAS A DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO. *E* – TRANSPIRAÇÃO, *g<sub>s</sub>* – CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA, *A* – TAXA DE FOTOSSÍNTESE LÍQUIDA, *C<sub>i</sub>* – CONCENTRAÇÃO INTERNA DE CO<sub>2</sub>. MÉDIA DOS VALORES ± DESVIO PADRÃO. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS, DE ACORDO COM O TESTE T (95%).

	<i>E</i> (mmol de H <sub>2</sub> O.m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )		<i>g<sub>s</sub></i> (mol de H <sub>2</sub> O.m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )		<i>A</i> (μmol de CO <sub>2</sub> .m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )		<i>C<sub>i</sub></i> (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	
	<i>In vitro</i>	Acclimatização	<i>In vitro</i>	Acclimatização	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>
Convencional	2612 ± 2250 aA	1304 ± 320 aB	18,4 ± 19,1 aA	16,7 ± 4,23 aA	-1,86 ± 0,86 a	681 ± 180 a		
Ventilação natural	1518 ± 381 aA	1178 ± 416 aB	9,2 ± 3,66 aB	14,9 ± 4,99 aA	-1,99 ± 0,43 a	729 ± 117 a		
CV (%)	55,6	29,9	71,8	29,4	34,1	21,2		

FONTE: O autor (2025).



**Figura 13.** Distribuição dos dados fisiológicas de trocas gasosas em plantas de *Maxillaria picta* após 50 dias de cultivo *in vitro* e após 50 dias de aclimatização. a) Transpiração ( $E$ ). b) Condutância estomática ( $G_s$ ). c) Taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ). d) Concentração interna de carbono ( $C_i$ ).



**Figura 14.** Aclimatização de mudas de *Maxillaria picta* cultivadas *in vitro* em sistema de cultivo sob ventilação natural (à esquerda) e convencional (à direita). Barra: 10 cm.

TABELA 3. DADOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS À FOTOSÍNTESE APÓS 50 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* E 50 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Maxillaria picta*, SUBMETIDAS A DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO. YIELD, ETR – TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS, qP – QUENCHING FOTOQUÍMICO. MÉDIA DOS VALORES ± DESVIO PADRÃO. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS, DE ACORDO COM O TESTE T (95%).

	Yield		ETR		qP	
	<i>In vitro</i>	Acimatação	<i>In vitro</i> *	Acimatação	<i>In vitro</i>	Acimatação *
Convencional	0,09 ± 0,04 aB	0,38 ± 0,08 aA	0,05 ± 0,03 bB	16,3 ± 3,38 aA	0,17 ± 0,08 aB	0,53 ± 0,11 bA
Ventilação natural	0,13 ± 0,08 aB	0,42 ± 0,07 aA	0,08 ± 0,04 aB	17,7 ± 3,08 aA	0,20 ± 0,09 aB	0,61 ± 0,07 aA
CV (%)	54,5	19,2	61,6	19,1	45,1	16,4

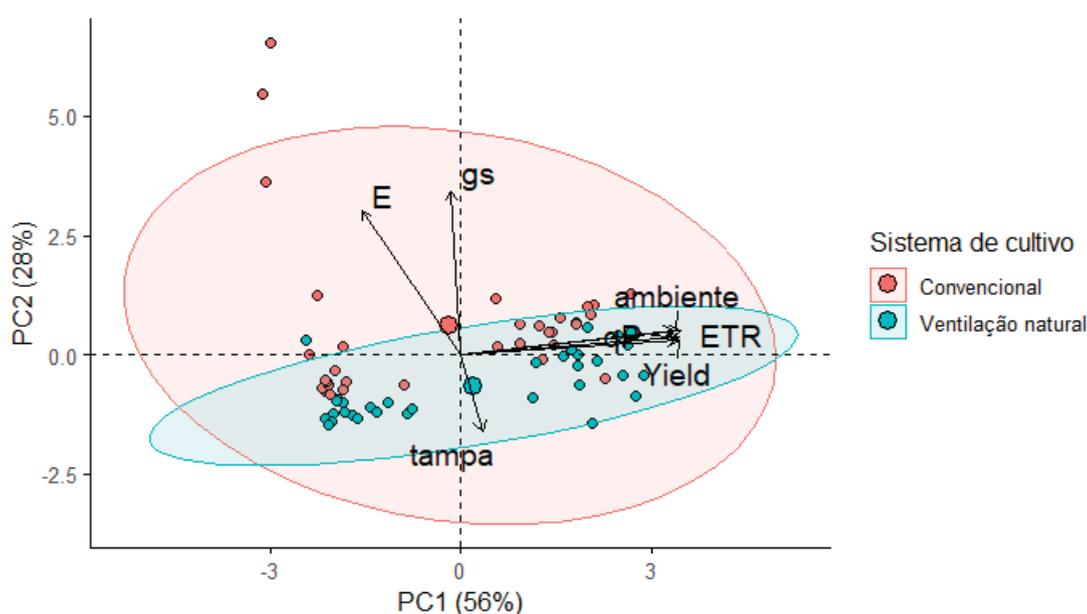
FONTE: O autor (2025).

TABELA 4. DADOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS À FOTOSÍNTESE DAS PLANTAS DE *Maxillaria picta*, APÓS 50 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO, SUBMETIDAS A DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO. Fv/Fm - RENDIMENTO QUÂNTICO MÁXIMO DO FOTOSISTEMA II, qN – COEFICIENTE DE QUENCHING NÃO FOTOQUÍMICO E NPQ – QUENCHING NÃO FOTOQUÍMICO. MÉDIA DOS VALORES ± DESVIO PADRÃO. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS, DE ACORDO COM O TESTE T (95%).

	Acimatação		
	Fv/Fm	qN	NPQ
Convencional	0,79 ± 0,02 a	0,48 ± 0,14 a	0,78 ± 0,36 a
Ventilação natural	0,78 ± 0,02 a	0,46 ± 0,18 a	0,75 ± 0,44 a
CV (%)	3,1	34	53

FONTE: O autor (2025).

Por meio da análise de PCA foi possível avaliar a correlação entre os parâmetros mensurados e os tratamentos aplicados. Os dois primeiros componentes explicaram 84% da variabilidade dos dados (Figura 15). Entre os tratamentos, observou-se sobreposição dos dados. No entanto, plantas cultivadas sob ventilação natural apresentaram menor variação. Os vetores ETR, Yield, qP e ambiente com cargas 0,492; 0,488; 0,487 e 0,480 respectivamente, estiveram altamente correlacionados entre si, sendo as variáveis mais importantes em ordem decrescente para o primeiro componente e com grande contribuição para separar os diferentes sistemas de cultivo. Por outro lado, as variáveis  $g_s$  e  $E$  com cargas 0,696 e 0,615 estiveram correlacionadas com o segundo componente.

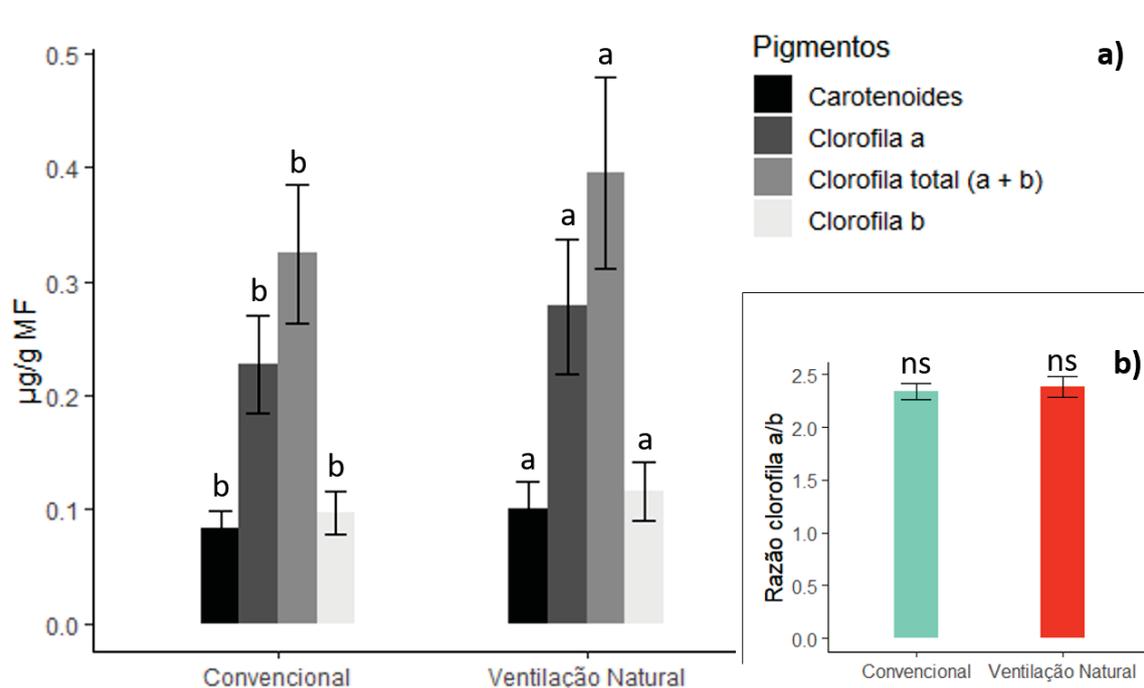


**Figura 15.** Análise de componentes principais (PCA) dos parâmetros fisiológicos de plantas de *Maxillaria picta*, submetidas a diferentes sistemas de cultivo.  $E$  – transpiração;  $g_s$  – condutância estomática; ambiente – *In vitro*/Aclimatização; ETR – taxa de transporte de elétrons; qP – *quenching* fotoquímico; Yield e Tampa – Convencional/Ventilação natural.

### 9.3 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

A concentração de todos os pigmentos fotossintéticos das folhas de *M. picta* com 30 dias aclimatizadas foi significativamente afetada em função do sistema de fechamento dos frascos. Todos os pigmentos fotossintéticos analisados foram significativamente maiores em plantas anteriormente cultivadas no sistema de cultivo sob ventilação natural em comparação com o sistema de cultivo convencional (Figura

16a). Por outro lado, não houve diferença significativa na razão de clorofila *a/b* entre os tratamentos (Figura 16b).



**Figura 16.** Efeito da ventilação natural na concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas de *Maxillaria picta* 30 dias aclimatizadas. a) Pigmentos fotossintéticos (Carotenoides, clorofila a, clorofila total (a+b) e clorofila b). b) Razão clorofila a/b. Barras de erro representam o desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, de acordo com o teste T (95%). ns: não significativo.

#### 9.4 MASSA FRESCA E SECA

Após 50 dias de aclimatização, os sistemas de fechamentos de frascos não apresentaram diferenças significativas na massa fresca e massa seca das plantas (Tabela 5).

TABELA 5. MASSA FRESCA E SECA DE PLANTAS DE *Maxillaria picta*, APÓS 50 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO. MÉDIA DOS VALORES ± DESVIO PADRÃO. LETRAS IGUAIS NÃO INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS, DE ACORDO COM O TESTE T (95%).

	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Convencional	0,52 ± 0,22 a	0,06 ± 0,02 a
Ventilação natural	0,64 ± 0,23 a	0,09 ± 0,03 a
CV (%)	39,4	38,8

FONTE: O autor (2025).

## 10. DISCUSSÃO

### 10.1 VENTILAÇÃO NATURAL *IN VITRO*

Nossos resultados mostraram que o sistema de cultivo sob ventilação natural favoreceu a formação de brotações em comparação com plantas cultivadas em sistema de cultivo convencional. Houve um aumento de 58% no número de brotos em plantas cultivadas *in vitro* sob ventilação natural, indicando ganhos consideráveis de produtividade e redução nos custos de produção. Da Silva et al. (2016) obtiveram resultados positivos no desenvolvimento da parte aérea e radicial com o uso da ventilação natural *in vitro* em *Cattleya walkeriana*. Carrari-Santos et al. (2024) por outro lado, não encontraram diferenças pronunciadas na formação de brotações em plantas cultivadas *in vitro* em frascos com membrana, no entanto, o uso de frascos com membranas microporosas acarretou em redução dos níveis de CO<sub>2</sub> e etileno e aumentou o número de proteínas associadas à fotossíntese, podendo concluir que o uso de membranas é uma estratégia mais eficiente para a propagação *in vitro* de mudas de *Dalbergia nigra* (Fabaceae).

Sabe-se que a ventilação natural propicia redução da umidade relativa dentro do frasco, menor teor de etileno e permite trocas gasosas entre os ambientes o que proporciona melhores taxas de crescimento (FRITSCHÉ et al., 2022). Ao passo que, a micropropagação convencional promove acúmulo de gás etileno nos frascos, hormônio capaz de inibir o crescimento da planta, além de causar amarelecimento acentuado, senescência das folhas e menor taxa de brotação (FOMENKOV et al., 2015; CARRARI-SANTOS et al., 2024).

O comprimento médio dos brotos de *M. picta* não foram afetados pelos sistemas de fechamento dos frascos. Lazzarini et al. (2019) também não observaram diferenças estatísticas no comprimento dos brotos com o uso de uma membrana sobre a tampa em *Lippia gracilis* (Verbenaceae). Zobayed et al. (2002) consideraram a ventilação natural suficiente para estimular a proliferação de brotos, no entanto, para o alongamento dos brotos é desejável a transferência das plantas para a ventilação forçada em *Annona squamosa* e *Annona muricata* (Annonaceae).

Neste sentido, foi possível observar que o cultivo *in vitro* sob ventilação natural incrementa a formação de brotações, proporcionando aumento de mudas produzidas, no entanto, sem impactar o comprimento dessas mudas. Vale ressaltar que ambos os

tratamentos foram cultivados com 9  $\mu\text{M}$  de BAP, uma citocinina que comprovadamente estimula brotações, todavia inibe o alongamento dos brotos produzidos.

## 10.2 TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A

Quanto aos dados de trocas gasosas, não houve diferenças estatísticas entres os tratamentos analisados, ao 50º dia de cultivo *in vitro* e 50º dia da aclimatização. No entanto, foi possível observar menor variação dos dados, ou seja, menor desvio padrão e menor coeficiente de variação, nas plantas submetidas ao sistema de cultivo sob ventilação natural ao final do cultivo *in vitro*. Estes resultados indicaram que as plantas cultivadas sob ventilação natural se mostraram fisiologicamente mais homogêneas do que as plantas cultivadas convencionalmente *in vitro*. Esses achados estão em conformidade com Fritsche et al. (2022), que apesar de não trabalharem com dados fisiológicos das plantas, seus dados morfológicos *in vitro* (número de folhas, brotos e raízes por planta), tiveram maior desvio padrão em plantas cultivadas convencionalmente em relação aos dados das plantas sob ventilação natural em *Epidendrum fulgens*.

Todas as plantas de *M. picta* sobreviveram ao período de aclimatização, indicando plasticidade fenotípica da espécie, ou seja, boa capacidade de adaptação às novas condições submetidas. Lazzarini et al. (2019) e Fritsche et al. (2022) também observaram 100% de sobrevivência na aclimatização de *Lippia gracilis* e *Epidendrum fulgens* cultivadas convencionalmente e sob ventilação natural.

Os nossos resultados demonstraram que a aclimatização também teve papel importante na diminuição do coeficiente de variação de  $E$  e  $g_s$ , bem como diminuição da taxa de transpiração para ambos os tratamentos e aumento da condutância estomática nas plantas advindas da ventilação natural. Pires et al. (2023) observaram menor taxa de transpiração em plantas cultivadas sob ventilação natural e com 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose em *Ananas comosus* cv. Pérola (Bromeliaceae) durante a aclimatização. Da Silva et al. (2014) observaram anatomicamente estômatos mais elípticos e possivelmente mais funcionais em plantas cultivadas sob ventilação natural. Esses estudos indicaram que, de maneira geral, a aclimatização em conjunto com a ventilação natural induz o desenvolvimento de estômatos mais funcionais, uma vez que, a menor umidade relativa, disponibilidade hídrica, fonte de carbono e maior

variação da temperatura favorecem o desenvolvimento dos estômatos, de forma a permitir que as plantas se adaptem as novas condições ambientais às quais são expostas, diminuindo as taxas de transpiração com o objetivo de evitar a desidratação dos tecidos em ambos os tratamentos.

Plantas aclimatizadas advindas do cultivo sob ventilação natural tiveram condutância estomática maior que as plantas *in vitro* na mesma condição, esse resultado evidencia estômatos mais abertos, permitindo maior troca gasosa, o que resulta potencialmente em maior taxa de fotossíntese e demonstra estômatos mais funcionais, haja visto a diminuição da taxa de transpiração dessas plantas.

As taxas de transporte de elétrons (ETR) após 50 dias de cultivo *in vitro* e o *quenching* fotoquímico (qP) após 50 dias de aclimatização, foram os únicos parâmetros fisiológicos relacionados a fotossíntese das plantas que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, e com as maiores médias para as plantas cultivadas sob ventilação natural. Esses dois parâmetros são citados como os principais avaliados pela fluorescência da clorofila *a*, *e*, devido sua associação próxima com os dados de *A* podem ser usados como substitutos para as taxas de fotossíntese líquida e considerados uma boa ferramenta para monitorar o desempenho fotossintético (CORRÊA et al., 2015).

O ETR expressa o valor absoluto de elétrons transportados por  $m^2$  no intervalo de um segundo. Aumento dos níveis de ETR em plantas submetidas à ventilação natural representam maior atividade do fotossistema II (FSII) das plantas nessas condições (ALVAREZ et al., 2012).

O qP é um parâmetro fotossintético que depende da presença de quinona A ( $Q_a$ ) no estado oxidado. Esse coeficiente indica a proporção de elétrons capturados sendo convertidos em energia química no centro de reação do FSII. Ou seja, o qP representa a fração “aberta” do FSII em relação à fração total deste fotossistema (KRAUSE e WEIS, 1991). Valores maiores de qP representam maior energia de excitação sendo utilizada em etapas fotoquímicas.

A aclimatização proporcionou aumento nas médias dos parâmetros relacionados à fotossíntese das plantas em comparação com os valores observados nas plantas no ambiente *in vitro*. Resultados semelhantes foram encontrados por Acosta-Motos et al. (2019) que observaram aumento dos valores de qP, ETR e Yield ao longo dos dias de aclimatização em plantas de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae), indicando um ganho de eficiência dos cloroplastos durante a aclimatização.

Os parâmetros relacionados à fotossíntese, avaliados somente durante a aclimatização, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

O rendimento quântico máximo do FSII (Fv/Fm) após 50 dias de aclimatização indicou um bom estado de funcionamento do FSII, uma vez que os valores variaram entre 0,79 – 0,78 para ambos os tratamentos. Os valores de Fv/Fm para Shin et al. (2014) também não apresentaram diferenças estatísticas para as diferentes condições de cultivo em híbridos de *Doritaenopsis* depois de 40 dias de *ex vitro* aclimatizadas. Cabral et al. (2023) obteve valores de Fv/Fm próximos a 0,73 após 45 dias de aclimatização para *Epidendrum denticulatum* cultivados sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs. No início da aclimatização, ambos os autores visualizaram diferenças mais pronunciadas nos valores de Fv/Fm entre os tratamentos, no entanto, os resultados sugerem que em média após 40 dias de aclimatização as orquídeas apresentam boa recuperação do aparato fotossintético, minimizando ou excluindo diferenças observadas nesse parâmetro.

Os coeficientes não fotoquímicos (qN e NPQ) estão relacionados ao processo de dissipação de energia excessiva nas plantas, eles constituem o principal mecanismo de ação contra danos ao aparato fotossintético (CALATAYUD et al., 2006).

O NPQ mede a quantidade de energia dissipada na forma de calor, e pode variar de 0,5 – 3,5, dependendo da espécie e histórico da planta (MAXWELL e JOHNSON, 2000). No nosso estudo, os valores de NPQ variaram de 0,75 a 0,78 e ficaram próximos aos observados por Vieira et al. (2019) em plantas de tabaco aclimatizadas, também expostas a baixa quantidade de luz.

O qN é um parâmetro que varia de 0 – 1 e indica a eficiência da dissipação de calor (SILVA et al., 2006). No presente trabalho, a média foi de 0,4 para ambos os tratamentos. Nos primeiros dias da aclimatização a tendência é de aumento do qN em virtude das novas condições expostas para as plantas. No entanto, ao longo da aclimatização o qN diminui, indicando que as plantas estão se adaptando às novas condições *ex vitro* (ACOSTA-MOTOS et al., 2019).

A PCA utilizou os dados fisiológicos comparativos entre o ambiente *in vitro* e aclimatização e permitiu visualizar maior uniformidade das plantas cultivadas sob ventilação natural, não foi possível visualizar a formação de agrupamentos distintos, uma vez que houve sobreposição dos dados fisiológicos. No entanto Yield, ETR, qP

foram os parâmetros principais para diferenciar os sistemas de cultivo. De fato, as plantas cultivadas sob ventilação natural apresentaram as maiores médias para taxa de transporte de elétrons e utilização de energia em etapas fotoquímicas (KRAUSE e WEIS, 1991; ALVAREZ et al., 2012).

### 10.3 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

No presente estudo, a concentração de pigmentos fotossintéticos foi afetada pelo sistema de cultivo. A concentração de todos os pigmentos fotossintéticos analisados foi significativamente maior no sistema de cultivo sob ventilação natural em comparação com o sistema de cultivo convencional. Resultados semelhantes foram encontrados para a orquídea *Cattleya walkeriana* (Da SILVA et al., 2016). Os frascos que propiciam trocas gasosas causam incremento da biossíntese de pigmentos fotossintetizantes nas folhas de plantas *in vitro*. Por outro lado, a menor concentração de pigmentos foi associada ao sistema de vedação de frascos que proporciona retenção da umidade relativa. Esses resultados sugeriram que alta umidade nos frascos diminuem a concentração de pigmentos (SALDANHA et al., 2012).

Além disso, a completa vedação dos frascos utilizados no cultivo *in vitro* convencional, acarretam acúmulo de etileno, o que reduz a concentração de clorofila das plantas. Neste sentido, provavelmente as trocas gasosas realizadas nos frascos com membrana reduziram a concentração de etileno nos frascos e aumentaram a concentração de clorofila (ZOBAYED, 2005; CARRARI-SANTOS et al., 2024). Fritsche et al. (2022) também observaram que as concentrações de clorofila *a* e carotenoides foram maiores em plantas cultivadas sob ventilação natural em *Epidendrum fulgens*.

Sabe-se que plantas expostas a condições de estresse possuem a razão clorofila *a/b* aumentada. No entanto, no presente trabalho a razão clorofila *a/b* entre os tratamentos não indicou diferença estatística, sugerindo que não houve agente estressor nas condições analisadas.

### 10.4 MASSA FRESCA E SECA

Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para massa fresca e massa seca das plantas aclimatizadas. Esses achados confirmam os resultados obtidos pelas análises fisiológicas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, indicando que provavelmente a aclimatização homogeneizou as diferenças entre os tratamentos antes observadas durante o cultivo *in vitro*.

Além disso, o pouco tempo de cultivo das plantas em diferentes sistemas de cultivo, pode ter minimizado as potenciais diferenças entre os tratamentos. Mantivemos o material vegetal em diferentes condições *in vitro* durante 50 dias, uma vez que as plantas estavam em meio contendo 9  $\mu\text{M}$  de BAP. No entanto, a maioria dos trabalhos comparativos mantiveram o material em diferentes tratamentos por 12 semanas em média, 90 dias (Da SILVA et al., 2014; FRITSCHÉ et al., 2022). Neste sentido, manter o material vegetal por mais tempo em diferentes condições potencialmente possibilitaria visualizar diferenças.

## 11. CONCLUSÕES

Com base nos dados experimentais, foi possível avaliar os efeitos do cultivo convencional e da ventilação natural em plantas de *M. picta* no ambiente *in vitro* e durante a aclimatização do ponto de vista morfológico e fisiológico. Nossos achados indicam que o cultivo *in vitro* sob ventilação natural proporciona 58% mais brotações que o cultivo convencional, o que resulta em ganhos de produtividade e diminuição dos custos de produção.

Apesar das análises de trocas gasosas não apresentarem diferenças estatísticas entre os tratamentos, foi possível observar que as plantas cultivadas sob ventilação natural *in vitro* eram mais homogêneas fisiologicamente que as plantas cultivadas convencionalmente. A aclimatização das mudas também homogeneizou os dados de trocas gasosas e potencialmente diminuiu as diferenças entre os tratamentos antes observadas no ambiente *in vitro*. Além disso, a aclimatização e a ventilação natural dos explantes *in vitro* possibilitaram o desenvolvimento de estômatos de *M. picta* mais funcionais, visto que nessas condições, as mudas apresentaram menor taxa de transpiração e maior condutância estomática, sugerindo que as plantas estavam mais capazes de regular a abertura estomática, realizando maior troca gasosa e potencialmente maior taxa de fotossíntese líquida. Plantas cultivadas sob ventilação natural tiveram parâmetros fotossintéticos mais favoráveis, como: maior taxa de transporte de elétrons, ou seja, maior quantidade de elétrons sendo transportados pelo fotossistema II dessas plantas e maiores médias de *quenching* fotoquímico, representando maior energia de excitação sendo utilizada em etapas fotoquímicas.

Este estudo representa o primeiro relato de propagação *in vitro* de mudas de *M. picta* em diferentes sistemas de ventilação *in vitro*, analisando principalmente aspectos morfofisiológicos. No entanto novos estudos que ampliem o tempo de cultivo em diferentes condições e reduzam especialmente as concentrações de sacarose do meio de cultura podem contribuir para aumentar o conhecimento acerca dos efeitos da ventilação natural e melhorar o desenvolvimento *in vitro* de espécies.

## 12. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho é de considerável relevância para o cultivo *in vitro* de *M. picta* e de outras espécies correlacionadas. As informações divulgadas por essa dissertação possibilitam avançar no conhecimento científico, principalmente acerca da morfologia e fisiologia de orquídeas cultivadas *in vitro*. Também permitem compreender os efeitos positivos e negativos da suplementação da citocinina sintética mais utilizada no cultivo *in vitro* (BAP), bem como avaliar os impactos de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* no desenvolvimento de mudas e por fim, otimizar protocolos de propagação *in vitro* de espécies.

As plantas apresentaram melhora na formação de brotos e folhas e maior diferenciação do cilindro vascular, no geral, na concentração de 9  $\mu\text{M}$  de BAP. A aplicação de concentrações elevadas de BAP durante a multiplicação *in vitro* causaram efeitos residuais negativos na concentração de pigmentos fotossintéticos de plantas aclimatizadas, indicando que a espécie desenvolve mecanismos de adaptação quando submetida à agentes estressores com o objetivo de evitar danos ao aparato fotossintético e manter a sobrevivência da espécie.

A ventilação natural proporcionou a formação de 58% mais brotos que o cultivo *in vitro* convencional, o que resulta em ganhos de produtividade e diminuição dos custos de produção. Plantas mais homogêneas fisiologicamente com estômatos mais funcionais e parâmetros fotossintéticos mais favoráveis foram desenvolvidos por esse sistema de cultivo.

O presente trabalho apresenta dados relevantes sobre o impacto do BAP e da ventilação natural no cultivo *in vitro* e durante a aclimatização de *M. picta*. Estudos futuros poderão ampliar as análises anatômicas, aumentar o tempo de cultivo em diferentes condições ambientais *in vitro*, reduzindo componentes do meio de cultura. Futuras investigações serão úteis para aumentar o conhecimento sobre a espécie e melhorar os protocolos de cultivo *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MOTOS, J. R. et al. Antioxidant metabolism and chlorophyll fluorescence during the acclimatisation to *ex vitro* conditions of micropropagated *Stevia rebaudiana* Bertoni plants. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, p. 615, 2019.
- ALVAREZ, C. et al. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, p. 93-101, 2012.
- ASGHAR, S. et al. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 16, p. 3097-3103, 2011.
- CABRAL, N. N. et al. Different spectral qualities do not influence the *in vitro* and *ex vitro* survival of *Epidendrum denticulatum* Barb. Rod.: A Brazilian orchid. **Vegetos**, v. 36, n. 2, p. 427-441, 2023.
- CALATAYUD, A.; ROCA, D.; MARTÍNEZ, P. F. Spatial-temporal variations in rose leaves under water stress conditions studied by chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 564-573, 2006.
- CARRARI-SANTOS, R. et al. Enhancing *in vitro* growth and development of *Dalbergia nigra* shoots using microporous membranes: impacts on gas exchange, protein profile, ethylene, and polyamine levels. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 158, n. 2, p. 34, 2024.
- CASSOL, D.; FALQUETO, A. R.; BACARIN, M. A. Influência da adubação nitrogenada nas características da fluorescência da clorofila em Arroz. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 573-575, 2007.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.
- CORRÊA, J. P. O. et al. *In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 121, p. 289-300, 2015.
- Da SILVA, A. B. et al. *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, v. 61, p. 883-890, 2014.
- Da SILVA, A.B. et al. Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the *in vitro* growth of orchids. 2016.
- DETTKE, G. A.; SANCHES-MARQUES, Â. M. M.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Anatomia vegetativa de três espécies de *Maxillaria* Ruiz et Pavón (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 531-533, 2007.

DOS SANTOS, Silvia Almeida et al. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Brasiliorchis picta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 134-144, 2016.

DOS SANTOS ANJOS, J. et al. The cytokinin 6-benzylaminopurine improves the formation and development of *Dryadella zebrina* (Orchidaceae) *in vitro* shoots. **Brazilian Journal of Botany**, v. 44, p. 811-819, 2021.

DUTRA, D. et al. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 94, p. 11-21, 2008.

FAY, M. F. Orchid conservation: How can we meet the challenges in the twenty-first century? **Botanical Studies**, v. 59, n.1, p.16, 2018.

FOMENKOV, A. A. et al. Ethylene in the proliferation of cultured plant cells: regulating or just going along?. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 62, p. 815-822, 2015.

FRANCESCHI, C. R. B et al. Storage and *in vitro* germination of orchids (Orchidaceae) seeds from Atlantic Forest–Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 03, p. e20180439, 2019.

FRITSCHÉ, Y.; PINHEIRO, M. V. M.; GUERRA, M. P. Light quality and natural ventilation have different effects on protocorm development and plantlet growth stages of the *in vitro* propagation of *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 146, p. 864-874, 2022.

HANELT, D. Photosynthesis assessed by chlorophyll fluorescence. In: **Bioassays**. Elsevier, p. 169-198, 2018

KANT, R.; GUPTA, A.; HOSSAIN, M. Musharof. Micropropagation of orchids through leaf culture. *In vitro*, p. 31-65, 2016.

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.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. (Ed.). Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. **Springer Science & Business Media**, 2005.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.313-349, 1991.

LEE, Y.I. Vegetative propagation of orchids. **Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols**, p. 403-425, 2018.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 350-382, 1987.

LIPÍŃSKA, M. M. et al. Active Compounds with Medicinal Potential Found in Maxillariinae Benth. (Orchidaceae Juss.) Representatives - A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 739, 2023.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

PANT, B. Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. **African Journal of Plant Science**, v. 7, n. 10, p. 448-467, 2013.

PANT, B.; THAPA, D. *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 42, p. 9970-9974, 2012.

PIRES, H. P. et al. Natural ventilation and sucrose concentrations in the *in vitro* culture system affect the acclimatization of "Pérola" pineapple plants under different substrates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 17, n. 1, p. 90-98, 2023.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, v. 18, n. 8, p. R325–R329, 2008.

SALDANHA, C. W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, p. 413-422, 2012.

SANTOS, S. A. et al. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Brasiliorchis picta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 134-144, 2016.

SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different *microenvironments in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 26-33, 2014.

SILVA, M. M. P. da et al. Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 67-74, 2006.

SILVEIRA, A. A. C. et al. Shoot proliferation, leaf anatomy and pigment content of *Eugenia dysenterica* growing in conventional and natural ventilation systems. **Revista Ceres**, v. 66, p. 363-371, 2019.

SIPAYUNG, P. et al. The effect of activated charcoal dose and benzyl amino purine concentration on the growth of orchid plantlets in murashige and skoog media *in vitro*. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, v. 205, p. 012025, 2018.

SOBREIRO, A. I. et al. Continuous Micro-Environments Associated Orchid Bees Benefit from an Atlantic Forest Remnant, Paraná State, Brazil. **Sociobiology**, v. 66, n. 2, p. 293–305, 2019.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of botany**, v. 104, n. 3, p. 543-556, 2009.

VIEIRA, C. F. et al. Integrative approach reveals new insights into photosynthetic and redox protection in *ex vitro* tobacco plantlets acclimatization to increasing light intensity. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, p. 59-72, 2019.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 105, p. 149-158, 2011.

ZHANG, S. et al. Physiological diversity of orchids. **Plant diversity**, v. 40, n. 4, p. 196-208, 2018.

ZOBAYED, S. M. A. Ventilation in micropropagation. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**, p. 147-186, 2005.