

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLARISSA ALVES STEFANELLO

ESTUDOS *IN VITRO* DE UMA RARA ORQUÍDEA DA FLORA DO PARANÁ,
Eltroplectris paranaënsis (ORCHIDACEAE: SPIRANTHINAE): EFEITOS DA
GLUTAMINA E DA VENTILAÇÃO NATURAL SOBRE A MORFOANATOMIA E
FISIOLOGIA

CURITIBA

JULHO / 2025

CLARISSA ALVES STEFANELLO

ESTUDOS *IN VITRO* DE UMA RARA ORQUÍDEA DA FLORA DO PARANÁ,
Eltroplectris paranaënsis (ORCHIDACEAE: SPIRANTHINAE): EFEITOS DA
GLUTAMINA E DA VENTILAÇÃO NATURAL SOBRE A MORFOANATOMIA E
FISIOLOGIA

Dissertação apresentada ao Programa 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

Co-orientadora: Profa. Dra. Leila do Nascimento Vieira

CURITIBA

JULHO / 2025

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

Stefanello, Clarissa Alves

Estudos in vitro de uma rara orquídea da flora do Paraná,
Eltroplectris paranaënsis (Orchidaceae : Spiranthinae) : efeitos da
glutamina e da ventilação natural sobre a morfoanatomia e
fisiologia / Clarissa Alves Stefanello. – 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.

Coorientadora: Profa. Dra. Leila do Nascimento Vieira.

1. Plantas - Anatomia. 2. Conservação biológica. 3.
Germinação. 4. Fisiologia vegetal. 5. Nitrogênio. I. Fraga, Hugo
Pacheco de Freitas, 1987. II. Vieira, Leila do Nascimento, 1987-
III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Botânica. IV. 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 **CLARISSA ALVES STEFANELLO**, intitulada: **Estudos in vitro de uma rara orquídea da Flora do Paraná, Eltroleptis paranaënsis (Orchidaceae: Spiranthinae): Efeitos da glutamina e da ventilação natural na morfoanatomia e fisiologia**, 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, 11 de Julho de 2025.

Assinatura Eletrônica

15/07/2025 14:48:19.0

HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

16/07/2025 11:40:29.0

MARCELO PEDROSA GOMES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/07/2025 15:15:31.0

MIGUEL PEDRO GUERRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

À todas as pequenas flores que passam despercebidas.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à todos aqueles que tornaram esse trabalho possível, à começar pelo meu amigo Mathias, quem primeiro encontrou e descreveu a espécie, e ao querido Marcos Klingelfus, que gentilmente me forneceu as sementes para começar o estudo.

Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência, ao Centro de Microscopia Eletrônica e ao Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal pelo apoio nas análises realizadas nesse trabalho.

Aos órgãos públicos Fundação Araucária e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro à essa pesquisa.

À minha família pelo apoio com a minha carreira, por me ouvirem e possibilitarem que eu me dedicasse à pesquisa que eu amo.

À todos os amigos e amigas que tiveram um tempo para me ouvir e se fazerem presentes. Um agradecimento especial à toda a equipe do Laboratório de Micropropagação Vegetal – Quezia, Fernanda, Jenifer, Caroline, Giovanna, Vitória, Suelen, Juliana, Rhuann e Rafaela – por todos os nossos momentos juntos. Vocês são as melhores!

Ao professor Marcelo pelo enorme acolhimento e incentivo para que eu experimentasse novas técnicas e me aprofundasse na Fisiologia Vegetal.

À professora Luciana por todas as conversas, conselhos e ensinamentos ao longo de tantos anos (e tardes de sextas-feiras em que o LMV estava vazio).

À professora Leila por ter aceitado ser minha coorientadora, trazendo equilíbrio e bom senso para esse trabalho, e por ser essa profissional tão inspiradora.

Por fim, ao professor Hugo, meu orientador, pelo apoio indescritível, por me acompanhar na série de loucuras desse mestrado, desde as dezenas de experimentos à todas as participações em congressos e palestras, e com tudo isso sendo tão leve, tão harmônico, tão genuíno. Obrigada por tudo!

Resultados parciais desse trabalho foram divulgados nos seguintes eventos:

- XII Simpósio de Botânica. 17 à 19 de Setembro de 2024, Curitiba – PR. Apresentação do trabalho “Caracterização da germinação *in vitro* de *Eltroplectris paranaënsis* Engels & E.C.Smidt (Orchidaceae: Spiranthinae) em resposta a diferentes composições salinas”. Pôster premiado com o segundo lugar no Concurso de Banner – Categoria Pós-Graduação.

- I Simpósio de Orquídeas da UniCamp. 8 e 9 de Abril de 2025, Campinas – SP. Apresentação do trabalho “Micromorfologia de *Eltroplectris paranaënsis* (Orchidaceae: Spiranthinae) cultivada *in vitro*”. Pôster premiado como Melhor apresentação de pôster.

- III Encontro de Botânicos da Região Sul. 21 à 24 de Maio de 2025, Guarapuava – PR. Resumo publicado “Estado fotossintético de plantas de *Eltroplectris paranaënsis* Engels & E.C.Smidt (Orchidaceae) cultivada *in vitro* sob suplementação de glutamina e ventilação natural”.

RESUMO

Spiranthinae (Orchidaceae: Orchidoideae: Cranichidae) é a subtribo com maior riqueza de espécies de orquídeas terrestres Neotropicais, com mais de 500 espécies em 40 gêneros. Dentre esses, *Eltroplectris* Raf. conta com 11 espécies nativas do Brasil, distribuídas pelos domínios da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Recém descrita para a Flora do Estado do Paraná, *Eltroplectris paranaënsis* Engels & E.C.Smidt é uma orquídea de pequeno porte e inflorescência parviflora com flores verde-claras e brancas. A espécie habita a região de sub-bosque da Mata Atlântica (Floresta Nebular) e, devido à área de ocorrência restrita e população extremamente reduzida, atende aos critérios da lista vermelha da IUCN para ser classificada como “Criticamente em Perigo”. Os estudos *in vitro* acerca da germinação, morfogênese e estado fotossintético das plantas são métodos eficientes para a compreensão das necessidades nutricionais e fisiológicas das orquídeas, e auxiliam na sua conservação *ex situ*, além de agregarem conhecimento sobre essas espécies ainda negligenciadas pela ciência. No Capítulo I foi abordada a germinação *in vitro* de *E. paranaënsis* em resposta a duas composições de meio de cultura, WPM e MS/2. A maior taxa de germinação foi obtida para o meio WPM aos 210 dias de cultivo, chegando a 50,8%. O meio MS/2 apresentou a maior mortalidade de protocormos. A anatomia dos estágios de germinação revelou um rápido acúmulo de amido nos tecidos dos protocormos, provavelmente um requisito para o desenvolvimento do embrião e rompimento da testa da semente. Estômatos ciclocíticos foram observados pela primeira vez em uma orquídea da tribo Cranichidae. Ainda nesse capítulo, as plantas foram cultivadas *in vitro* sob suplementação de glutamina em duas concentrações (0; 6,8 e 13,6 mM), a fim de avaliar os efeitos desse aminoácido sobre o crescimento e acúmulo de pigmentos fotossintetizantes das plantas. As maiores ocorrências de escurecimento dos tecidos foram observadas no tratamento sem adição de glutamina, caracterizadas pela presença de folhas e ápices radiculares com coloração amarronzada. Os parâmetros de comprimento da maior folha e altura do meristema caulinar foram afetados positivamente pela suplementação de glutamina, sem diferença entre os tratamentos de 6,8 e 13,6 mM. As plantas cultivadas sem glutamina apresentaram menor acúmulo de clorofila *a*, carotenoides e xantofilas. Nas raízes, foi observado maior desenvolvimento dos polos de protoxilema do cilindro vascular e maior acúmulo de amido nas plantas cultivadas sob suplementação de glutamina. Os efeitos benéficos da suplementação de glutamina sobre a morfogênese das plantas *in vitro* são esperados devido a possibilidade de abreviação da rota de incorporação de nitrogênio nos tecidos vegetais, além de ser uma biomolécula essencial para a síntese de diversos outros compostos, enzimas e componentes estruturais, como clorofilas. *E. paranaënsis* é uma planta húmica que habita a camada de serrapilheira, e, portanto, tem acesso aos compostos orgânicos oriundos da degradação das folhas do dossel, e provavelmente está adaptada à crescer em condições de maior aporte de nitrogênio orgânico. O Capítulo II trata sobre a análise do estado fotossintético de *E. paranaënsis*. Em conjunto com a avaliação do crescimento, as plantas foram submetidas à análise de gases e fluorescência da clorofila em dois momentos: 1) 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de glutamina e ventilação natural (VN); 2) seis meses de cultivo *ex vitro* em casa de vegetação. A glutamina influencia positivamente o comprimento foliar e número de raízes; entretanto, a VN é prejudicial para a formação das raízes, com várias ocorrências de interrupção do crescimento. Sob

VN, foi observado aumento de F0 e queda de Fv/Fm, o que indica danos causados ao Fotossistema II. Os parâmetros de dispersão de energia (NPQ e Y(NPQ)) também foram reduzidos em VN. Os frascos ventilados perdem água mais rapidamente, aumentando o potencial osmótico do meio de cultura, o que pode induzir estresse osmótico e danificar a maquinaria fotossintética. Os dados também apontam para uma falha na rota de dispersão de energia, o que pode estar relacionado com insuficiência na produção de carotenoides. Esses resultados sugerem que *E. paranaënsis* é sensível à baixa umidade ambiental, e, portanto, o uso de frascos vedados é recomendável para seu cultivo *in vitro*. A avaliação da aclimatização demonstrou elevada plasticidade fisiológica de *E. paranaënsis*, pois todos os parâmetros da fotossíntese ficaram idênticos entre as plantas, independentemente do tratamento ao qual haviam sido submetidas anteriormente. A transpiração e condutância estomática de todas as plantas foi igual a zero, o que indica que os estômatos permaneceram fechados durante todo o período de análise. Dessa forma, conclui-se que *E. paranaënsis* provavelmente realiza fotossíntese tipo CAM, sendo que novos estudos devem ser realizados para investigar o comportamento fotossintético da espécie. Ao final, nos meses de Janeiro e Fevereiro (2025), várias plantas entraram em florescimento, e as cápsulas se desenvolveram corretamente. Dessa forma, esse trabalho descreveu também o ciclo de vida de *Eltroplectris paranaënsis*, da germinação de sementes à maturação das cápsulas. A capacidade de florescimento e produção de cápsulas demonstra que as plantas de *E. paranaënsis* produzidas *in vitro* são fisiologicamente funcionais e estão aptas para reintrodução no ambiente natural, podendo ser utilizadas no resgate dessa rara espécie.

Palavras-chave: anatomia vegetal; conservação; germinação; fisiologia vegetal; nitrogênio.

ABSTRACT

Spiranthinae (Orchidaceae: Orchidoideae: Cranichidae) is the subtribe with the highest species richness of Neotropical terrestrial orchids, with more than 500 species amongst 40 genera. Among them, *Eltroplectris* Raf. has 11 species native to Brazil, distributed along the biomes of Amazon, Caatinga, Cerrado and the Atlantic Rainforest. Recently described for the Paraná State Flora, *Eltroplectris paranaënsis* Engels & E.C.Smids is a small orchid with parviflorous inflorescence of greenish-white flowers. The species inhabits the understorey of the Atlantic Rainforest (Cloud Forest) and, due to restricted site and extremely reduced population size, it fills IUNC Red List criteria to be evaluated as Critically Endangered. *In vitro* studies regarding germination, morphogenesis, and photosynthetic state of the plants are efficient methods to enable the comprehension of nutritional and physiological needs of orchids, and aid on their *ex vitro* conservation, in addition to building knowledge about those species still neglected by science. Chapter I regarded the *in vitro* germination of *E. paranaënsis* in response to two culture media composition, WPM and MS/2. The highest germination rate was obtained on WPM medium at 210 days of cultivation, reaching 50.8%. MS/2 medium had the highest protocorm mortality. Anatomy of the germination stages revealed a rapid accumulation of starch in the protocorm tissues, probably a requirement for embryo development and testa rupture. Cyclocytic stomata were seen for the first time in an orchid of the Cranichidae tribe. Still in this Chapter, the plants were cultivated under glutamine supplementation in two concentrations (0; 6.8 and 13.6 mM) in order to evaluate the effects of this amino acid in the growth and photosynthetic pigment accumulation of the plants. The major occurrence of tissue browning happened on the treatment without glutamine, characterized by leaves and root apices with brown colour. Only the parameters of longest leaf and shoot apical height were positively affected by glutamine, without any difference between the treatments of 6.8 and 13.6 mM. Plants cultivated in the absence of glutamine had the lowest accumulation of chlorophyll *a*, carotenoids and xanthophyll. In the roots, it was observed further development of the protoxylem poles in the vascular cylinder and higher accumulation of starch in the plants cultivated under glutamine supply. The beneficial effects of glutamine on the *in vitro* morphogenesis are expected due to possible abbreviation of the nitrogen uptake route in the plant tissues, besides being an essential biomolecule to the synthesis of several other compounds, enzymes and structural molecules such as chlorophylls. *E. paranaënsis* is a humiculous plant that inhabits the leaf litter layer, and thus has access to organic compounds from the degradation of leaves, and it is likely adapted to grow in conditions of broad organic nitrogen supply. Chapter II regards the photosynthetic state analysis of *E. paranaënsis*. In combination with the evaluation of the growth, the plants were submitted to a gas analyser and chlorophyll fluorescence in two moments: 1) 60 days of *in vitro* cultivation under different glutamine concentrations and natural ventilation (NV); 2) six months of *ex vitro* cultivation in greenhouse. Glutamine influences positively the leaf length and root number; however, NV is detrimental to root formation, with several occurrences of growth interruption. Under NV, it was observed an elevation of F₀ and reduction of F_v/F_m, which indicates damages to the photosystem II. The parameters of energy dispersal (NPQ and Y(NPQ)) were also reduced by NV. Ventilated flasks loose water quickly, rising the osmotic potential of culture media, which may induce osmotic stress

and damage the photosynthetic apparatus. The data also point to a failure in the energy dispersal route, possibly related to an insufficient carotenoid production. These results suggest that *E. paranaënsis* is sensitive to low environmental humidity and, therefore, the usage of sealed flasks is recommended for its *in vitro* culture. The acclimatization analysis showed high physiological plasticity from *E. paranaënsis*, as every parameter became identical amongst the plants, regardless of the treatment to which they were previously submitted. Transpiration and stomatal conductance of all plants were equal to zero, indicating that stomata remained closed during analysis period. Therefore, it can be concluded that *E. paranaënsis* probably performs CAM photosynthesis, as novel studies should be carried to investigate the photosynthetic behaviour of the species. At the end, in the months of January and February (2025), several plants entered flowering, and capsules developed correctly. In this sense, this work also described the life cycle of *Eltroplectris paranaënsis*, from seed germination to capsule maturation. The capacity for flowering and capsule production shows that plants of *E. paranaënsis* produced *in vitro* are physiologically functional and are suitable for reintroduction in nature, and may be used for the recovery of this rare species.

Key-words: plant anatomy; conservation; germination; plant physiology; nitrogen.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – CARACTERIZAÇÃO DOS ESTÁGIOS DE GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Eltroplectris paranaënsis*. A: ESTÁGIO I – EMBRIÃO ENTUMECIDO. B: ESTÁGIO II – EMBRIÃO CLOROFILADO, TESTA INTACTA. C: ESTÁGIO III – RUPTURA DA TESTA (= GERMINAÇÃO), PRESENÇA DO PROTOMERISTEMA. D: ESTÁGIO IV – APARECIMENTO DA PRIMEIRA FOLHA. E: ESTÁGIO V – ALONGAMENTO DAS FOLHAS, FORMAÇÃO DA RAIZ TUBEROSA. F: ESTÁGIO VI – CRESCIMENTO DA(S) RAIZ(ES) TUBEROSA(S) (> 5 MM). O ESTÁGIO 0 (NÃO DEMONSTRADO NA FIGURA) CORRESPONDE À SEMENTE HIALINA, NÃO GERMINADA. BARRA = 1 MM.....p. 37
- FIGURA 2 – GERMINAÇÃO DE *Eltroplectris paranaënsis* EM MEIO WPM, AOS 210 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DAS SEMENTES. A SETA AZUL (À ESQUERDA) APONTA PARA UM PROTOCORMO EM ESTÁGIO III (GERMINAÇÃO); UM REMANESCENTE DA TESTA PODE SER VISUALIZADO. A SETA LARANJA (À DIREITA) APONTA PARA UMA RAIZ TUBEROSA EM INÍCIO DE FORMAÇÃO. O PROTOCORMO AO CENTRO DA FIGURA SE ENCONTRA EM ESTÁGIO VI (CRESCIMENTO DA(S) RAIZ(ES) TUBEROSA(S), > 0,5 MM), COM UMA RAIZ TUBEROSA PLENAMENTE DESENVOLVIDA E UMA RAIZ SECUNDÁRIA À ESQUERDA; OS DEMAIS PROTOCORMOS REPRESENTAM O ESTÁGIO IV (APARECIMENTO DA PRIMEIRA FOLHA).....p. 38
- FIGURA 3 – MICROSCOPIA DE LUZ DOS ESTÁGIOS DE GERMINAÇÃO DE *Eltroplectris paranaënsis*, CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA WPM, CORADOS COM AZUL DE TOLUIDINA O (A, C-E, H-L) OU LUGOL (B, F-G). A: CÉLULAS DO CÓRTEX DO PROTOCORMO COM NÚCLEOS E NUCLÉOLOS EVIDENTES. B: MAPEAMENTO DE AMIDO EM PROTOCORMO DE ESTÁGIO II; À ESQUERDA, PORÇÃO APICAL; À DIREITA, PORÇÃO BASAL. C: PROTOCORMO DE ESTÁGIO III. D: DETALHE DA PORÇÃO BASAL DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO III, PELOS RADICULARES EM DESENVOLVIMENTO (CABEÇA DE SETA). E: PROTOCORMO DE ESTÁGIO IV, PRIMEIRA FOLHA EM EVIDÊNCIA. CABEÇA DE SETA APONTA PARA UM PELO RADICULAR EM FORMAÇÃO. F: MAPEAMENTO DE AMIDO EM PROTOCORMO DE ESTÁGIO IV. A CABEÇA DE SETA APONTA PARA AMIDO ACUMULADO EM UM ESTÔMATO. G: DETALHE DOS ESPIRANTOSSOMOS. H: SECÇÃO TRANSVERSAL DA RAIZ DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO V, DESENVOLVIMENTO DO VELAME. I: PORÇÃO APICAL DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO V. J: SECÇÃO TRANSVERSAL DA RAIZ DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO VI. CABEÇAS DE SETA APONTAM PARA ESPIRANTOSSOMOS NO CÓRTEX. K: DETALHE DO CILINDRO VASCULAR DA RAIZ DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO VI. L: SECÇÃO LONGITUDINAL DA RAIZ DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO VI. CÍRCULOS TRACEJADOS EM TODAS AS IMAGENS MOSTRAM RÁFIDES.....p. 41
- FIGURA 4 – MICROSCOPIA DE LUZ DOS ESTÁGIOS DE GERMINAÇÃO DE *Eltroplectris paranaënsis*, CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MS/2, CORADOS COM AZUL DE TOLUIDINA (A-C, E-F, H-K) OU LUGOL (D, G, L). A: PROTOCORMO DE ESTÁGIO II. B: PROTOCORMO DE ESTÁGIO III, DETALHE DO PROTOMERISTEMA. C: PROTOCORMO DE ESTÁGIO III. CABEÇA DE SETA APONTA PARA CÉLULA PRECURSORA DO PELO RADICULAR. D: MAPEAMENTO DE AMIDO EM PROTOCORMO DE ESTÁGIO III. E: PROTOCORMO DE ESTÁGIO IV, COM VÁRIAS FOLHAS EM FORMAÇÃO.

CABEÇA DE SETA APONTA PARA UM PELO RADICULAR. F: DETALHE DO ESTÔMATO DA FOLHA DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO IV. G: MAPEAMENTO DE AMIDO NA PORÇÃO MEDIANA DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO V. H: SECÇÃO LONGITUDINAL DA RAIZ DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO V. CABEÇA DE SETA APONTA PARA UM PELO RADICULAR. I: DETALHE DA SECÇÃO LONGITUDINAL DA RAIZ DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO V, MOSTRANDO A FORMAÇÃO DO VELAME. J: SECÇÃO TRANSVERSAL DA RAIZ DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO VI. K: DETALHE DO CILINDRO VASCULAR DA RAIZ DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO VI. L: MAPEAMENTO DE AMIDO NA PORÇÃO MEDIANA-BASAL DO PROTOCORMO DE ESTÁGIO VI, MOSTRANDO APENAS AS RAÍZES TUBEROSAS. CÍRCULOS TRACEJADOS EM TODAS AS IMAGENS MOSTRAM RÁFIDES.....p. 43

FIGURA 5 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE RAIZ (A-D) E FOLHA (E-G) DE PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADAS *IN VITRO* EM MEIO WPM POR DEZ MESES, EM FASE III DE DESENVOLVIMENTO (PLANTA COM MAIS DE 1 CM DE ALTURA, COM TRÊS OU MAIS RAÍZES MAIORES DO QUE 0,5 CM). A: CORTE TRANSVERSAL DA REGIÃO MEDIANA DA RAIZ TUBEROSA MADURA. B: DETALHE DO VELAME DA RAIZ MOSTRANDO O PADRÃO DE ESPESSAMENTO DE PAREDE CELULAR LINEAR (EXOVELAME) E ESCALARIFORME (ENDOVELAME). C: CÉLULAS DO CÓRTEX DA RAIZ COM ESPIRANTOSSOMOS. D: DETALHE DO CILINDRO VASCULAR DA RAIZ; ASTERISCOS (*) DEMARCAM AS ÁREAS COM ARCOS DE FLOEMA. E: MARGEM DA FACE FOLIAR ADAXIAL. F: MARGEM DA FACE FOLIAR ABAXIAL; CABEÇAS DE SETA APONTAM PARA OS ESTÔMATOS MARGINAIS. G: ÁREA MEDIANA DA FACE FOLIAR ABAXIAL, DETALHE DOS ESTÔMATOS.....p. 45

FIGURA 6 – PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADAS *IN VITRO* EM MEIO WPM, DEZ MESES APÓS A GERMINAÇÃO. O ASTERISCO (*) DEMARCA A NOVA RAIZ SURGINDO ENTRE DUAS FOLHAS. A CABEÇA DE SETA APONTA PARA A RAIZ ANTERIOR AO SURGIMENTO DA NOVA. BARRA = 1 CM.....p. 46

FIGURA 7 – PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTAMINA. A: 0 mM GLUTAMINA. B: 6,8 mM GLUTAMINA. C: 13,6 mM GLUTAMINA. BARRA = 1 CM.....p. 48

FIGURA 8 – PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* APÓS 60 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO WPM COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTAMINA. A: 0 mM. B: 6,8 mM. C: 13,6 mM. BARRA = 1 CM.....p. 50

FIGURA 9 – TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES DE FOLHAS SAUDÁVEIS DE PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADAS *IN VITRO* EM MEIO WPM, DE ACORDO COM O TEMPO DE CULTIVO (30 OU 60 DIAS) E SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA (0; 6,8 OU 13,6 mM). VALORES DENTRO DAS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA DA AMOSTRA, EXPRESSOS EM MG.G^{-1} DE MASSA FRESCA. VALORES DA ESTATÍSTICA F INDICAM: F GLN = EFEITO DA GLUTAMINA; F T = EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO; F GLN X T = EFEITO DE INTERAÇÃO ENTRE A GLUTAMINA E O TEMPO DE CULTIVO.....p. 51

FIGURA 10 – SECÇÕES TRANSVERSAIS DAS RAÍZES DE PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADAS *IN VITRO* POR 60 DIAS EM MEIO DE

CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTAMINA (0; 6,8; 13,6 mM), CORADAS COM AZUL DE TOLUIDINA O, FLOROGLUCINOL-HCL (D, J, P) OU LUGOL (F, L, R). A-F: TRATAMENTO 0 mM. G-L: TRATAMENTO 6,8 mM. A SETA VERMELHA (K) APONTA PARA O ESPESAMENTO DE PAREDE ESCALARIFORME. M-R: TRATAMENTO 13,6 mM. ASTERISCOS (*) DEMARCAM OS ARCOS DE XILEMA NO CILINDRO VASCULAR.....p. 52

FIGURA 11 – PLANTA DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADA *IN VITRO* EM MEIO WPM SEM GLUTAMINA, COM MEMBRANA DE FILTRO DE TROCA DE AR. DETALHE DAS MÚLTIPLAS BROTAÇÕES LATERAIS. O CÍRCULO DESTACA UMA RAIZ CUJO DESENVOLVIMENTO FOI INTERROMPIDO. CADA ASTERISCO DEMARCA UMA BROTAÇÃO LATERAL. BARRA = 1 CM.....p. 80

FIGURA 12 – PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADAS *IN VITRO* EM MEIO WPM POR 60 DIAS COM DIFERENTES SUPLEMENTAÇÕES DE GLUTAMINA E SISTEMAS DE VENTILAÇÃO. A: 0 mM + C. B: 0 mM + VN. CADA ASTERISCO DEMARCA UMA BROTAÇÃO LATERAL. VÁRIAS RAÍZES COM DESENVOLVIMENTO INTERROMPIDO SÃO MOSTRADAS. C: 6,8 mM + C. D: 6,8 mM + VN. A CABEÇA DE SETA APONTA PARA UMA RAIZ CUJO DESENVOLVIMENTO FOI INTERROMPIDO. E: 13,6 mM + C. F: 13,6 mM + VN. O ASTERISCO DEMARCA UMA BROTAÇÃO LATERAL. C = FRASCOS COM TAMPA CONVENCIONAL, VEDADA. VN = FRASCOS COM VENTILAÇÃO NATURAL.....p. 81

FIGURA 13 – ANÁLISES DOS PARÂMETROS DA FOTOSSÍNTESE EM PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADAS *IN VITRO* POR 60 DIAS EM MEIO WPM SOB DIFERENTES TRATAMENTOS COM SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA E VENTILAÇÃO NATURAL. LEGENDA: C – FRASCOS COM TAMPA CONVENCIONAL, VEDADA; VN – FRASCOS COM VENTILAÇÃO NATURAL. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA NO TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 95% DE CONFIANÇA. NS: NÃO SIGNIFICATIVO. VALORES DA ESTATÍSTICA F INDICAM: F GLN – EFEITO DA GLUTAMINA; F VN – EFEITO DA VENTILAÇÃO NO FRASCO; F GLN X VN – EFEITO DE INTERAÇÃO ENTRE A GLUTAMINA E O TIPO DE VENTILAÇÃO NO FRASCO.....p. 84

FIGURA 14 – TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES DE FOLHAS SAUDÁVEIS DE PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADAS *IN VITRO* POR 60 DIAS EM MEIO WPM SOB DIFERENTES TRATAMENTOS COM SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA (0; 6,8 E 13,6 mM) E VENTILAÇÃO NATURAL. VALORES DENTRO DAS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA DA AMOSTRA, EXPRESSOS EM MG.G⁻¹ DE MASSA FRESCA. LEGENDA: C – FRASCOS COM TAMPA CONVENCIONAL, VEDADA; VN – FRASCOS COM VENTILAÇÃO NATURAL. VALORES DA ESTATÍSTICA F INDICAM: F GLN – EFEITO DA GLUTAMINA; F VN – EFEITO DA VENTILAÇÃO NO FRASCO; F GLN X VN – EFEITO DE INTERAÇÃO ENTRE A GLUTAMINA E O TIPO DE VENTILAÇÃO NO FRASCO.....p. 85

FIGURA 15 – ACLIMATIZAÇÃO DE *Eltroplectris paranaënsis* EM CASA DE VEGETAÇÃO. ACIMA, UMA SEMANA APÓS ACLIMATIZAÇÃO (PLANTIO COLETIVO). ABAIXO, SEIS MESES DE CULTIVO *EX VITRO*. AS CABEÇAS DE SETA APONTAM PARA PLANTAS COM PENDÃO FLORAL. BARRA = 2 CM.....p. 89

FIGURA 16 – FLORAÇÃO E FRUTIFICAÇÃO DAS PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* GERMINADAS *IN VITRO*, EM CASA DE VEGETAÇÃO, CERCA DE 22 MESES APÓS INOCULAÇÃO DAS SEMENTES. BARRA = 1 CM.....p. 90

FIGURA 17 – FLUXOGRAMA DO CICLO DE VIDA DE *Eltroplectris paranaënsis*. ETAPAS CONSIDERADAS EM MESES. 0-4: SEMENTES EM DORMÊNCIA. 5-7: GERMINAÇÃO DAS SEMENTES (ESTÁGIOS I – VI). 8-10: CRESCIMENTO INICIAL DAS PLANTAS (FASES I – III). 11-14: CRESCIMENTO DAS PLANTAS ATÉ FASE ‘PRÉ-ADULTA’. 15-20: CRESCIMENTO DAS PLANTAS ATÉ FASE ADULTA. 20-22: FLORESCIMENTO: CRESCIMENTO DO PENDÃO FLORAL. 22-24: PLANTAS COM FLORES. 23/24: MATURAÇÃO DAS CÁPSULAS.....p. 91

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – PROPORÇÕES DOS ESTÁGIOS DE GERMINAÇÃO DE *Eltroplectris paranaënsis*, NOS DOIS MEIOS DE CULTURA AVALIADOS, A PARTIR DOS 150 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DAS SEMENTES. VALORES SÃO EXPRESSOS EM PORCENTAGEM DE PROTOCORMOS, SEGUIDOS DO DESVIO PADRÃO DA AMOSTRA. VALORES EM **NEGRITO** SIMBOLIZAM OS ESTÁGIOS APÓS ROMPIMENTO DA TESTA DA SEMENTE. TRACEJADOS (---) REPRESENTAM AUSÊNCIA DO ESTÁGIO INDICADO NA AMOSTRA.....**p. 39**
- TABELA 2 – PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DAS PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* AVALIADOS DENTRO DE CADA TRATAMENTO, AOS 30 DIAS DE CULTIVO. VALORES REPRESENTAM AS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS, SEGUIDOS DO DESVIO PADRÃO DA AMOSTRA. CV = COEFICIENTE DE VARIAÇÃO.....**p. 47**
- TABELA 3 – MODELO LINEAR COM REGRESSÃO MÚLTIPLA ASSOCIANDO OS PARÂMETROS DE COMPRIMENTO DA MAIOR FOLHA, ALTURA DO MERISTEMA CAULINAR E PRESENÇA DE GLUTAMINA AOS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE *Eltroplectris paranaënsis*.....**p. 48**
- TABELA 4 – PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DAS PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* AVALIADOS DENTRO DE CADA TRATAMENTO, AOS 60 DIAS DE CULTIVO. VALORES REPRESENTAM AS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS, SEGUIDOS DO DESVIO PADRÃO DA AMOSTRA. CV = COEFICIENTE DE VARIAÇÃO.....**p. 49**
- TABELA 5 – MÉDIAS DOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DAS PLANTAS *IN VITRO* DE *Eltroplectris paranaënsis* AVALIADOS DENTRO DE CADA TRATAMENTO, AOS 60 DIAS DE CULTIVO NO EXPERIMENTO DE VENTILAÇÃO NATURAL. C = FRASCOS COM TAMPA CONVENCIONAL, VEDADA; VN = FRASCOS COM VENTILAÇÃO NATURAL; CV = COEFICIENTE DE VARIAÇÃO.....**p. 78**
- TABELA 6 – VALORES DA CAPACIDADE MÁXIMA DO FOTOSSISTEMA II (FV/FM) DE PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADAS *IN VITRO* POR 60 DIAS EM MEIO WPM SOB DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA E VENTILAÇÃO NATURAL. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA DAS AMOSTRAS, SEGUIDO DO DESVIO PADRÃO. LEGENDA: C – FRASCOS COM TAMPA CONVENCIONAL, VEDADA; NV – FRASCOS COM VENTILAÇÃO NATURAL; CV – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO.....**p. 83**
- TABELA 7 – MÉDIAS DOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DAS PLANTAS *EX VITRO* DE *Eltroplectris paranaënsis* AVALIADOS DENTRO DE CADA TRATAMENTO, AOS 180 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO APÓS O EXPERIMENTO DE VENTILAÇÃO NATURAL. C = FRASCOS COM TAMPA CONVENCIONAL, VEDADA; NV = FRASCOS COM VENTILAÇÃO NATURAL; CV = COEFICIENTE DE VARIAÇÃO.....**p. 86**
- TABELA 8 – VALORES DA CAPACIDADE MÁXIMA DO FOTOSSISTEMA II (FV/FM) DE PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* ACLIMATIZADAS *EX VITRO* POR 180 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO, ORIUNDAS DE DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA E VENTILAÇÃO NATURAL. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA DAS AMOSTRAS, SEGUIDO DO DESVIO PADRÃO. LEGENDA: C – FRASCOS COM TAMPA CONVENCIONAL,

VEDADA; NV – FRASCOS COM VENTILAÇÃO NATURAL; CV – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO.....	p. 87
TABELA 9 – CICLO DE VIDA DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i>	p. 90

LISTA DE ABREVIACOES

CAM Metabolismo cido Crassulceo

DAP Dias Após a Polinização

LHC *Light Harvesting Complex*, complexo antena de captação de luz

MS Murashige & Skoog, meio de cultura

MS/2 Murashige & Skoog, meio de cultura com metade da concentração salina

NADPH nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PSII Fotossistema II

ROS espécies reativas de oxignio

RuBisCO ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase

VN ventilação natural

WPM Wood Plant Medium, meio de cultura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	21
REFERÊNCIAS	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E MORFOANATOMIA DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> SOB SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA	
RESUMO	28
3 INTRODUÇÃO	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	32
4.2 ALONGAMENTO DAS PLANTAS	33
4.3 DESENVOLVIMENTO DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> SOB SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA	33
4.4 MICROSCOPIA DE LUZ	34
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	35
4.6 ANÁLISE DOS TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES	35
5 RESULTADOS	36
5.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	36
5.2 ANATOMIA DOS ESTÁGIOS DE GERMINAÇÃO	39
5.3 FASES DE DESENVOLVIMENTO	44
5.4 DESENVOLVIMENTO DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> SOB SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA	47
6 DISCUSSÃO	54
6.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	54
6.2 DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS	59
6.3 DESENVOLVIMENTO DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> SOB SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA	60
7 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO II - EFEITOS DA GLUTAMINA E DA VENTILAÇÃO NATURAL SOBRE A FOTOSSÍNTESE DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> CULTIVADA <i>IN VITRO</i> E ACLIMATIZADA	
RESUMO	70
8 INTRODUÇÃO	71
9 MATERIAIS E MÉTODOS	75
9.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> EM CONDIÇÕES DE GLUTAMINA E VENTILAÇÃO NATURAL	75
9.2 ANÁLISE DE GASES E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EM PLANTAS DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	75
9.3 ANÁLISE DOS TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES	76
9.4 ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO	76
9.5 ANÁLISE DE GASES E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EM PLANTAS DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> ACLIMATIZADAS <i>EX VITRO</i>	77
10 RESULTADOS	78

10.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> EM CONDIÇÕES DE GLUTAMINA E VENTILAÇÃO NATURAL	78
10.2 ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO	86
11 DISCUSSÃO	92
11.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> EM CONDIÇÕES DE GLUTAMINA E VENTILAÇÃO NATURAL	92
11.2 ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Eltroplectris paranaënsis</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO	96
12 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101
13 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	105
REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em 2005, Dressler apontava que a família das orquídeas, já com a estimativa de 24.500 espécies, certamente aumentaria nas décadas seguintes, principalmente diante de novas pesquisas e descrições da flora Neotropical. Depois de 20 anos de pesquisa, Orchidaceae Juss. compreende 30.000 espécies, além de 100.000 híbridos registrados, produzidos por polinização artificial, sendo uma das maiores famílias de Angiospermae, atrás somente de Asteraceae Bercht. & J.Presl. (CARDOSO *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2024). Presentes em quase todos os continentes, à exceção da Antártica, as orquídeas habitam desde as tundras de elevadas altitudes até florestas tropicais, ocorrendo no solo, sobre as árvores ou em rochedos (WANG *et al.*, 2024; WRAITH *et al.*, 2020). A enorme variedade de cores e formas florais as colocam como plantas de alto valor ornamental, ao mesmo tempo em que seus mecanismos complexos de atração de polinizadores e adaptações ao ambiente intrigam os pesquisadores há séculos (RASMUSSEN *et al.*, 2015).

Apesar da família, como um todo, apresentar ampla distribuição no planeta, a maioria dos gêneros individualmente se encontram confinados a uma pequena região ou tipo de habitat – com exceções, certamente, como o gênero pan-tropical *Bulbophyllum Thouars* – de modo que diversas orquídeas são tidas como “raras”. A raridade de uma espécie pode ser definida segundo diversos critérios: de acordo com Harper (1981), a raridade poderia estar relacionada com o espaço, o tempo e/ou um grupo filogenético específico. Plantas raras de acordo com o espaço podem ser localmente abundantes, porém se encontram restritas àquela única região, tendo sua dispersão restringida por barreiras físicas ou elevada especificidade de nicho, o que caracteriza uma espécie endêmica. A raridade associada ao tempo reflete populações cuja distribuição e tamanho são muito variáveis por serem modulados por eventos ambientais esporádicos, como queimadas naturais, inundações e secas, podendo alterar drasticamente o número de indivíduos da espécie presentes em determinado local. Por fim, certos grupos de plantas com alta especialização de nicho podem apresentar ecótipos em populações de um único local, de acordo com as condições daquele ambiente, caracterizando raridade de grupo.

Além de serem encontradas em todas essas situações, a ação antropogênica de coleta indiscriminada dispõe mais um argumento sobre a raridade das orquídeas (SWARTS & DIXON, 2009; FERRAZ *et al.*, 2025). Muitas orquídeas são retiradas de seus ambientes naturais para comercialização como ornamentais, fins alimentícios ou

medicinais, frequentemente transportadas ilegalmente de um país para o outro – razão pela qual todas as orquídeas, tão logo são descritas, estão inclusas no apêndice II do acordo CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*). A fragmentação de habitats – ou sua destruição completa – interpõe dificuldades de interação entre as orquídeas e seus polinizadores e simbiontes, conjuntamente à perda de forófitos e depleção de nutrientes essenciais do solo, que também prejudicam o estabelecimento de novas plantas para repor a população. Esse quadro, somado à coleta indiscriminada de espécies com flores vistosas e atrativas ao público, leva à redução das populações naturais das orquídeas e consequente erosão genética, o que pode culminar na extinção local da espécie (FAJARDO *et al.*, 2017; GALE *et al.*, 2018; WRAITH *et al.*, 2020).

Embora a maior parte das orquídeas apresente hábito epífita, aproximadamente 1/3 das espécies de Orchidaceae são terrestres (MAGRINI *et al.*, 2011; UTAMI & HARIYANTO, 2020). Spiranthinae (Orchidoideae: Cranichideae) é a subtribo com maior riqueza de espécies de orquídeas terrestres nos Neotrópicos, abrangendo mais de 500 espécies em 40 gêneros. Atualmente são reconhecidos cinco clados dentro da subtribo: *Cotylolabium* Garay (monoespecífico), *Eurystyles* Wawra, *Pelexia* Poit. ex Lindl., *Spiranthes* Rich. e *Stenorrhynchos* Rich. ex Spreng.. O centro de origem de Spiranthinae é estimado no leste da América do Sul, com migrações e diversificações secundárias ocorrendo em direção às Américas Central e do Norte e Eurásia, para o clado *Spiranthes*, e migrações subsequentes para a Mesoamérica em vários subgrupos dos clados *Eurystyles* e *Pelexia* (SALAZAR *et al.*, 2018). Entre as características morfológicas de Spiranthinae se destacam as raízes fasciculadas, podendo ser rizomatosas, folhas basais, às vezes dispostas em roseta, flores ressupinadas com as margens do labelo adnatas às laterais da coluna e presença de um rostelo (SALAZAR *et al.*, 2018).

Atualmente, são reconhecidas 14 espécies para *Eltroplectris* Raf. (Spiranthinae: *Stenorrhynchos*), 11 das quais ocorrem no Brasil, distribuídas pelos domínios da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. De hábito terrestre, acaulescente, essas orquídeas possuem folhas de pecíolos longos, basais em roseta, e inflorescências racemosas que exibem flores verde-esbranquiçadas ou branco-acastanhadas, destacando-se o calcar cilíndrico ou clavado formado pela fusão das sépalas laterais com o pé da coluna (GUIMARÃES, 2024; ROCHA & AFONSO, 2022). A espécie *Eltroplectris paranaënsis* Engels & E.C.Smids foi recém descrita para a Flora do Estado do Paraná, e se destaca por seu hábito pequeno (menos de 30 centímetros de altura) e inflorescência

parviflora com somente uma ou duas flores, verde-claras e brancas, com labelo tri-lobado de margens inteiras. A espécie habita a região de sub-bosque da Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Densa Altomontana ou Floresta Nebular), no substrato húmico, à 1500 m de altitude, sendo encontrada somente no estado do Paraná nos cumes da Serra do Mar (ENGELS *et al.*, 2023). *Eltroplectris paranaënsis* pode ser definida como uma espécie rara devido à sua ocorrência restrita e população extremamente reduzida, tendo sido enquadrada na classificação Criticamente em Perigo para a Flora do Estado do Paraná (FERRAZ *et al.*, 2025).

A situação de *Eltroplectris* no Brasil é delicada: três espécies (*E. kuhlmanniana* (Hoehne) Pabst, *E. macrophylla* (Schltr.) Pabst e *E. longicornu* (Cogn.) Pabst) são consideradas extintas, por não terem havido registros botânicos há mais de 70 anos. Uma quarta espécie, *E. schlechteriana* (Porto & Brade) Pabst, é tida como extinta para o estado de São Paulo, embora ainda tenha sido encontrada em outros estados brasileiros (GUIMARÃES, 2024). *E. calcarata* (Sw.) Garay & Sweet foi avaliada como Criticamente em Perigo na Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção no Espírito Santo (FERREIRA *et al.*, 2007). *E. assumptaoana* Campacci & Kautsky e *E. paranaënsis* são conhecidas apenas pelo material tipo (ENGELS *et al.*, 2023; GUIMARÃES, 2024). Pouco se sabe sobre a vida dessas plantas, e informações sobre germinação, ciclo de vida, fenologia e polinização do grupo permanecem ausentes – estima-se, somente, que a polinização ocorra por mariposas, baseado na morfologia floral e proximidade de *Eltroplectris* com *Pteroglossa* Schltr., gênero polinizado por borboletas (PANSARIN & FERREIRA, 2015).

O conhecimento da biologia de um táxon é essencial para sua conservação (WRAITH *et al.*, 2020). Estudos de crescimento e desenvolvimento *in vitro* abrem portas para o entendimento das necessidades nutricionais, ontogenia dos tecidos e órgãos vegetais e respostas fisiológicas ao estresse, as quais são moduladas por expressão gênica diferencial atrelada a cada conjunto de condições às quais as plantas podem ser expostas. Além disso, a propagação *in vitro* pode ser usada para fins de conservação, dada a possibilidade de produção de grande quantidade de novas plantas em curto período de tempo e a partir de pouco material vegetal, as quais podem, posteriormente, serem reintroduzidas no ambiente natural da espécie, principalmente se utilizadas sementes, pois elas mantêm a variabilidade genética desejada para a conservação (CARDOSO *et al.*, 2020; UTAMI & HARIYANTO, 2020). Ademais, o cultivo *in vitro* permite o estabelecimento de bancos *in vitro* de germoplasma, formas de conservação *ex situ* a

longo termo que preservam a espécie e sua variedade genética (MAGRINI *et al.*, 2019). Sendo assim, pesquisas acerca da germinação, fisiologia e ecologia das orquídeas são fundamentais para o resgate de espécies negligenciadas e em risco de extinção (KAUTH *et al.*, 2008).

A eficiência de um sistema de cultura de tecidos *in vitro* reside, principalmente, na escolha do meio de cultura apropriado, para que ele forneça o aporte de nutrientes e água necessário para o desenvolvimento saudável da espécie. Outros fatores como luz, temperatura, reguladores vegetais e outros componentes químicos também são muito importantes no sucesso da propagação *in vitro* (PHILLIPS & GARDA, 2019). A possibilidade de controle de cada um desses parâmetros e melhor ajuste desses de acordo com o desenvolvimento de uma espécie é o que torna os estudos *in vitro* uma forma eficiente e reprodutível de compreensão do panorama fisiológico da espécie em estudo (HAROUN *et al.*, 2010).

Para que a escolha de um sistema de propagação *in vitro* seja verdadeiramente apropriada, é preciso avaliar a resposta das plantas além dos parâmetros morfológicos. Mesmo que a micropropagação seja vantajosa sob muitos aspectos, é frequente que as plantas *in vitro* apresentem problemas estruturais e inadequações fisiológicas, tais como subdesenvolvimento do cilindro vascular da raiz, descontrole da abertura e fechamento estomático, baixa deposição cuticular, excesso de espaços intercelulares nos tecidos parenquimáticos e baixa ou inexistente atividade fotossintética (SOARES *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2018). Devido a esses problemas, muitas plantas têm dificuldade de aclimatização no ambiente *ex vitro*, rapidamente entrando em declínio (MANI *et al.*, 2021). Análises anatômicas podem ser realizadas para assinalar a ocorrência de tais defeitos de desenvolvimento e validar possíveis soluções de melhoria da saúde fisiológica das plantas *in vitro*. De modo semelhante, elucidar os níveis de estresse celular contribui para a compreensão do estado fisiológico das plantas, dado que alterações anormais nos tecidos podem ser reflexo de altos níveis de radicais livres e substâncias oxidantes.

Dessa forma, nesse trabalho foi buscado explorar a fisiologia do crescimento e desenvolvimento *in vitro* da espécie *Eltroplectris paranaënsis*, acerca de seus requerimentos nutricionais e hídricos ao longo do seu ciclo de vida, utilizando-se de análises morfo-anatômicas e bioquímicas, com o intuito de caracterizar morfo-fisiologicamente, propagar e conservar essa rara orquídea terrestre endêmica do estado do Paraná.

REFERÊNCIAS

- CARDOSO, J. C.; ZANELLO, C. A.; CHEN, J. T. An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, e985, 2020.
- DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, v. 26 (1-2), p. 155-158, 2005.
- ENGELS, M. E.; SILVA-PEREIRA, V., SMIDT, E. C. *Eltroplectris paranaënsis*: a new species of Spiranthinae (Orchidaceae) from the nebular Atlantic Rain Florest, **Phytotaxa**, v. 609, n. 2, p. 115-123, 2023.
- FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A.; FELIX, L. P.; MOLINA, W. F. Negligence in the Atlantic Forest, northern Brazil: a case study of an endangered orchid, **Biodiversity Conservation**, v. 26, p. 1047-1063, 2017.
- FERRAZ, J. R.; MOLINA, J. M. P.; HASSEMER, G.; RIBEIRO, J. E. L. S. An annotated checklist of the endemic flowering plants of Paraná, southern Brazil, **Phytotaxa**, v. 685, n. 1, p. 1-62, 2025.
- FERREIRA, A. L.; COUTINHO, B. R.; PINHEIRO, H. T.; THOMAZ, L. D. Composição florística e formações vegetais da Ilha dos Franceses, Espírito Santo, **Boletim do Museu Biológico Mello Leitão**, v. 22, p. 25-44, 2007.
- GALE, S. W.; FISCHER, G. A.; CRIBB, P. J.; FAY, M. F. Orchid conservation: bridging the gap between science and practice, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 186, p. 425-434, 2018.
- GUIMARÃES, L. R. S. *Eltroplectris* in Flora e Funga do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB630919> Acesso em: 01 jan. 2024.
- HAROUN, S. A.; SHUKRY, W. M.; EL-SAWY, O. Effect of asparagine or glutamine on growth and metabolic changes in *Phaseolus vulgaris* under *in vitro* conditions, **Bioscience Research**, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2010.
- HARPER, J. L. The meaning of rarity. In: SYNGE, H. (eds) **The Biological Aspects of Rare Plant Conservation**, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 1981.
- KAUTH, P. J.; DUTRA, D.; JOHNSON, T. R.; STEWART, S. L.; KANE, M. E.; VENDRAME, W. Chapter 38: Techniques and Applications of *In Vitro* Orchid Seed Germination in Floriculture, **Ornamental and Plant Biotechnology**, Volume V, Global Science Books, UK, p. 375-391, 2008.
- MAGRINI, S.; DE CARLI, A.; ONOFRI, S.; SCOPPOLA, A. A comparative study of the seed germination capabilities of *Anacamptis palustris* (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid, and other more common *Anacamptis* species, by asymbiotic culture *in vitro*, **European Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 71-79, 2011.
- MAGRINI, S.; DE VITIS, M.; TORELLI, D.; SANTI, L.; ZUCCONI, L. Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage, **Plant Biology**, v. 21, p. 544-550, 2019.
- MANI, M.; RASANGAM, L.; SELVAM, P.; SHEKHAWAT, M. S. Micro-morpho-anatomical mechanisms involved 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.

- PANSARIN, E. R.; FERREIRA, A. W. C. Butterfly pollination in *Pteroglossa* (Orchidaceae, Orchidoideae): a comparative study on the reproductive biology of two species of a Neotropical genus of Spiranthinae, **Journal of Plant Research**, v. 128, p. 459-468, 2015.
- PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: An overview, **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 55, p. 242-257, 2019.
- RASMUSSEN, H. N.; DIXON, K. W.; JERSÁKOVÁ, J.; TĚŠITELOVÁ, T. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements, **Annals of Botany**, v. 116, p. 391-402, 2015.
- ROCHA, A. E. S.; AFONSO, E. L. *Eltroplectris guimaraesii* (Spiranthinae, Orchidoideae, Orchidaceae), nova espécie para a Amazônia brasileira, **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 17, n. 2, p. 283-288, 2022.
- SALAZAR, G. A.; BATISTA, J. A. N.; CABRERA, L. I.; VAN DEN BERG, C.; WHITTEN, W. M.; SMIDT, E. C.; BUZATTO, C. R.; SINGER, R. B.; GERLACH, G.; JIMÉNEZ-MACHORRO, R.; RADINS, J. A.; INSAURRALDE, I. S.; GUIMARÃES, L. R. S.; BARROS, F.; TOBAR, F.; LINARES, J. L.; MÚJICA, E.; DRESSLER, R. L.; BLANCO, M. A.; HÁGSATER, E.; CHASE, M. W. Phylogenetic systematics of subtribe Spiranthinae (Orchidaceae: Orchidoideae: Cranichideae) based on nuclear and plastid DNA sequences of a nearly complete generic sample, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 186, p. 273-303, 2018.
- SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; BRAGA, F. T. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations, **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 4, p. 413-421, 2012.
- SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction, **Annals of Botany**, v. 104, p. 543-556, 2009.
- UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S. Organic Compounds: Contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids, **International Journal of Agronomy**, e2795108, 2020.
- WANG, Y.; WANG, H.; YE, C.; WANG, Z.; MA, C.; LIN, D.; JIN, X. Progress in systematics and biogeography of Orchidaceae, **Plant Diversity**, v. 46, p. 425-434, 2024.
- WRAITH, J.; NORMAN, P.; PICKERING, C. Orchid conservation and research: An analysis of gaps and priorities for globally Red Listed species, **Ambio**, v. 49, p. 1601-1611, 2020.
- ZHANG, S.; YANG, Y.; LI, J.; QIN, J.; ZHANG, W.; HUANG, W.; HU, H. Physiological diversity of orchids, **Plant Diversity**, v. 40, p. 196-208, 2018.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar diferentes condições de cultivo *in vitro*, relativos à composição salina do meio de cultura, suplementação com glutamina e estabelecimento de ventilação natural, nas respostas de desenvolvimento morfológico, formação dos tecidos e capacidade fotossintética de *Eltroplectris paranaënsis*, desde a germinação até a aclimatização *ex vitro*, de forma a elucidar os requerimentos nutricionais e hídricos da espécie durante o seu ciclo de vida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a eficiência de duas formulações salinas de meio de cultura (MS/2 e WPM) na germinação de *E. paranaënsis*;
- Descrever os estágios de germinação da espécie segundo sua morfologia e anatomia, por microscopia de luz;
- Descrever as fases de desenvolvimento da espécie segundo sua morfologia e micromorfologia, por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar os efeitos da glutamina na morfogênese *in vitro*;
- Quantificar os teores de pigmentos fotossintetizantes das plantas cultivadas, ao longo do tempo e em diferentes tratamentos;
- Investigar os efeitos da ventilação natural sobre a morfogênese *in vitro*;
- Analisar e comparar a atividade fotossintética das plantas nos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (glutamina x ventilação natural);
- Analisar e comparar a atividade fotossintética das plantas aclimatizadas provenientes dos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (glutamina x ventilação natural).

CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MORFOANATOMIA DE *ELTROPECTRIS PARANAËNSIS* SOB SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA*

RESUMO

A germinação *in vitro* possibilita a compreensão das necessidades nutricionais e ambientais das orquídeas, ao mesmo tempo em que fornece subsídios para a restauração de populações degradadas. No presente trabalho, foi estudada a germinação *in vitro* de *Eltropectris paranaënsis*, uma orquídea terrestre rara e endêmica da Floresta Nebular do Paraná, em duas composições de meio de cultura: sais e vitaminas WPM totais e MS, com metade da concentração (MS/2). A maior taxa de germinação foi obtida resposta ao meio WPM (50,8%). A maior mortalidade de protocormos foi registrada no meio MS/2. Um rápido acúmulo de amido ocorreu nos protocormos em estágio I de germinação. O velame foi formado em estágio V de germinação, e atingiu a maturidade cerca de dez meses após a germinação. Estômatos ciclocíticos foram observados pela primeira vez em uma Cranichidae. O crescimento de *E. paranaënsis* é compatível com a ocupação de nicho de solos rasos no estrato húmico. A fim de explorar essa característica, as plantas foram cultivadas em meio de cultura suplementado com glutamina nas concentrações 0; 6,8 e 13,6 mM, e avaliadas quanto ao crescimento, acúmulo de pigmentos fotossintetizantes e desenvolvimento radicular. O comprimento foliar e altura do meristema caulinar foram significativamente promovidos pela glutamina, sem diferença entre os tratamentos 6,8 e 13,6 mM. Um maior acúmulo de clorofila *a* também foi registrado na presença desse aminoácido, dado que a glutamina é o principal precursor desse pigmento. O desenvolvimento do cilindro vascular e acúmulo de amido nas raízes foi superior nos tratamentos com 6,8 ou 13,6 mM de glutamina. Portanto, conclui-se que a suplementação de glutamina na concentração de 6,8 mM é benéfica para o crescimento de *E. paranaënsis in vitro*.

*Parte dos resultados apresentados neste capítulo fazem parte de um manuscrito submetido para a Revista “Protoplasma”.

3 INTRODUÇÃO

As sementes de orquídeas são muito pequenas, produzidas em grandes quantidades em cápsulas secas deiscentes, que, ao se romperem, dispersam as sementes pelo vento. Esse tipo de estratégia favorece altas taxas de dispersão e propicia maior variabilidade genética ao longo do eixo geográfico, com o mínimo de investimento energético do parental (SWARTS & DIXON, 2009). Sendo assim, as sementes de orquídeas são desprovidas de reservas nutricionais e de enzimas capazes de processar polissacarídeos, e necessitam encontrar no ambiente um fungo compatível que forneça ao embrião aclorofilado os minerais, vitaminas e carboidratos fundamentais para o seu desenvolvimento inicial (ARCIDIACONO *et al.*, 2021; GODO *et al.*, 2010; KAUTH *et al.*, 2008; SWARTS & DIXON, 2009; UTAMI & HARIYANTO, 2020). A especificidade da relação simbiótica orquídea-micorriza ainda é debate na comunidade científica, variando de acordo com cada espécie, sem que o comportamento seja delimitado filogeneticamente (ARCIDIACONO *et al.*, 2021).

De um modo geral, a germinação de orquídeas terrestres é considerada mais desafiadora do que a de orquídeas epífitas, impactada pelo pouco conhecimento acerca do modo de vida dessas espécies, no que diz respeito às suas interações micorrízicas e exigências nutricionais ao longo do ciclo de vida (ARCIDIACONO *et al.*, 2021; GODO *et al.*, 2010; HENRICH *et al.*, 1981; THOMPSON *et al.*, 2006). O nível de dependência da orquídea com a micorriza é um *continuum* de espécies que a utilizam somente para a germinação até espécies holomicotróficas, que dependem completamente do mutualismo durante toda a sua vida (SWARTS *et al.*, 2010). A existência de um micro-ambiente apropriado em que a micorriza possa se desenvolver e estabelecer simbiose com a orquídea é um fator que pode contribuir para a raridade das orquídeas terrestres, limitando sua distribuição espacial (PHILLIPS *et al.*, 2011a; PHILLIPS *et al.*, 2011b). Para algumas espécies, o período em que o embrião germinado permanece debaixo do solo, sendo nutrido pelo fungo, pode chegar a vários anos (RASMUSSEN & WHIGHAM, 1993).

A composição do meio de cultura exerce forte influência sobre a germinação *in vitro* das orquídeas. Um dos meios de cultura mais amplamente utilizados na cultura de tecidos *in vitro* é Murashige & Skoog (MS) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), considerado um meio de cultura eficiente para regeneração vegetal devido ao amplo aporte de nitrogênio inorgânico, tanto na forma de sais de amônio quanto de nitrato. Entretanto, a elevada concentração de amônio em sua formulação pode ser prejudicial

para o desenvolvimento de algumas espécies particularmente sensíveis a esse composto. Em Orchidaceae, por exemplo, as espécies *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó e *Vanda tricolor* Lindl. tiveram seu desenvolvimento prejudicado quanto cultivadas em meio MS (KAUTH *et al.*, 2008); nenhuma germinação de *Ophrys panormitana* (Tod.) Soó foi observada nesse mesmo meio de cultura (ARCIDIACONO *et al.*, 2021) e proporções de amônio superiores à 75% do nitrogênio total do meio de cultura foram deletérias para *Phalaenopsis* Blume e *Dendrobium* Sw. (MANTOVANI *et al.*, 2018). O amônio se torna tóxico se acumulado nos tecidos devido a dissipação do gradiente de prótons transmembrana, que são fundamentais para que ocorra o transporte de elétrons durante a fotossíntese e respiração, e para manter funcionais os transportes de nutrientes através das membranas, além de aumentar o estresse oxidativo, o que pode levar à clorose das folhas e mudanças estruturais nas raízes (MANTOVANI *et al.*, 2018; TAIZ *et al.*, 2016).

Uma alternativa para minimizar os efeitos tóxicos do amônio é a redução das quantidades de sais para metade ou menos (MS/2, MS/4, MS/8 sendo as mais frequentes) ou a utilização de outras composições salinas (PHILLIPS & GARDA, 2019). Diantina *et al.* (2020) observaram maior porcentagem de protocormos germinados de *Dendrobium strebloceras* Rchb.f quando os sais MS foram utilizados na metade da concentração (MS/2), desde que a sacarose também fosse reduzida para 2%. Outra espécie do gênero, *Dendrobium tosaense* Makino, também teve melhor germinação em MS/2 (LO *et al.*, 2004). De modo semelhante, a espécie *Gomesa fuscopetala* (Hoehne) M.W.Chase & N.H.Williams (sinônimo: *Alatiglossum fuscopetalum*) teve melhor germinação em MS/2 acrescido de sacarose 2% (MELO FERREIRA *et al.*, 2017). Segundo Zeng *et al.* (2012), a maioria das espécies de *Paphiopedilum* preferem meios de cultura de baixa salinidade, e opções como MS/2, MS/4 e MS/8, em diferentes concentrações de sacarose/glucose, são mais adequadas para o seu cultivo. Outra opção a ser considerada é o meio de cultura “Wood Plant Medium” (WPM) (LLOYD & McCOWN, 1980), pois possui menores concentrações de amônio e nitrato, e tem se mostrado apropriado no cultivo *in vitro* de diversas espécies de Orchidaceae Neotropicais (ANJOS *et al.*, 2021; KOENE *et al.*, 2019; KOENE *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2016; VUDALA & RIBAS, 2017).

Além do balanço salino do meio de cultura, outras substâncias podem apresentar forte influência sobre o desenvolvimento *in vitro* dos tecidos. Reguladores vegetais, aminoácidos, vitaminas, aditivos orgânicos complexos (água de coco, homogenato de banana ou batata, peptona, extrato de levedura, entre outros) e demais fatores elicitores podem desencadear respostas fisiológicas diferenciais nas culturas (THOMPSON *et al.*,

2006; UTAMI & HARIYANTO, 2020). O uso de formas de nitrogênio orgânico – L-glutamina, caseína hidrolisada, asparagina, entre outros – pode ser benéfico para culturas *in vitro* aumentando a eficiência de assimilação de nitrogênio, ao abreviar a rota de incorporação de nitrogênio inorgânico (HAN *et al.*, 2022; KAUTH *et al.*, 2008; MAGRINI *et al.*, 2011; STEWART & KANE, 2006). Nas células vegetais, os aminoácidos livres são a principal forma de nitrogênio transportada via floema, e podem atuar nas vias de regulação osmótica, estabilidade e proteção antioxidante das membranas celulares e detoxificação de metais pesados (HAN *et al.*, 2022; NOROOZLO *et al.*, 2019b). Entre esses, a L-glutamina se apresenta como uma fonte tanto de nitrogênio quanto de carbono, facilmente incorporada pelas células no Ciclo do Ácido Cítrico. A glutamina é um precursor essencial da síntese de clorofila e de todos os demais aminoácidos, além de diversos outros compostos nitrogenados, como NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), o que promove a diferenciação dos tecidos e, conseqüentemente, estimula o crescimento vegetal (HAMASAKI *et al.*, 2005; HAROUN *et al.*, 2010; MAJEROWICZ *et al.*, 2000; NOROOZLO *et al.*, 2019b).

Sendo assim, esse capítulo objetiva estudar o efeito de duas composições salinas (WPM e MS/2) sobre a germinação *in vitro* de *Eltroplectris paranaënsis*, buscando a caracterização morfoanatômica de seus estágios de desenvolvimento, bem como a avaliação dos efeitos da suplementação de duas concentrações de glutamina sobre o seu crescimento, anatomia e acúmulo de pigmentos fotossintetizantes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 GERMINAÇÃO

Para a germinação, foi utilizada uma cápsula madura de *E. paranaënsis*, a qual foi produzida por polinização artificial de uma planta matriz mantida sob cultivo protegido em casa de vegetação em Curitiba, Paraná. A confirmação da identificação botânica foi feita pelo Dr. M. E. Engels. O material vegetal corresponde à população original da espécie conforme especificado no depósito em herbário (número de registro UPCB 106287). A cápsula foi coletada aos 35 Dias Após a Polinização (DAP) e mantida em geladeira à 4°C e total escuridão por sete dias. Após esse período, a cápsula foi lavada em água corrente e desinfestada por imersão em etanol 70°, por 10 minutos, com lavagem triplice em água destilada, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 2% e Tween® 20 0,1%, por 30 minutos, e lavagem triplice em água destilada autoclavada. A cápsula foi aberta em ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar e as sementes foram raspadas e suspensas em água autoclavada. Uma alíquota de 500 µL da suspensão de sementes foi inoculada em cada unidade experimental, que consistiu de placas de Petri com 25 mL de meio de cultura, totalizando 10 placas por tratamento.

Duas composições salinas foram testadas no experimento de germinação: sais e vitaminas Murashige & Skoog (1962) em metade da concentração (MS/2), suplementado com 15 g.L⁻¹ de sacarose, e sais e vitaminas Woody Plant Medium (LLOYD & McCOWN, 1980) na concentração basal (WPM), suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose. Ambos os meios de cultura foram acrescidos de 6,8 mM (1 g.L⁻¹) de glutamina e geleificados com 3 g.L⁻¹ de Phytigel® (Sigma-Aldrich, USA). O pH foi ajustado para 5.8 e os meios foram autoclavados à 121°C por 20 minutos. As placas foram colocadas em sala de crescimento com temperatura constante de 25±2°C e fotoperíodo de 16:8 (luz/escuro) simulado por luzes LED brancas (40 µmol m⁻² s⁻¹). A ocorrência de germinação foi avaliada por amostragem por conglomerados, a cada 30 dias, com auxílio de esteromicroscópio. Considerou-se como germinada toda semente cujo embrião tenha rompido a testa. A observação de eventuais protocormos escurecidos foi realizada no mesmo intervalo. Os demais estágios de germinação também foram caracterizados e contabilizados, no mesmo período, segundo a classificação de Stewarts & Kane (2006), com modificações. As porcentagens de germinação nos dois meios de cultura, ao longo

do tempo, foram avaliadas estatisticamente em ambiente de linguagem R versão 4.3.1 (R Core Team, 2023) segundo os modelos de regressão linear múltipla e Teste de Tukey.

4.2 ALONGAMENTO DAS PLANTAS

A composição do meio de cultura que indicou as melhores porcentagens de germinação foi escolhido para o primeiro ciclo de 30 dias de alongamento das plantas. Após esse período, a glutamina foi removida da composição, e as plantas passaram a ser cultivadas em meio de cultura isento de glutamina. Todos os meios de cultura tiveram pH ajustado para 5.8 e foram geleificados com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel e autoclavados à 121°C por 20 min. As plantas foram colocadas em frascos de vidro (8,5 cm de altura por 5,8 cm de diâmetro) contendo 30 mL de meio de cultura, cada frasco com seis plantas. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura constante de 25±2°C e fotoperíodo de 16:8 (luz/escuro) simulado por luzes LED brancas (40 μmol m⁻² s⁻¹) por cerca de três meses. A fim de homogeneizar as unidades amostrais dos experimentos subsequentes, somente plantas de Fase III – planta com mais de 1 cm de altura, com três ou mais raízes maiores do que 0,5 cm – foram selecionadas para uso.

4.3 DESENVOLVIMENTO DE *ELTROPLECTRIS PARANAËNSIS* SOB SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA

Para esse experimento, foram utilizados sais e vitaminas WPM, suplementados com 20 g.L⁻¹ de sacarose e diferentes concentrações de glutamina, em três tratamentos: 0 mM, 6,8 mM e 13,6 mM. Cada tratamento consistiu em oito repetições de um frasco de cultivo (13 cm de altura por 5,8 cm de diâmetro) contendo 30 mL de meio de cultura, cada qual com três plantas, realizado em três blocos. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5.8 e os meios foram autoclavados à 121°C por 20 minutos. Os frascos de cultivo foram transferidos para sala de crescimento com temperatura constante de 25±2°C e fotoperíodo de 16:8 (luz/escuro), iluminado por lâmpadas LED brancas (40 μmol m⁻² s⁻¹). O experimento teve delineamento inteiramente casualizado. Os parâmetros morfológicos avaliados foram número de folhas e raízes, comprimento da maior folha e da maior raiz, e altura do meristema caulinar, além de taxas de sobrevivência e de danos visíveis nos tecidos (escurecimento). Avaliações foram realizadas após 30 e 60 dias,

havendo renovação do meio de cultura logo após as avaliações. Os parâmetros morfológicos citados foram submetidos a análises estatísticas em ambiente de linguagem R (R Core Team, 2023), sendo avaliados quanto à variância das médias por tratamento e considerados pelos modelos de regressão linear múltipla e Análise de Variância (*One-way ANOVA*). O Teste de Tukey *post hoc* foi aplicado quando apropriado.

4.4 MICROSCOPIA DE LUZ

Amostras de protocormos em diferentes estágios (II à VI) de germinação foram coletadas 210 dias após inoculação das sementes, oriundas dos dois meios de cultura testados na germinação, totalizando 10 amostras. Esses estágios correspondem à: II - embrião clorofilado, testa intacta; III - ruptura da testa (= germinação), presença do protomeristema; IV - aparecimento da primeira folha; V - alongamento das folhas, formação da raiz tuberosa; VI - crescimento da(s) raiz(es) tuberosa(s) (>5 mm). Secções de raízes com 1,5 cm, a partir do ápice, foram amostradas dos tratamentos de glutamina (0; 6,8 e 13,6 mM) aos 60 dias de cultivo. As amostras foram imersas em solução de fixação contendo paraformaldeído (PFA) 2,5% e tampão fosfato 0,1 M (1:1) por no mínimo 24 h, em câmara fria ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). O tampão fosfato foi preparado com fosfato monossódico (NaH_2PO_4) e fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 0,2 M e ajustado para pH 7.2. Após esse período, as amostras foram lavadas com o tampão fosfato 0,1 M e submetidas à desidratação seriada com etanol (30, 50, 70 e 90%) por duas vezes de 15 min cada. Depois, as amostras foram desidratadas em etanol absoluto por duas vezes de 30 min. A seguir, para os estágios de germinação, foi realizado o procedimento de inclusão com Histoiresina® (Leica Biosystems, Germany) em curva crescente de Histoiresina®:etanol nas proporções 1:2, 1:1 e 2:1, por duas horas cada etapa. Por fim, as amostras foram recobertas com Histoiresina® pura e colocadas sob vácuo por 48 h. Após esse período, as amostras foram emblocadas com Histoiresina® e o endurecedor do fabricante (15:1) e seccionadas em micrótomo de rotação Olympus CUT 4055 (Olympus America Inc., USA), em cortes de 20 μm . As amostras de raízes foram seccionadas à mão livre. As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina 0,05% em tampão fosfato pH 6.8 (O'BRIEN *et al.*, 1964) e testadas com Floroglucinol-HCl 3% (HERR, 1992), Lugol (KRAUS *et al.*, 1998) e/ou Cloreto férrico 10% (JOHANSEN, 1940) e finalizadas em Bálsamo do Canadá sintético (CRQ Química, Brasil). Micrografias foram obtidas com

câmera AxioCam ERc 5s acoplada ao microscópio óptico Axio Lab A1 Zeiss (Carl Zeiss, Germany) no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência, UFPR.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras de plantas de Fase III foram coletadas, imersas em solução de fixação e desidratadas em série etílica, conforme descrito anteriormente. Depois, as amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico de CO₂ (BAL-TEC CPD 030, Columbia University, USA) e metalizadas com ouro. Micrografias foram obtidas com o microscópio TESCAN VEGA3 (TESCAN, Czech Republic) no Centro de Microscopia Eletrônica, UFPR.

4.6 ANÁLISE DOS TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES

Para análise dos teores de pigmentos fotossintetizantes, foram utilizadas plantas selecionadas ao acaso do experimento de crescimento com glutamina nas concentrações 0; 6,8 e 13,6 mM, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Foram coletados 50 mg de folhas frescas e isentas de lesões visíveis, em seis repetições, sendo as amostras imediatamente congeladas em freezer -20°C. Depois, foram adicionados 1,5 mL de acetona P.A. em cada tubo de amostra, os quais permaneceram em geladeira (4°C), no escuro, por 72 horas. Para melhor extração dos pigmentos, os tubos foram agitados por cerca de oito horas diariamente à 1100 rpm com o equipamento Finemixer SH2000 (FINEPCR, Korea). Os pigmentos extraídos foram analisados em espectrofotômetro LMR FLEX UV-VIS (Loccus, Brasil) nos comprimentos de onda de 661,6 nm (clorofila *a*), 644,8 nm (clorofila *b*) e 470,0 nm (carotenoides e xantofilas). Os cálculos da concentração de pigmentos foram realizados segundo Lichtenthaler (1987) e expressos em µg.g⁻¹ de massa fresca. Os dados foram analisados em ambiente de linguagem R (R Core Team, 2023) segundo a Análise de Variância (*Two-way* ANOVA) e Teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 GERMINAÇÃO

Os estágios de desenvolvimento observados para a espécie *E. paranaënsis* foram caracterizados (FIGURA 1) de acordo com Stewart & Kane (2006), com modificações, e atribuídos como: 0 – semente hialina, não germinada; I – embrião entumecido; II – embrião clorofilado, testa intacta; III – ruptura da testa (= germinação), presença do protomeristema; IV – aparecimento da primeira folha; V – alongamento das folhas, formação da raiz tuberosa; VI – crescimento da(s) raiz(es) tuberosa(s) (> 5 mm).

A germinação da espécie *E. paranaënsis* é assíncrona (FIGURA 2). As sementes permaneceram em dormência durante os três primeiros meses após a inoculação em meio de cultura; no quarto mês, embriões entumecidos e clorofilados começaram a ser observados nos dois tratamentos, ainda em pequeno número. A Tabela 1 traz as proporções de cada estágio nos dois meios de cultura ao longo do tempo, a partir do início da germinação. A partir do quinto mês, as primeiras sementes germinaram em meio WPM, totalizando 14,2% de taxa de germinação, porém ainda nenhuma germinação havia ocorrido em meio MS/2. No sexto mês, a germinação alcançou 36,3% em meio WPM e 1,4% em meio MS/2. Por fim, no sétimo mês, a proporção de germinação final foi de 50,8% em meio WPM e 31,1% em meio MS/2. Embriões escurecidos começaram a ser observados em meio WPM no último mês, tendo aparecido primeiro em meio MS/2, a partir do sexto mês (TABELA 1). Dessa forma, após o período de sete meses, todos os protocormos germinados foram transferidos das placas de germinação para frascos de cultivo, devido ao meio de cultura não suportar mais o desenvolvimento das plantas.

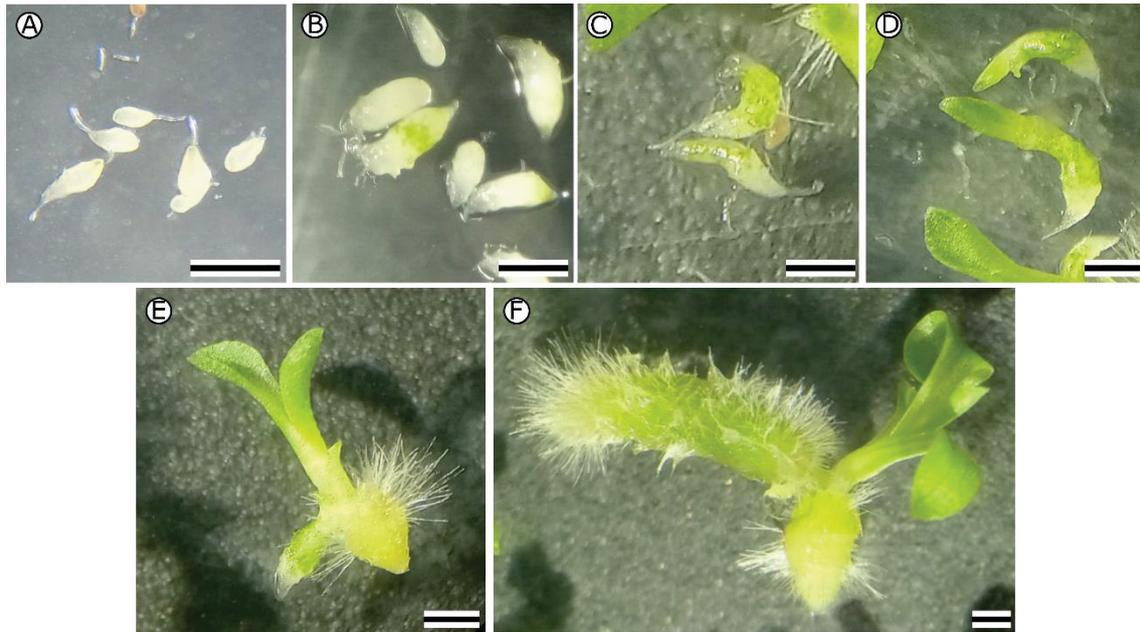


FIGURA 1: Caracterização dos estágios de germinação *in vitro* de *Eltroplectris paranaënsis*. A: estágio I – embrião entumecido. B: estágio II – embrião clorofilado, testa intacta. C: estágio III – ruptura da testa (= germinação), presença do protomeristema. D: estágio IV – aparecimento da primeira folha. E: estágio V – alongamento das folhas, formação da raiz tuberosa. F: estágio VI – crescimento da(s) raiz(es) tuberosa(s) (> 5 mm). O estágio 0 (não demonstrado na figura) corresponde à semente hialina, não germinada. Barra = 1 mm.

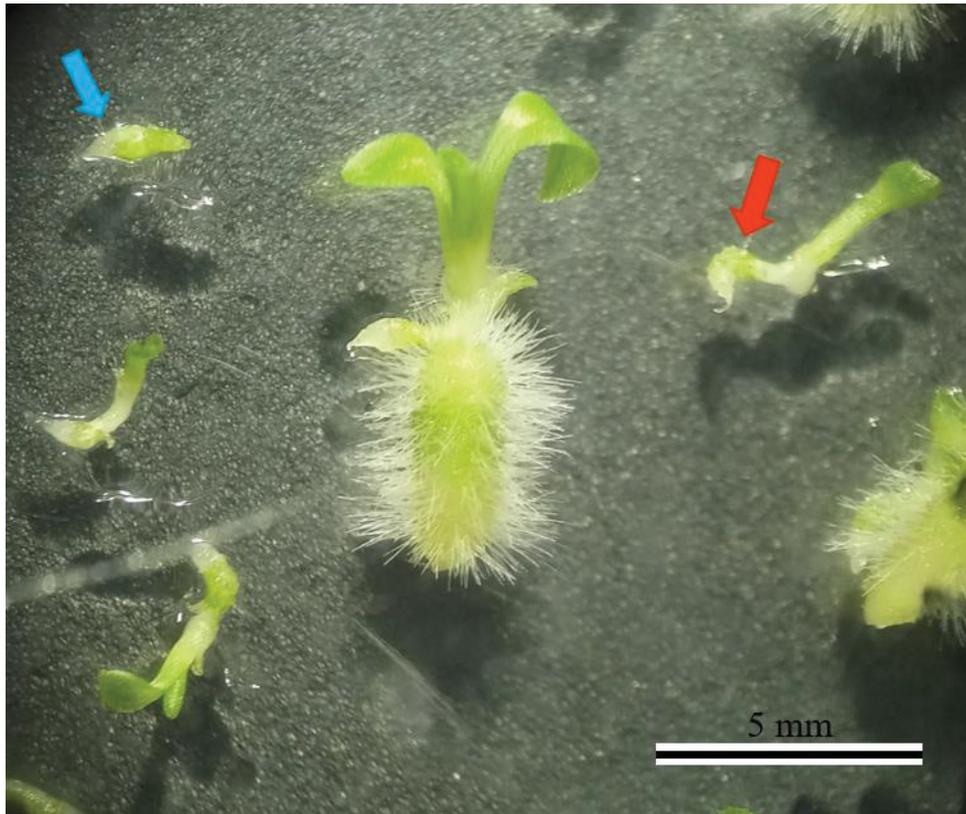


FIGURA 2: Germinação de *Eltroplectris paranaënsis* em meio WPM, aos 210 dias após inoculação das sementes. A seta azul (à esquerda) aponta para um protocormo em estágio III (germinação); um remanescente da testa pode ser visualizado. A seta laranja (à direita) aponta para uma raiz tuberosa em início de formação. O protocormo ao centro da figura se encontra em estágio VI (crescimento da(s) raiz(es) tuberosa(s), > 0,5 mm), com uma raiz tuberosa plenamente desenvolvida e uma raiz secundária à esquerda; os demais protocormos representam o estágio IV (aparecimento da primeira folha).

TABELA 1: Proporções dos estágios de germinação de *Eltroplectris paranaënsis*, nos dois meios de cultura avaliados, a partir dos 150 dias após a inoculação das sementes. Valores são expressos em porcentagem de protocormos, seguidos do desvio padrão da amostra. Valores em **negrito** simbolizam os estágios após rompimento da testa da semente. Tracejados (---) representam ausência do estágio indicado na amostra.

Meio de cultura	WPM			MS/2		
	150 dias	180 dias	210 dias	150 dias	180 dias	210 dias
0	39,7 ±12,6	29,9 ±9,9	31,9 ±11,8	51,7 ±6,8	37,0 ±7,0	38,0 ±9,2
I	29,2 ±11,6	17,6 ±8,1	7,6 ±5,6	44,5 ±3,6	36,7 ±3,5	10,8 ±7,4
II	16,9 ±8,2	16,4 ±10,1	6,0 ±4,8	3,8 ±3,8	15,5 ±10,6	11,1 ±3,8
III	14,2 ±13,6	20,4 ±6,6	20,4 ±8,9	---	1,4 ±2,4	24,1 ±11,2
IV	---	14,9 ±15,1	26,1 ±7,2	---	---	7,0 ±3,9
V	---	0,9 ±1,1	3,6 ±4,6	---	---	---
VI	---	---	0,7 ±0,9	---	---	---
Escurecimento	---	---	3,7 ±5,4	---	9,4 ±9,1	9,2 ±4,2
Total	14,2% ^b	36,3% ^a	50,8% ^a	---	1,4% ^c	31,1% ^{ab}

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística no Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. Legenda: 0 – semente hialina, não germinada; I – embrião entumecido; II – embrião clorofilado, testa intacta; III – ruptura da testa (= germinação), presença do protomeristema; IV – aparecimento da primeira folha; V – alongamento das folhas, formação da raiz tuberosa; VI – crescimento da(s) raiz(es) tuberosa(s) (> 5 mm).

5.2 ANATOMIA DOS ESTÁGIOS DE GERMINAÇÃO

Os protocormos de *E. paranaënsis* apresentam grande quantidade de idioblastos contendo ráfides de oxalato de cálcio desde o estágio II, distribuídos por todo o tecido, inclusive nos primórdios foliares. As células possuem núcleos grandes com nucléolos evidentes, às vezes com mais de um nucléolo por núcleo (FIGURA 3A). A partir do estágio II, também já são observados espirantossomos – conjuntos de amiloplastos, característicos de Spiranthinae – mais presentes nos terços mediano e inferior dos protocormos, ausentes somente nas regiões do meristema apical caulinar e suspensório (FIGURAS 3B, F-G; 4D). No estágio III, é possível visualizar o início da formação do cilindro vascular (protoxilema), com espessamento de parede celular em espiral, assim

como da exoderme unisseriada e primeiros pelos radiculares (FIGURAS 3C-D). Cutícula aparentemente ausente. Estômatos estão presentes em protocormos de estágio IV (FIGURA 4F). O velame começa a se formar no estágio IV, e se torna evidente no estágio V (FIGURAS 3H; 4H-I), sendo composto de duas camadas que, posteriormente, se tornam o endovelame e exovelame.

O estágio V é caracterizado pela presença de uma raiz tuberosa quase plenamente formada – com velame, epiderme, córtex, endoderme rudimentar e cilindro vascular – e formação da primeira raiz secundária. Nesse momento, a maior parte do estoque de amido (nos espirantossomos) é canalizado do tecido do protocormo para a raiz secundária, com pouco amido sendo mantido na primeira raiz da germinação (FIGURAS 4G, L). No estágio VI, a raiz primária tem a endoderme completa e o cilindro vascular mais definido, com pelo menos quatro arcos de protoxilema. As células do velame permanecem vivas (FIGURAS 3J-L; 4J-K). Não foi visualizada nenhuma diferença significativa na estruturação dos tecidos dos protocormos cultivados entre os meios WPM e MS/2. O teste de presença de compostos fenólicos foi negativo em todos os estágios.

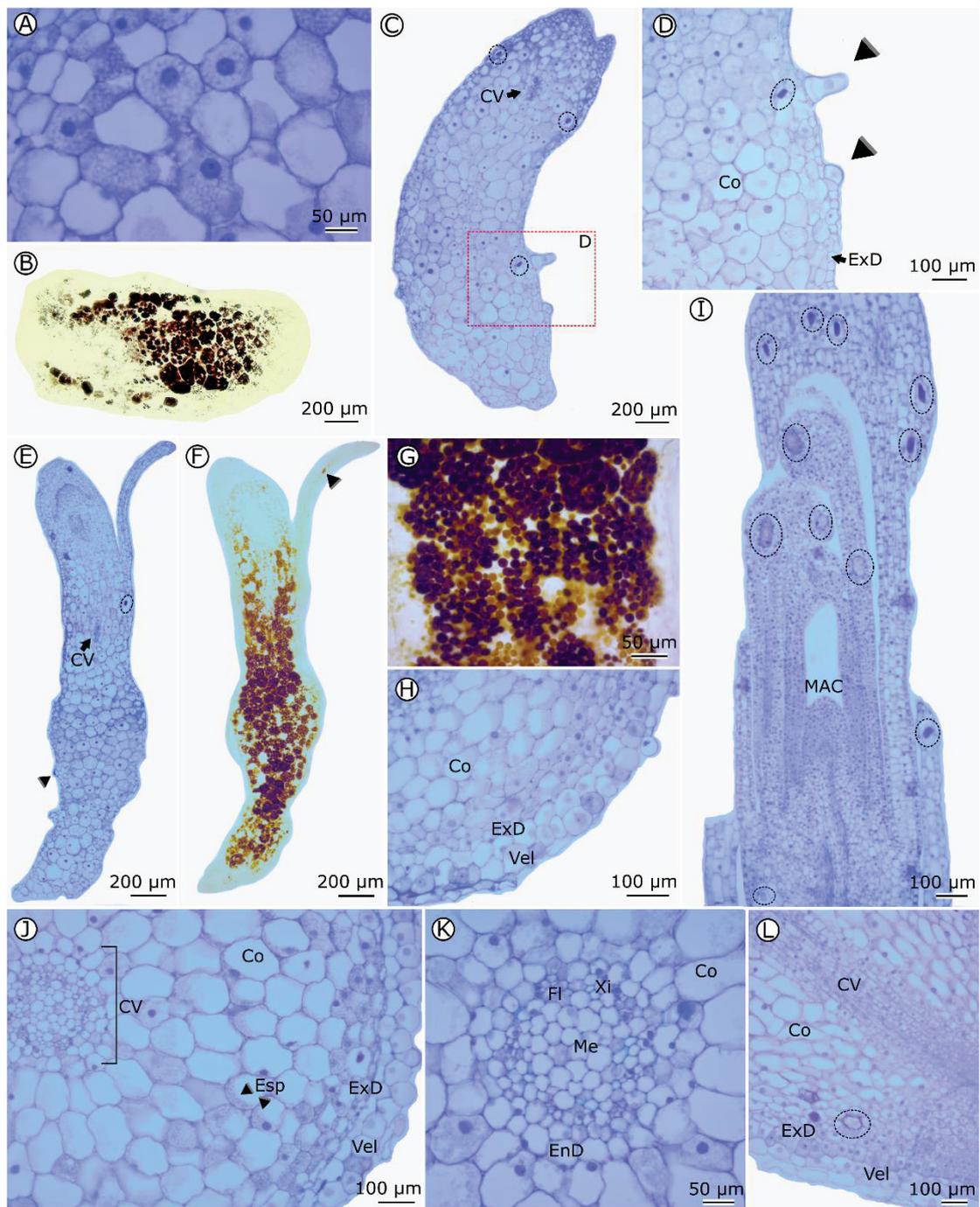


FIGURA 3: Microscopia de luz dos estágios de germinação de *Eltroleptis paranaënsis*, cultivada em meio de cultura WPM, corados com Azul de Toluidina O (A, C-E, H-L) ou Lugol (B, F-G). A: células do córtex do protocormo com núcleos e nucléolos evidentes. B: Mapeamento de amido em protocormo de estágio II; à esquerda, porção apical; à direita, porção basal. C: Protocormo de estágio III. D: Detalhe da porção basal do protocormo de estágio III, pelos radiculares em desenvolvimento (cabeça de seta). E: Protocormo de estágio IV, primeira folha em evidência. Cabeça de seta aponta para um pelo radicular em formação. F: Mapeamento de amido em protocormo de estágio IV. A

cabeça de seta aponta para amido acumulado em um estômato. G: Detalhe dos espirantossomos. H: Secção transversal da raiz do protocormo de estágio V, desenvolvimento do velame. I: Porção apical do protocormo de estágio V. J: Secção transversal da raiz do protocormo de estágio VI. Cabeças de seta apontam para espirantossomos no córtex. K: Detalhe do cilindro vascular da raiz do protocormo de estágio VI. L: Secção longitudinal da raiz do protocormo de estágio VI. Círculos tracejados em todas as imagens mostram ráfides. Legenda: Co – córtex; CV – cilindro vascular; EnD – endoderme; Esp – espirantossomos; ExD – exoderme; Fl – floema; MAC – meristema apical caulinar; Me – medula; Vel – velame; Xi – xilema.

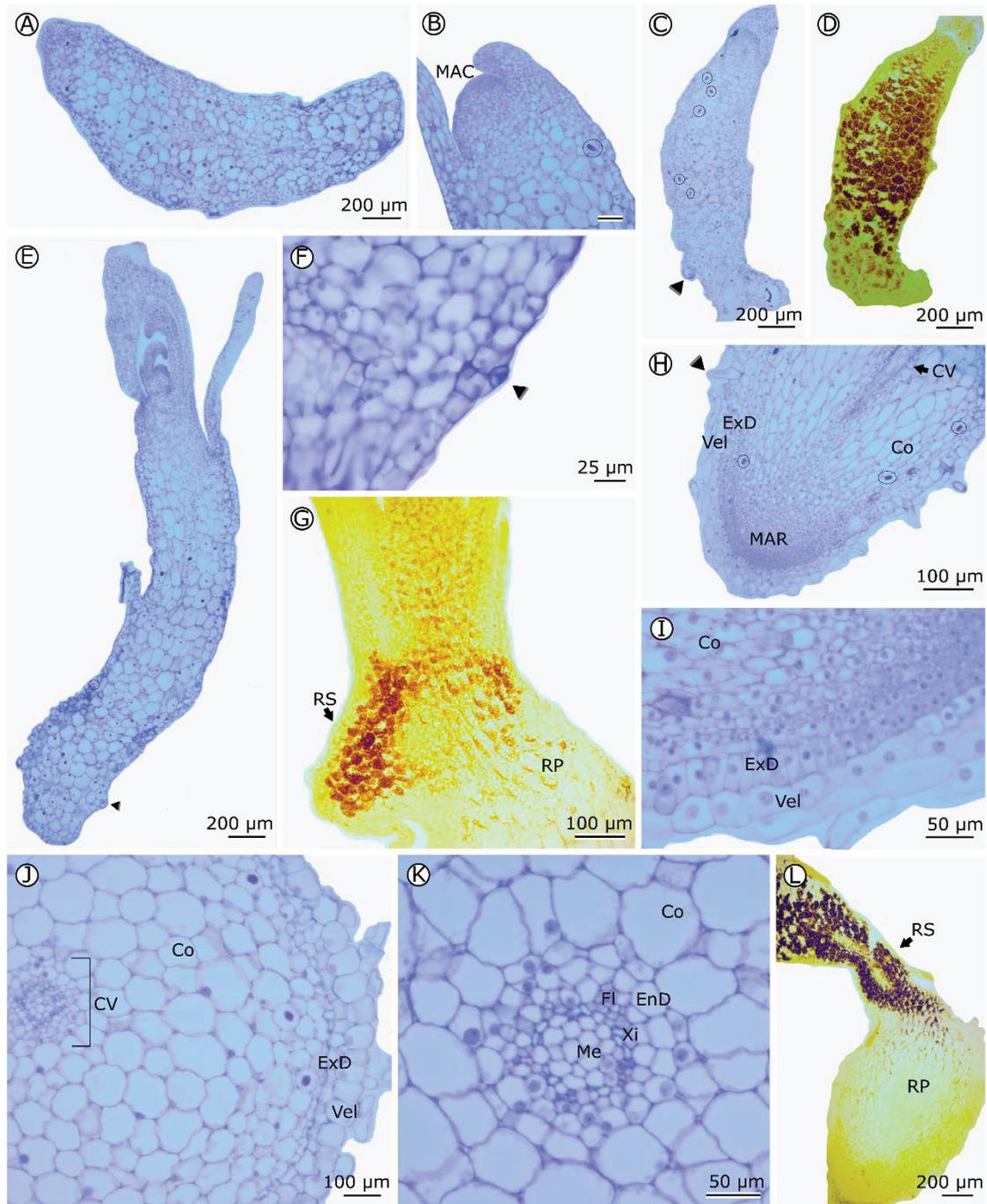


FIGURA 4: Microscopia de luz dos estágios de germinação de *Eltroleptis paranaënsis*, cultivada em meio de cultura MS/2, corados com Azul de Toluidina (A-C, E-F, H-K) ou Lugol (D, G, L). A: Protocormo de estágio II. B: Protocormo de estágio III, detalhe do protomeristema. C: Protocormo de estágio III. Cabeça de seta aponta para célula precursora do pelo radicular. D: Mapeamento de amido em protocormo de estágio III. E: Protocormo de estágio IV, com várias folhas em formação. Cabeça de seta aponta para um pelo radicular. F: Detalhe do estômato da folha do protocormo de estágio IV. G: Mapeamento de amido na porção mediana do protocormo de estágio V. H: Secção

longitudinal da raiz do protocormo de estágio V. Cabeça de seta aponta para um pelo radicular. I: Detalhe da secção longitudinal da raiz do protocormo de estágio V, mostrando a formação do velame. J: Secção transversal da raiz do protocormo de estágio VI. K: Detalhe do cilindro vascular da raiz do protocormo de estágio VI. L: Mapeamento de amido na porção mediana-basal do protocormo de estágio VI, mostrando apenas as raízes tuberosas. Círculos tracejados em todas as imagens mostram ráfides. Legenda: Co – córtex; CV – cilindro vascular; EnD – endoderme; ExD – exoderme; Fl – floema; MAC – meristema apical caulinar; MAR – meristema apical radicular; Me – medula; RP – raiz primária; RS – raiz secundária; Vel – velame; Xi – xilema.

5.3 FASES DE DESENVOLVIMENTO

Por ter sido a combinação mais favorável à germinação e ao desenvolvimento inicial das plantas, o meio WPM suplementado com glutamina 6,8 mM foi escolhido também como meio de alongamento das plantas, com posterior remoção da glutamina. Os indivíduos se desenvolveram saudáveis, sem ocorrências de escurecimento nas folhas ou raízes. Durante esse período, foi possível separar os indivíduos em três fases de desenvolvimento, de acordo com a morfologia externa, para melhor manejo das plantas e desenho experimental, conforme segue: Fase I – planta com somente duas folhas, e uma raiz maior do que 0,5 cm; Fase II – planta com mais do que duas folhas, menos de 1 cm de altura, com duas raízes maiores do que 0,5 cm; Fase III – planta com mais do que duas folhas, mais de 1 cm de altura, com três ou mais raízes maiores do que 0,5 cm.

As plantas de Fase III apresentam raízes com velame maduro (células mortas) em bicamada e espessamento de parede celular linear no exovelame e escalariforme no endovelame (FIGURA 5B). As células do córtex estão repletas de espirantossomos (FIGURA 5C). Nenhuma ráfide foi localizada. O cilindro vascular da raiz apresenta vasos de metaxilema e pelo menos cinco arcos de floema (FIGURA 5D). As folhas são hipoestomáticas, com estômatos reniformes ciclocíticos (com cinco ou mais células subsidiárias ao redor do estômato, menores do que as células da epiderme); não possuem tricomas (FIGURA 5E-G). A densidade estomática das folhas foi de 88 est/mm². Todos os estômatos se encontravam fechados.

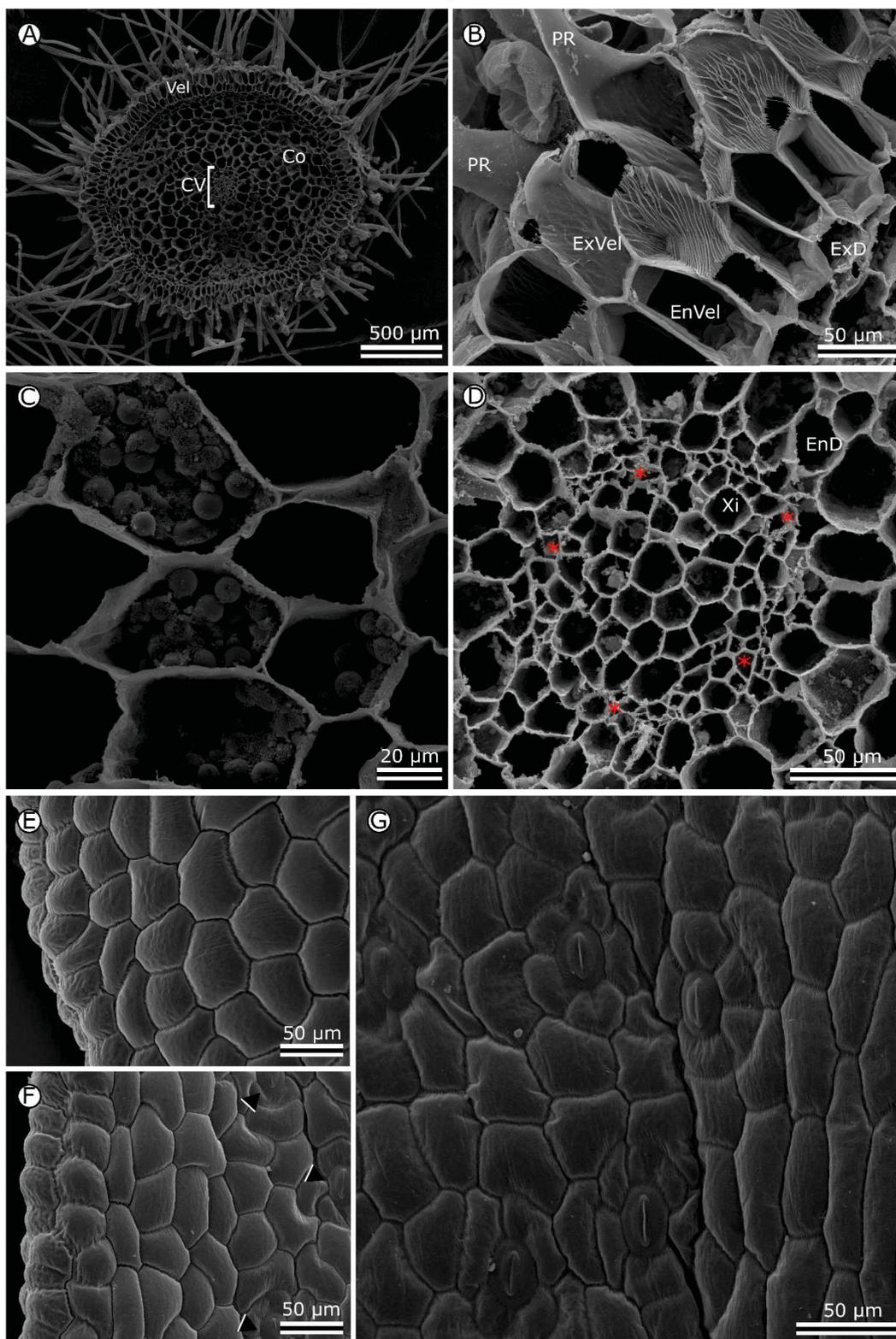


FIGURA 5: Microscopia Eletrônica de Varredura de raiz (A-D) e folha (E-G) de plantas de *Eltroleptis paranaënsis* cultivadas *in vitro* em meio WPM por dez meses, em Fase III de desenvolvimento (planta com mais de 1 cm de altura, com três ou mais raízes maiores do que 0,5 cm). A: Corte transversal da região mediana da raiz tuberosa madura. B: Detalhe do velame da raiz mostrando o padrão de espessamento de parede celular

linear (exovelame) e escalariforme (endovelame). C: Células do córtex da raiz com espirantossomos. D: Detalhe do cilindro vascular da raiz; asteriscos (*) demarcam as áreas com arcos de floema. E: Margem da face foliar adaxial. F: Margem da face foliar abaxial; cabeças de seta apontam para os estômatos marginais. G: Área mediana da face foliar abaxial, detalhe dos estômatos. Legenda: Co – córtex; CV – cilindro vascular; EnD – endoderme; ExD – exoderme; EnVel – endovelame; ExVel – exovelame; PR – pelo radicular; Vel – velame; Xi – xilema.

As plantas de *E. paranaënsis* apresentam raízes tuberosas clorofiladas de crescimento horizontal, paralelo ao substrato, densamente pilosas desde a base até o ápice, excetuando a região da coifa (FIGURA 6A). Geralmente, uma única nova raiz é formada de cada vez. A raiz mais jovem se desenvolve a partir de quando a raiz anterior atingiu pelo menos um centímetro de comprimento, e surge entre duas folhas (FIGURA 6B). Com o surgimento da nova raiz, as folhas que a cercam caem.

A filotaxia é espiralada, com cada nova folha partindo do pseudocaulé; a planta não possui pseudobulbos nem cormos. As folhas têm textura membranácea e morfologia de base estreita e alongada, o que lhes conferem o aspecto de um “pecíolo”, com o terço apical largo elíptico e ápice acuminado, o qual é curvado para baixo e pode se apresentar espiralado.

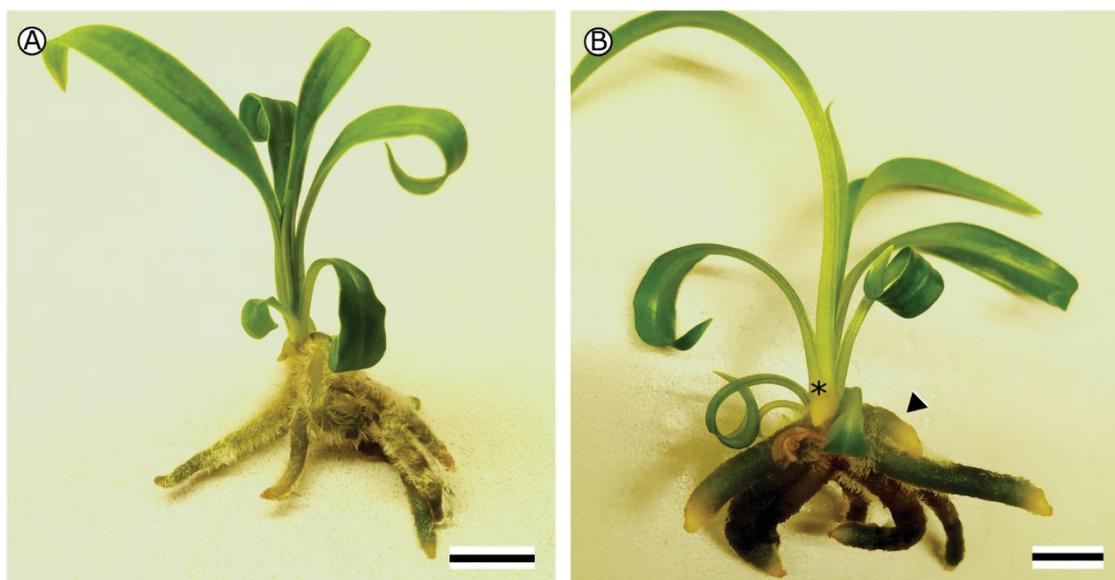


FIGURA 6: Plantas de *Eltroleptis paranaënsis* cultivadas *in vitro* em meio WPM, dez meses após a germinação. O asterisco (*) demarca a nova raiz surgindo entre duas folhas. A cabeça de seta aponta para a raiz anterior ao surgimento da nova. Barra = 1 cm.

5.4 DESENVOLVIMENTO DE *ELTROPLECTRIS PARANAËNSIS* SOB SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA

Após 30 dias de cultivo, a maior ocorrência de escurecimento se deu no tratamento sem suplementação de glutamina (4,79%), seguido do tratamento de glutamina 13,6 mM (3,38%), sendo, em sua maioria, folhas danificadas, embora ápices radiculares escurecidos também tenham sido observados. O tratamento de glutamina 6,8 mM teve a menor taxa (1,51%).

A Tabela 2 traz as médias dos parâmetros avaliados no estudo, dentro de cada tratamento. Desses, o comprimento da maior folha (cm) foi o único com diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,0056$; $R^2 = 0,1175$). Essa variação é correlacionada com a presença da glutamina, pois os tratamentos 6,8 mM e 13,6 mM diferem de 0 mM mais do que diferem entre si, segundo o Teste de Tukey.

TABELA 2: Parâmetros morfológicos das plantas de *Eltroplectris paranaënsis* avaliados dentro de cada tratamento, aos 30 dias de cultivo. Valores representam as médias dos tratamentos, seguidos do desvio padrão da amostra. CV = coeficiente de variação.

Tratamento/ Parâmetros	Número de folhas	Número de raízes	Comprimento da maior folha (cm)	Comprimento da maior raiz (cm)	Altura do meristema caulinar (cm)
0 mM	4,41 ±0,67 ^{ns}	4,53 ±0,69 ^{ns}	2,24 ±0,60 ^b	2,50 ±0,22 ^{ns}	0,89 ±0,27 ^{ns}
6,8 mM	4,40 ±0,62 ^{ns}	4,64 ±0,68 ^{ns}	2,56 ±0,57 ^a	2,46 ±0,23 ^{ns}	1,04 ±0,39 ^{ns}
13,6 mM	4,43 ±0,44 ^{ns}	4,60 ±0,59 ^{ns}	2,67 ±0,38 ^a	2,46 ±0,18 ^{ns}	1,06 ±0,35 ^{ns}
CV (%)	13,1	14,2	21,1	8,5	33,6

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. ns: Não significativo.

Entretanto, o teste de correlação múltipla apontou também a existência de uma associação entre os parâmetros de comprimento da maior folha e altura do meristema caulinar ($r = 0,73$). Diante disso, foi encontrada que a maior variação observada no comprimento da maior folha se deve, em primeira ordem, à variação de altura do

meristema caulinar e, em segunda ordem, ao tratamento de glutamina 13,6 mM (TABELA 3).

TABELA 3: Modelo linear com regressão múltipla associando os parâmetros de comprimento da maior folha, altura do meristema caulinar e presença de glutamina aos 30 dias de cultivo *in vitro* de *Eltroplectris paranaënsis*.

Coefficiente	Desvio padrão	P
Gln 6,8 mM	0,044	0,1850
Gln 13,6 mM	0,044	0,0288 *
Altura	0,094	$8,98e^{-08}$ ***
Gln 6,8 mM + Altura	0,128	0,5963
Gln 13,6 mM + Altura	0,130	0,0351 *

Asteriscos (*) representam diferença estatística no teste ao nível de 5% (*) ou 0,1% (***). Gln = glutamina.



FIGURA 7: Plantas de *Eltroplectris paranaënsis* após 30 dias de cultivo em meio WPM com diferentes concentrações de glutamina. A: 0 mM glutamina. B: 6,8 mM glutamina. C: 13,6 mM glutamina. Barra = 1 cm.

Com 60 dias de cultivo, os mesmos parâmetros mencionados anteriormente foram novamente avaliados. Houve redução nos números de ocorrências de escurecimento, em relação à avaliação de 30 dias, porém a maior taxa de escurecimento permaneceu sendo no tratamento sem suplementação de glutamina (3,19%), enquanto os outros dois tratamentos apresentaram a mesma taxa (0,95%).

A Tabela 4 traz as médias de todos os parâmetros, dentro de cada tratamento. A tendência indicada pelas análises estatísticas aos 30 dias de cultivo se confirmou aos 60 dias, com os parâmetros de comprimento da maior folha e altura do meristema caulinar sendo significativos ($p = 4,795e^{-05}$, $R^2 = 0,2825$; $p = 5,436e^{-05}$, $R^2 = 0,2792$,

respectivamente). Ambos os parâmetros estão fortemente associados à presença da glutamina.

TABELA 4: Parâmetros morfológicos das plantas de *Eltroplectris paranaënsis* avaliados dentro de cada tratamento, aos 60 dias de cultivo. Valores representam as médias dos tratamentos, seguidos do desvio padrão da amostra. CV = coeficiente de variação.

Tratamento/ Parâmetros	Número de folhas	Número de raízes	Comprimento da maior folha (cm)	Comprimento da maior raiz (cm)	Altura do meristema caulinar (cm)
0 mM	6,18 ±0,80 ^{ns}	5,50 ±0,76 ^{ns}	3,00 ±0,69 ^b	2,87 ±0,29 ^{ns}	1,41 ±0,42 ^b
6,8 mM	6,56 ±0,79 ^{ns}	5,77 ±0,85 ^{ns}	3,90 ±1,0 ^a	2,89 ±0,28 ^{ns}	1,89 ±0,49 ^a
13,6 mM	6,30 ±0,64 ^{ns}	5,94 ±0,51 ^{ns}	4,18 ±0,66 ^a	2,70 ±0,30 ^{ns}	2,13 ±0,53 ^a
CV %	11,7	12,3	21,5	10,3	26,9

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. ns: Não significativo.

No teste de correlação múltipla, o comprimento da maior folha e a altura do meristema caulinar aparecem novamente associados ($r = 0,83$). Uma correlação entre o número de raízes e o comprimento da maior folha também é apontada no teste ($r = 0,81$), porém o número de raízes não sofre influência significativa de nenhum dos tratamentos com glutamina. No entanto, por estar associado a um parâmetro que é fortemente afetado pela presença da glutamina, pode-se afirmar que o número de raízes sofre influência indireta da glutamina.

O tratamento de 6,8 mM de glutamina apresentou a maior variação em número de raízes por indivíduo, com o menor valor de quatro raízes (10% dos indivíduos) e o maior de nove raízes (3,3% dos indivíduos). O tratamento controle (0 mM) também apresentou proporção semelhante de indivíduos com quatro raízes (9,8%), porém o tratamento 13,6 mM teve a menor proporção de indivíduos com esse porte (1,7%). Essas diferenças de proporção entre os tratamentos corroboram com a hipótese de que a glutamina exerce efeito indireto sobre o número de raízes das plantas *in vitro* de *E. paranaënsis*.



FIGURA 8: Plantas de *Eltrophectris paranaënsis* após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM com diferentes concentrações de glutamina. A: 0 mM. B: 6,8 mM. C: 13,6 mM. Barra = 1 cm.

As plantas cultivadas sem suplementação de glutamina apresentaram folhas de coloração mais pálida tanto aos 30 quanto aos 60 dias de cultivo (FIGURA 7A, 8A). A quantificação dos pigmentos fotossintetizantes revelou que, de fato, a quantidade de clorofila *a* era maior nas plantas cultivadas na presença de glutamina, independentemente da concentração, em relação às plantas cultivadas sem glutamina. O mesmo foi observado acerca dos teores de carotenoides e xantofilas. Embora o teor de clorofila *b* não tenha sido apontado como significativamente diferencial entre os tratamentos, é possível notar uma tendência de aumento na presença da glutamina, de modo semelhante aos demais pigmentos. Sendo assim, a proporção entre os pigmentos clorofila *a/b* permaneceu estável independentemente do tratamento ou período de cultivo.

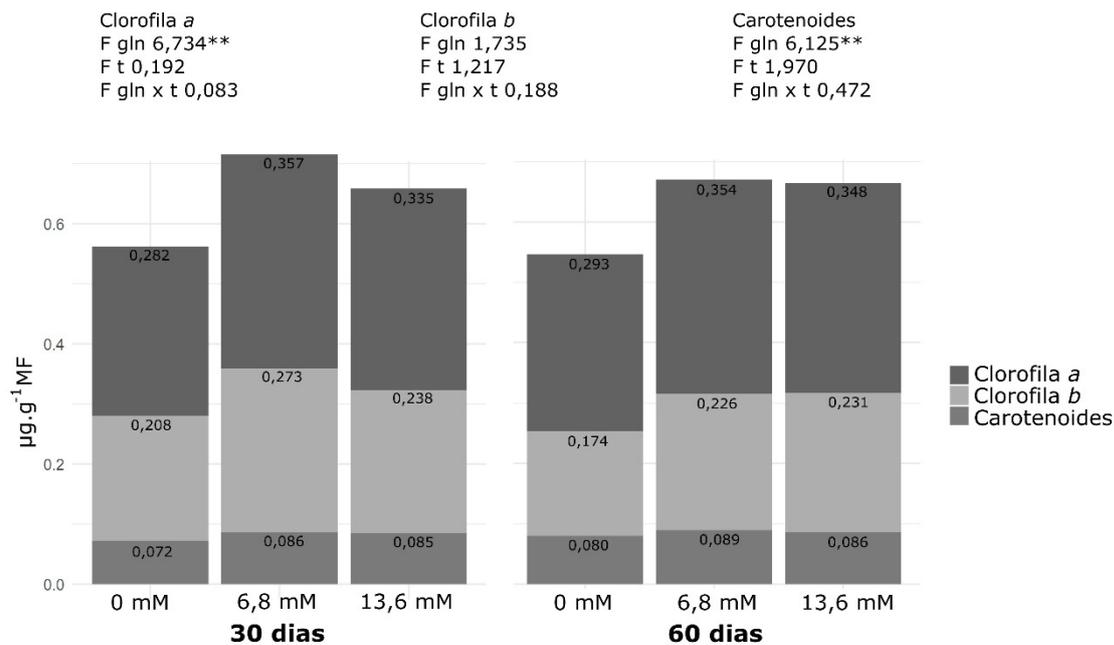


FIGURA 9: Teores de pigmentos fotossintetizantes de folhas saudáveis de plantas de *Etroplectris paranaënsis* cultivadas *in vitro* em meio WPM, de acordo com o tempo de cultivo (30 ou 60 dias) e suplementação de glutamina (0; 6,8 ou 13,6 mM). Valores dentro das barras representam a média da amostra, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca. Valores da estatística F indicam: F gln = efeito da glutamina; F t = efeito do tempo de cultivo; F gln x t = efeito de interação entre a glutamina e o tempo de cultivo.

Conforme demonstrado na figura acima, a resposta de acúmulo de pigmentos fotossintetizantes foi muito semelhante aos 30 e 60 dias.

Além do efeito benéfico sobre o crescimento da parte aérea e no acúmulo de pigmentos, a suplementação de glutamina também favoreceu o crescimento radicular quanto ao seu desenvolvimento como órgão de reserva. Isso porque as raízes apresentaram cinco à seis arcos de xilema no cilindro vascular quando cultivadas em meio de cultura sem glutamina (FIGURA 10D) – semelhante ao observado nas plantas de Fase III (FIGURA 5D) –, porém continham sete arcos de xilema quando cultivadas em meio de cultura suplementado com 6,8 ou 13,6 mM de glutamina (FIGURAS 10J, P). Além disso, as raízes dos dois tratamentos de glutamina aparentavam ter mais amido nas células do córtex (FIGURAS 10F, L, R). Foram encontradas ráfides em raízes de todos os tratamentos.

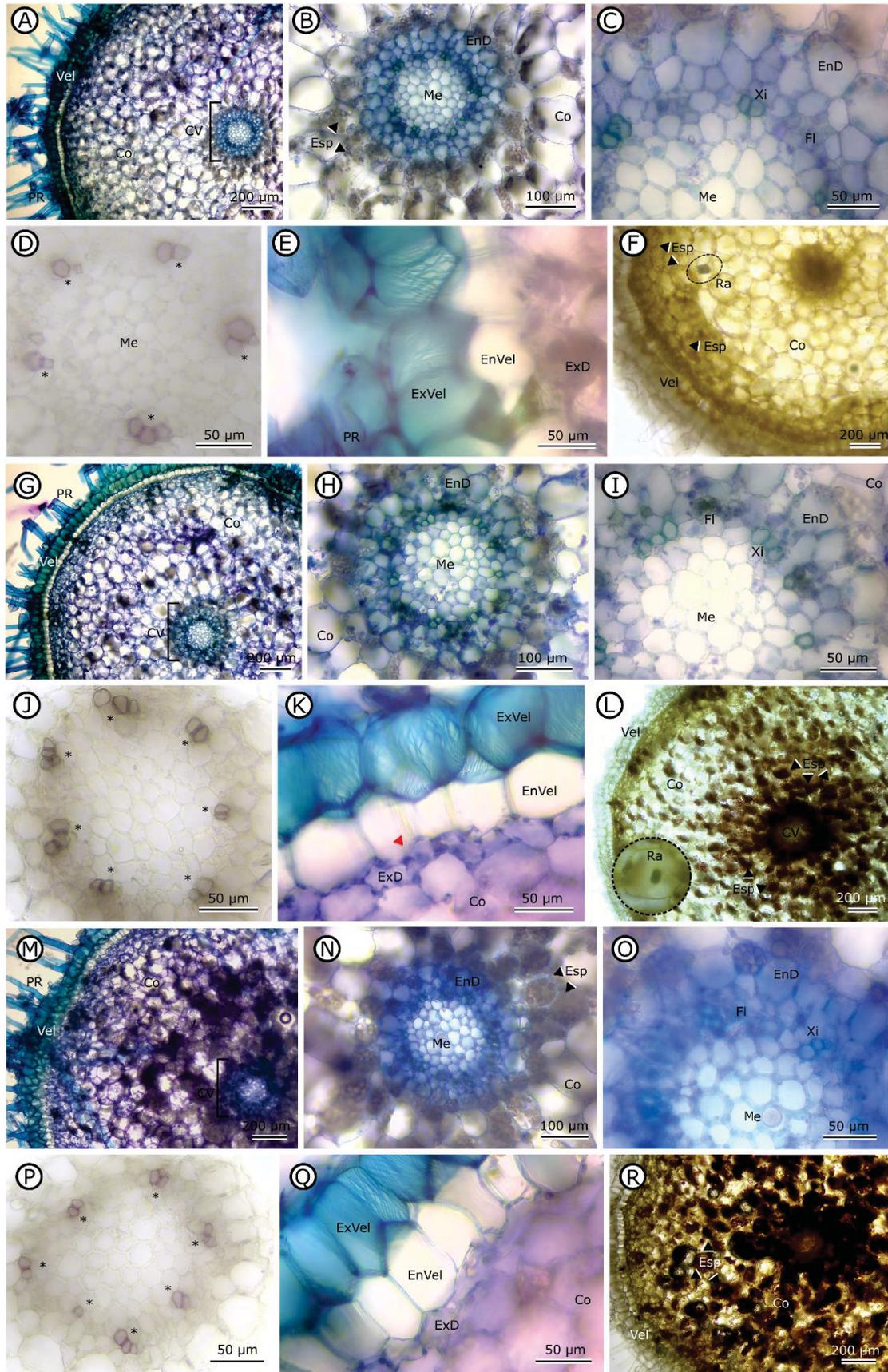


FIGURA 10: Secções transversais das raízes de plantas de *Eltroleptis paranaëns* cultivadas *in vitro* por 60 dias em meio de cultura WPM suplementado com diferentes

concentrações de glutamina (0; 6,8; 13,6 mM), coradas com Azul de Toluidina O, Floroglucinol-HCl (D, J, P) ou Lugol (F, L, R). A-F: tratamento 0 mM. G-L: tratamento 6,8 mM. A seta vermelha (K) aponta para o espessamento de parede escalariforme. M-R: tratamento 13,6 mM. Asteriscos (*) demarcam os arcos de xilema no cilindro vascular. Legenda: Co – córtex; CV – cilindro vascular; EnD – endoderme; EnVel – endovelame; Esp – espirantossomos; ExD – exoderme; ExVel – exovelame; Fl – floema; Me – medula; PR – pelo radicular; Ra – ráfide; Vel – velame; Xi – xilema.

6 DISCUSSÃO

6.1 GERMINAÇÃO

A cápsula se encontrava completamente desenvolvida no momento da coleta, com sementes viáveis. Nenhuma contaminação ocorreu durante o procedimento de germinação, mostrando-se adequados os métodos de desinfestação do material e inoculação das sementes.

Para vários autores, a germinação de orquídeas terrestres pôde ser obtida somente em condições de escuridão, tendo, pelo menos, um período definido de incubação no escuro antes da transferência para as condições de luz (GODO *et al.*, 2010; RASMUSSEN *et al.*, 2015; STEWART & KANE, 2006; THOMPSON *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2012). A utilização de sementes imaturas é comum, o que justifica a exigência de um período de incubação no escuro para finalização da maturação da semente após a colheita, porém a exatidão quanto ao momento da coleta – em Dias Após a Polinização (DAP) – é fundamental para o sucesso da técnica e precisa ser definida para cada espécie individualmente (LONG *et al.*, 2010; THOMPSON *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2016). Infelizmente, essas informações são escassas na literatura. Por exemplo, a espécie *Paphiopedilum wardii* Summerh. apresenta maior sucesso de germinação quando a cápsula é coletada aos 180 DAP (ZENG *et al.*, 2012), enquanto a espécie *P. villosum* var. *densissimum* Z.J. Liu & S.C. Chen apresenta a melhor germinação aos 200 DAP, com menos de 1% das sementes germinando aos 180 DAP (LONG *et al.*, 2010); por outro lado, *P. armeniacum* S.C. Chen & F.Y. Liu atinge maior porcentagem de germinação aos 127 DAP (LIAO & CHEN, 2006). *Paphiopedilum*, no entanto, é um gênero de orquídeas de clima temperado (ZENG *et al.*, 2012). Por comparação, espécies de *Disa* – um gênero dos Paleotrópicos – devem ter as cápsulas coletadas entre 35 e 50 DAP para que as melhores taxas de germinação sejam alcançadas (MICHEL, 2002; THOMPSON *et al.*, 2006). A coleta de *E. paranaënsis* foi realizada aos 35 DAP, pois se encontrava visualmente madura, o que coincide com os relatos para orquídeas tropicais.

A maioria das espécies de *Paphiopedilum* apresenta melhor germinação quando as sementes são inoculadas em completa escuridão e posteriormente transferidas para ambiente com fotoperíodo de 16:8 (luz/escuro), embora não necessariamente sejam inibidas pela luz (ZENG *et al.*, 2012; ZENG *et al.*, 2016). Outras orquídeas terrestres de clima temperado, porém, sofreram inibição da germinação quando inoculadas sob

fotoperíodo de 16 h (ARCIDIACONO *et al.*, 2021; DULIĆ *et al.*, 2019; GODO *et al.*, 2010; KAUTH *et al.*, 2008; VAN WAES & DEBERGH, 1986). Entretanto, Dulić *et al.* (2019) relataram que a espécie *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall não só foi capaz de germinar sob fotoperíodo de 16 h, chegando à 87,01% de taxa de germinação, como teve seu desenvolvimento acelerado por essa condição luminosa, produzindo protocormos maiores e percentuais de formação de brotos, rizoides e folhas mais elevados em comparação com a incubação no escuro. É interessante notar que as orquídeas terrestres Neotropicais têm se mostrado “insensíveis à luz”, ou seja, plantas que apresentam taxas de germinação elevadas tanto na luz quanto no escuro (DUTRA *et al.*, 2008). O sucesso de germinação de sementes inoculadas diretamente sob fotoperíodo de 16 h foi observado para as espécies de *Bletia* Ruiz & Pav. (CONRADO-GARCIA *et al.*, 2019; DUTRA *et al.*, 2008; PAIVA NETO *et al.*, 2015; RUBLUO *et al.*, 1989) e *Epidendrum fulgens* Brongn. (FRITSCHÉ *et al.*, 2022). Portanto, a inoculação das sementes no escuro não é necessariamente a regra para a germinação de orquídeas terrestres, sendo relevante considerar o ambiente do qual as espécies são nativas.

No presente trabalho, a cápsula de *E. paranaënsis* permaneceu em completa escuridão e baixa temperatura ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$), por uma semana, antes da inoculação das sementes no meio de cultura. O objetivo desse processo foi retardar a difusão do etileno a fim de prevenir a abertura da cápsula. Métodos semelhantes também foram utilizados por outros autores (ARCIDIACONO *et al.*, 2021; DUTRA *et al.*, 2008; STEWART & KANE, 2006). Sendo assim, em conjunto com a consideração do habitat natural da espécie, as sementes foram cultivadas diretamente sob a luz, em fotoperíodo de 16 h, sem nenhum período adicional de incubação no escuro após inoculação das sementes de *E. paranaënsis* em meio de cultura.

O padrão de germinação das sementes de *E. paranaënsis* é assíncrono, com vários estágios podendo ser observados simultaneamente. O comportamento de germinação assíncrona também foi relatado para as espécies de orquídeas terrestres *Disa nervosa* Lindl. (THOMPSON *et al.*, 2006) e *Dichromanthus aurantiacus* (Lex.) Salazar & Soto Arenas (SANDOVAL REYES *et al.*, 2020) e espécies epífitas como *Acianthera prolifera* (Herb ex. Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase (KOENE *et al.*, 2019), *A. ochreatea* (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase (KOENE *et al.*, 2020) e *Restrepia brachypus* Rchb.f (MILLNER *et al.*, 2008). A germinação assíncrona representa uma estratégia ambiental de sobrevivência à intempéries (THOMPSON *et al.*, 2006), sendo comum em espécies

que habitam ambientes em constante mudança, tais como as copas das árvores e a serrapilheira.

Arcidiacono *et al.* (2021) apontaram que a formação de protocormos – o primeiro passo para a germinação – é promovida essencialmente por fontes de nitrogênio orgânico. Quando formas de nitrogênio inorgânico, tais como sais de amônio e nitratos, estão presentes no meio de germinação, elas precisam ser convertidas em formas de nitrogênio orgânico para serem utilizadas pela planta, de modo que a suplementação com aminoácidos e vitaminas pode viabilizar a aceleração dos processos celulares e, conseqüentemente, tornar mais eficiente o sistema de cultivo *in vitro* (KAUTH *et al.*, 2008; MAJEROWICZ *et al.*, 2000). Ambos os meios de cultura foram suplementados com glutamina 6,8 mM, entretanto a maior taxa de germinação alcançada foi de 50,8%, no meio WPM. Além disso, o meio WPM propiciou desenvolvimento saudável dos protocormos e crescimento mais acelerado em relação às sementes germinadas em MS/2, muitas das quais se tornaram necróticas nos primeiros estágios. Fatores determinantes do meio de cultura para a germinação de espécies são o total de compostos nitrogenados e a proporção amônio/nitrato (KOENE *et al.*, 2019; VUDALA & RIBAS, 2017). No presente experimento, o total de compostos nitrogenados no meio WPM foi de 14,7 mM, enquanto em MS/2 foi de 26,8 mM, embora a proporção amônio/nitrato tenha permanecido semelhante e o aporte de glutamina fosse idêntico. O maior sucesso do meio WPM provavelmente ocorreu devido aos níveis de nitrogênio inorgânico serem reduzidos nessa formulação salina (KOENE *et al.*, 2019; PHILLIPS & GARDA, 2019; SANTOS *et al.*, 2016; VUDALA & RIBAS, 2017), enquanto a concentração de nitrogênio orgânico (L-glutamina) foi proporcionalmente mais alta, apontando para a sensibilidade da espécie às concentrações salinas mais elevadas e preferência de uso de formas orgânicas de nitrogênio. Esse cenário também foi observado para a germinação de *Maxillaria picta* Hook. (sin: *Brasiliorchis picta*) (SANTOS *et al.*, 2016), *Hadrolaelia grandis* (Lindl. & Paxton) Chiron & V. P. Castro (VUDALA & RIBAS, 2017), *Anacamptis longicornu* (Poir.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase e *Ophrys panormitana* (Tod.) Soó (ARCIDIACONO *et al.*, 2021), com maiores taxas de escurecimento e mortalidade ocorrendo em meio MS/2 ou MS. Mead & Bulard (1979) encontraram que *Anacamptis laxiflora* (Lam.) R. M. Bateman, Pridgeon & M. W. Chase (sin: *Orchis laxiflora*) tem melhor desenvolvimento durante os primeiros seis meses em meio ausente de formas de nitrogênio inorgânico e suplementado somente com aminoácidos. Esse resultado também foi obtido por Pereira *et al.* (2015) com a espécie *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) I.M.

Johnst., com a melhor germinação e crescimento das plantas em meio de cultura que continha somente nitrogênio orgânico. Além disso, foi observado que protocormos jovens de *Cattleya* híbrida (RAGHAVAN & TORREY, 1964) e *Anacamptis* (MAGRINI *et al.*, 2011) são incapazes de utilizar nitratos, desenvolvendo a forma ativa da enzima nitrato redutase posteriormente, o que pode ser o caso também de *E. paranaënsis*. A relação das orquídeas terrestres com o aporte de nitrogênio orgânico é um tópico relevante acerca do modo de vida dessas espécies e deve ser explorado em estudos futuros.

As análises anatômicas não revelaram diferenças na estruturação dos tecidos dos protocormos entre os meios de cultura avaliados. Na ausência de danos celulares visíveis, é mais provável que a diferença na taxa de germinação entre os tratamentos seja devido às condições metabólicas dos protocormos, propiciadas pela composição salina de cada meio de cultura, assim como pela disponibilidade de sacarose. Enquanto o nitrogênio é necessário para a produção e manutenção das enzimas de crescimento, controle da absorção de outros nutrientes e uso de carbono, a sacarose suplementada providencia o carbono requisitado para a produção de amido e geração de energia (CAZETTA *et al.*, 1999; SASAMORI *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2006). No cultivo de grãos de trigo imaturos isolados *in vitro*, Zhou *et al.* (2006) relataram que, mantendo a mesma concentração de glutamina no meio de cultura (41,1 mM), o aumento da concentração de sacarose (0 – 351 mM) permitiu que os conteúdos de amilose, amilopectina, amido, açúcares solúveis e sacarose dentro do grão fossem mais elevados. No presente trabalho, foi possível observar que o acúmulo de amido nos tecidos de *E. paranaënsis* já se inicia tão logo o protocormo é formado, já em estágio II, antes da germinação do embrião. Elevada quantidade de grãos de amido também foi observada para a espécie *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth no primeiro estágio de germinação (estágio I – embrião clorofilado entumecido), que corresponde ao estágio II de *E. paranaënsis* (FERREIRA *et al.*, 2018). Dado que as sementes das orquídeas não possuem nenhum tipo de tecido de reserva energética (ARCIDIACONO *et al.*, 2021; DULIĆ *et al.*, 2019; KAUTH *et al.*, 2008; KOENE *et al.*, 2020), esse rápido acúmulo de amido deve ser necessário para que o protocormo consiga romper a testa da semente e progredir para os estágios seguintes. Na orquídea *E. paranaënsis*, esse processo acontece no período de tempo de um a dois meses, até o estágio IV (aparecimento da primeira folha). Depois, quando as raízes tuberosas começam a se desenvolver, o amido é canalizado para a raiz secundária, diante da necessidade de crescimento dessa raiz, enquanto que a raiz primária já desenvolvida tem crescimento mais lento e, portanto, menor necessidade energética. Todos esses

processos são influenciados pelo aporte de carbono ao qual as plantas têm acesso, o que, na natureza, é providenciado pelo fungo parceiro.

Debeljak *et al.* (2002) observaram a formação de raízes tuberosas na germinação da orquídea terrestre *Pterostylis sanguínea* aos 180 dias de cultivo *in vitro*, em meio OMA (*Oat Meal Agar*) simbiótico. Esse resultado foi semelhante ao obtido para *Eltroplectris paranaënsis*, em que protocormos com raízes tuberosas foram registrados aos 180 e 210 dias de cultivo, embora somente em meio de cultura WPM (TABELA 1). O processo de tuberização é afetado por diversos fatores como aporte de nitrogênio e nutrientes, fotoperíodo, temperatura, genótipo, tipo de explante, reguladores de crescimento e concentração de sacarose. Por se tratar de um órgão de reserva energética, concentrações mais elevadas de sacarose no meio de cultura frequentemente contribuem para a melhor formação dos tubérculos e maior acúmulo de biomassa (ASKARI, 2024; MOHAMED & GIRGIS, 2023). Dessa forma, é provável que a concentração de sacarose disponível no meio WPM (20 g.L⁻¹) tenha sido mais vantajosa do que a presente no meio MS/2 (15 g.L⁻¹), no qual a taxa de germinação foi menor e não foram observados protocormos com raízes tuberosas no período de 210 dias da germinação. Em contradição aos resultados desse trabalho, Debeljak *et al.* (2002) relataram que a concentração de sacarose 20 g.L⁻¹ propiciou menor formação de raízes tuberosas em *P. sanguínea* em comparação aos tratamentos de 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹. Os autores atribuíram esse efeito à presença de um fungo em simbiose com *P. sanguínea*, que já estaria providenciando os nutrientes necessários para as plantas. Dessa forma, podemos notar que a amplitude do efeito da suplementação de sacarose na germinação de orquídeas terrestres é muito variável e precisa ser melhor compreendida dentro dos diferentes gêneros da família Orchidaceae.

A grande quantidade de ráfides presentes nos protocormos é provavelmente também um reflexo da composição dos meios de cultura, os quais são ricos em sais de cálcio (3 mM para WPM e 1,5 mM para MS/2). Mayer *et al.* (2008) também relataram a presença de muitos idioblastos com ráfides no meristema fundamental de *Cymbidium* ‘Joy Polis’ cultivado *in vitro* em meio de cultura MS. Essas estruturas são muito comuns em plantas, presentes em todos os tipos de órgãos vegetativos e reprodutivos, e representam uma reserva biológica de cálcio, seja como mecanismo de controle da biodisponibilidade desse mineral nos tecidos ou como forma de descarte do excesso (PAIVA, 2019).

6.2 DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

O crescimento horizontal, paralelo ao substrato, apresentado pelas raízes das plantas de *E. paranaënsis* no ambiente de cultivo *in vitro*, é indicativo da ocupação de um nicho ambiental de solos rasos, na camada de serrapilheira. Muitas espécies de sub-bosque, incluindo herbáceas e sub-arbustos, têm a maior biomassa de raízes no estrato mais raso do solo (WANG *et al.*, 2016). Engels *et al.* (2023) descrevem a espécie como húmica e relatam tê-la encontrado no estrato de sub-bosque da Floresta Nebular, o que é compatível com a morfologia das raízes observadas *in vitro*. Além disso, as raízes de *E. paranaënsis* possuem elevada quantidade de amido estocado em organelas celulares especializadas – os espirantossomos –, o que as caracteriza como órgãos de reserva (SANTOS & SILVA, 2023; STERN *et al.*, 1993). A alta densidade de pelos radiculares possibilita a alta eficiência de absorção de água e nutrientes mesmo que as raízes não explorem o solo com profundidade, o que é comum para espécies que se desenvolvem em camadas superiores de solo devido à alta porosidade do solo. A camada de serrapilheira, na porção mais superficial, é a que apresenta maior aporte de matéria orgânica e nutrientes devido, principalmente, à deposição de folhas das camadas de bosque e dossel. Entretanto, a disponibilidade desses nutrientes é muito breve, o que torna esse ambiente desafiador para as plantas (WANG *et al.*, 2016).

Sabe-se que diversas orquídeas terrestres perdem as folhas durante determinada estação do ano, ficando dormentes por tempo variável antes de lançarem uma nova brotação a partir dos órgãos subterrâneos. No gênero *Eltroplectris*, algumas espécies não apresentam folhas durante o período de florescimento, como *E. longicornu*, *E. cogniauxiana* e *E. pauciflora* (sin: *E. guimaraesii*) (ENGELS & SMIDT, 2025; ROCHA & AFONSO, 2022), o que implica que toda a energia necessária para o florescimento é deslocada dos órgãos subterrâneos, dado que as plantas não estão fotossinteticamente ativas durante esse período. *E. longicornu* e *E. cogniauxiana* são espécies de ambientes secos no Cerrado, enquanto *E. pauciflora* ocorre no sub-bosque das florestas amazônicas de várzea, onde passa um período do ano submersa (ROCHA & AFONSO, 2022). Entretanto, esse não é o caso de *E. paranaënsis*, pois a espécie mantém as folhas durante todo o período de florescimento (ENGELS *et al.*, 2023). Portanto, a presença das raízes tuberosas não está necessariamente associada a um período de dormência das plantas, mas pode representar um mecanismo de sobrevivência às alterações de disponibilidade nutricional e luminosa do ambiente.

Folhas hipoestomáticas, também observadas em *E. paranaënsis*, estão menos sujeitas à desidratação devido à face abaxial receber menos radiação solar e correntes de ar do que a face adaxial, sendo frequentes em orquídeas (ANDREOTA *et al.*, 2015; BONA *et al.*, 2020). Muitas espécies de Orchidaceae exibem mais de uma morfologia estomática na mesma folha, e estudos com orquídeas terrestres Neotropicais relataram as formas mais comumente observadas sendo estômatos anomocíticos, anisocíticos, paracíticos, diacíticos e tetracíticos (ANDREOTA *et al.*, 2015; BONA *et al.*, 2020; CORREDOR & ARIAS, 2012; SANTOS & SILVA, 2023). Portanto, a presença de estômatos ciclocíticos foi observada pela primeira vez na tribo Cranichidae, o que pode ser melhor investigado como um possível caractere diagnóstico.

6.3 DESENVOLVIMENTO DE *Eltroplectris paranaënsis* SOB SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA

As plantas de *E. paranaënsis* conseguem se desenvolver de forma saudável no meio de cultura WPM sem suplementação de outros compostos, indicando que as plantas germinadas assimbioticamente são capazes de utilizar fontes de nitrogênio inorgânico, como sais de amônio e nitrato, conforme os tecidos maturam. Entretanto, a presença da glutamina teve efeitos positivos no crescimento das plantas. A glutamina é um dos aminoácidos mais abundantes em tecidos vegetais, sendo um substrato importante para a biossíntese de outros compostos nitrogenados necessários ao desenvolvimento da planta. Além disso, ela afeta o transporte de íons amônio e nitrato transmembrana e está envolvida com a sinalização de nitrogênio a longa distância, além de determinar o estabelecimento de órgãos-dreno e promover a atividade de várias enzimas do metabolismo de carbono (CAZZETA *et al.*, 1999; KAN *et al.*, 2015). Embora não tenha sido apontada diferença estatística entre os tratamentos de glutamina (6,8 mM e 13,6 mM), as plantas alcançaram as maiores alturas (média = 2,13 cm) e comprimentos de folha mais longos (média = 4,18 cm) no tratamento de 13,6 mM, sendo nesse sentido benéfica para as mudas *in vitro*. O desenvolvimento de uma parte aérea bem estruturada é fundamental para a sobrevivência das plantas por ser a região fotossinteticamente ativa, o que é especialmente importante para o sucesso no processo de transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. De modo semelhante, o progresso do cilindro vascular e acúmulo de amido nos órgãos de reserva, demonstra que o aporte nutricional promovido pela suplementação de glutamina pôde suprir as necessidades energéticas das plantas de modo

mais eficiente, pois além de crescerem vegetativamente, as plantas ainda puderam armazenar nutrientes.

Os efeitos da maior disponibilidade de nitrogênio orgânico sobre as culturas *in vitro* têm sido explorados por diversos autores em diferentes famílias botânicas. Samiei *et al.* (2021) relataram que o uso de ácido glutâmico no cultivo *in vitro* de *Rosa canina* L. promoveu a regeneração e o alongamento de brotos a partir de gemas laterais em todas as concentrações testadas, que variaram de 2 à 12 mg.L⁻¹ (13,6 à 81,6 µM). A taxa de regeneração de explantes foliares de abacaxi foi estimulada pela suplementação de 8 mM de glutamina no meio de cultura, o que indicaria, segundo Hamasaki *et al.* (2005), que esse aminoácido poderia estimular a competência celular para a organogênese *in vitro* do abacaxi. Entretanto, os autores também observaram efeito deletério da glutamina nas concentrações mais elevadas (16 e 32 mM), com todas as culturas morrendo após 30 dias na concentração de 32 mM. Müller *et al.* (2020) também reportaram impactos negativos da aplicação de glutamina em qualquer concentração acima de 15 mM durante a fertilização de bromélias da espécie *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker. Em Orchidaceae, Majerowicz *et al.* (2000) observaram que plantas de *Catasetum fimbriatum* cultivadas com suplementação de 6 mM de glutamina tiveram maior acúmulo de biomassa, em relação às plantas sem acesso à glutamina, chegando a apresentarem até 63% a mais de massa seca. O comprimento do broto também foi estimulado pela glutamina, e os autores apontam que o nitrogênio orgânico, juntamente com íons amônio, é uma das principais fontes nutricionais de *C. fimbriatum*, uma espécie “epífita com perfil húmico” (MAJEROWICZ *et al.*, 2000). *E. paranaënsis* é uma planta húmica (ENGELS *et al.*, 2023) que, habitando a camada de serrapilheira, tem acesso aos compostos orgânicos oriundos da degradação das folhas do dossel, e provavelmente está adaptada à crescer em condições de maior aporte de nitrogênio orgânico. Com base na revisão de literatura, podemos concluir que as concentrações testadas no presente experimento (6,8 mM e 13,6 mM) estão dentro da faixa de segurança em que a glutamina tem efeitos sistêmicos benéficos, e concentrações mais elevadas provavelmente também teriam sido deletérias para *E. paranaënsis*.

Em relação ao acúmulo de pigmentos fotossintetizantes, era esperado que a glutamina propiciasse aumento dos teores de clorofilas por ser o principal precursor dessas moléculas (TAIZ *et al.*, 2017). Estudos com a fertilização foliar de manjeriço (*Ocimum basilicum* L., Lamiaceae) demonstraram que a aplicação de 2,4 mM de glutamina propiciou o maior acúmulo de clorofilas *a* e *b*, em relação ao controle e demais

testes, também sendo benéfico para a produção de carotenoides (NOROOZLO *et al.*, 2019a). Para o alface (*Latuca sativa* L., Asteraceae), o uso de 6,8 mM de glutamina ou a combinação 1,2 mM glutamina + 1,2 mM glicina foram as melhores suplementações de aminoácidos no acúmulo de pigmentos foliares (NOROOZLO *et al.*, 2019b). Além disso, aminoácidos livres podem atuar na proteção contra oxidação e na prevenção da degradação de moléculas acessórias (como clorofilas), conseqüentemente prolongando a vida celular e promovendo maior tolerância a condições de estresse ambiental (NOROOZLO *et al.*, 2019b).

7 CONCLUSÕES

Esse trabalho relata os primeiros resultados de germinação *in vitro* para o gênero *Eltroplectris*. A espécie *E. paranaënsis* aparenta ser sensível à salinidade, se desenvolvendo melhor em meio de cultura menos salino. Um acúmulo rápido de amido, observado nos protocormos logo nos primeiros estágios, é provavelmente um requisito para que o embrião consiga romper a testa da semente e avançar para os estágios seguintes. O velame já se desenvolve nos protocormos, nos estágios V e VI, e atinge a maturidade cerca de dez meses após a germinação, quando o espessamento de parede celular é estimulado. A caracterização da germinação de *E. paranaënsis* agrega conhecimento acerca do desenvolvimento e morfologia desse gênero de orquídeas ainda negligenciado pela ciência, e pode ser utilizada em estudos futuros com espécies próximas. A germinação de orquídeas terrestres Neotropicais pode não ter os mesmos requerimentos que a de orquídeas de clima temperado, e mais estudos quanto às suas necessidades luminosas e nutricionais devem ser realizados, principalmente sobre a relação dessas orquídeas com a disponibilidade de nitrogênio orgânico no ambiente.

Eltroplectris paranaënsis é uma planta responsiva à aplicação de glutamina exógena, desde sua germinação até o desenvolvimento de fase pré-adulta. O sistema de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM se revelou apropriado para o crescimento da espécie e realização de análises a seu respeito. Devido à ausência de diferença estatística entre os tratamentos de glutamina 6,8 e 13,6 mM, em todos os parâmetros morfo-fisiológicos avaliados, é recomendada a suplementação de 6,8 mM aos sais e vitaminas WPM, por ser suficiente para a obtenção de respostas positivas de crescimento.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTA, R. C.; BARROS, F.; SAJO, M. G. Root and leaf anatomy of some terrestrial representatives of the Cranichidae tribe (Orchidaceae), **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 367-378, 2015.
- ANJOS, J. S.; STEFANELLO, C. A.; VIEIRA, L. N.; POLES, L. G.; GUERRA, M. P.; FRAGA, H. P. F. The cytokinin 6-Benzilaminopurine improves the formation and development of *Dryadella zebrina* (Orchidaceae) *in vitro* shoots, **Brazilian Journal of Botany**, v. 44, p. 811-819, 2021.
- ARCIDIACONO, M.; CATALANO, C.; MOTISI, A.; SAJEVA, M.; CARIMI, F.; CARRA, A. Influence of culture conditions on *in vitro* asymbiotic germination of *Anacamptis longicornu* and *Ophrys panormitana* (Orchidaceae), **Plants**, v. 10, e2543, 2021.
- ASKARI, N. Evaluation of sucrose benefits to tuberization in ‘Sante’ potato cultivar *in vitro*, **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 11, n. 4, p. 437-444, 2024.
- BONA, C.; ENGELS, M. E.; PIECZAK, F. S.; SMIDT, E. C. Comparative vegetative anatomy of Neotropical Goodyerinae Klotzsch (Orchidaceae Juss.: Orchidoideae Lindl.), **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, n. 3, p. 530-539, 2020.
- CAZETTA, J. O.; SEEBAUER, J. R.; BELOW, F. E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels, **Annals of Botany**, v. 84, n. 6, p. 747-754, 1999.
- CONRADO-GARCIA, D.; CANO-SOSA, J.; NORIEGA-TREJO, R.; GONGORACHIN, R.; RAMOS-DIAZ, A. L. Establishment of a protocol of asymbiotic germination of *Bletia purpurea* (Lam.) A. DC., **Journal of Bioengineering and Biomedicine Research**, v. 3, n. 1, p. 6-11, 2019.
- CORREDOR, B. A. D.; ARIAS, R. L. Morfoanatomía en Cranichideae (Orchidaceae) de la estación Loma Redonda del Parque Nacional “Sierra Nevada”, Mérida, Venezuela, **Lankesteriana**, v. 12, n. 1, p. 61-75, 2012.
- DEBELJAK, N.; REGVAR, M.; DIXON, K. W.; SIVASITHAMPARAM, K. Induction of tuberisation *in vitro* with jasmonic acid and sucrose in an Australian terrestrial orchid, *Pterostylis sanguinea*, **Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 253-260, 2002.
- DIANTINA, S., KARTIKANINGRUM, S., MCCORMIK, A.C., MILLNER, J., MCGILL, C., PRITCHARD, H.W., NADARAJAN, J. Comparative *in vitro* seed germination and seedling development in tropical and temperate epiphytic and temperate terrestrial orchids, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 143, n. 3, p. 619-633, 2020.
- DULIĆ, J.; LJUBOJEVIĆ, M.; OGNJANOV, V.; BARAĆ, G.; DULIĆ, T. *In vitro* germination and seedling development of two European orchid species, *Himantoglossum jankae* Somlyay, Kreutz & Óvári and *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall., **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 55, p. 380-391, 2019.
- DUTRA, D.; JOHNSON, T. R.; KAUTH, P. J.; STEWART, S. L.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. 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.

- ENGELS, M. E.; SILVA-PEREIRA, V.; SMIDT, E. C. *Eltroplectris paranaënsis*: a new species of Spiranthinae (Orchidaceae) from the nebular Atlantic Rain Florest, **Phytotaxa**, v. 609, n. 2, p. 115-123, 2023.
- ENGELS, M. E.; SMIDT, E. C. Notes of taxonomy and nomenclature of *Pelexia pauciflora* (Orchidaceae) in ENGELS, M. E. Estudos taxonômicos da subtribo Goodyerinae (Orchidaceae: Orchidoideae) no Brasil. Tese (Doutorado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2025.
- FERREIRA, W. M.; OLIVEIRA, S. P.; SUZUKI, R. M.; SILVA, K. L. F.; SOARES JÚNIOR, J. W. P. Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*, **Rodriguésia**, v. 69, n. 4, p. 2137-2151, 2018.
- FRITSCH, 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.
- GODO, T.; KOMORI, M.; NAKAOKI, E.; YUKAWA, T.; MIYOSHI, K. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*, **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 323-328, 2010.
- HAMASAKI, R. M.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*, **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 4, pp. 383-389, 2005.
- HAN, M.; XU, M.; WANG, S.; WU, L.; SUN, S.; SU, T. Effects of exogenous L-Glutamine as a sole nitrogen source on physiological characteristics and nitrogen use efficiency of poplar, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 172, p. 1-13, 2022.
- HAROUN, S. A.; SHUKRY, W. M.; EL-SAWY, O. Effect of asparagine or glutamine on growth and metabolic changes in *Phaseolus vulgaris* under *in vitro* conditions, **Bioscience Research**, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2010.
- HENRICH, J. E.; STIMART, D. P.; ASCHER, P. D. Terrestrial orchid seed germination *in vitro* on a defined medium, **Journal of the American Society of Horticultural Sciences**, v. 106, n. 2, p. 193-196, 1981.
- HERR, J. M. New uses for calcium chloride solution as mounting medium, **Biotechnic & Histochemistry**, v. 67, n. 1, p. 9-13, 1992.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**, McGraw-Hill Publishing Company, London, UK, 1940.
- KAN, C. C.; CHUNG, T. Y.; JUO, Y. A.; HSIEH, M. H. Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots, **BMC Genomics**, v. 16, 731, 2015.
- KAUTH, P. J.; DUTRA, D.; JOHNSON, T. R.; STEWART, S. L.; KANE, M. E.; VENDRAME, W. Chapter 38: Techniques and Applications of *In Vitro* Orchid Seed Germination in Floriculture, **Ornamental and Plant Biotechnology**, Volume V, Global Science Books, UK, p. 375-391, 2008.
- KOENE, F. M.; AMANO, E.; 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.

- KOENE, F. M.; AMANO, E.; SMIDT, E. C.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic germination and morphological studies of seeds of Atlantic Rainforest micro-orchids (Pleurothallidinae), **PLoS ONE**, v. 15, n° 12, e0243297, 2020.
- KRAUS, J. E.; SOUSA, H. C.; REZENDE, M. H.; CASTRO, N. M.; VECCHI, C.; LUQUE, R. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials, **Biotechnic & Histochemistry**, v. 73, n. 5, p. 235-243, 1998.
- LIAO, Y. Z.; CHEN, J. J. **Asymbiotic seed germination of *Paphiopedilum* in *Paphiopedilum* in Taiwan IV**, editora Taiwan *Paphiopedilum* Society, Taiwan, 2006.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, **Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society**, v. 30, n. 5, p. 421-427, 1980.
- LO, S.F., NALAWADE, S.M., KUO, C.L., CHEN, C.L., TSAY, H.S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid, **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 528-535, 2004.
- LONG, B.; NIEMIERA, A. X.; CHENG, Z.; LONG, C. *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae), **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 101, p. 151-162, 2010.
- MAGRINI, S.; DE CARLI, A.; ONOFRI, S.; SCOPPOLA, A. A comparative study of the seed germination capabilities of *Anacamptis palustris* (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid, and other more common *Anacamptis* species, by asymbiotic culture *in vitro*, **European Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 71-79, 2011.
- MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G. B.; NIEVOLA, C. C.; SUZUKI, R. M. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources, **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 195-206, 2000.
- MANTOVANI, C.; PRADO, R. M.; PIVETTA, K. F. L. Impact of nitrate and ammonium ratio on nutrition and growth of two epiphytic orchids, **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, n. 4, p. 3423-3431, 2018.
- 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**, v. 22, n. 2, p. 323-332, 2008.
- MEAD, J. W.; BULARD, C. Vitamins and Nitrogen requirements of *Orchis laxiflora*, **New Phytologist**, v. 83, p. 129-136, 1979.
- MELO FERREIRA, W.; VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. C. N.; OLIVEIRA, H. R.; SUZUKI, R. M. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators, **Iheringia, Série Botânica**, v. 72, n. 1, p. 57-65, 2017.
- MICHEL, E. E. Asymbiotic propagation of tropical terrestrial orchid species *in vitro*, CLARK, J.; ELLIOT, W. M.; TINGLEY, G.; BIRO, J. (eds) **Proceedings of the 16th World Orchid Conference**, Vancouver Orchid Society, Vancouver, Canada, 2002.

- MILLNER, H. J.; OBENG, A.; MCCREA, A. R.; BALDWIN, T. C. Axenic seed germination and *in vitro* seedling development of *Restrepia brachypus* (Orchidaceae), **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 135 (4), p. 497-505, 2008.
- MOHAMED, A. E.; GIRGIS, N. D. Factors affecting *in vitro* tuberization of potato, **Bulletin of the National Research Centre**, v. 47, n. 80, 2023.
- MÜLLER, D. B.; KANASHIRO, S.; JOCYS, T.; TAVARES, A. R. Nitrogen uptake by ornamental bromeliad during atmospheric and tank developmental stages, **IDESIA (Chile)**, v. 38, n. 1, p. 105-111, 2020.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NOROOZLO, Y. A.; SOURI, M. K.; DELSHAD, M. Effects of foliar application of glycine and glutamine amino acids on growth and quality of sweet basil, **Advances in Horticultural Science**, v. 33, n. 4, p. 495-501, 2019a.
- NOROOZLO, Y. A.; SOURI, M. K.; DELSHAD, M. Stimulation effects of foliar applied glycine and glutamine amino acids on lettuce growth, **Open Agriculture**, v. 4, p. 164-172, 2019b.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O, **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 367-373, 1964.
- PAIVA, E. A. S. Are calcium oxalate crystals a dynamic calcium store in plants? **New Phytologist**, v. 223, p. 1707-1711, 2019.
- PAIVA NETO, V. B.; CORREA, A. P. M.; BARROS, F.; PADILHA, D. R. C.; BORGES, M. C. R. Z. The *Bletia catenulata* ornamental orchid is self-compatible but pollinator-dependent for reproduction, **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, p. 473-479, 2015.
- PEREIRA, G.; ALBORNOZ, V.; MUÑOZ-TAPIA, L.; ROMERO, C.; ATALA, C. Asymbiotic germination of *Bipinnula fimbriata* (Orchidaceae) seeds in different culture media, **Seed Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 1-11, 2015.
- PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: An overview, **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 55, p. 242-257, 2019.
- PHILLIPS, R. D.; BARRETT, M. D.; DIXON, K. W.; HOPPER, S. D. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? **Journal of Ecology**, v. 99, p. 858-869, 2011a.
- PHILLIPS, R. D.; BROWN, A. P.; DIXON, K. W.; HOPPER, S. D. Orchid biogeography and factors associated with rarity in a biodiversity hotspot, the Southwest Australian Floristic Region, **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 3, p. 487-501, 2011b.
- R Core Team (v. 4.3.1). R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023.
- RAGHAVAN, V.; TORREY, J. G. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid *Cattleya*, **American Journal of Botany**, v. 51, n. 3, p. 264-274, 1964.
- RASMUSSEN, H. N.; DIXON, K. W.; JERSÁKOVÁ, J.; TĚŠITELOVÁ, T. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements, **Annals of Botany**, v. 116, p. 391-402, 2015.

- RASMUSSEN, H. N.; WHIGHAM, D. F. Seed ecology of dust seeds *in situ*: A new study technique and its application in terrestrial orchids, **American Journal of Botany**, v. 80, n. 12, p. 1374-1378, 1993.
- ROCHA, A. E. S.; AFONSO, E. L. *Eltroplectris guimaraesii* (Spiranthinae, Orchidoideae, Orchidaceae), nova espécie para a Amazônia brasileira, **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 17, n. 2, p. 283-288, 2022.
- RUBLUO, A.; CHÁVEZ, V.; MARTÍNEZ, A. *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat, **Lindleyana**, v. 4, n. 2, p. 68-73, 1989.
- SALAZAR, G. A.; BATISTA, J. A. N.; CABRERA, L. I.; VAN DEN BERG, C.; WHITTEN, W. M.; SMIDT, E. C.; BUZATTO, C. R.; SINGER, R. B.; GERLACH, G.; JIMÉNEZ-MACHORRO, R.; RADINS, J. A.; INSAURRALDE, I. S.; GUIMARÃES, L. R. S.; BARROS, F.; TOBAR, F.; LINARES, J. L.; MÚJICA, E.; DRESSLER, R. L.; BLANCO, M. A.; HÁGSATER, E.; CHASE, M. W. Phylogenetic systematics of subtribe Spiranthinae (Orchidaceae: Orchidoideae: Cranichideae) based on nuclear and plastid DNA sequences of a nearly complete generic sample, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 186, p. 273-303, 2018.
- SAMIEI, L.; PAHNEHKOLAYI, M. D.; TEHRANIFAR, A.; KARIMIAN, Z. Organic and inorganic elicitors enhance *in vitro* regeneration of *Rosa canina*, **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 60, 2021.
- SANDOVAL REYES, J. B.; AGUILAR MORALES, M. A.; de la CRUZ OLVERA, A.; LAGUNA CERDA, A.; CRUZ MONTERROSA, R. G.; DIAZ RAMÍREZ, M.; JIMÉNEZ GUZMÁN, J.; GARCÍA GARIBAY, M.; MARTÍNEZ GARCÍA, C. G.; RAYAS AMOR, A. A. Seed analysis of *Dichromanthus aurantiacus*, terrestrial orchid from Toluca Valley, Mexico, **Agroproductividad**, v. 13, n. 10, p. 113-118, 2020.
- SANTOS, I. S.; SILVA, M. J. Anatomy and histochemistry of the vegetative system of *Brachystele guayanensis* (Lindl.) Schltr. (Orchidaceae), a potential medicinal species, **Plants**, v. 12, 2635, 2023.
- SANTOS, S. A.; SMIDT, E. C.; PADIAL, A. A.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Brasiliorchis picta*, **African Journal of Biotechnology**, v. 15, nº 6, p. 134-144, 2016.
- SASAMORI, M. H.; ENDRES-JÚNIOR, D.; DROSTE, A. Asymbiotic culture of *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae): the influence of macronutrient salts and sucrose concentrations on survival and development of plantlets, **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, n. 3, p. 292-298, 2015.
- STERN, W. L.; ALDRICH, H. C.; McDOWELL, L. M.; MORRIS, M. W.; PRIDGEON, A. M. Amyloplasts from the cortical root cells of Spiranthoideae (Orchidaceae), **Protoplasma**, v. 172, p. 49-55, 1993.
- STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 147-158, 2006.
- SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction, **Annals of Botany**, v. 104, p. 543-556, 2009.

SWARTS, N. D.; SINCLAIR, E. A.; FRANCIS, A.; DIXON, K. W. Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid, **Molecular Biology**, v. 19, p. 3226-3242, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**, 6ª edição, editora Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2017.

THOMPSON, D. I.; EDWARDS, T. J.; van STADEN, J. Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability *in vitro*: relationships, requirements and first-time records, **Plant Growth Regulation**, v. 49, p. 269-284, 2006.

UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S. Organic Compounds: Contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids, **International Journal of Agronomy**, e2795108, 2020.

VAN WAES, J. M.; DEBERGH, P. C. *In vitro* germination of some Western European orchids, **Physiologia Plantarum**, v. 67, p. 253-261, 1986.

VUDALA, S. M.; RIBAS, L. L. F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae), **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 1-8, 2017.

WANG, W.; WU, X.; HU, K.; LIU, J.; TAO, J. Understorey fine root mass and morphology in the litter and upper soil layers of three Chinese subtropical forests, **Plant Soil**, v. 406, p. 219-230, 2016.

ZENG, S.; HUANG, W.; WU, K.; ZHANG, J.; SILVA, J. A. T.; DUAN, J. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids, **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 521-534, 2016.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T.; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid, **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 198-209, 2012.

ZHOU, Q.; JIANG, D.; DAI, T.; JING, Q.; CAO, W. Regulation of starch and protein synthesis in wheat grains by feeding sucrose and glutamine to detached ears cultured *in vitro*, **Plant Growth Regulation**, v. 48, p. 247-259, 2006.

CAPÍTULO II – EFEITOS DA GLUTAMINA E DA VENTILAÇÃO NATURAL SOBRE A FOTOSSÍNTESE DE *ELTROPECTRIS PARANAËNSIS* CULTIVADA *IN VITRO* E ACLIMATIZADA

RESUMO

Estudos sobre a fotossíntese nos organismos vegetais permitem compreender as formas como as espécies se relacionam com o ambiente. A expressão de boa capacidade fotossintética é fundamental para o sucesso da aclimatização, etapa final da produção de mudas micropropagadas. Em conjunto com a avaliação do crescimento, as plantas de *E. paranaënsis* foram submetidas à análise de gases e fluorescência da clorofila em dois momentos: 1) Após 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de glutamina e presença ou ausência de ventilação natural (VN); 2) Após seis meses de cultivo *ex vitro* em casa de vegetação. A glutamina influenciou positivamente o comprimento foliar e número de raízes; entretanto, a VN foi prejudicial para a formação das raízes, com várias ocorrências de interrupção do desenvolvimento das raízes. Sob VN, foi observado aumento de F_0 e queda de F_v/F_m , o que indica danos causados ao Fotossistema II. Os parâmetros de dispersão de energia (NPQ e $Y(NPQ)$) também foram reduzidos em VN. Esses frascos apresentam menor umidade relativa, o que pode induzir estresse osmótico e danificar a maquinaria fotossintética. Os resultados também apontaram para uma falha na rota de dispersão de energia, o que pode estar relacionado com insuficiência na produção de carotenoides. Os resultados sugerem que *E. paranaënsis* é sensível à baixa umidade ambiental, e, portanto, o uso de frascos vedados é recomendável para seu cultivo. Em relação aos pigmentos fotossintetizantes, somente o teor de clorofila *a* foi estimulado pela glutamina. Na aclimatização, as plantas demonstraram elevada plasticidade fisiológica, pois todos os parâmetros da fotossíntese ficaram semelhantes entre as plantas oriundas dos diferentes tratamentos. A transpiração e condutância estomática de todas as plantas foi igual a zero, indicando que os estômatos permaneceram fechados durante o período de análise. Dessa forma, conclui-se que *E. paranaënsis* provavelmente realiza fotossíntese CAM, e novos estudos devem ser realizados para averiguar o comportamento fotossintético da espécie. Por fim, várias plantas entraram em florescimento, e cápsulas se desenvolveram corretamente. Sendo assim, esse trabalho descreveu também o ciclo de vida de *Eltroplectris paranaënsis*.

8 INTRODUÇÃO

A fotossíntese é um dos processos mais importantes para a vida na Terra, pois é através dela que a energia solar é captada e utilizada como força motriz para a fixação do carbono e consequente produção de compostos orgânicos. Além de fornecer o alimento para os seres heterotróficos e impulsionar sua diversificação, o processo fotossintético das plantas modificou o clima do planeta em diversos momentos históricos (TAIZ *et al.*, 2017).

Os organismos vegetais podem realizar fotossíntese de acordo com três sistemas principais: C3, a rota fotossintética mais basal, utilizada pela maioria das plantas, no mundo inteiro; C4, uma modificação surgida na linhagem das gramíneas e intrinsecamente associada com alterações na morfologia foliar (anatomia Kranz) para maximização da eficiência de interceptação de CO₂ pela RuBisCO; e CAM, ou Metabolismo Ácido Crassuláceo, um sistema de captação de CO₂ que surgiu em várias linhagens distintas, sendo utilizado por cerca de 33 famílias botânicas distintas (ASHRAF & HARRIS, 2013; HERRERA, 2009). Desses, a fotossíntese CAM apresenta a melhor eficiência de uso da água, uma vez que nesse sistema os estômatos são abertos somente no período de escuro, quando a evapotranspiração é menor, possibilitando que a assimilação de CO₂ ocorra com o mínimo de perda de água (ASHRAF & HARRIS, 2013; HERRERA, 2009). Esse sistema permitiu que muitas plantas CAM colonizassem ambientes de baixa disponibilidade de água, como terrenos áridos e copas de árvores. Na linhagem evolutiva das orquídeas, a fotossíntese C3 representa o estado ancestral, porém todos os sistemas fotossintéticos são realizados na família (ORLOV *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2018). Nenhum desses sistemas é fixo, com diversas plantas exibindo a capacidade de alternar entre C3 e CAM de acordo com as pressões ambientais, em uma expressão de plasticidade fisiológica (HERRERA, 2009; LÜTTGE, 2010; ZHANG *et al.*, 2018). Muitas orquídeas epífitas apresentam o metabolismo CAM como mais uma forma de regulação da disponibilidade e perda de água, uma adaptação fisiológica geralmente aliada a características morfológicas como velame em várias camadas, pseudobulbos e folhas espessas (ZHANG *et al.*, 2018). Nas terrestres, o metabolismo CAM também pode estar presente (BONE *et al.*, 2015; ORLOV *et al.*, 2022), mesmo que essas plantas geralmente tenham velame mais simplificado e não apresentem pseudobulbos.

Uma forma de estudar a fotossíntese nas plantas é a medição de parâmetros associados à fluorescência da clorofila *a* e à troca gasosa dos tecidos vegetais. Além de

serem não-destrutivos, esses métodos possibilitam análises qualitativas e quantitativas acerca da captação e transferência de energia luminosa pelo Fotossistema II (PSII), funcionamento da cadeia de elétrons, dissipação da energia pelas rotas fotoquímica e não-fotoquímica, captação de CO₂ e abertura do poro estomático, entre outras. O monitoramento de tais parâmetros pode revelar situações de estresse e de mau funcionamento do aparato fotossintético, sendo útil na investigação da adaptação das plantas ao seu ambiente (AZEVEDO NETO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2017).

As orquídeas são plantas de crescimento lento, geralmente apresentando baixo potencial fotossintético, e, embora esforços tenham sido feitos para compreender as relações dessas plantas com a disponibilidade de água e nutrientes nos ambientes naturais em que ocorrem, pouco se sabe sobre como essas relações são alteradas no ambiente de cultivo *in vitro*. A elevada concentração mineral dos meios de cultura, a baixa difusão de gases dentro dos frascos e baixa luminosidade nas salas de cultivo (por comparação com a luz solar no ambiente natural) impõem sobre as culturas *in vitro* a necessidade de adaptação diante de possível toxicidade mineral, estresse osmótico e oxidativo (DESJARDINS *et al.*, 2009). Quando submetidas à estresse – seja esse osmótico ou salino – as plantas se adaptam exibindo uma série de alterações nos seus metabolismos e padrões de crescimento, o que geralmente se manifesta na expressão diferencial de genes associados à produção e acúmulo de proteínas específicas e moléculas antioxidantes, redução do volume citosólico e vacuolar, crescimento reduzido e diminuição das taxas de fotossíntese (BARTELS & SUNKAR, 2005). Esse é um ponto que necessita ser explorado, dado que toda a produção de mudas de orquídeas é realizada por germinação e multiplicação *in vitro*.

Avanços expressivos foram feitos quanto à otimização da composição nutricional dos meios de cultura, visando índices de germinação mais elevados e aumento da eficiência de formação de estruturas semelhantes à protocormos (PLB, *protocorm-like bodies*) e brotações (ZOBAYED, 2005). No entanto, os demais aspectos do cultivo *in vitro* também precisam ser explorados para que os desafios da lenta taxa de crescimento, indução de estresse e baixa atividade fotossintética sejam compreendidos e superados (ZHANG *et al.*, 2018). Um desses aspectos diz respeito à atmosfera gasosa à qual as plantas são submetidas.

A atmosfera gasosa dos frascos *in vitro* é um aspecto do cultivo que também deve ser levado em consideração. Em sistemas convencionais, a elevada umidade relativa do ar, baixa difusão dos gases, e acúmulo de etileno são fatores que podem impactar

negativamente o crescimento das plantas (FORTINI *et al.*, 2021; IVANOVA & VAN STADEN, 2010; MARTINS *et al.*, 2015). Foi demonstrado que, durante o fotoperíodo, a concentração de CO₂ é demasiado baixa para suprir as necessidades funcionais das plantas *in vitro*, o que resulta em “taxas negativas” de fotossíntese. Entretanto, as plantas continuam a crescer utilizando o carbono do meio de cultura – geralmente presente na forma de sacarose – para compensar a baixa fixação atmosférica (FORTINI *et al.*, 2021; MARTINS *et al.*, 2015). A desvantagem desse cenário fotomixotrófico é que, frequentemente, as plantas são acometidas de deformidades morfofisiológicas como controle deficiente da abertura e fechamento estomático, hiperhidricidade, baixa, ou inexistente, atividade fotossintética e degradação acelerada de pigmentos fotossintetizantes (DESJARDINS *et al.*, 2009; LUCCHESINI *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2018). Mesmo assim, a presença da sacarose é importante para maior garantia de sucesso no estabelecimento das culturas *ex vitro*, principalmente quanto ao enraizamento (LUCCHESINI *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2015). Além disso, o acúmulo de carboidratos – especialmente sacarose – nos tecidos aparenta estar conectado com a tolerância à desidratação, agindo como um composto de regulação osmótica e estabilização de membranas (BARTELS & SUNKAR, 2005; SINGH *et al.*, 2015). Portanto, apenas permitir a ventilação natural em um frasco *in vitro*, de modo a igualar a atmosfera interna e externa ao frasco, pode ser um método simples, porém eficiente, para minimizar os problemas sobre a morfofisiologia das plantas cultivadas (MARTINS *et al.*, 2015; ZOBAYED, 2005).

A última etapa do processo de produção de mudas *in vitro* é a aclimatização, na qual as plantas produzidas são retiradas do ambiente *in vitro* e transplantadas, geralmente, para estufas ou casas de vegetação. Segundo Jolman *et al.* (2022), menos da metade dos trabalhos sobre a germinação *in vitro* de orquídeas relatam procedimentos de aclimatização com recuperação de plantas adultas. Desses, poucos trazem espécies da subfamília Orchidoideae, indicando um possível maior desafio na aclimatização de orquídeas desse grupo, o que precisa ser desvendado. Esse primeiro contato com o ambiente *ex vitro* pode ser muito desafiador para as plantas, pois agora estarão sujeitas à variações de temperatura, menor disponibilidade de nutrientes e menor umidade ambiental (SOARES *et al.*, 2012; ZENG *et al.*, 2012). Por essa razão, é imperativo acompanhar não só a sobrevivência das plantas ao longo dos meses, mas também seu o progresso de crescimento em termos de parâmetros morfológicos chave e capacidade

fotossintética das plantas, de modo a aumentar a garantia de sobrevivência dessas plantas na reintrodução ao ambiente natural.

No presente trabalho, foram investigados os efeitos da glutamina e da ventilação natural sobre a morfologia e estado fisiológico das plantas de *Eltroplectris paranaënsis*, desde o cultivo *in vitro* até a fase de aclimatização, a fim de elucidar as respostas de crescimento e adaptação das plantas diante da disponibilidade de nitrogênio orgânico e CO₂ atmosférico, assim garantindo maior sucesso na reintrodução dessa espécie ameaçada ao seu local de origem.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 CULTIVO *IN VITRO* DE *Eltroplectris paranaënsis* EM CONDIÇÕES DE GLUTAMINA E VENTILAÇÃO NATURAL

Plantas *in vitro* de *E. paranaënsis* foram transferidas para frascos de vidro (13 cm de altura por 5,8 cm de diâmetro) contendo 30 mL de meio de cultura WPM suplementado com sacarose 20 g.L⁻¹ e duas concentrações de glutamina (6,8 e 13,6 mM), além de um tratamento controle sem glutamina. Metade dos frascos de cada tratamento consistiu em frascos com tampas que permitiam trocas gasosas (ventilação natural). Os frascos com ventilação natural possuíam tampa plástica semitransparente perfurada, com uma membrana de filtro de ar autoadesiva de PTFE com 20 mm de diâmetro. Foram utilizados 10 frascos com tampa perfurada e 10 frascos com vedação completa para cada tratamento de suplementação de glutamina, sendo cada frasco com três plantas. O meio de cultura foi renovado após 30 dias. As plantas foram cultivadas em sala de crescimento com temperatura constante de 25±2°C e fotoperíodo de 16:8 (luz/escuro), iluminado por lâmpadas LED brancas (40 µmol m⁻² s⁻¹), e umidade relativa do ar de 56%. O experimento teve delineamento inteiramente casualizado em fatorial 3x2. Após 60 dias, os parâmetros morfológicos (número de raízes e folhas, comprimento da maior raiz e da maior folha e altura do meristema caulinar), as taxas de sobrevivência e de danos visíveis nos tecidos (escurecimento) foram avaliados.

9.2 ANÁLISE DE GASES E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EM PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* CULTIVADAS *IN VITRO*

Após 60 dias de cultivo *in vitro* em condições de suplementação de glutamina e ventilação natural (fatorial 3x2), foram selecionadas ao acaso 15 plantas de *E. paranaënsis* oriundas de cada tratamento (conforme descrito anteriormente) para análise em IRGA (*Infra Red Gas Analyzer*) e fluorescência da clorofila *a*, com o equipamento GFS-3000 Portable Photosynthesis System (Walz Mess-und Regeltechnik, Germany). As plantas foram submetidas a condições de completa escuridão por 15 minutos antes da análise. Durante o procedimento, foi utilizada iluminação actínica de 60 µmol m⁻² s⁻¹ e irradiância de 7000 µmol m⁻² s⁻¹ no pulso luminoso. Os parâmetros considerados foram a condutância estomática (GS), a taxa de transpiração (E), a fluorescência basal (F0), o

rendimento quântico máximo do Fotossistema II (Fv/Fm), o rendimento quântico eficaz do Fotossistema II (*Yield*), a taxa de transporte de elétrons (ETR), os coeficientes de *quenching* fotoquímico (qP) e não-fotoquímico (NPQ), além do rendimento quântico de dissipação de energia regulada (Y(NPQ)). Os dados foram utilizados em análises estatísticas em ambiente de linguagem R (R Core Team, 2023) e submetidos à Análise de Variância (*Two-way* ANOVA). O Teste de Tukey *post hoc* foi aplicado quando apropriado.

9.3 ANÁLISE DOS TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES

Para análise dos teores de pigmentos fotossintetizantes, foram utilizadas plantas cultivadas *in vitro* por 60 dias conforme descrito nos itens acima, escolhidas ao acaso. Foram coletados 50 mg de folhas frescas, sem nenhum tipo de lesão visível, em seis repetições, sendo imediatamente congeladas em freezer -20°C. Depois, foram adicionados 1,5 mL de acetona P.A. em cada tubo de amostra, os quais permaneceram em geladeira (4±1°C), no escuro, por 72 horas. Para melhor extração dos pigmentos, os tubos foram agitados por cerca de oito horas diariamente à 1100 rpm com o equipamento Finemixer SH2000 (FINEPCR, Korea). Os pigmentos extraídos foram analisados em espectrofotômetro LMR FLEX UV-VIS (Loccus, Brasil) nos comprimentos de onda de 661,6 nm (clorofila *a*), 644,8 nm (clorofila *b*) e 470,0 nm (carotenoides e xantofilas). Os cálculos da concentração de pigmentos foram realizados segundo Lichtenthaler (1987) e expressos em µg.g⁻¹ de massa fresca. Os dados foram analisados em ambiente de linguagem R (R Core Team, 2023) segundo a Análise de Variância (*Two-way* ANOVA) e Teste de Tukey.

9.4 ACLIMATIZAÇÃO DE *Eltroplectris paranaënsis* EM CASA DE VEGETAÇÃO

Ao final do cultivo, as plantas foram lavadas em água corrente e aclimatizadas em casa de vegetação com fotoperíodo de 12/12, temperatura de 24±3°C e umidade relativa do ar de 90%, em plantio coletivo (plantas não individualizadas). Cada recipiente plástico (25 x 17,5 cm) foi preparado com substrato de casca de arroz carbonizada + perlita + turfa (4:1:1). As plantas foram regadas de uma a duas vezes por semana, quando o substrato aparentava seco, sem serem fertilizadas. A avaliação da sobrevivência e crescimento das

plantas foi realizada após seis meses, incluindo o número de raízes vivas e mortas e comprimento da maior folha (cm).

9.5 ANÁLISE DE GASES E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EM PLANTAS DE *Eltroplectris paranaënsis* ACLIMATIZADAS *EX VITRO*

Após seis meses de aclimatização, as plantas de foram selecionadas para análise em IRGA (*Infra Red Gas Analyzer*), com o equipamento CI-340 (CID Bio-Science Inc., USA), e fluorescência da clorofila *a*, com o equipamento Junior PAM (Walz Mess-und Regeltechnik, Germany), sendo submetidas a condições de completa escuridão por 15 minutos antes da análise. Foi utilizada iluminação de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a análise de gases e iluminação actínica de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e irradiância de $7000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no pulso luminoso, para fluorescência da clorofila. Os parâmetros considerados foram a condutância estomática (GS), a taxa de transpiração (E), a fluorescência basal (F0), o rendimento quântico máximo do Fotossistema II (Fv/Fm), o rendimento quântico eficaz do Fotossistema II (*Yield*), a taxa de transporte de elétrons (ETR), os coeficientes de *quenching* fotoquímico (qP) e não-fotoquímico (NPQ), além do rendimento quântico de dissipação de energia regulada (Y(NPQ)). Os dados foram utilizados em análises estatísticas em ambiente de linguagem R (R Core Team, 2023) e submetidos à Análise de Variância (*Two-way* ANOVA) e Teste de Tukey.

10 RESULTADOS

10.1 CULTIVO *IN VITRO* DE *Eltroplectris paranaënsis* EM CONDIÇÕES DE GLUTAMINA E VENTILAÇÃO NATURAL

A presença da glutamina e da ventilação natural afetaram diferencialmente os parâmetros morfológicos avaliados no crescimento *in vitro* da espécie. O número de ocorrências visíveis de tecidos necrosados nas plantas *in vitro* foi mais elevado em todos os tratamentos com ventilação natural, se tratando principalmente de ápices radiculares danificados. Enquanto a taxa de escurecimento dos tecidos nos frascos convencionais foi de 1,70% em 0 mM e 0,26% em 6,8 mM e 13,6 mM, nos frascos ventilados as taxas foram para 3,56% em 0 mM, 3,98% em 6,8 mM e 3,00% em 13,6 mM.

A Tabela 5 traz as médias dos parâmetros morfológicos observados aos 60 dias de cultivo. O número médio de folhas por indivíduo permaneceu inalterado por qualquer um dos modelos testados, sendo cerca de 8 folhas por indivíduo. O comprimento da maior raiz também não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, atingindo em média 3 cm.

TABELA 5: Médias dos parâmetros morfológicos das plantas *in vitro* de *Eltroplectris paranaënsis* avaliados dentro de cada tratamento, aos 60 dias de cultivo no experimento de ventilação natural. C = frascos com tampa convencional, vedada; VN = frascos com ventilação natural; CV = coeficiente de variação.

Tratamento/ Parâmetros	Número de folhas	Número de raízes	Comprimento da maior folha (cm)	Comprimento da maior raiz (cm)	Altura do meristema caulinar (cm)
0 mM + C	7,5 ±1,2 ^{ns}	6,7 ±0,9 ^b	4,9 ±1,5 ^b	3,2 ±0,8 ^{ns}	1,7 ±0,7 ^b
0 mM + VN	8,0 ±1,0 ^{ns}	6,7 ±1,2 ^b	5,6 ±1,2 ^{ab}	3,0 ±0,3 ^{ns}	2,8 ±0,7 ^a
6,8 mM + C	7,6 ±0,6 ^{ns}	7,8 ±1,1 ^a	6,5 ±0,9 ^a	2,9 ±0,4 ^{ns}	2,8 ±0,4 ^a
6,8 mM + VN	8,3 ±1,1 ^{ns}	7,5 ±0,8 ^{ab}	7,3 ±0,9 ^a	2,8 ±0,5 ^{ns}	2,9 ±0,7 ^a
13,6 mM + C	8,1 ±1,0 ^{ns}	8,3 ±0,8 ^a	7,9 ±1,0 ^a	2,9 ±0,5 ^{ns}	3,1 ±0,8 ^a
13,6 mM + VN	8,0 ±1,1 ^{ns}	6,7 ±1,0 ^b	7,2 ±0,8 ^a	2,9 ±0,5 ^{ns}	3,1 ±0,6 ^a
CV (%)	12,6	13,4	17,0	16,8	25,0

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística no Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. ns: não significativo.

Os demais parâmetros, no entanto, foram significativamente afetados pela presença da glutamina – conforme indicado pelo experimento do Capítulo anterior – e respondem diferencialmente à presença ventilação natural nos frascos. O comprimento da maior folha teve valores progressivamente mais altos de acordo com o aumento da concentração de glutamina no meio de cultura ($p = 9,46e^{-13}$), com as folhas mais longas sendo encontradas no tratamento de 13,6 mM de glutamina e frascos vedados (média = 7,9). Quando as plantas foram cultivadas em meio de cultura sem glutamina, a presença da ventilação natural propiciou maior altura do meristema caulinar ($p = 0,0009$); entretanto, quando a glutamina foi suplementada ao meio de cultura, o seu efeito foi dominante sobre esse parâmetro morfológico ($p = 5,8e^{-7}$), e a influência da ventilação natural não foi mais significativa sozinha, havendo sobreposição do fator glutamina (efeito da interação entre glutamina e ventilação natural: $p = 0,0002$).

O número de raízes por indivíduo foi o parâmetro que respondeu mais diferencialmente ao experimento. Plantas cultivadas na ausência de glutamina produziram os menores números de raízes por indivíduo, independentemente do tipo de tampa utilizada, sendo em média sete raízes. A suplementação com esse aminoácido impulsionou a formação de novas raízes ($p = 0,0009$), porém a presença da ventilação exerceu efeito prejudicial sobre a formação de raízes. Essa resposta negativa é mais acentuada na concentração 13,6 mM de glutamina (efeito da interação entre glutamina e ventilação natural: $p = 0,009$). Isso é observado comparando-se as médias nos tratamentos de glutamina e frascos convencionais com seus correspondentes de ventilação natural, em que se nota queda nos valores médios nos números de raízes por indivíduo (TABELA 5).

Durante o experimento, foi observada pela primeira vez a ocorrência de brotações laterais nas plantas, podendo haver mais de uma brotação em um mesmo indivíduo. O novo broto é lançado de dentro da bainha de uma folha totalmente expandida, sem que essa seja degradada (FIGURA 11). O surgimento do broto lateral aparentou ser uma resposta a danos no sistema radicular, pois sempre estão presentes na base de uma raiz cujo desenvolvimento foi interrompido, sendo ausentes na base de raízes saudáveis. Poucos indivíduos apresentaram esse comportamento, porém a maioria eram plantas cultivadas em frascos com ventilação natural, independentemente do tratamento com glutamina (proporção de plantas com brotações de 1:6, frascos convencionais: frascos com ventilação natural).



FIGURA 11: Planta de *Eltroplectris paranaënsis* cultivada *in vitro* em meio WPM sem glutamina e com ventilação natural. Detalhe das múltiplas brotações laterais. O círculo destaca uma raiz cujo desenvolvimento foi interrompido. Cada asterisco demarca uma brotação lateral. Barra = 1 cm.

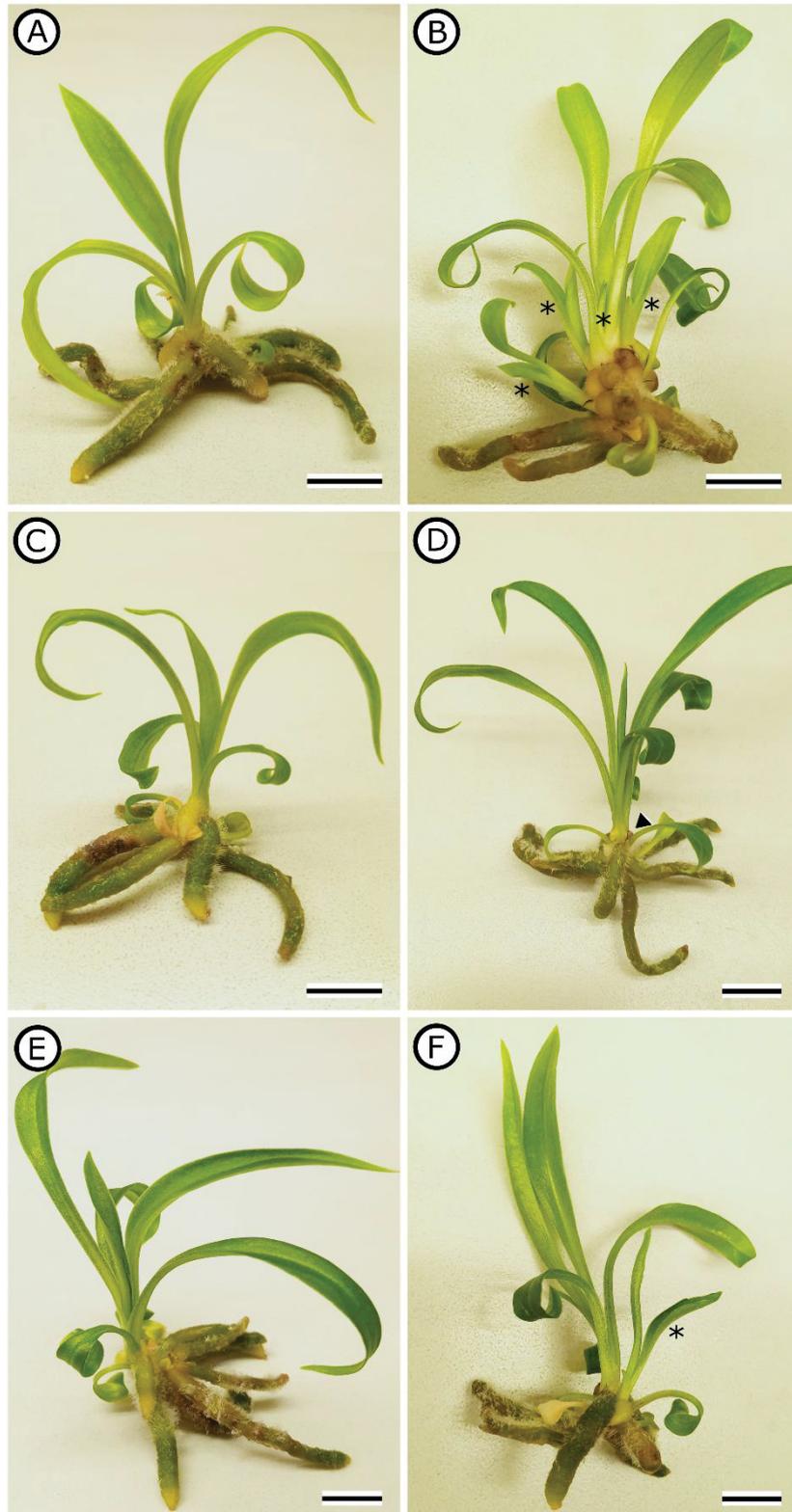


FIGURA 12: Plantas de *Eltroleptis paranaënsis* cultivadas *in vitro* em meio WPM por 60 dias com diferentes suplementações de glutamina e sistemas de ventilação. A: 0 mM + C. B: 0 mM + VN. Cada asterisco demarca uma brotação lateral. Várias raízes com desenvolvimento interrompido são mostradas. C: 6,8 mM + C. D: 6,8 mM + VN. A

cabeça de seta aponta para uma raiz cujo desenvolvimento foi interrompido. E: 13,6 mM + C. F: 13,6 mM + VN. O asterisco demarca uma brotação lateral. C = frascos com tampa convencional, vedada. VN = frascos com ventilação natural.

Em conjunto com as avaliações morfológicas, as plantas foram submetidas à análise dos parâmetros da fotossíntese em IRGA. Desses, a taxa de transpiração foi muito baixa em todos os tratamentos, com valores menores do que 0,1 mM. A condutância estomática também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, com valores entre 0 e 4 mM em todos os sistemas de cultivo. A taxa de fluorescência basal (F0) teve aumento na presença da glutamina e nos frascos com ventilação natural, com as maiores médias chegando a 72 mV, nos tratamentos 6,8 mM + VN e 13,6 mM + VN. A capacidade máxima do Fotossistema II (PSII), F_v/F_m , teve valores próximos ou superiores à 0,700 em todos os tratamentos, com aumentos de mais de 5% na presença da glutamina, em relação ao sistema de cultivo convencional sem glutamina, porém com queda significativa (em torno de 3%) nos tratamentos de ventilação natural (TABELA 6). Apesar disso, o rendimento quântico eficaz, a taxa de transporte de elétrons e o *quenching* fotoquímico não apresentaram alteração por nenhum dos modelos testados. Por outro lado, o *quenching* não-fotoquímico e o rendimento quântico de dissipação de energia regulada foram influenciados em tendência de aumento pela presença da glutamina, ao mesmo tempo em que sofreram redução significativa em todos os tratamentos com ventilação natural.

TABELA 6: Valores da capacidade máxima do Fotossistema II (Fv/Fm) de plantas de *Eltroplectris paranaënsis* cultivadas *in vitro* por 60 dias em meio WPM sob diferentes tratamentos de suplementação de glutamina e ventilação natural. Valores expressos em média das amostras, seguido do desvio padrão. Legenda: C – frascos com tampa convencional, vedada; VN – frascos com ventilação natural; CV – coeficiente de variação.

Tratamento	Fv/Fm	Redução / aumento
0 mM + C	0,715 ±0,032 ^{ab}	---
0 mM + VN	0,696 ±0,031 ^b	- 2,66%
6,8 mM + C	0,752 ±0,017 ^a	+ 5,17%
6,8 mM + VN	0,693 ±0,067 ^b	- 3,08%
13,6 mM + C	0,754 ±0,021 ^a	+ 5,45%
13,6 mM + VN	0,694 ±0,040 ^b	- 2,94%
CV (%)	4,9	

Letras diferentes representam diferença estatística no Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. ns: não significativo.

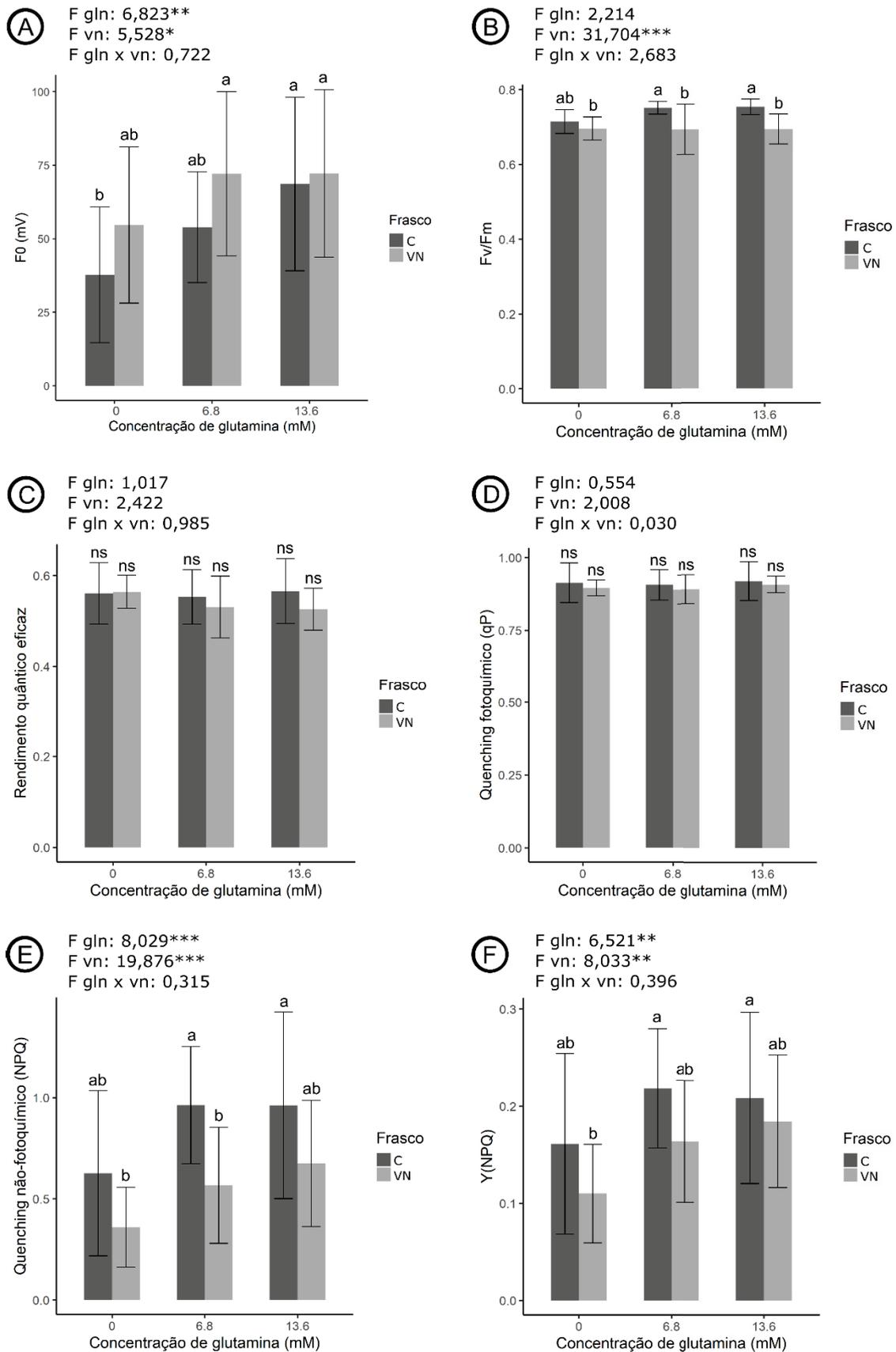


FIGURA 13: Análises dos parâmetros da fotossíntese em plantas de *Eltroleptis paranaënsis* cultivadas *in vitro* por 60 dias em meio WPM sob diferentes tratamentos

com suplementação de glutamina e ventilação natural. Legenda: C – frascos com tampa convencional, vedada; VN – frascos com ventilação natural. Letras diferentes representam diferença estatística no Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. ns: Não significativo. Valores da estatística F indicam: F gln – efeito da glutamina; F vn – efeito da ventilação no frasco; F gln x vn – efeito de interação entre a glutamina e o tipo de ventilação no frasco.

Os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides das plantas de *E. paranaënsis* cultivadas *in vitro* por 60 dias em diferentes tratamentos de glutamina e ventilação natural são apresentados na Figura 14. A suplementação de glutamina no meio de cultura propiciou maior acúmulo de clorofila *a* nas folhas, em relação ao controle, independentemente da concentração utilizada. O teor de clorofila *b* não foi afetado por nenhum tratamento. Por essa razão, a proporção entre clorofilas *a/b* também sofreu alteração nos tratamentos suplementados com glutamina, sem efeito de interação com a ventilação natural. Entretanto, uma alteração significativa no teor de carotenoides foi observada somente no tratamento de 13,6 mM glutamina com ventilação natural.

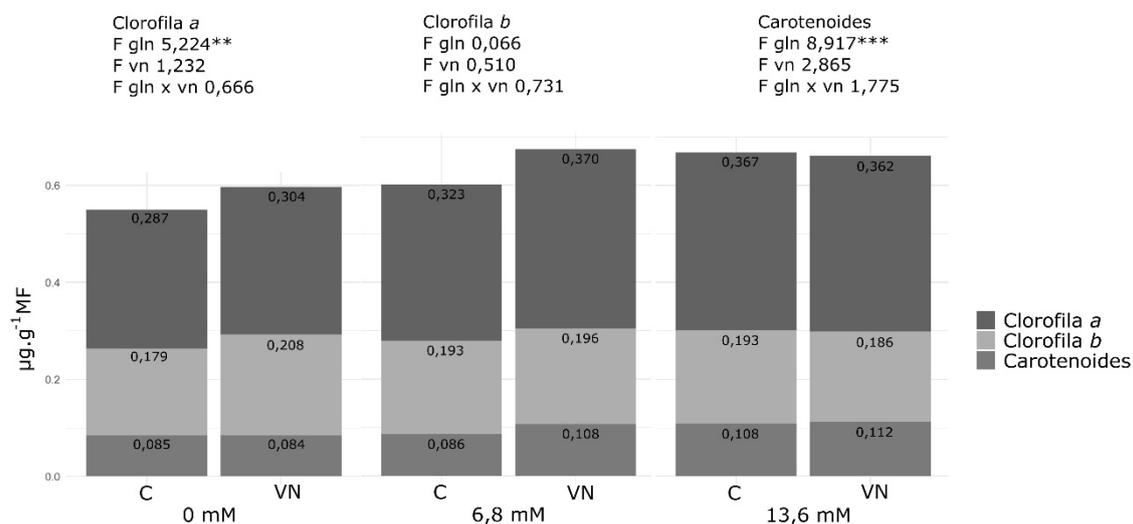


FIGURA 14: Teores de pigmentos fotossintetizantes de folhas saudáveis de plantas de *Eltrophectris paranaënsis* cultivadas *in vitro* por 60 dias em meio WPM sob diferentes tratamentos com suplementação de glutamina (0; 6,8 e 13,6 mM) e ventilação natural. Valores dentro das barras representam a média da amostra, expressos em µg.g⁻¹ de massa fresca. Legenda: C – frascos com tampa convencional, vedada; VN – frascos com ventilação natural. Valores da estatística F indicam: F gln – efeito da glutamina; F vn –

efeito da ventilação no frasco; F gln x vn – efeito de interação entre a glutamina e o tipo de ventilação no frasco.

10.2 ACLIMATIZAÇÃO DE *Eltroplectris paranaënsis* EM CASA DE VEGETAÇÃO

Decorridos seis meses do transplante em casa de vegetação, todas as plantas sobreviventes (98%) se apresentavam saudáveis, sem manchas ou danos visíveis nas folhas ou raízes (FIGURA 15). Ao todo, mais de 300 mudas de *E. paranaënsis* foram transplantadas para a casa de vegetação. A análise dos parâmetros morfológicos chave (TABELA 7) apontou que os efeitos da suplementação com glutamina e da ventilação natural permaneceram afetando as plantas quanto ao número de raízes vivas, porém não quanto ao número de raízes mortas. Os maiores números de raízes por indivíduo, novamente, foram observados nos dois tratamentos com glutamina, independentemente da concentração ($p = 1,65e^{-5}$). Houve redução do número de raízes em todos os tratamentos com ventilação natural, em relação aos seus correspondentes de tampa convencional ($p = 0,0002$). O comprimento da maior folha praticamente dobrou no período de aclimatização em relação ao *in vitro* (TABELA 5), e também foi positivamente influenciado pela glutamina, principalmente se usadas tampas convencionais ($p = 0,024$).

TABELA 7: Médias dos parâmetros morfológicos das plantas *ex vitro* de *Eltroplectris paranaënsis* avaliados dentro de cada tratamento, aos 180 dias de aclimatização após o experimento de ventilação natural. C = frascos com tampa convencional, vedada; VN = frascos com ventilação natural; CV = coeficiente de variação.

Tratamento/ Parâmetros	Número de raízes vivas	Número de raízes mortas	Comprimento da maior folha (cm)
0 mM + C	6,34 ±1,40 ^b	1,27 ±0,96 ^{ns}	12,1 ±2,03 ^b
0 mM + VN	5,47 ±2,10 ^c	1,87 ±1,30 ^{ns}	12,1 ±1,61 ^b
6,8 mM + C	8,87 ±1,88 ^a	1,07 ±0,88 ^{ns}	13,8 ±1,23 ^a
6,8 mM + VN	6,54 ±1,77 ^b	1,34 ±0,82 ^{ns}	12,4 ±1,49 ^{ab}
13,6 mM + C	8,80 ±1,57 ^a	1,60 ±0,74 ^{ns}	13,6 ±1,10 ^a
13,6 mM + VN	7,54 ±2,23 ^{ab}	1,20 ±1,01 ^{ns}	12,5 ±1,79 ^{ab}
CV (%)	26,0	69,8	12,2

Letras diferentes representam diferença estatística no Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. ns: Não significativo.

Com relação aos parâmetros da fotossíntese, nenhum efeito diferencial entre os tratamentos foi observado decorridos os seis meses de aclimatização. A Tabela 8 apresenta os valores de Fv/Fm das plantas comparando os tratamentos e o ambiente *in vitro*. Foi observada uma homogeneização da capacidade máxima do PSII, com variações de menos de 1% entre os tratamentos, não significativas. Isso se deu devido a todas os tratamentos apresentarem ganho na capacidade fotossintética em relação ao seus equivalentes do período de cultivo *in vitro*. Os tratamentos de glutamina e tampas convencionais apresentaram os menores ganhos, pois as plantas oriundas desses tratamentos já apresentavam os valores mais elevados de Fv/Fm (TABELA 6). Portanto, o ganho decorrido durante a aclimatização foi proporcional à deficiência fotossintética causada pelo tratamento durante o período *in vitro*, de modo a homogeneizar as plantas.

TABELA 8: Valores da capacidade máxima do Fotossistema II (Fv/Fm) de plantas de *Eltroplectris paranaënsis* aclimatizadas *ex vitro* por 180 dias em casa de vegetação, oriundas de diferentes tratamentos de suplementação de glutamina e ventilação natural. Valores expressos em média das amostras, seguido do desvio padrão. Legenda: C – frascos com tampa convencional, vedada; VN – frascos com ventilação natural; CV – coeficiente de variação.

Tratamento	Fv/Fm	Redução / aumento	Redução / aumento em relação ao <i>in vitro</i>
0 mM + C	0,798 ±0,011 ^{ns}	---	+ 11,61%
0 mM + VN	0,803 ±0,009 ^{ns}	+ 0,60%	+ 15,37%
6,8 mM + C	0,793 ±0,008 ^{ns}	- 0,63%	+ 5,45%
6,8 mM + VN	0,794 ±0,007 ^{ns}	- 0,50%	+ 14,57%
13,6 mM + C	0,791 ±0,008 ^{ns}	- 0,88%	+ 4,91%
13,6 mM + VN	0,793 ±0,021 ^{ns}	- 0,63%	+ 14,27%
CV (%)	1,3		

Legenda: ns – não significativo.

Todos os demais parâmetros – F0, Yield, *quenching* fotoquímico, *quenching* não-fotoquímico, rendimento quântico de dissipação de energia regulada – foram similares

entre os tratamentos, não havendo diferença estatística entre as amostras. No entanto, é interessante ressaltar que a transpiração e condutância estomática de todas as plantas foi igual a zero, sem que variações no vapor de água e CO₂ interno e externo fossem detectadas pelo aparelho, o que indica que os estômatos permaneceram fechados durante todo o período de análise.

Nos meses de Janeiro e Fevereiro (2025), várias plantas entraram em florescimento, tanto *ex vitro* quanto *in vitro*. Dessa forma, todas as plantas que ainda estavam sendo mantidas nos frascos *in vitro* foram imediatamente aclimatizadas. O pendão floral levou cerca de dois meses para completar o seu alongamento e maturação, de modo que, nos meses de Março à Maio, as plantas estavam com flores. Foi realizada polinização autógama manual, e as cápsulas se desenvolveram corretamente (FIGURA 16). Dessa forma, nesse trabalho também foi possível descrever o ciclo de vida de *Eltroplectris paranaënsis*, da germinação de sementes à maturação das cápsulas (TABELA 9).



FIGURA 15: Aclimatização de *Eltroleptis paranaënsis* em casa de vegetação. Acima, uma semana após aclimatização (plantio coletivo). Abaixo, seis meses de cultivo *ex vitro*. As cabeças de seta apontam para plantas com pendão floral. Barra = 2 cm.



FIGURA 16: Floração e frutificação das plantas de *Eltrolepctris paranaënsis* germinadas *in vitro*, em casa de vegetação, cerca de 22 meses após inoculação das sementes. Barra = 1 cm.

TABELA 9: Ciclo de vida de *Eltrolepctris paranaënsis*.

Período (meses)	0 – 4	5 – 7	8 – 10	11 – 14
Estágio de desenvolvimento	Sementes em dormência	Germinação das sementes (estágios I – VI)	Crescimento inicial das plantas (fases I – III)	Crescimento das plantas até fase ‘pré-adulta’
Período (meses)	15 – 20	20 – 22	22 – 24	23/24
Estágio de desenvolvimento	Crescimento das plantas até fase adulta	Florescimento: crescimento do pendão floral	Plantas com flores	Maturação das cápsulas

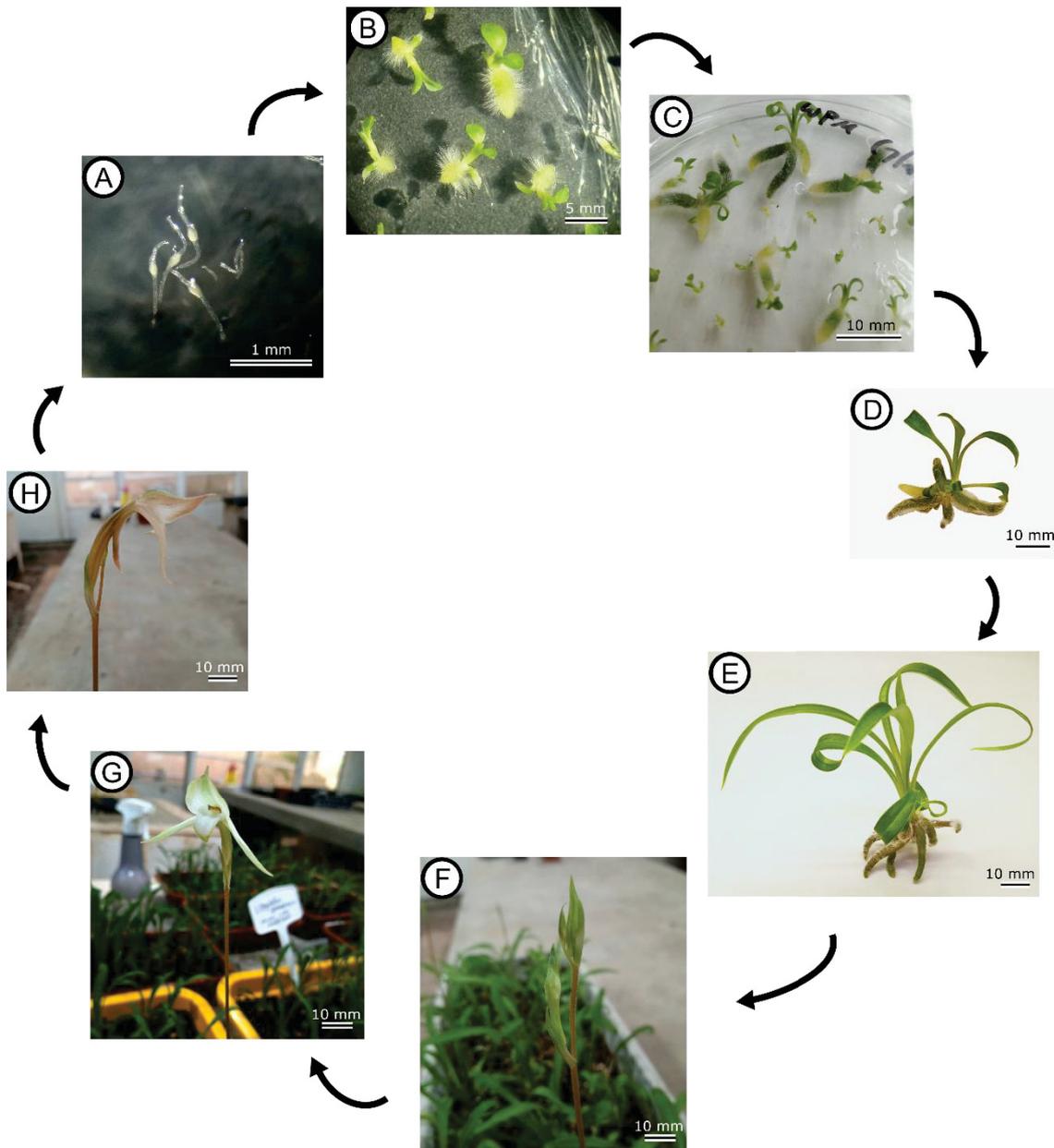


FIGURA 17: Fluxograma do ciclo de vida de plantas micropropagadas de *Eltroplectris paranaënsis*. A: 0 – 4 meses, sementes em dormência. B: 5 – 7 meses, germinação das sementes (estágios I – VI). C: 8 – 10 meses, crescimento inicial das plantas (fases I – III). D: 11 – 14 meses, crescimento das plantas até fase ‘pré-adulta’. E: 15 – 20 meses, crescimento das plantas até fase adulta. F: 20 – 22 meses, florescimento: crescimento do pendão floral. G: 22 – 24 meses, plantas com flores. H: 23/24 meses, maturação das cápsulas.

11 DISCUSSÃO

11.1 CULTIVO *IN VITRO* DE *Eltroplectris paranaënsis* EM CONDIÇÕES DE GLUTAMINA E VENTILAÇÃO NATURAL

Eltroplectris paranaënsis é considerada uma planta de pequeno porte, em comparação com as demais representantes do gênero (ENGELS *et al.*, 2023). Ao final do experimento de cultivo em condições de glutamina e ventilação natural, muitas plantas se aproximaram do tamanho máximo esperado para a espécie. A expectativa para comprimento de raiz, por exemplo, é de 2,7 à 4,8 cm (ENGELS *et al.*, 2023); as médias para todos os tratamentos ficaram entre 2,8 e 3,2 cm (TABELA 5), com a raiz mais longa sendo de 4 cm. Dessa forma, conclui-se que o comprimento das raízes não foi um parâmetro morfológico adequado para esse tipo de estudo acerca do crescimento da espécie, dado que não foi afetado por nenhum dos modelos experimentais testados, sendo dependente exclusivamente do tempo de cultivo. De modo semelhante, o número de folhas também não foi um parâmetro informativo sobre o desenvolvimento *in vitro*.

O comprimento das folhas e a altura do meristema caulinar, parâmetros intrinsecamente associados, são fortemente influenciados pela presença da glutamina, porém pouco afetados pela membrana de filtro de ar. Devido a essa redundância de informações, a análise do comprimento da maior folha é suficiente para a compreensão dos efeitos dos sistemas de cultivo na espécie. Com folhas passando de 7 cm, as plantas cultivadas na presença de glutamina se aproximaram da expectativa de um adulto da espécie (11 à 14 cm, considerando o pseudopecíolo) (ENGELS *et al.*, 2023), podendo ser consideradas ‘pré-adultas’.

Entretanto, o número de raízes é apontado como o parâmetro morfológico chave na compreensão do desenvolvimento da espécie. A interrupção no desenvolvimento da raiz aparenta ser determinante para o lançamento das brotações laterais, as quais podem ser destacadas e gerar um novo indivíduo, em uma forma de propagação assexuada. Sendo órgãos acumuladores de amido (SANTOS & SILVA, 2023; STERN *et al.*, 1995), as raízes são amplamente influenciadas pela presença da glutamina e também refletem o estado fisiológico dos indivíduos quanto a sua capacidade fotossintetizante. A redução no número de raízes associada à presença da ventilação natural nos frascos *in vitro* está relacionada, também, com o aumento de F0 e queda de Fv/Fm observados nas condições de ventilação natural. A fluorescência basal F0 corresponde ao estado oxidado da

plastoquinona A – receptora primária de elétrons – e embora seja independente dos eventos fotoquímicos posteriores, ela está intimamente relacionada com o funcionamento adequado do Fotossistema II (PSII). F_v/F_m é um valor associado à fluorescência da clorofila e informativo sobre a capacidade máxima e integridade do PSII quando todos os seus centros de reação estão abertos – situação iminente à ativação das reações luminosas da fotossíntese –, e tem sido explorado por diversos estudos em fisiologia vegetal e problemas metabólicos das plantas (ASHRAF & HARRIS, 2013; SILVA *et al.*, 2017; TAIZ *et al.*, 2017).

O aumento dos valores de F_0 indica que a transferência de energia do complexo antena para o centro de reação está prejudicada, enquanto o decréscimo nos valores de F_v/F_m sinaliza que o PSII foi danificado, seja por danos induzidos pela própria luz ou outros fatores ambientais, como déficit hídrico, baixa disponibilidade de CO_2 , alta salinidade, variações de temperatura ou presença de compostos tóxicos (LÜTTGE, 2010; SILVA *et al.*, 2017). Os valores de F_v/F_m foram registrados acima de 0,700, o que indica que as plantas de *E. paranaënsis* cultivadas *in vitro* estão aptas para realizar fotossíntese, dado que valores próximos de 0,800 são considerados esperados em plantas saudáveis e fotossinteticamente ativas (ASHRAF & HARRIS, 2013; AZEVEDO NETO *et al.*, 2011). No entanto, se a integridade do PSII for afetada, a capacidade de geração de energia por aquele indivíduo reduz e, portanto, menos energia pode ser armazenada na forma de amido. Ao mesmo tempo, o crescimento da nova raiz só irá ocorrer caso haja energia o suficiente para que sua função como órgão de reserva se faça necessária; do contrário, seu desenvolvimento é interrompido, e uma nova brotação é gerada, a qual irá produzir folhas e contribuir com a captação de energia luminosa e produção de energia, em uma forma de compensação de área fotossintética.

Apesar da queda de F_v/F_m , o rendimento quântico eficaz (*Yield*), a taxa de transporte de elétrons e o *quenching* fotoquímico foram semelhantes em todos os tratamentos. Esses parâmetros estão associados com o fluxo de reações luminosas nos tilacóides, e indicam que a fotossíntese está viável nos indivíduos. Muitas plantas que evoluíram em ambientes com limitação de acesso ao nitrogênio, como epífitas, estocam nitrogênio produzindo mais moléculas de RuBisCO e mais pigmentos fotossintetizantes (GONÇALVES *et al.*, 2020). Como não foram registrados aumentos dos valores de *quenching* fotoquímico, pode-se inferir que a demanda energética de crescimento das plantas estava sendo suprida em qualquer um dos sistemas de cultivo avaliados, provavelmente devido ao aporte de carbono fornecido no meio de cultura.

A utilização de ventilação natural no sistema de cultivo *in vitro* trouxe resultados positivos para várias espécies (FORTINI *et al.*, 2021; FRITSCHE *et al.*, 2022; MARTINS *et al.*, 2015; ZOBAYED, 2005). Em Orchidaceae, o crescimento de *Epidendrum fulgens* foi estimulado pela ventilação natural quanto ao número de folhas e raízes por planta e acúmulo de biomassa (FRITSCHE *et al.*, 2022). Nesse trabalho, os autores também observaram que a formação do velame ocorreu somente nas raízes de plantas cultivadas sob ventilação natural, o que é fundamental para o desenvolvimento saudável das plantas e posterior aclimatização *ex vitro*, bem como maior acúmulo de pigmentos carotenoides e clorofila *a*. Para a epífita *Cattleya walkeriana* Gardner, brotos e raízes mais longas, maior biomassa e maior espessura do mesófilo foliar também foram obtidas no sistema de ventilação natural, sendo um sistema benéfico para a espécie (SILVA *et al.*, 2014).

No entanto, ao contrário dos trabalhos mencionados, *Eltroplectris paranaënsis* tem o crescimento prejudicado pela ventilação natural, com a queda no número de raízes por indivíduo, maior ocorrência de necrose dos tecidos – principalmente necrose de novas raízes – aumento de F0 (acúmulo de plastoquinona oxidada) e redução de Fv/Fm. Tecidos essenciais para a sobrevivência das plantas como o velame e cilindro vascular já haviam sido desenvolvidos nas plantas cultivadas ainda durante as etapas de germinação (Capítulo I), portanto não sofreram alterações causadas pela ventilação natural.

É necessário considerar que frascos de cultivo com membranas de filtro ar que permitem trocas atmosféricas perdem água rapidamente. Martins *et al.* (2015) relataram que no período de 45 dias, em sala de crescimento à $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, os frascos de cultivo com ventilação natural perderam cerca de 34% do conteúdo de água. Em condições semelhantes de cultivo e ventilação, meios de cultura geleificados com o agente gelrite perderam de 49 à 53% do conteúdo de água, enquanto aqueles geleificados com ágar perderam de 42 à 44%, num período de 60 dias (IVANOVA & VAN STADEN, 2010). Esse fenômeno acarreta em uma concentração dos sais presentes no meio de cultura e consequente declínio do potencial osmótico do meio, de modo que as plantas se tornam sujeitas à estresse osmótico. No cultivo de *Billbergia zebrina* (Herb.) Lindl. (Bromeliaceae), a ventilação natural tem vários efeitos positivos sobre a morfofisiologia das plantas, desde que a sacarose esteja ausente do meio de cultura; do contrário, o baixo potencial osmótico do meio se torna prejudicial às plantas (MARTINS *et al.*, 2015).

Em seu estudo de seleção de genótipos de girassol tolerantes à salinidade, Azevedo Neto *et al.* (2011) demonstraram que o estresse salino aumenta F0 e reduz Fv/Fm em diversas linhagens, em relação ao controle, o que sugere danos às estruturas

dos tilacóides. Embora o mecanismo pelo qual o estresse salino prejudica a atividade fotossintética das plantas ainda não esteja perfeitamente elucidado, os danos ao PSII parecem estar relacionados com modificações na conformação do centro de reação e elevação da formação de espécies reativas de oxigênio (ASHRAF & HARRIS, 2013; BARTELS & SUNKAR, 2005). Desse modo, conclui-se que a redução do potencial osmótico do meio devido à ventilação natural resultou em fator de estresse osmótico para as plantas de *E. paranaënsis*, provavelmente causando danos ao PSII. Essa sensibilidade à elevação da concentração salina já havia sido apontada desde a germinação da espécie, indicando que ela provavelmente é adaptada para ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes no solo. Além disso, em seu ambiente natural na Floresta Nebular, a umidade relativa do ar é em torno de 90%, enquanto que a sala de crescimento apresentava somente 56% de umidade relativa do ar durante o experimento. Sendo assim, a baixa umidade do ar associada à concentração dos sais no meio de cultura provavelmente foram responsáveis pelos danos ao PSII acusados pela análise de gases.

É importante discutir que os dois parâmetros relacionados com a dissipação de excesso de energia, NPQ e Y(NPQ) tiveram valores mais baixos nos frascos com ventilação natural. Esses dados refletem o processo de dissipação do excesso de energia nos complexos antena do PSII na forma de energia térmica, um mecanismo de fotoproteção induzida pela luz que gera mudanças na conformação do centro de captação de luz (LHC), modificando a forma como os pigmentos interagem. O processo está correlacionado com a presença dos pigmentos acessórios carotenoides e com o ciclo das xantofilas, que culmina na formação de zeaxantina (ASHRAF & HARRIS, 2013; TAIZ *et al.*, 2017). É esperado que esses valores estejam mais elevados em plantas sob estresse, conforme observado por Azevedo Neto *et al.* (2011); portanto, os baixos valores de NPQ e Y(NPQ) nas plantas de *E. paranaënsis* indicam que esse sistema de proteção foi desestabilizado nos tratamentos com ventilação natural. Quando as clorofilas absorvem a luz de forma eficiente, mas as proteínas acessórias estão ausentes ou são insuficientes, a rota de liberação de energia falha, permitindo que o PSII seja danificado por moléculas de oxigênio singlete (ASHRAF & HARRIS, 2013; TAIZ *et al.*, 2017). A quantidade de carotenoides de *E. paranaënsis* é consideravelmente baixa ($>0,15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) e não teve a elevação de produção causada pela glutamina conforme ocorrido para a clorofila *a* (FIGURA 14), à exceção do tratamento 13,6 mM + VN, o qual também registrou os danos mais intensos ao PSII (FIGURA 13). Portanto, é provável que o mecanismo de proteção

do ciclo das xantofilas tenha sido insuficiente para preservar a integridade do PSII diante dos fatores de estresse promovidos pela ventilação natural.

11.2 ACLIMATIZAÇÃO DE *Eltroplectris paranaënsis* EM CASA DE VEGETAÇÃO

A sobrevivência de *Eltroplectris paranaënsis* em casa de vegetação foi bastante elevada (98%), demonstrando que as plantas estavam desenvolvidas o suficiente para serem retiradas dos frascos *in vitro*. O substrato preparado com casca de arroz carbonizada, perlita e turfa foi apropriado para o cultivo de *E. paranaënsis*, provavelmente por não reter umidade em demasia e ao mesmo tempo permitir o crescimento das raízes tuberosas por entre as partículas, tendo granulometria similar à da serrapilheira, onde as plantas crescem naturalmente. O uso de casca de arroz carbonizada como substrato foi demonstrado eficiente para diferentes orquídeas (FARIA *et al.*, 2018; ZANDONÁ *et al.*, 2014) e outras flores de corte e hortaliças (TERRA *et al.*, 2011; SALÉ *et al.*, 2021; YOUNIS *et al.*, 2022), sendo um material de boa drenagem e aeração, baixo peso, pH levemente alcalino (6 – 6.5) e naturalmente contendo macronutrientes como nitrogênio (0,5 – 0,8%), fósforo (0,3 – 0,5%) e potássio (0,2 – 0,5%) (SALÉ *et al.*, 2021; YOUNIS *et al.*, 2022). Ao ser combinada com a turfa, altamente porosa, e com a perlita, um mineral vulcânico bom retentor de água ao mesmo tempo em que permite aeração do solo, o balanço do substrato reteve água o bastante para a hidratação das plantas sem prejudicar o desenvolvimento radicular por sufocamento.

Em relação ao crescimento, um efeito residual do cultivo *in vitro* ainda foi observado no número total de raízes vivas por indivíduo, sendo que as plantas oriundas dos tratamentos de ventilação natural continuaram a apresentar menos raízes do que as plantas oriundas do cultivo convencional. Isso demonstra que efeitos prejudiciais sobre as raízes são mais difíceis de serem compensados, mesmo quando a situação estressante é removida. Apesar disso, todas as plantas alcançaram o porte de indivíduos adultos, com folhas entre 12 e 14 cm de comprimento, conforme descrito para a espécie (ENGELS *et al.*, 2023).

A compensação dos danos causados ao PSII e homogeneização dos indivíduos, independentemente do tratamento ao qual haviam sido submetidos anteriormente, reflete uma alta adaptabilidade fisiológica na recuperação do estresse. Em um estudo com folhas de trigo, foi demonstrado que os danos ao PSII causados pelo estresse salino (0,1 à 0,5 M de NaCl) foram quase completamente reversíveis, com uma recuperação de 100% na

porção aceptora do PSII e de 85% na porção doadora de elétrons (MEHTA *et al.*, 2010). Quando submetidas à escassez de água por vários dias seguidos, plantas de *Clusia minor* L. (Clusiaceae) apresentaram queda significativa em Fv/Fm (de 0,800 para 0,750), indicando ocorrência de fotoinibição; porém, os danos foram revertidos dois dias após as plantas serem regadas novamente (MATTOS *et al.*, 1999). *C. minor* é uma planta capaz de alternar entre o metabolismo C3 e CAM, de acordo com os estímulos ambientais. Os autores observaram que a redução de Fv/Fm ocorreu nas fases II e IV do metabolismo CAM, porém não na fase III, quando há a descarboxilação dos ácidos orgânicos e fixação de CO₂, de modo que a mudança para CAM em *C. minor* seria também uma forma de proteção dos fotossistemas e auxiliaria na recuperação dos danos ao PSII uma vez superado o desafio ambiental (HERRERA, 2009; MATTOS *et al.*, 1999). A umidade relativa do ar da casa de vegetação na qual as plantas de *E. paranaënsis* foram aclimatizadas é mantida em torno de 90%, o que certamente foi fundamental para que as plantas retornassem ao estado saudável.

Durante a análise de gases, a transpiração e condutância estomática foram zero, e os teores de vapor de água e CO₂ interno e externo às folhas permaneceram inalterados. Esses dados indicam que os estômatos se mantiveram fechados durante o experimento. Ao serem cultivadas *in vitro*, maioria das plantas apresenta dificuldades quanto ao controle da abertura e fechamento estomático devido à alta umidade dentro dos frascos (em torno de 95%). Isso faz com que os estômatos fiquem permanentemente abertos durante o cultivo, pois as plantas não sofrem com a desidratação, o que pode se tornar um problema grave no processo de aclimatização (FRITSCHÉ *et al.*, 2022). Entretanto, *E. paranaënsis* não apresentou essa deformidade, e mesmo as plantas *in vitro* possuem controle sobre os estômatos, conforme demonstrado pelos baixos valores de transpiração e condutância estomática das plantas. Esse comportamento se tornou evidente nas plantas aclimatizadas, com os estômatos permanecendo fechados durante o período diurno. Portanto, é provável que *E. paranaënsis* realize fotossíntese do tipo CAM – no qual os estômatos permanecem fechados durante o dia e são abertos à noite, captando o CO₂ necessário com o mínimo de perda de água. O metabolismo CAM é utilizado não apenas para minimizar a perda de água, podendo também favorecer a absorção da água por alterações no potencial osmótico dos vasos condutores e células do mesófilo (HERRERA, 2009). Nas orquídeas, a fotossíntese CAM evoluiu ao menos quatro vezes de forma independente, e é considerada uma das inovações responsáveis pela grande diversidade de espécies (WANG *et al.*, 2024). Entretanto, não foi possível realizar ensaios

confirmatórios para o metabolismo CAM, como a marcação de C¹³, análise da acidificação do vacúolo e atividade enzimática da fosfoenolpiruvato carboxilase, principal enzima envolvida no metabolismo. Sendo assim, pesquisas futuras devem explorar esse aspecto da fisiologia de *E. paranaënsis* a fim de melhor compreender as relações da espécie com o ambiente.

A conservação da biodiversidade no cenário mundial da atualidade não precisa estar limitada à proteção *in situ* das populações naturais, embora seja um aspecto fundamental. Entretanto, se faz necessário ir além, e estratégias como reintrodução de espécies nativas no habitat devem ser aplicadas para o resgate de espécies raras e restauração de ambientes degradados, as quais podem servir de subsídio para melhor compreensão dessas espécies no habitat, no caso de populações extremamente reduzidas (JOLMAN *et al.*, 2022; REITER *et al.*, 2016; ZENG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2025). O sucesso de reintrodução ao habitat depende de múltiplos fatores, como a qualidade das mudas produzidas, tamanho e maturação, além da escolha apropriada do local de reintrodução, haja vista que as relações das plantas com a biosfera do solo, forófitos e polinizadores são fundamentais para a longevidade das plantas (JOLMAN *et al.*, 2022; YAM *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2025).

Zeng *et al.* (2012) realizaram a reintrodução de mudas de *Paphiopedilum wardii* germinadas *in vitro* em três locais potencialmente apropriados para o estabelecimento da espécie. Após dois anos, os autores observaram sobrevivência de até 65% (no melhor ambiente) e florescimento de 30% das mudas em todos os locais de reintrodução, demonstrando que as plantas *in vitro* são viáveis para recompor populações naturais. Entretanto, em somente um desses locais foi observada também a produção de cápsulas e sementes, indicando a provável ausência dos polinizadores nos outros locais escolhidos (ZENG *et al.*, 2012). Plantas de *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. produzidas *in vitro* e reintroduzidas em matas nativas apresentaram de 70 à 80% de sobrevivência e também floresceram no período de três anos (SEENI & LATHA, 2000). Mudas pequenas (0,24 g de massa fresca) de *Cymbidium tracyanum* Rolfe tiveram mortalidade total em dois meses de reintrodução *in situ*, enquanto mudas grandes (1,41 g de massa fresca) tiveram 80% de sobrevivência ao final de 14 meses de acompanhamento (ZHANG *et al.*, 2025). Esses dados demonstram a importância do período de fortalecimento das mudas em casa de vegetação a fim de garantir maior sucesso na recuperação das populações naturais.

Por essa razão, as plantas devem ser cuidadosamente monitoradas em casa de vegetação antes do planejamento da reintrodução na natureza. *E. paranaënsis* não

apresentou dificuldades quanto à transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, provando que as técnicas da cultura de tecidos foram eficientes na produção de mudas dessa espécie. Ao mesmo tempo, a capacidade de florescimento e produção de cápsulas demonstra que as plantas de *E. paranaënsis* produzidas *in vitro* são fisiologicamente funcionais e estão aptas para reintrodução no ambiente natural, podendo ser utilizadas no resgate dessa espécie considerada Criticamente em Perigo (FERRAZ *et al.*, 2025).

12 CONCLUSÕES

A utilização da ventilação natural no cultivo *in vitro* de *Eltroplectris paranaënsis* causou impactos negativos sobre o desenvolvimento da espécie, promovendo danos ao aparato fotossintético, bem como redução do número de raízes por interrupção do crescimento de novas raízes. A suplementação de glutamina teve efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas e acúmulo de clorofila *a*, em relação ao controle sem esse aminoácido. A espécie aparenta ser extremamente sensível à alta salinidade do meio de cultura, o que provavelmente é um reflexo do ambiente natural em que a espécie evoluiu. Dessa forma, é recomendado que o cultivo *in vitro* de *E. paranaënsis* seja realizado em frascos completamente vedados, preferencialmente com a suplementação de glutamina na concentração 6,8 mM para estimular a formação de raízes tuberosas e acúmulo de pigmentos fotossintetizantes.

As plantas não apresentaram dificuldades de aclimatização nas condições de substrato e umidade relativa do ar utilizadas na casa de vegetação. A restauração do aparato fotossintético após seis meses de aclimatização indica elevada adaptabilidade da espécie e capacidade de superação do estresse ambiental. Além da alta sobrevivência, as plantas chegaram à idade adulta, floresceram e produziram sementes, completando seu ciclo de vida.

REFERÊNCIAS

- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview, **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.
- AZEVEDO NETO, A. D.; PEREIRA, P. P. A.; COSTA, D. P.; SANTOS, A. C. C. Fluorescência da clorofila como uma ferramenta possível para seleção de tolerância à salinidade em girassol, **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 893-897, 2011.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 23-58, 2005.
- BONE, R. E.; SMITH, J. A. C.; ARRIGO, N.; BUERKI, S. A macro-ecological perspective on crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis evolution in Afro-Madagascan drylands: Eulophiinae orchids as a case study, **New Phytologist**, v. 208, p. 469-481, 2015.
- DESJARDINS, Y.; DUBUC, J. F.; BADR, A. *In vitro* culture of plants: A stressful activity! **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 29-50, 2009.
- ENGELS, M. E.; SILVA-PEREIRA, V.; SMIDT, E. C. *Eltroplectris paranaënsis*: a new species of Spiranthinae (Orchidaceae) from the nebular Atlantic Rain Florest, **Phytotaxa**, v. 609, n. 2, p. 115-123, 2023.
- FARIA, R. T.; STEGANI, V.; BERTONCELLI, D. J.; ALVES, G. A. C.; ASSIS, A. M. Substrates for the cultivation of epiphytic orchids, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 2851-2866, 2018.
- FERRAZ, J. R.; MOLINA, J. M. P.; HASSEMER, G.; RIBEIRO, J. E. L. S. An annotated checklist of the endemic flowering plants of Paraná, southern Brazil, **Phytotaxa**, v. 685, n. 1, p. 1-62, 2025.
- FORTINI, E. A.; BATISTA, D. S.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; FELIPE, S. H. S.; CORREIA, L. N. F.; CHAGAS, K.; SILVA, P. O.; ROCHA, D. I.; OTONI, V. C. Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, p. 593-605, 2021.
- 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.
- GONÇALVES, A. Z.; LATANSIO, S.; DETMANN, K. C.; MARABESI, M. A.; NETO, A. A. C.; AIDAR, M. P. M.; Da MATTA, F. M.; MERCIER, H. What does the RuBisCO activity tell us about a C₃-CAM plant?, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 147, p. 172-180, 2020.
- HAROUN, S. A.; SHUKRY, W. M.; EL-SAWY, O. Effect of asparagine or glutamine on growth and metabolic changes in *Phaseolus vulgaris* under *in vitro* conditions, **Bioscience Research**, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2010.
- HERRERA, A. Crassulacean acid metabolism and fitness under water stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM for? **Annals of Botany**, v. 103, p. 645-653, 2009.

- IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans, **Plant Growth Regulation**, v. 60, p. 143-150, 2010.
- JOLMAN, D.; BATALLA, M. I.; HUNGERFORD, A.; NORWOOD, P., TAIT, N.; WALLACE, L. E. The challenges of growing orchids from seeds for conservation: An assessment of asymbiotic techniques, **Applications in Plant Sciences**, v. 10, n. 5, e11496, 2022.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, **Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society**, v. 30, v. 5, p. 421-427, 1980.
- LUCCHESINI, M.; MONTEFORTI, G.; MENSUALI-SODI, A.; SERRA, G. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions, **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 2, p. 161-168, 2006.
- LÜTTGE, U. Ability of crassulacean acid metabolism plants to overcome interacting stresses in tropical environments, **AoB PLANTS**, v. 2010, plq005, 2010.
- MARTINS, J. P. R.; VERDOODT, V.; PASQUAL, M.; De PROFT, M. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae), **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 123, p. 121-132, 2015.
- MATTOS, E. A.; HERZOG, B.; LÜTTGE, U. Chlorophyll fluorescence during CAM-phases in *Clusia minor* L. under drought stress, **Journal of Experimental Botany**, v. 331, p. 253-261, 1999.
- MEHTA, P.; JAOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 16-20, 2010.
- ORLOV, N. M.; VIKTOROVA, V. A.; ESKOV, A. K. CAM (Crassulacean Acid Metabolism) photosynthesis in vascular epiphytes, **Biology Bulletin Reviews**, v. 12, n. 5, p. 527-543, 2022.
- R Core Team (v. 4.3.1). R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023.
- RAO, M. V.; PALIYATH, G.; ORMROD, D. P. Ultraviolet-B and Ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*, **Plant Physiology**, v. 110, p. 125-136, 1996.
- REITER, N.; WHITFIELD, J.; POLLARD, G.; BEDGGOOD, W.; ARGALL, M.; DIXON, K.; DAVIS, B.; SWARTS, N. Orchid re-introductions: an evaluation of success and ecological considerations using key comparative studies from Australia, **Plant Ecology**, v. 217, p. 81-95, 2016.
- SALÉ, M. M.; PEREIRA, A. S.; LANGE, H.; NEUTZLING, C.; SANTOS, P. M.; SCHIEDECK, G.; DORNELES, A. O. S. Carbonized rice husk as an alternative substrate for *Ocimum basilicum* L. seedling production, **Acta Agronómica**, v. 70, n. 1, p. 93-100, 2021.

- SEENI, S.; LATHA, P. G. *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 1-8, 2000.
- SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system, **Revista Ceres (Viçosa)**, v. 61, n. 6, p. 883-890, 2014.
- SILVA, K. G.; SILVA, E. A.; FERREIRA, M. L.; KANASHIRO, S.; CAMARGO, P. B.; TAVARES, A. R. Gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence parameters of ornamental bromeliads, **Ornamental Horticulture (Campinas)**, v. 23, n. 4, p. 400-406, 2017.
- SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: A review, **Reviews in Environmental Sciences and Bio/Technology**, v. 14, n. 3, p. 407-426, 2015.
- SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; BRAGA, F. T. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations, **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 4, p. 413-421, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**, 6ª edição, editora Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2017.
- TERRA, S. B.; FERREIRA, A. A. F.; PEIL, R. M. N.; STUMPF, E. R. T.; BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; CAVALCANTE, I. H. L. Alternative substrates for growth and production of potted chrysanthemum (cv. Funny), **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 465-471, 2011.
- WANG, Y.; WANG, H.; YE, C.; WANG, Z.; MA, C.; LIN, D.; JIN, X. Progress in systematics and biogeography of Orchidaceae, **Plant Diversity**, v. 46, p. 425-434, 2024.
- YAM, T. W.; CHUA, J.; TAY, F.; ANG, P. Conservation of the native orchids through seedling culture and reintroduction – a Singapore experience, **The Botanical Review**, v. 76, p. 263-274, 2010.
- YOUNIS, A.; AHSAN, M.; AKRAM, A.; LIM, K. B.; ZULFIQAR, F.; TARIQ, U. Chapter 9: Use of organic substrates in sustainable horticulture *in* HASANUZZAMAN, M.; HAWRYLAK-NOWAK, B.; ISLAM, T.; FUJITA, M. (eds) **Biostimulants for Crop Production and Sustainable Agriculture**, CAB International, Boston, USA, 2022.
- ZANDONÁ, A. P.; FARIA, R. T.; LONE, A. B.; HOSHINO, R. T. Alternative substrates to the acclimatization of *Arundina graminifolia* ‘Alba’ (Orchidaceae), **Ornamental Horticulture (Campinas)**, v. 20, n. 1, p. 7-12, 2014.
- ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T.; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. 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.; YANG, Y.; LI, J.; QIN, J.; ZHANG, W.; HUANG, W.; HU, H. Physiological diversity of orchids, **Plant Diversity**, v. 40, p. 196-208, 2018.
- ZHANG, W.; QIN, J.; LIAO, Q. C.; ZHOU, Y.; FU, X. W.; HU, Z. H.; HU, H.; XU, G. G.; GAO, T. Y.; ZHANG, S. B. Reintroduction of an epiphytic orchid: Plant size matters, **Global Ecology and Conservation**, v. 58, e03496, 2025.
- ZOBAYED, S. M. A. Chapter 9: Ventilation in micropropagation *in* KOZAI, T.; AFREEN, F. F.; ZOBAYED, S. M. A. (eds) **Photoautotrophic (sugar-free medium)**

micropropagation as a new micropropagation and transplant production system,
Springer Science & Business Media, New York, USA, 2005.

13 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Esse trabalho relata os primeiros estudos morfoanatômicos e fisiológicos da orquídea terrestre *Eltroplectris paranaënsis*. Durante a germinação *in vitro*, foi apontada a sensibilidade da espécie à elevadas concentrações salinas e preferência de uso de formas orgânicas de nitrogênio. Foi realizada a caracterização morfoanatômica dos estágios de germinação da espécie, com especial destaque para o rápido acúmulo de amido no tecido dos protocormos, presença de numerosas ráfides e desenvolvimento do velame biestratificado. Nas fases de desenvolvimento, o padrão de crescimento correspondente à ocupação de nicho de solos rasos foi apresentado e discutido. Recomenda-se estabelecer novos experimentos explorando a relação da espécie com o aporte de nutrientes, principalmente acerca do nitrogênio orgânico e inorgânico, visando ampliar o conhecimento sobre as necessidades nutricionais das orquídeas terrestres Neotropicais.

As plantas foram altamente responsivas à suplementação de glutamina no meio de cultura, porém prejudicadas pelo cultivo com ventilação natural. Esses dados também trazem luz sobre a forma com que a espécie interage com seu ambiente natural, no qual a alta umidade relativa do ar e baixa disponibilidade de compostos inorgânicos provavelmente tornaram a espécie muito sensível ao estresse osmótico. Apesar disso, *E. paranaënsis* demonstrou boa capacidade de superação do estresse, com sobrevivência quase total das plantas aclimatizadas.

As análises de fotossíntese, tanto durante o cultivo *in vitro* quanto *ex vitro*, apontaram para a possibilidade de *E. paranaënsis* realizar o sistema CAM. Novos estudos nesse sentido deverão ser realizados para melhor compreender a atividade fotossintética da espécie e a sua relação com a superação do estresse osmótico e evolução do grupo dentro de Spiranthinae.

Finalmente, esse trabalho acompanhou o ciclo de vida de *E. paranaënsis*, da semente à semente. O planejamento para a reintrodução das mudas no local de origem da espécie está sendo realizado e, se obtidas as autorizações dos órgãos competentes, será em breve realizada, com monitoramento da sobrevivência e estabelecimento das plantas nos anos subsequentes, a fim de efetivamente implementar uma estratégia de preservação dessa rara orquídea da flora do Paraná.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTA, R. C.; BARROS, F.; SAJO, M. G. Root and leaf anatomy of some terrestrial representatives of the Cranichidae tribe (Orchidaceae), **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 367-378, 2015.
- ANJOS, J. S.; STEFANELLO, C. A.; VIEIRA, L. N.; POLES, L. G.; GUERRA, M. P.; FRAGA, H. P. F. The cytokinin 6-Benzilaminopurine improves the formation and development of *Dryadella zebrina* (Orchidaceae) *in vitro* shoots, **Brazilian Journal of Botany**, v. 44, p. 811-819, 2021.
- ARCIDIACONO, M.; CATALANO, C.; MOTISI, A.; SAJEVA, M.; CARIMI, F.; CARRA, A. Influence of culture conditions on *in vitro* asymbiotic germination of *Anacamptis longicornu* and *Ophrys panormitana* (Orchidaceae), **Plants**, v. 10, e2543, 2021.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview, **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.
- ASKARI, N. Evaluation of sucrose benefits to tuberization in ‘Sante’ potato cultivar *in vitro*, **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 11, n. 4, p. 437-444, 2024.
- AZEVEDO NETO, A. D.; PEREIRA, P. P. A.; COSTA, D. P.; SANTOS, A. C. C. Fluorescência da clorofila como uma ferramenta possível para seleção de tolerância à salinidade em girassol, **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 893-897, 2011.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 23-58, 2005.
- BONA, C.; ENGELS, M. E.; PIECZAK, F. S.; SMIDT, E. C. Comparative vegetative anatomy of Neotropical Goodyerinae Klotzsch (Orchidaceae Juss.: Orchidoideae Lindl.), **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, n. 3, p. 530-539, 2020.
- BONE, R. E.; SMITH, J. A. C.; ARRIGO, N.; BUERKI, S. A macro-ecological perspective on crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis evolution in Afro-Madagascan drylands: Eulophiinae orchids as a case study, **New Phytologist**, v. 208, p. 469-481, 2015.
- CARDOSO, J. C.; ZANELLO, C. A.; CHEN, J. T. An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, e985, 2020.
- CAZETTA, J. O.; SEEBAUER, J. R.; BELOW, F. E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels, **Annals of Botany**, v. 84, n. 6, p. 747-754, 1999.
- CONRADO-GARCIA, D.; CANO-SOSA, J.; NORIEGA-TREJO, R.; GONGORACHIN, R.; RAMOS-DIAZ, A. L. Establishment of a protocol of asymbiotic germination of *Bletia purpurea* (Lam.) A. DC., **Journal of Bioengineering and Biomedicine Research**, v. 3, n. 1, p. 6-11, 2019.
- CORREDOR, B. A. D.; ARIAS, R. L. Morfoanatomía en Cranichideae (Orchidaceae) de la estación Loma Redonda del Parque Nacional “Sierra Nevada”, Mérida, Venezuela, **Lankesteriana**, v. 12, n. 1, p. 61-75, 2012.

- DEBELJAK, N.; REGVAR, M.; DIXON, K. W.; SIVASITHAMPARAM, K. Induction of tuberisation *in vitro* with jasmonic acid and sucrose in an Australian terrestrial orchid, *Pterostylis sanguinea*, **Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 253-260, 2002.
- DESJARDINS, Y.; DUBUC, J. F.; BADR, A. *In vitro* culture of plants: A stressful activity! **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 29-50, 2009.
- DIANTINA, S., KARTIKANINGRUM, S., MCCORMIK, A.C., MILLNER, J., MCGILL, C., PRITCHARD, H.W., NADARAJAN, J. Comparative *in vitro* seed germination and seedling development in tropical and temperate epiphytic and temperate terrestrial orchids, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 143, n. 3, p. 619-633, 2020.
- DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, v. 26 (1-2), p. 155-158, 2005.
- DULIĆ, J.; LJUBOJEVIĆ, M.; OGNJANOV, V.; BARAĆ, G.; DULIĆ, T. *In vitro* germination and seedling development of two European orchid species, *Himantoglossum jankae* Somlyay, Kreutz & Óvári and *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall., **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 55, p. 380-391, 2019.
- DUTRA, D.; JOHNSON, T. R.; KAUTH, P. J.; STEWART, S. L.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. 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.
- ENGELS, M. E.; SILVA-PEREIRA, V., SMIDT, E. C. *Eltroplectris paranaënsis*: a new species of Spiranthinae (Orchidaceae) from the nebular Atlantic Rain Florest, **Phytotaxa**, v. 609, n. 2, p. 115-123, 2023.
- ENGELS, M. E.; SMIDT, E. C. Notes of taxonomy and nomenclature of *Pelexia pauciflora* (Orchidaceae) in ENGELS, M. E. Estudos taxonômicos da subtribo Goodyerinae (Orchidaceae: Orchidoideae) no Brasil. Tese (Doutorado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2025.
- FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A.; FELIX, L. P.; MOLINA, W. F. Negligence in the Atlantic Forest, northern Brazil: a case study of an endangered orchid, **Biodiversity Conservation**, v. 26, p. 1047-1063, 2017.
- FARIA, R. T.; STEGANI, V.; BERTONCELLI, D. J.; ALVES, G. A. C.; ASSIS, A. M. Substrates for the cultivation of epiphytic orchids, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 2851-2866, 2018.
- FERRAZ, J. R.; MOLINA, J. M. P.; HASSEMER, G.; RIBEIRO, J. E. L. S. An annotated checklist of the endemic flowering plants of Paraná, southern Brazil, **Phytotaxa**, v. 685, n. 1, p. 1-62, 2025.
- FERREIRA, A. L.; COUTINHO, B. R.; PINHEIRO, H. T.; THOMAZ, L. D. Composição florística e formações vegetais da Ilha dos Franceses, Espírito Santo, **Boletim do Museu Biológico Mello Leitão**, v. 22, p. 25-44, 2007.
- FERREIRA, W. M.; OLIVEIRA, S. P.; SUZUKI, R. M.; SILVA, K. L. F.; SOARES JÚNIOR, J. W. P. Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*, **Rodriguésia**, v. 69, n. 4, p. 2137-2151, 2018.
- FORTINI, E. A.; BATISTA, D. S.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; FELIPE, S. H. S.; CORREIA, L. N. F.; CHAGAS, K.; SILVA, P. O.; ROCHA, D. I.; OTONI, V. C. Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of

flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, p. 593-605, 2021.

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.

GALE, S. W.; FISCHER, G. A.; CRIBB, P. J.; FAY, M. F. Orchid conservation: bridging the gap between science and practice, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 186, p. 425-434, 2018.

GODO, T.; KOMORI, M.; NAKAOKI, E.; YUKAWA, T.; MIYOSHI, K. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*, **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 323-328, 2010.

GONÇALVES, A. Z.; LATANSIO, S.; DETMANN, K. C.; MARABESI, M. A.; NETO, A. A. C.; AIDAR, M. P. M.; Da MATTA, F. M.; MERCIER, H. What does the RuBisCO activity tell us about a C₃-CAM plant?, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 147, p. 172-180, 2020.

GUIMARÃES, L. R. S. *Eltroplectris* in Flora e Funga do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB630919> Acesso em: 01 jan. 2024.

HAMASAKI, R. M.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*, **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 4, pp. 383-389, 2005.

HAN, M.; XU, M.; WANG, S.; WU, L.; SUN, S.; SU, T. Effects of exogenous L-Glutamine as a sole nitrogen source on physiological characteristics and nitrogen use efficiency of poplar, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 172, p. 1-13, 2022.

HAROUN, S. A.; SHUKRY, W. M.; EL-SAWY, O. Effect of asparagine or glutamine on growth and metabolic changes in *Phaseolus vulgaris* under *in vitro* conditions, **Bioscience Research**, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2010.

HARPER, J. L. The meaning of rarity. In: SYNGE, H. (eds) **The Biological Aspects of Rare Plant Conservation**, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 1981.

HENRICH, J. E.; STIMART, D. P.; ASCHER, P. D. Terrestrial orchid seed germination *in vitro* on a defined medium, **Journal of the American Society of Horticultural Sciences**, v. 106, n. 2, p. 193-196, 1981.

HERR, J. M. New uses for calcium chloride solution as mounting medium, **Biotechnic & Histochemistry**, v. 67, n. 1, p. 9-13, 1992.

HERRERA, A. Crassulacean acid metabolism and fitness under water stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM for? **Annals of Botany**, v. 103, p. 645-653, 2009.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans, **Plant Growth Regulation**, v. 60, p. 143-150, 2010.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**, McGraw-Hill Publishing Company, London, UK, 1940.

- JOLMAN, D.; BATALLA, M. I.; HUNGERFORD, A.; NORWOOD, P., TAIT, N.; WALLACE, L. E. The challenges of growing orchids from seeds for conservation: An assessment of asymbiotic techniques, **Applications in Plant Sciences**, v. 10, n. 5, e11496, 2022.
- KAN, C. C.; CHUNG, T. Y.; JUO, Y. A.; HSIEH, M. H. Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots, **BMC Genomics**, v. 16, 731, 2015.
- KAUTH, P. J.; DUTRA, D.; JOHNSON, T. R.; STEWART, S. L.; KANE, M. E.; VENDRAME, W. Chapter 38: Techniques and Applications of *In Vitro* Orchid Seed Germination in Floriculture, **Ornamental and Plant Biotechnology**, Volume V, Global Science Books, UK, p. 375-391, 2008.
- KOENE, F. M.; AMANO, E.; 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.
- KOENE, F. M.; AMANO, E.; SMIDT, E. C.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic germination and morphological studies of seeds of Atlantic Rainforest micro-orchids (Pleurothallidinae), **PLoS ONE**, v. 15, n° 12, e0243297, 2020.
- KRAUS, J. E.; SOUSA, H. C.; REZENDE, M. H.; CASTRO, N. M.; VECCHI, C.; LUQUE, R. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials, **Biotechnic & Histochemistry**, v. 73, n. 5, p. 235-243, 1998.
- LIAO, Y. Z.; CHEN, J. J. **Asymbiotic seed germination of *Paphiopedilum* in *Paphiopedilum* in Taiwan IV**, editora Taiwan *Paphiopedilum* Society, Taiwan, 2006.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, **Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society**, v. 30, n. 5, p. 421-427, 1980.
- LO, S.F., NALAWADE, S.M., KUO, C.L., CHEN, C.L., TSAY, H.S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid, **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 528-535, 2004.
- LONG, B.; NIEMIERA, A. X.; CHENG, Z.; LONG, C. *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae), **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 101, p. 151-162, 2010.
- LUCCHESINI, M.; MONTEFORTI, G.; MENSUALI-SODI, A.; SERRA, G. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions, **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 2, p. 161-168, 2006.
- LÜTTGE, U. Ability of crassulacean acid metabolism plants to overcome interacting stresses in tropical environments, **AoB PLANTS**, v. 2010, plq005, 2010.
- MAGRINI, S.; DE CARLI, A.; ONOFRI, S.; SCOPPOLA, A. A comparative study of the seed germination capabilities of *Anacamptis palustris* (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid, and other more common *Anacamptis* species, by asymbiotic culture *in vitro*, **European Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 71-79, 2011.

- MAGRINI, S.; DE VITIS, M.; TORELLI, D.; SANTI, L.; ZUCCONI, L. Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage, **Plant Biology**, v. 21, p. 544-550, 2019.
- MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G. B.; NIEVOLA, C. C.; SUZUKI, R. M. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources, **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 195-206, 2000.
- MANI, M.; RASANGAM, L.; SELVAM, P.; SHEKHAWAT, M. S. Micro-morpho-anatomical mechanisms involved 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.
- MANTOVANI, C.; PRADO, R. M.; PIVETTA, K. F. L. Impact of nitrate and ammonium ratio on nutrition and growth of two epiphytic orchids, **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, n. 4, p. 3423-3431, 2018.
- MARTINS, J. P. R.; VERDOODT, V.; PASQUAL, M.; De PROFT, M. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae), **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 123, p. 121-132, 2015.
- MATTOS, E. A.; HERZOG, B.; LÜTTGE, U. Chlorophyll fluoresce during CAM-phases in *Clusia minor* L. under drought stress, **Journal of Experimental Botany**, v. 331, p. 253-261, 1999.
- 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 Brasílica**, v. 22, n. 2, p. 323-332, 2008.
- MEAD, J. W.; BULARD, C. Vitamins and Nitrogen requirements of *Orchis laxiflora*, **New Phytologist**, v. 83, p. 129-136, 1979.
- MEHTA, P.; JAOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 16-20, 2010.
- MELO FERREIRA, W.; VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. C. N.; OLIVEIRA, H. R.; SUZUKI, R. M. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators, **Iheringia, Série Botânica**, v. 72, n. 1, p. 57-65, 2017.
- MICHEL, E. E. Asymbiotic propagation of tropical terrestrial orchid species in CLARK, J.; ELLIOT, W. M.; TINGLEY, G.; BIRO, J. (eds) **Proceedings of the 16th World Orchid Conference**, Vancouver Orchid Society, Vancouver, Canada, 2002.
- MILLNER, H. J.; OBENG, A.; MCCREA, A. R.; BALDWIN, T. C. Axenic seed germination and *in vitro* seedling development of *Restrepia brachypus* (Orchidaceae), **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 135 (4), p. 497-505, 2008.
- MOHAMED, A. E.; GIRGIS, N. D. Factors affecting *in vitro* tuberization of potato, **Bulletin of the National Research Centre**, v. 47, n. 80, 2023.
- MÜLLER, D. B.; KANASHIRO, S.; JOCYS, T.; TAVARES, A. R. Nitrogen uptake by ornamental bromeliad during atmospheric and tank developmental stages, **IDESIA (Chile)**, v. 38, n. 1, p. 105-111, 2020.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NOROOZLO, Y. A.; SOURI, M. K.; DELSHAD, M. Effects of foliar application of glycine and glutamine amino acids on growth and quality of sweet basil, **Advances in Horticultural Science**, v. 33, n. 4, p. 495-501, 2019a.
- NOROOZLO, Y. A.; SOURI, M. K.; DELSHAD, M. Stimulation effects of foliar applied glycine and glutamine amino acids on lettuce growth, **Open Agriculture**, v. 4, p. 164-172, 2019b.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O, **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 367-373, 1964.
- ORLOV, N. M.; VIKTOROVA, V. A.; ESKOV, A. K. CAM (Crassulacean Acid Metabolism) photosynthesis in vascular epiphytes, **Biology Bulletin Reviews**, v. 12, n. 5, p. 527-543, 2022.
- PAIVA, E. A. S. Are calcium oxalate crystals a dynamic calcium store in plants? **New Phytologist**, v. 223, p. 1707-1711, 2019.
- PAIVA NETO, V. B.; CORREA, A. P. M.; BARROS, F.; PADILHA, D. R. C.; BORGES, M. C. R. Z. The *Bletia catenulata* ornamental orchid is self-compatible but pollinator-dependent for reproduction, **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, p. 473-479, 2015.
- PANSARIN, E. R.; FERREIRA, A. W. C. Butterfly pollination in *Pteroglossa* (Orchidaceae, Orchidoideae): a comparative study on the reproductive biology of two species of a Neotropical genus of Spiranthinae, **Journal of Plant Research**, v. 128, p. 459-468, 2015.
- PEREIRA, G.; ALBORNOZ, V.; MUÑOZ-TAPIA, L.; ROMERO, C.; ATALA, C. Asymbiotic germination of *Bipinnula fimbriata* (Orchidaceae) seeds in different culture media, **Seed Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 1-11, 2015.
- PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: An overview, **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 55, p. 242-257, 2019.
- PHILLIPS, R. D.; BARRETT, M. D.; DIXON, K. W.; HOPPER, S. D. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? **Journal of Ecology**, v. 99, p. 858-869, 2011a.
- PHILLIPS, R. D.; BROWN, A. P.; DIXON, K. W.; HOPPER, S. D. Orchid biogeography and factors associated with rarity in a biodiversity hotspot, the Southwest Australian Floristic Region, **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 3, p. 487-501, 2011b.
- R Core Team (v. 4.3.1). R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023.
- RAGHAVAN, V.; TORREY, J. G. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid *Cattleya*, **American Journal of Botany**, v. 51, n. 3, p. 264-274, 1964.
- RAO, M. V.; PALIYATH, G.; ORMROD, D. P. Ultraviolet-B and Ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*, **Plant Physiology**, v. 110, p. 125-136, 1996.
- RASMUSSEN, H. N.; DIXON, K. W.; JERSÁKOVÁ, J.; TĚŠITELOVÁ, T. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements, **Annals of Botany**, v. 116, p. 391-402, 2015.

- RASMUSSEN, H. N.; WHIGHAM, D. F. Seed ecology of dust seeds *in situ*: A new study technique and its application in terrestrial orchids, **American Journal of Botany**, v. 80, n. 12, p. 1374-1378, 1993.
- REITER, N.; WHITFIELD, J.; POLLARD, G.; BEDGGOOD, W.; ARGALL, M.; DIXON, K.; DAVIS, B.; SWARTS, N. Orchid re-introductions: an evaluation of success and ecological considerations using key comparative studies from Australia, **Plant Ecology**, v. 217, p. 81-95, 2016.
- ROCHA, A. E. S.; AFONSO, E. L. *Eltroplectris guimaraesii* (Spiranthinae, Orchidoideae, Orchidaceae), nova espécie para a Amazônia brasileira, **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 17, n. 2, p. 283-288, 2022.
- RUBLUO, A.; CHÁVEZ, V.; MARTÍNEZ, A. *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat, **Lindleyana**, v. 4, n. 2, p. 68-73, 1989.
- SALAZAR, G. A.; BATISTA, J. A. N.; CABRERA, L. I.; VAN DEN BERG, C.; WHITTEN, W. M.; SMIDT, E. C.; BUZATTO, C. R.; SINGER, R. B.; GERLACH, G.; JIMÉNEZ-MACHORRO, R.; RADINS, J. A.; INSAURRALDE, I. S.; GUIMARÃES, L. R. S.; BARROS, F.; TOBAR, F.; LINARES, J. L.; MÚJICA, E.; DRESSLER, R. L.; BLANCO, M. A.; HÁGSATER, E.; CHASE, M. W. Phylogenetic systematics of subtribe Spiranthinae (Orchidaceae: Orchidoideae: Cranichideae) based on nuclear and plastid DNA sequences of a nearly complete generic sample, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 186, p. 273-303, 2018.
- SALÉ, M. M.; PEREIRA, A. S.; LANGE, H.; NEUTZLING, C.; SANTOS, P. M.; SCHIEDECK, G.; DORNELES, A. O. S. Carbonized rice husk as an alternative substrate for *Ocimum basilicum* L. seedling production, **Acta Agronômica**, v. 70, n. 1, p. 93-100, 2021.
- SAMIEI, L.; PAHNEHKOLAYI, M. D.; TEHRANIFAR, A.; KARIMIAN, Z. Organic and inorganic elicitors enhance *in vitro* regeneration of *Rosa canina*, **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 60, 2021.
- SANDOVAL REYES, J. B.; AGUILAR MORALES, M. A.; de la CRUZ OLVERA, A.; LAGUNA CERDA, A.; CRUZ MONTERROSA, R. G.; DIAZ RAMÍREZ, M.; JIMÉNEZ GUZMÁN, J.; GARCÍA GARIBAY, M.; MARTÍNEZ GARCÍA, C. G.; RAYAS AMOR, A. A. Seed analysis of *Dichromanthus aurantiacus*, terrestrial orchid from Toluca Valley, Mexico, **Agroproductividad**, v. 13, n. 10, p. 113-118, 2020.
- SANTOS, I. S.; SILVA, M. J. Anatomy and histochemistry of the vegetative system of *Brachystele guayanensis* (Lindl.) Schltr. (Orchidaceae), a potential medicinal species, **Plants**, v. 12, 2635, 2023.
- SANTOS, S. A.; SMIDT, E. C.; PADIAL, A. A.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Brasiliorchis picta*, **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n° 6, p. 134-144, 2016.
- SASAMORI, M. H.; ENDRES-JÚNIOR, D.; DROSTE, A. Asymbiotic culture of *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae): the influence of macronutrient salts and sucrose concentrations on survival and development of plantlets, **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, n. 3, p. 292-298, 2015.
- SEENI, S.; LATHA, P. G. *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 1-8, 2000.

SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system, **Revista Ceres (Viçosa)**, v. 61, n. 6, p. 883-890, 2014.

SILVA, K. G.; SILVA, E. A.; FERREIRA, M. L.; KANASHIRO, S.; CAMARGO, P. B.; TAVARES, A. R. Gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence parameters of ornamental bromeliads, **Ornamental Horticulture (Campinas)**, v. 23, n. 4, p. 400-406, 2017.

SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: A review, **Reviews in Environmental Sciences and Bio/Technology**, v. 14, n. 3, p. 407-426, 2015.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; BRAGA, F. T. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations, **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 4, p. 413-421, 2012.

STERN, W. L.; ALDRICH, H. C.; McDOWELL, L. M.; MORRIS, M. W.; PRIDGEON, A. M. Amyloplasts from the cortical root cells of Spiranthoideae (Orchidaceae), **Protoplasma**, v. 172, p. 49-55, 1993.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 147-158, 2006.

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

SWARTS, N. D.; SINCLAIR, E. A.; FRANCIS, A.; DIXON, K. W. Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid, **Molecular Biology**, v. 19, p. 3226-3242, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**, 6ª edição, editora Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2017.

TERRA, S. B.; FERREIRA, A. A. F.; PEIL, R. M. N.; STUMPF, E. R. T.; BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; CAVALCANTE, I. H. L. Alternative substrates for growth and production of potted chrysanthemum (cv. Funny), **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 465-471, 2011.

THOMPSON, D. I.; EDWARDS, T. J.; van STADEN, J. Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability *in vitro*: relationships, requirements and first-time records, **Plant Growth Regulation**, v. 49, p. 269-284, 2006.

UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S. Organic Compounds: Contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids, **International Journal of Agronomy**, e2795108, 2020.

VAN WAES, J. M.; DEBERGH, P. C. *In vitro* germination of some Western European orchids, **Physiologia Plantarum**, v. 67, p. 253-261, 1986.

VUDALA, S. M.; RIBAS, L. L. F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae), **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 1-8, 2017.

WANG, Y.; WANG, H.; YE, C.; WANG, Z.; MA, C.; LIN, D.; JIN, X. Progress in systematics and biogeography of Orchidaceae, **Plant Diversity**, v. 46, p. 425-434, 2024.

WANG, W.; WU, X.; HU, K.; LIU, J.; TAO, J. Understorey fine root mass and morphology in the litter and upper soil layers of three Chinese subtropical forests, **Plant Soil**, v. 406, p. 219-230, 2016.

WRAITH, J.; NORMAN, P.; PICKERING, C. Orchid conservation and research: An analysis of gaps and priorities for globally Red Listed species, **Ambio**, v. 49, p. 1601-1611, 2020.

YAM, T. W.; CHUA, J.; TAY, F.; ANG, P. Conservation of the native orchids through seedling culture and reintroduction – a Singapore experience, **The Botanical Review**, v. 76, p. 263-274, 2010.

YOUNIS, A.; AHSAN, M.; AKRAM, A.; LIM, K. B.; ZULFIQAR, F.; TARIQ, U. Chapter 9: Use of organic substrates in sustainable horticulture *in* HASANUZZAMAN, M.; HAWRYLAK-NOWAK, B.; ISLAM, T.; FUJITA, M. (eds) **Biostimulants for Crop Production and Sustainable Agriculture**, CAB International, Boston, USA, 2022.

ZANDONÁ, A. P.; FARIA, R. T.; LONE, A. B.; HOSHINO, R. T. Alternative substrates to the acclimatization of *Arundina graminifolia* ‘Alba’ (Orchidaceae), **Ornamental Horticulture (Campinas)**, v. 20, n. 1, p. 7-12, 2014.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T.; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. 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.; YANG, Y.; LI, J.; QIN, J.; ZHANG, W.; HUANG, W.; HU, H. Physiological diversity of orchids, **Plant Diversity**, v. 40, p. 196-208, 2018.

ZHANG, W.; QIN, J.; LIAO, Q. C.; ZHOU, Y.; FU, X. W.; HU, Z. H.; HU, H.; XU, G. G.; GAO, T. Y.; ZHANG, S. B. Reintroduction of an epiphytic orchid: Plant size matters, **Global Ecology and Conservation**, v. 58, e03496, 2025.

ZENG, S.; HUANG, W.; WU, K.; ZHANG, J.; SILVA, J. A. T.; DUAN, J. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids, **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 521-534, 2016.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T.; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid, **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 198-209, 2012.

ZHOU, Q.; JIANG, D.; DAI, T.; JING, Q.; CAO, W. Regulation of starch and protein synthesis in wheat grains by feeding sucrose and glutamine to detached ears cultured *in vitro*, **Plant Growth Regulation**, v. 48, p. 247-259, 2006.

ZOBAYED, S. M. A. Chapter 9: Ventilation in micropropagation *in* KOZAI, T.; AFREEN, F. F.; ZOBAYED, S. M. A. (eds) **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**, Springer Science & Business Media, New York, USA, 2005.