

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLARISSA ALVES STEFANELLO

GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Pabstiella leucopyramis*
(ORCHIDACEAE: PLEUROTHALLIDINAE), UMA MICRO-ORQUÍDEA
ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA

CURITIBA

2023

CLARISSA ALVES STEFANELLO

GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Pabstiella leucopyramis*
(ORCHIDACEAE: PLEUROTHALLIDINAE), UMA MICRO-ORQUÍDEA
ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA

Monografia apresentada ao curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga

CURITIBA

2023

À menina de oito anos que, abrindo uma flor de hibisco, decidiu que seria bióloga.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de me formar naquilo que sempre quis cursar.

À todo o corpo docente do curso de Ciências Biológicas, pelas aulas enriquecedoras, pelo compromisso e todo o conhecimento compartilhado. Agradeço particularmente aos professores e às professoras do Departamento de Botânica, em especial aos professores Renato Goldenberg e Paulo Labiak, por alimentarem ainda mais minha paixão pelas plantas.

Ao orquidófilo e cultivador Sr. Marcos Klingelfus, por gentilmente ceder o material vegetal e, conseqüentemente, possibilitar que esse trabalho fosse realizado.

À minha família, por todo o apoio ao longo desses anos. A minha trajetória começou com vocês, e foi enriquecida por vocês em cada conversa.

Às minhas amigas e amigos, pela companhia e paciência em me ouvirem falar (e muito) das minhas plantas.

Às professoras Leila Vieira e Luciana Ribas, pelos conselhos e sugestões, e por sempre conversarem comigo sobre as plantas. Agradeço também à professora Erika Amano por disponibilizar seu laboratório para as análises anatômicas.

À todo o pessoal do Laboratório de Micropropagação Vegetal. Obrigada por cada conversa e idéia trocada, pela simples presença e acolhimento. Agradeço muito à Jackeline, que esteve junto nas minhas primeiras semanas no laboratório. Também agradeço em especial à Juliana, pela grande ajuda e pela amizade. À Kathleen, à Brenda, à Suelen, à Vitória, à Mavi e ao Rhuann, que me acompanharam nessa jornada ao longo de tantos dias e noites no laboratório. Obrigada por tudo!

Por fim, meu maior agradecimento é ao meu orientador. Obrigada por me apresentar o universo das micro-orquídeas, pelas quais me apaixonei, e que com certeza irão me acompanhar para o resto da vida. Obrigada pelo diálogo, pela presença, pela compreensão e por me ajudar a crescer como pesquisadora. O senhor é o melhor orientador que eu poderia ter.

RESUMO

A Mata Atlântica abriga 52% das orquídeas brasileiras, porém tem sido alvo de exploração insustentável por séculos. A redução desse bioma pelo desmatamento impacta as populações de orquídeas devido à perda de forófitos e imposição de maiores dificuldades de interação das plantas com polinizadores e micobiontes, o que pode levar à erosão das populações naturais e consequente extinção local de uma espécie. *Pleurothallidinae* Lindl. (Epidendroideae: Epidendreae) é a maior subtribo de micro-orquídeas habitando os Neotrópicos, sendo também a mais diversa. A espécie *Pabstiella leucopyramis* é uma micro-orquídea epífita endêmica da Mata Atlântica, em potencial risco de extinção. Uma estratégia de conservação *ex situ* é a micropropagação *in vitro*, a qual permite produção de plantas em larga escala a partir de pouco material vegetal. Desse modo, esse trabalho buscou avaliar a eficiência de duas composições distintas de meios de cultura sobre a germinação *in vitro* de *P. leucopyramis*, sendo elas WPM e MS/2, e caracterizar e comparar o desenvolvimento das plântulas germinadas, em diferentes condições de cultivo. Para a germinação, foi utilizada uma cápsula madura obtida por autopolinização, a qual foi aberta em ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar. As sementes foram removidas e suspensas em água destilada, sendo inoculado 1 mL de solução em cada placa de Petri. Os estádios de germinação foram avaliados a cada 30 dias por quatro meses. O melhor resultado de germinação e recuperação de plântulas se deu no meio de cultura WPM, com 97,72% de taxa de germinação e 69,88% de taxa de conversão em plântulas. As plântulas seguiram para dois experimentos de desenvolvimento, com suplementação de glutamina, nas concentrações 0 mM, 6,8 mM ou 13,6 mM, ou de 6-benzilaminopurina (BAP), nas concentrações 0 µM, 3 µM, 6 µM ou 9 µM, ao meio de cultura WPM. A suplementação com 6,8 mM de glutamina provocou aumento na média do número de raízes por indivíduo ($m = 6$), em relação aos outros tratamentos. No experimento com suplementação de BAP, foi observada redução nas médias de número e comprimento das raízes em todos os tratamentos suplementados com a citocinina. No entanto, não houve diferença significativa quanto aos números médios de folhas e brotações. A anatomia radicular e foliar de *P. leucopyramis* foi estudada e alterações provocadas pela presença de glutamina no meio de cultura foram apresentadas. A concentração de 13,6 mM de glutamina promoveu a organização dos feixes vasculares das raízes. Foi observada mudança de forma progressiva nas folhas, acompanhada pela redução da espessura do parênquima aquífero. Em conclusão, recomenda-se que o meio WPM seja utilizado para a germinação e desenvolvimento de *P. leucopyramis*, e que a glutamina pode ser suplementada ao meio de cultura a depender do objetivo do estudo. Por fim, é reforçada a importância dos estudos anatômicos para devido conhecimento do estado de desenvolvimento das culturas *in vitro*.

Palavras-chave: Micropropagação. Anatomia. Glutamina. 6-benzilaminopurina.

ABSTRACT

The Atlantic Rainforest holds 52% of Brazilian orchids, yet it has been the target of unsustainable exploitation for centuries. The reduction of this biome through deforestation impacts orchids' populations due loss of phorophytes and imposition of major difficulties for interactions between plants, their pollinators and micobionts, which might lead to the erosion of natural populations and consequent local extinction of a species. Pleurothallidinae Lindl. (Epidendroideae: Epidendreae) is the largest subtribe of micro-orchids inhabiting the Neotropics, also being the most diverse. The species *Pabstiella leucopyramis* is an epiphytic micro-orchid endemic to the Atlantic Rainforest, in potential risk of extinction. A strategy of *ex vitro* conservation is the *in vitro* micropropagation, which enables large-scale production of plants from little plant material. In this sense, this work aimed to evaluate the efficiency of two distinct compositions of culture media upon *in vitro* germination of *P. leucopyramis*, these being WPM and MS/2, and characterize and compare the development of germinated plantlets, under different culture conditions. For the germination, a mature capsule obtained from self-pollination was used, opened in aseptic air laminar flow chamber. Seeds were removed and suspended in distilled water, and 1 mL of solution was inoculated in each Petri dish. Germination stages were evaluated every 30 days for four months. The greatest results of germination and plant recovery were obtained on WPM culture medium, with a rate of germination of 97.72% and a rate of conversion into plantlets of 69.88%. The plantlets proceeded for two development experiments, with the supplementation of glutamine, in the concentrations of 0 mM, 6.8 mM or 13.6 mM, or 6-benzilaminopurine (BAP), in the concentrations of 0 μ M, 3 μ M, 6 μ M or 9 μ M, into WPM culture medium, at different concentrations. The supplementation of 6.8 mM glutamine promoted an increase in the mean number of roots per individual ($m = 6$), in relation to other treatments. Within the experiment with BAP supplementation, it was observed a decrease in the mean number and length of roots in all treatments supplied with the cytokinin. However, there were no significant differences in the mean numbers of leaves and sprouts. *P. leucopyramis* root and leaf anatomy were studied and alterations caused by the presence of glutamine to culture medium were presented. The concentration of 13.6 mM glutamine promoted the organization of vascular bundles in the roots. A progressive change in the shape of leaves was observed, along with a reduction in the width of the aquiferous parenchyma. In conclusion, it is recommended that WPM medium is used for germination and development of *P. leucopyramis*, and that glutamine might be supplemented to culture media depending on the aim of the study. Finally, the importance of anatomical studies for appropriate knowledge of the developmental stage of *in vitro* cultures is reinforced.

Key-words: Micropropagation. Anatomy. Glutamine. 6-benzilaminopurine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – OBSERVAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> , DENOTANDO SEU PADRÃO ASSÍNCRONO	33
FIGURA 2 – DIFERENTES ESTÁDIOS DE PROTOCORMOS OBSERVADOS DURANTE A GERMINAÇÃO DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i>	33
FIGURA 3 – EXEMPLOS DE FRASCOS COM CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA REGIÃO DAS RAÍZES, CONFORME VISUALIZADO PELO FUNDO DO FRASCO	35
FIGURA 4 – <i>BOX-PLOT</i> DAS VARIÁVEIS AVALIADAS NAS PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS GLN0, GLN1 E GLN2, AOS 30 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.....	38
FIGURA 5 – EXEMPLOS DE PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> CULTIVADAS EM CADA UM DOS TRATAMENTOS COM GLUTAMINA, AOS 30 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.....	38
FIGURA 6 – <i>BOX-PLOT</i> DAS VARIÁVEIS AVALIADAS NAS PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS GLN0, GLN1 E GLN2, AOS 60 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.....	39
FIGURA 7 – EXEMPLOS DE PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> CULTIVADAS EM CADA UM DOS TRATAMENTOS COM GLUTAMINA, AOS 60 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.....	40
FIGURA 8 – <i>BOX-PLOT</i> DOS COMPRIMENTOS DE RAIZ E FOLHA DE PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS BAP0, BAP3, BAP6 E BAP9, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO.....	45
FIGURA 9 – <i>BOX-PLOT</i> DOS NÚMEROS DE RAÍZES, FOLHAS E BROTAÇÕES DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> , POR INDIVÍDUO, COM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS BAP0, BAP3, BAP6 E BAP9, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO.....	45
FIGURA 10 – EXEMPLOS DE PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> CULTIVADAS EM CADA UM DOS TRATAMENTOS COM BAP, AOS 30 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO	46

FIGURA 11 – EXEMPLOS DE PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> CULTIVADAS EM CADA UM DOS TRATAMENTOS COM BAP, AOS 60 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO	47
FIGURA 12 – SECÇÕES LONGITUDINAIS DAS RAÍZES DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i>	47
FIGURA 13 – COMPARAÇÃO DA SECÇÃO TRANSVERSAL DAS RAÍZES DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> , AO LONGO DOS DIAS E TRATAMENTOS	49
FIGURA 14 – ASPECTOS ANATÔMICOS DA FOLHA DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> , EM CORTE TRANSVERSAL, E COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUIDINA. AMOSTRA COLETADA DO MEIO DE NIVELAMENTO, CARACTERIZANDO O TEMPO ZERO (F0)	50
FIGURA 15 – ASPECTOS ANATÔMICOS DA FOLHA DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> , EM CORTE TRANSVERSAL, E COLORAÇÃO COM FUCSINA BÁSICA	50
FIGURA 16 – MUDANÇA DE FORMA NAS FOLHAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> AO LONGO DO TEMPO.....	51
FIGURA 17 – OBSERVAÇÃO DOS FEIXES VASCULARES DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> , EM COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUIDINA, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO, RESPECTIVAMENTE.....	51
FIGURA 18 – IDIOBLASTOS ENCONTRADOS NAS RAÍZES E FOLHAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i>	52

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DOS ESTUDOS DE GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> REALIZADOS COM ESPÉCIES DA SUBTRIBO PLEUROTHALLIDINAE ATÉ O ANO DE 2022. OS GÊNEROS CONSIDERADOS SEGUEM A CLASSIFICAÇÃO DE PLEUROTHALLIDINAE SEGUNDO KARREMANS (2016)	23
QUADRO 2 – STATUS DE CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS (CONFORME RELAÇÃO APRESENTADA NO QUADRO 1, ACIMA)	26
QUADRO 3 – COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO SALINA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NESSE EXPERIMENTO	28
QUADRO 4 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS DE CADA ESTÁDIO (E) DE DESENVOLVIMENTO DOS PROTOCORMOS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> AO LONGO DAS OBSERVAÇÕES DE 60, 90, 105 E 120 DIAS	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS PARA NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO DE RAIZ (CR), EM MILÍMETROS, NÚMERO DE FOLHAS (NF) E COMPRIMENTO DE FOLHA (CF), EM MILÍMETROS, DAS PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> CULTIVADAS POR 30 DIAS, EM CADA TRATAMENTO COM GLUTAMINA.....	35
TABELA 2 – TESTE DE TUKEY <i>POST HOC</i> PARA NÚMERO DE RAÍZES DAS PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> , COMPARANDO OS TRATAMENTOS PAR-A-PAR.....	36
TABELA 3 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS PARA NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO DE RAIZ (CR), EM MILÍMETROS, NÚMERO DE FOLHAS (NF) E COMPRIMENTO DE FOLHA (CF), EM MILÍMETROS, DAS PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> CULTIVADAS POR 60 DIAS, EM CADA TRATAMENTO COM GLUTAMINA.....	36
TABELA 4 – TESTE DE TUKEY <i>POST HOC</i> PARA NÚMERO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DE RAIZ DAS PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> , APÓS 60 DIAS, COMPARANDO OS TRATAMENTOS PAR-A-PAR.....	37
TABELA 5 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS PARA NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO DE RAIZ (CR), NÚMERO DE FOLHAS (NF), COMPRIMENTO DE FOLHA (CF) E NÚMERO DE BROTAÇÕES (NB) DAS PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> APÓS 30 DIAS, EM CADA TRATAMENTO COM BAP.....	42
TABELA 6 – TESTE DE TUKEY <i>POST HOC</i> PARA NÚMERO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DE RAIZ DE PLÂNTULAS DE <i>PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS</i> , APÓS 30 DIAS, COMPARANDO OS TRATAMENTOS PAR-A-PAR.....	42
TABELA 7 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS PARA NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO DE RAIZ (CR), NÚMERO DE FOLHAS (NF), COMPRIMENTO DE FOLHA (CF) E NÚMERO DE BROTAÇÕES	

(NB) DAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, APÓS 60 DIAS, EM
CADA TRATAMENTO COM BAP..... 43

TABELA 8 – TESTE DE TUKEY *POST HOC* PARA NÚMERO DE RAÍZES E
COMPRIMENTO DE RAIZ DAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*,
APÓS 60 DIAS, COMPARANDO OS TRATAMENTOS PAR-A-
PAR..... 44

LISTA DE SIGLAS

BAP – 6-benzilaminopurina

KC – Knudson C

EtOH – álcool etílico

Gln – Glutamina

MS – Murashige & Skoog

MS/2 – Murashige & Skoog modificado para metade da concentração de sais e vitaminas

NaOCl – Hipoclorito de sódio

PFA – Paraformaldeído

PPM – Plant Preservative Mixture

WPM – Woody Plant Medium

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Objetivo geral	22
1.1.2 Objetivos específicos	23
1.2 JUSTIFICATIVA	23
2 METODOLOGIA	27
2.1 GERMINAÇÃO	27
2.2 MEIO DE NIVELAMENTO	29
2.3 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS COM GLUTAMINA	30
2.4 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS COM BAP	30
2.5 ANÁLISE ANATÔMICA	31
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
3 RESULTADOS	32
3.1 GERMINAÇÃO	32
3.2 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS	34
3.2.1 Desenvolvimento com glutamina	34
3.2.2 Desenvolvimento com BAP	41
3.3 ANÁLISE ANATÔMICA	47
3.3.1 Anatomia radicular	47
3.3.2 Anatomia foliar	49
4 DISCUSSÃO	53
4.1 GERMINAÇÃO	53
4.2 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS	55
4.2.1 Desenvolvimento com glutamina	55
4.2.2 Desenvolvimento com BAP	57
4.3 ANÁLISE ANATÔMICA	58
4.3.1 Anatomia radicular	58
4.3.2 Anatomia foliar	60

5 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas compõem uma das maiores famílias botânicas, que, atualmente, compreende cerca de 27.800 espécies classificadas em 899 gêneros (THE PLANT LIST, 2013), além de mais de 100.000 híbridos registrados, produzidos por polinização artificial (CARDOSO *et al.*, 2020). No Brasil, Orchidaceae está representada por 2.681 espécies, das quais 1.487 são endêmicas, sendo que 52% têm sua ocorrência registrada em vegetação de Mata Atlântica, bioma que compreende 1-8% de toda a vegetação do planeta e as maiores taxas de endemismos para plantas (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022a; LIMA *et al.*, 2015). Historicamente, as orquídeas são valorizadas como plantas ornamentais devido à durabilidade de suas flores, as quais possuem grande variedade de cores e formas, além de deslumbrar cientistas com a amplitude de suas interações com outros organismos (CHUGH *et al.*, 2009; RASMUSSEN *et al.*, 2015). Na costa do Paraná, as orquídeas correspondem à 36,3% das flores consumidas para decoração de casas e 59,3% das plantas compradas para presentear amigos e familiares (ANACLETO *et al.*, 2017).

Por mais de 500 anos, a Mata Atlântica tem constantemente sofrido redução e fragmentação de sua área, tendo sido reduzida à 15% de sua extensão total, principalmente devido à expansão urbana e agropecuária (FAJARDO *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2015). Para as orquídeas, o desmatamento implica em perda de forófitos e em maiores dificuldades de interação com polinizadores e micobiontes. Além disso, muitas orquídeas são alvo de extração ilegal devido ao seu valor ornamental, o que reduz a população nativa e conduz a um quadro de erosão da variabilidade genética, o que pode, inclusive, levar à extinção local da espécie (ANJOS *et al.*, 2021; BARROS, 2007; FAJARDO *et al.*, 2017).

Pleurothallidinae Lindl. (Epidendroideae: Epidendreae) é a maior subtribo de micro-orquídeas habitando os Neotrópicos, distribuída desde a Argentina até o sul do México, sendo também a mais diversa, com aproximadamente 5.200 espécies reconhecidas (KOENE *et al.*, 2020; MORALES *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2021). A subtribo pode ser reconhecida pelas plantas perenes de hábito majoritariamente epífita – embora algumas espécies apresentem hábitos terrestres e litofíticos – e ausência de pseudobulbos; em vez disso, há formação de caules aéreos, ou ramicaules, que sustentam, geralmente, uma única folha conduplicada articulada. As raízes apresentam velame e são estratificadas em duas a seis camadas de tecido epidérmico. As inflorescências são laterais

ou terminais, em racemos, com flores geralmente ressupinadas. O ovário é articulado com o pedicelo, junto a uma coluna robusta ou alongada que sustenta um número par de polínias, entre duas a oito. Os frutos da subtribo são do tipo cápsula elipsóide (KARREMANS, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2021).

Pabstiella Brieger & Senghas é um gênero pertencente ao clado *Pabstiella* – *Pleurothallis* – *Stelis*, uma das linhagens mais derivadas em Pleurothallidinae (KARREMANS, 2016). Ao todo, *Pabstiella* conta com 138 espécies distribuídas pelos países Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Panamá, Peru e Venezuela (KARREMANS, 2016; TOSCANO DE BRITO & LUER, 2016). No Brasil, são encontradas 119 espécies, que habitam os domínios fitogeográficos da Amazônia, do Cerrado e, principalmente, da Mata Atlântica (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022b; MORALES *et al.*, 2020). Segundo Rodrigues *et al.* (2021), a taxa de endemismo estimada para o gênero *Pabstiella* é de 80%, o que torna ainda mais crucial a necessidade de conhecer e preservar essas espécies e o seu hábitat.

Pabstiella leucopyramis (Rchb.f) Luer (sinônimos: *Pleurothallis leucopyramis* Rchb.f, *Pleurothallis pterophora* Cogn.) é uma espécie endêmica do domínio Mata Atlântica, ocorrendo somente nos estados brasileiros do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (CHIRON *et al.*, 2012; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022b). Seu hábito é epífito, cespitoso, e apresenta raízes numerosas, fasciculadas. Os caules secundários (ramicaules) são finos e eretos, ascendentes, de 4 a 6 centímetros de comprimento, dos quais partem folhas pedunculadas de base oblonga-cuneada, com 4 a 7 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura. Apresenta inflorescências em racemo na base das folhas. As flores são brancas, com sépalas de 7 a 9 mm, côncavas, as inferiores fusionadas formando ápice bidentado, pétalas oblíquas de 3 mm e labelo de 2,5 mm, conduplicado longitudinalmente. Polínias geminadas lateralmente. Suas cápsulas são oblongas, tendo de 5 a 6 mm de comprimento (COGNIAUX, 1896; REICHENBACH, 1878).

Alguns caminhos possíveis para a preservação de espécies são a conservação *in situ*, protegendo o local de ocorrência de uma população via criação de Unidades de Conservação ambiental, ou a conservação *ex situ*, como o cultivo em Jardins Botânicos, o armazenamento de sementes em bancos de germoplasma e a propagação *in vitro*. Os métodos de propagação *in vitro* permitem intensa multiplicação do material vegetal em curto período de tempo, em razão da otimização das condições de crescimento, como fotoperíodo e temperatura controlados, além do fornecimento de água e nutrientes

exigidos pela planta, os quais podem ser adaptados a cada fase do desenvolvimento e complementados pela adição de reguladores vegetais e agentes elicitores. Essa produção em massa de plantas abre a possibilidade de reintrodução de indivíduos na natureza para restaurar uma população em declínio ou para a comercialização, de modo a coibir a retirada ilegal de plantas ornamentais do ambiente (CARDOSO *et al.*, 2020; UEMOTO *et al.*, 2006). De modo semelhante, o uso da germinação *in vitro* permite propagação de espécies de baixa germinação na natureza e obtenção de indivíduos geneticamente diferentes da planta-mãe, o que é desejável em termos de conservação (ARCIDIACONO *et al.*, 2021).

Diversos fatores bióticos e abióticos influenciam a germinação de sementes, como temperatura, umidade do substrato, intensidade luminosa, interações fúngicas e estrutura genética da população de origem (RASMUSSEN *et al.*, 2015). Orchidaceae produz frutos do tipo cápsula seca que, ao se abrirem, liberam centenas de sementes diminutas, dispersas pelo vento. As sementes possuem apenas um embrião envolto por uma testa membranosa, carecendo de endosperma e de enzimas capazes de degradar polissacarídeos, de tal modo que, mesmo que estejam presentes açúcares e lipídeos, os embriões não têm capacidade de converter e utilizar esses recursos para germinar (KAUTH *et al.*, 2008; KOENE *et al.*, 2020). Sendo assim, as orquídeas dependem de uma associação fúngica compatível que forneça aos seus embriões recursos como água, carboidratos, minerais e vitaminas, necessários para a germinação e desenvolvimento inicial; caso contrário, os protocormos – o primeiro estágio de desenvolvimento da plântula – irão definhar tão logo tenham rompido a testa da semente (CARDOSO *et al.*, 2020; CHUGH *et al.*, 2009; KAUTH *et al.*, 2008). Essa dependência fúngica durante seu estágio inicial de desenvolvimento é conhecida como mico-heterotrofia (MALDONADO *et al.*, 2020). São conhecidos alguns fungos simbiontes de raízes de orquídeas, porém não há consenso sobre a especificidade da interação exigida para o processo de germinação (ARCIDIACONO *et al.*, 2021; KAUTH *et al.*, 2008).

Por causa dessa simbiose obrigatória, a taxa de germinação na natureza é muito baixa, não passando de 5% (CARDOSO *et al.*, 2020; KOENE *et al.*, 2020), e por muito tempo a obtenção de plântulas a partir de sementes permaneceu inviável para os cultivadores. Em 1922, o trabalho de Knudson foi pioneiro em conseguir um sistema de germinação não-simbiótica de diversas espécies de *Cattleya* e *Laelia*, com uma formulação de meio de cultura com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_3$ e

(NH₄)₂SO₄. Posteriormente, o autor estabeleceu a formulação do meio Knudson C (KC), ainda hoje amplamente utilizado para culturas *in vitro*.

A germinação de orquídeas é tipicamente definida em cinco estádios, conforme Koene *et al.* (2020): 1. Semente com embrião clorofilado presente; 2. Rompimento da testa e/ou formação do protocormo clorofilado; 3. Protocormo com rizoides e/ou ápice presentes; 4. Protocormo com uma ou duas folhas; 5. Plântula estabelecida com duas ou mais folhas e raízes. O período necessário para obtenção de plântulas geralmente é de quatro a seis meses (KNUDSON, 1922).

A composição apropriada do meio de cultura é muito importante para o desenvolvimento das culturas vegetais. Segundo Phillips & Garda (2019), os meios mais utilizados para germinação de orquídeas são MS (Murashige & Skoog, 1962) e suas modificações (por exemplo, MS/2, com metade da concentração salina), presente em 82% dos trabalhos publicados entre 2011 e 2015. Artigos utilizando meio de cultura B5 (Gamborg B5, 1968) ou somente suas vitaminas corresponderam a 5%; os meios WPM (Lloyd & McCown, 1980 Wood Plant Medium) e DKW (Driver and Kuniyuki, 1984 Woody plant medium) conjuntamente foram mencionados em 6% dos trabalhos; o restante correspondeu aos meios KC (Knudson C, 1925), VW (Vacin & Went, 1949), SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) e outras composições salinas. Koene *et al.* (2020) também apontaram que o meio mais utilizado para orquídeas é MS, no entanto recomendaram o uso de WPM na germinação de *Acianthera prolifera* (Pleurothallidinae), *Brasiliorchis picta* e *Hadrolaelia grandis*.

O nitrogênio cumpre um papel fundamental no desenvolvimento vegetal, e sua fonte e disponibilidade influenciam intensamente a germinação *in vitro* em Orchidaceae (ARCIDIACONO *et al.*, 2021). A formulação do meio MS oferece aporte de nitrogênio tanto na forma de amônio (NH₄⁺) quanto de nitrato (NO₃⁻), sendo que o amônio está em maior concentração do que o nitrato (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Essa composição têm se revelado bastante adequada tanto para o desenvolvimento de eudicotiledôneas quanto monocotiledôneas, entretanto, para algumas espécies, os altos níveis de amônio podem ser prejudiciais.

Por outro lado, diversas composições salinas utilizadas para plantas lenhosas, como WPM e DKW, possuem menor concentração de amônio, e não foram relatados casos de toxicidade induzida por amônio em nenhum desses meios (PHILLIPS & GARDA, 2019). A tolerância à alta concentração de amônio é possivelmente espécie-específico em Orchidaceae; por exemplo, *Encyclia boothiana* e *Calopogon tuberosus*

tiveram seu desenvolvimento beneficiado nessa formulação de meio de cultura, enquanto *Dactylorhiza incarnata* e *Vanda tricolor* foram prejudicadas (KAUTH *et al.*, 2008).

Fontes de nitrogênio orgânico, como os aminoácidos glicina, glutamina e tiamina, e casaminoácidos, também têm sido investigadas e se mostrado vantajosas em relação à fontes inorgânicas no cultivo *in vitro* de algumas espécies (ARCIDIACONO *et al.*, 2021; KAUTH *et al.*, 2008; MEAD & BULARD, 1979). No cultivo *in vitro* de *Catasetum fimbriatum*, Majerowicz *et al.* (2000) obtiveram melhores respostas de crescimento das plântulas e maior acúmulo de massa seca com meio de cultura suplementado com glutamina, em relação à composições de amônio e nitrato, somente.

Reguladores vegetais da classe das citocininas são frequentemente utilizados em culturas *in vitro* de espécies ornamentais, buscando regeneração ou proliferação dos tecidos e produção de múltiplas brotações (ANJOS *et al.*, 2021; MARTINS *et al.*, 2018), que podem ser isoladas e cultivadas como novas plântulas, gerando clones de determinada matriz vegetal. Os efeitos da aplicação desses reguladores sobre o tecido vegetal são dependentes do tipo e concentração usada, além dos níveis endógenos que a espécie-alvo possui. Entre seus efeitos estão a aceleração da divisão celular nos tecidos meristemáticos, retardo da senescência foliar, demarcação de estruturas de dreno e diferenciação dos cloroplastos. Nas culturas *in vitro* de orquídeas, as citocininas são amplamente utilizadas para maior produção de brotações laterais, sendo as mais comuns 6-benzilaminopurina, cinetina e thidiazuron (RADEMACHER, 2015).

A visualização da eficiência de determinada fonte nutricional ou composto químico sobre o desenvolvimento de culturas *in vitro* pode ser feita por comparação de aspectos morfológicos – como comprimentos gerais e números totais de raízes, folhas, entre outros – e por análises anatômicas buscando observação da diferenciação celular e deposição de compostos extracelulares. Em Pleurothallidinae, vários trabalhos já utilizaram análises anatômicas para explorar a sistemática do grupo e evolução de caracteres que pudessem servir de subsídio para a identificação das afinidades e gêneros da subtribo. A anatomia da raiz é de especial importância taxonômica devido aos diversos tipos de espessamento de parede celular e número de camadas de velame e de polos do protoxilema (RODRIGUES *et al.*, 2021). Além disso, como raízes e folhas são órgãos vegetativos, sofrem menor pressão seletiva do que os órgãos reprodutivos, podendo ser utilizadas para inferir as relações da planta com o seu ambiente (KEDROVSKI & SAJO, 2019).

No ambiente *in vitro*, é comum as plântulas apresentarem estômatos atrofiados ou não funcionais, baixa deposição e espessamento da cutícula, sub-desenvolvimento dos feixes vasculares, desorganização celular e espaços intercelulares em maior quantidade (MANI *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2012). Isso decorre, principalmente, da alta umidade relativa mantida nos frascos de cultivo, que faz com que as plântulas não passem por estresse hídrico e, conseqüentemente, não desenvolvam os sistemas que regulam a perda de água. Dessa forma, conhecer o estado estrutural dessas plântulas pode auxiliar na transposição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* com menor número de perdas, uma vez que o manejo do estresse hídrico é um fator determinante para a sobrevivência das plântulas aclimatizadas (SOARES *et al.*, 2012). Para as orquídeas, especificamente, o bom desenvolvimento do velame é fundamental para a adaptação das plantas ao ambiente epífito (MANI *et al.*, 2021).

Nesse contexto, esse trabalho se propôs a estudar um sistema de germinação da espécie *Pabstiella leucopyramis*, de forma inédita na literatura, avaliando o efeito de diferentes composições de meios de cultura sobre a germinação e desenvolvimento dessa micro-orquídea da Mata Atlântica. Os meios avaliados foram o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado para metade da concentração de sais e vitaminas (MS/2) e WPM (LLOYD & McCOWN, 1980) completo. A escolha desses meios de cultura se deu pelo MS ser o mais utilizado na literatura, com a redução de concentração dos sais a fim de se evitar a toxicidade induzida por amônio. Ao mesmo tempo, como alguns autores obtiveram sucesso na germinação de Pleurothallidinae em WPM, esse meio também foi contemplado para os experimentos em *Pabstiella*. Em seguida, os efeitos de uma fonte de nitrogênio orgânico e da aplicação de uma citocinina ao meio de cultura foram avaliados com as plântulas germinadas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho é investigar os processos de germinação e desenvolvimento *in vitro* da micro-orquídea *Pabstiella leucopyramis* sob diferentes condições de cultivo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a efetividade das formulações salinas MS/2 e WPM quanto à taxa de germinação e sucesso no desenvolvimento da espécie-alvo;
- Caracterizar e comparar o desenvolvimento das plântulas por meio de análises morfológicas e anatômicas durante o processo de multiplicação e alongamento *in vitro* na presença de diferentes concentrações de glutamina, uma fonte de nitrogênio orgânico;
- Caracterizar e comparar os processos de multiplicação e alongamento *in vitro* das plântulas, utilizando análises morfológicas, em resposta à diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), um regulador vegetal da classe das citocininas.

1.2 JUSTIFICATIVA

Diversos pesquisadores tiveram sucesso na germinação *in vitro* de Orchidaceae, com taxas frequentemente acima de 70% para orquídeas epífitas (CARDOSO *et al.*, 2020; KOENE *et al.*, 2020). No QUADRO 1 está apresentada a relação de espécies da subtribo Pleurothallidinae que possuem estudos de germinação *in vitro*, assim como a taxa de germinação obtida nesses trabalhos, quando informada. Há apenas um relato na literatura acerca da germinação de *Pabstiella*, tendo como espécie-alvo *Pabstiella fusca*. Nesse trabalho, os autores obtiveram 4% de germinação em meio de cultura WPM, entretanto também relataram que os protocormos se tornaram necróticos ao final de oito semanas, não sendo possível recuperar plântulas (KOENE *et al.*, 2020).

QUADRO 1 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DOS ESTUDOS DE GERMINAÇÃO *IN VITRO* REALIZADOS COM ESPÉCIES DA SUBTRIBO PLEUROTHALLIDINAE ATÉ O ANO DE 2022. OS GÊNEROS CONSIDERADOS SEGUEM A CLASSIFICAÇÃO DE PLEUROTHALLIDINAE SEGUNDO KARREMANS (2016).

Espécie	Taxa de germinação obtida	Meio de germinação	Obtenção de plântulas	Referência
<i>Acianthera aphtosa</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	41,0%	WPM	Sim (menos de 10%)	Koene <i>et al.</i> , 2020
<i>Acianthera glumacea</i> (Pleurothallis <i>glumacea</i>) (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	60,0%	KC	Não informado	Alvarez-Pardo <i>et al.</i> , 2006

<i>Acianthera ochreatea</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	86,0%	WPM	Sim (80% após aclimatização)	Koene <i>et al.</i> , 2020
<i>Acianthera prolifera</i> (Herb. Ex Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	79,0%	WPM	Sim (95% após aclimatização)	Koene <i>et al.</i> , 2019
<i>Acianthera prolifera</i> (Herb. Ex Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	92,0%	WPM	Sim (80% após aclimatização)	Koene <i>et al.</i> , 2020
<i>Acianthera teres</i> (Lindl.) Borba	±49%	MS/2	Não informado	Barbero <i>et al.</i> , 2011
<i>Anathallis adenochila</i> (Loefgr.) F. Barros	Não informado	Não informado	Sim	Endres Júnior <i>et al.</i> , 2014
<i>Anathallis obovata</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	36,0%	WPM	Não	Koene <i>et al.</i> , 2020
<i>Anathallis racemiflora</i> (Sw.)Pridgeon & M. W. Chase	Não informado	Não informado	Sim (41%)	Damon <i>et al.</i> , 2005
<i>Barbosella</i> sp.	±59%	MS+15% leite de côco	Não	Roberts <i>et al.</i> , 2007
<i>Brachionidium muscosum</i> Luer & R. Vásquez	±49%	KC+15% leite de côco	Não	Roberts <i>et al.</i> , 2007
<i>Dryadella lilliputiana</i> (Cogn.) Luer	38,0%	WPM	Não	Koene <i>et al.</i> , 2020
<i>Dryadella zebrina</i> (Porsch) Luer	90,0%	WPM	Sim	Anjos <i>et al.</i> , 2021
<i>Lepanthes rupestris</i> Stimson	±80%	Não informado	Não informado	Ospina & Bayman, 2009
<i>Masdevallia auropurpurea</i> Rchb.f & Warsz.	49,8%	Hidro-Coljap®+2,68µM GA ₃	Sim	Pedrosa-Manrique, 2007
<i>Masdevallia coccinea</i> Linden ex Lindl.	Não obtida por imaturidade dos protocormos	MS+0,1g.L mio-inositol+10g.L amido de milho	Não	Pedrosa-Manrique <i>et al.</i> , 2010
<i>Masdevallia ignea</i> Rchb.f	73,0%	KC+1ppm GA ₃	Sim	Martínez & Salamanca, 2005
<i>Masdevallia melanoxantha</i> Linden & Rchb.f	52,8%	H1 meio com aveia (simbiótica)	Sim	Hughes <i>et al.</i> , 2018
<i>Masdevallia menatoi</i> Luer & R. Vásquez	37,9%	H1 meio com aveia (simbiótica)	Não	Hughes <i>et al.</i> , 2018
<i>Masdevallia patchicutzae</i> Luer & Hirtz	40,3%	H1 meio com aveia (simbiótica)	Não	Hughes <i>et al.</i> , 2018
<i>Masdevallia tovarensis</i> Rchb.f	Não informado	MS/2	Sim	Clavijo, 2010
<i>Masdevallia yungasensis</i> T. Hashim.	±46%	KC+15% leite de côco	Não	Roberts <i>et al.</i> , 2007

<i>Octomeria crassifolia</i> Lindl.	±42%	MS/2	Não informado	Barbero <i>et al.</i> , 2011
<i>Octomeria gracilis</i> Lodd. ex Lindl.	77,0%	WPM	Não	Koene <i>et al.</i> , 2020
<i>Octomeria gracilis</i> Lodd. ex Lindl.	±16%	MS/2	Não informado	Barbero <i>et al.</i> , 2011
<i>Pabstiella fusca</i> (Lindl.) Chiron & Xim. Bols.	4,0%	WPM	Não	Koene <i>et al.</i> , 2020
<i>Pleurothallis coriacardia</i> Rchb.f	30,0%	Simbiótica	Não	Maldonado <i>et al.</i> , 2020
<i>Pleurothallis microptera</i> Schltr.	31,1%	H1 meio com aveia (simbiótica)	Sim	Hughes <i>et al.</i> , 2018
<i>Pleurothallis pulchella</i> (Kunth) Lindl.	33,2%	MS/2+ 2g.L ⁻¹ carvão ativado	Sim	Glushchenko, 2019
<i>Restrepia brachypus</i> Rchb.f	53,1%	Western	Sim	Millner <i>et al.</i> , 2008
<i>Restrepia contorta</i> (Ruiz & Pav.) Luer	20,2%	H1 meio com aveia (simbiótica)	Não	Hughes <i>et al.</i> , 2018
<i>Stelis grandiflora</i> Lindl.	51,0%	WPM	Sim (menos de 10%)	Koene <i>et al.</i> , 2020
<i>Stelis</i> sp. Peru	1,2%	P6668/2	Não	Hughes <i>et al.</i> , 2018

FONTE: o autor (2023).

É possível notar que ainda há poucas espécies estudadas, bem como poucos gêneros representados. Embora as principais linhagens de Pleurothallidinae estejam representadas por, ao menos, um gênero, nem todas estão presentes. Mesmo nas linhagens abordadas, os dados são consideravelmente escassos: dentro do clado *Pabstiella* – *Pleurothallis* – *Stelis*, que ao todo conta com 1630 espécies (KARREMANS, 2016), apenas seis foram contempladas em estudos de germinação *in vitro*, representando 0,4% do grupo.

Mesmo considerando espécies que possuem, ao menos, os estudos *in vitro* listados no QUADRO 1, a maioria das orquídeas ainda não têm status de conservação estabelecidos (QUADRO 2). Isso decorre da falta de conhecimento sobre estrutura populacional, distribuição de indivíduos e dados de qualidade genética das populações remanescentes. Apesar disso, mesmo que nenhum dado acerca do status da espécie na natureza esteja disponível, todas as orquídeas foram incluídas no Apêndice II do CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), o qual se refere ao “comércio controlado para evitar uso incompatível com a sobrevivência da espécie” (CITES, 2022). A espécie alvo desse estudo, *Pabstiella leucopyramis*, consta

como “não avaliada” pelo CNC Flora e também está ausente da Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022b; IUCN, 2022).

QUADRO 2 – STATUS DE CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS (CONFORME RELAÇÃO APRESENTADA NO QUADRO 1, ACIMA).

Espécie	CNC Flora	IUCN	CITES
<i>Acianthera aphyta</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	LC	Ausente	Apêndice II
<i>Acianthera glumacea</i> (<i>Pleurothallis glumacea</i>) (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	LC	Ausente	Apêndice II
<i>Acianthera ochreatea</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	Não avaliada	Ausente	Apêndice II
<i>Acianthera prolifera</i> (Herb. Ex Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	Não avaliada	Ausente	Apêndice II
<i>Acianthera teres</i> (Lindl.) Borba	LC	Ausente	Apêndice II
<i>Anathallis adenochila</i> (Loefgr.) F. Barros	Não avaliada	Ausente	Apêndice II
<i>Anathallis obovata</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	Não avaliada	Ausente	Apêndice II
<i>Anathallis racemiflora</i> (Sw.)Pridgeon & M. W. Chase	-	Ausente	Apêndice II
<i>Brachionidium muscosum</i> Luer & R. Vásquez	-	Ausente	Apêndice II
<i>Dryadella lilliputiana</i> (Cogn.) Luer	VU	Ausente	Apêndice II
<i>Dryadella zebrina</i> (Porsch) Luer	Não avaliada	Ausente	Apêndice II
<i>Lepanthes rupestris</i> Stimson	-	Ausente	Apêndice II
<i>Masdevallia auropurpurea</i> Rchb.f & Warsz.	-	Ausente	Apêndice II
<i>Masdevallia coccinea</i> Linden ex Lindl.	-	Ausente	Apêndice II
<i>Masdevallia ignea</i> Rchb.f	-	EN	Apêndice II
<i>Masdevallia melanoxantha</i> Linden & Rchb.f	-	Ausente	Apêndice II
<i>Masdevallia menatoi</i> Luer & R. Vásquez	-	Ausente	Apêndice II
<i>Masdevallia patchicutzae</i> Luer & Hirtz	-	EN	Apêndice II
<i>Masdevallia towarensis</i> Rchb.f	-	Ausente	Apêndice II
<i>Masdevallia yungasensis</i> T. Hashim.	-	Ausente	Apêndice II
<i>Octomeria crassifolia</i> Lindl.	Não avaliada	Ausente	Apêndice II
<i>Octomeria gracilis</i> Lodd. ex Lindl.	Não avaliada	Ausente	Apêndice II

<i>Pabstiella fusca</i> (Lindl.) Chiron & Xim. Bols.	Não avaliada	Ausente	Apêndice II
<i>Pleurothallis coriacardia</i> Rchb.f	-	Ausente	Apêndice II
<i>Pleurothallis microptera</i> Schltr.	-	Ausente	Apêndice II
<i>Pleurothallis pulchella</i> (Kunth) Lindl.	-	Ausente	Apêndice II
<i>Restrepia brachypus</i> Rchb.f	-	LC	Apêndice II
<i>Restrepia contorta</i> (Ruiz & Pav.) Luer	-	LC	Apêndice II
<i>Stelis grandiflora</i> Lindl.	Não avaliada	Ausente	Apêndice II

FONTE: o autor (2023).

LEGENDA: LC: pouco preocupante; VU: vulnerável; EN: ameaçada. (-) Espécie não se aplica à classificação do CNC Flora por não ocorrer no Brasil.

Millner *et al.* (2008) chamam a atenção para a importância fundamental de se conhecer as espécies de orquídeas e caracterizar quais ameaças afetam as espécies-alvo em seus ambientes naturais para que os programas de conservação *ex situ* possam ser eficientes. As necessidades nutricionais de um organismo estão relacionadas com o ambiente que ele habita e com seu ciclo de vida. Pesquisas acerca da germinação, fisiologia e ecologia são essenciais para a recuperação e proteção de espécies em potencial risco de extinção (KAUTH *et al.*, 2008). Nesse sentido, o presente trabalho busca agregar conhecimento acerca da fisiologia e necessidades nutricionais da espécie *Pabstiella leucopyramis*, dado que informações sobre essa espécie e seu gênero, como um todo, são escassas.

2 METODOLOGIA

2.1 GERMINAÇÃO

Todos os experimentos descritos nesse trabalho foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal (LMV-UFPR), localizado nas dependências do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, exceto quando indicado o contrário. Para o experimento de germinação, uma cápsula madura de um indivíduo adulto de *Pabstiella leucopyramis* foi gentilmente cedida pelo colecionador e cultivador Sr. Marcos Klingelfus. A cápsula foi obtida no mês de fevereiro, produzida por polinização artificial autógama. A planta-matriz se encontra em cultivo protegido. O procedimento de desinfestação de superfície da cápsula consistiu em: lavagem em água pura, imersão em álcool etílico 70°, por 10 minutos, lavagem tríplice em água destilada,

seguido de imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% + Tween20® 0,1%, por 30 minutos e lavagem tríplice final em água destilada autoclavada. A cápsula foi aberta com um corte longitudinal, em ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar, e as sementes foram raspadas e suspensas em 20 mL de água destilada autoclavada. Cada placa de Petri com meio de cultura recebeu 1 mL da suspensão de sementes.

Duas composições salinas de meios de cultura foram testadas quanto a sua eficiência sobre a germinação de *P. leucopyramis*. As composições foram sais e vitaminas MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado para metade da concentração (MS/2), suplementado com sacarose (Synth) 15 g.L⁻¹, e sais e vitaminas WPM (LLOYD & McCOWN, 1980), suplementado com sacarose (Synth) 20 g.L⁻¹. No QUADRO 3 estão apresentadas as composições e molaridades dos dois meios de cultura avaliados nesse experimento. Ambos os meios foram geleificados com Phytigel® (Sigma-Aldrich) 3 g.L⁻¹ após ajuste do pH para 5,8, e autoclavados por 20 minutos a 121°C. O experimento foi realizado com 10 repetições de cada tratamento, utilizando placas de Petri com 25 mL de meio de cultura. Após inoculação da suspensão de sementes, as placas foram colocadas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C e fotoperíodo controlado de 16:8, sendo o período luminoso simulado por lâmpadas LED de luz branca (40 µmol m⁻² s⁻¹). As placas foram colocadas diretamente sob a luz. A emergência dos protocormos foi observada após 30, 60, 90, 105 e 120 dias da inoculação das sementes com auxílio de microscópio óptico binocular Motic SMZ-171.

QUADRO 3 – COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO SALINA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NESSE EXPERIMENTO.

Componente	MS/2		WPM	
Macronutrientes	mg.L ⁻¹	mM	mg.L ⁻¹	mM
NH ₄ NO ₃	825	10,3	400	5,0
KNO ₃	950	9,4	-	-
CaCl ₂ *2H ₂ O	220	1,5	96	0,65
MgSO ₄ *7H ₂ O	185	0,75	370	1,5
KH ₂ PO ₄	85	0,625	170	1,25
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	-	-	556	2,35
K ₂ SO ₄	-	-	990	5,68
Micronutrientes	mg.L ⁻¹	µM	mg.L ⁻¹	µM

KI	0,415	2,5	-	-
H ₃ BO ₃	3,1	50	6,2	100
MnSO ₄ *H ₂ O	-	-	22,3	131,9
MnSO ₄ *4H ₂ O	11,15	50	-	-
ZnSO ₄ *7H ₂ O	4,3	15	8,6	30
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,125	0,5	0,25	1,03
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,0125	0,05	0,25	1,0
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,0125	0,05	-	-
Na ₂ *EDTA	18,65	55	37,3	110
FeSO ₄ *7H ₂ O	13,9	50	27,8	100
Mio-inositol	50	277,5	100	555
Ácido nicotínico	0,25	2,03	0,5	4,06
Pirridoxina HCl	0,25	1,22	-	-
Tiamina HCl	0,05	0,15	1,6	4,7
Glicina	1	13,3	-	-
Sacarose	15 g.L-1	43,8 mM	20 g.L-1	54,4 mM
Osmolaridade total:	-	0,0669 M	-	0,07188 M
Potencial hídrico:	-	-0,166 MPa	-	-0,178 MPa

FONTE: adaptado de Gamborg & Phillips (1995).

2.2 MEIO DE NIVELAMENTO

Após 210 dias da inoculação das sementes, protocormos que haviam se desenvolvido em plântulas completas – considerando como plântula indivíduos que possuíam ao menos uma folha e uma raiz – foram transferidos das placas de germinação para frascos contendo 30 ml de meio WPM (Caisson Labs) 2,58 g.L⁻¹ + sacarose (Synth) 20 g.L⁻¹ + PPM (Plant Cell Technology) 0,5 ml.L⁻¹. O pH foi ajustado para 5.8 e o meio foi geleificado com Phytigel® (Sigma-Aldrich) 3 g.L⁻¹, em seguida submetido à autoclavagem de 20 minutos por 121°C. As plântulas permaneceram por 30 dias nesse meio em sala de crescimento antes de seguirem para os próximos experimentos.

2.3 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS COM GLUTAMINA

Plântulas recuperadas do meio de nivelamento foram utilizadas para um experimento de desenvolvimento por suplementação de glutamina, o qual foi realizado em três tratamentos: glutamina 0 (Gln0), glutamina 1 (Gln1) e glutamina 2 (Gln2). Os tratamentos foram delineados com 10 repetições, cada unidade amostral sendo um frasco com 30 mL de meio de cultura e 10 plântulas. O experimento foi realizado em triplicata, totalizando 30 frascos por tratamento. O meio base consistiu de WPM (Caisson Labs) $2,58 \text{ g.L}^{-1}$ + sacarose (Synth) 20 g.L^{-1} . A adição de glutamina (Alphatec) para os tratamentos Gln0, Gln1 e Gln2 foi de 0 g.L^{-1} , 1 g.L^{-1} e 2 g.L^{-1} , respectivamente, resultando em concentrações de 0 mM, 6,8 mM e 13,6 mM, respectivamente. Os meios foram geleificados com Phytigel® (Sigma-Aldrich) 3 g.L^{-1} após ajuste do pH para 5.8 e, em seguida, autoclavados à 121°C por 20 minutos. Os frascos foram colocados em sala de crescimento e o desenvolvimento das plântulas foi observado após 30 e 60 dias.

As variáveis avaliadas foram: número médio de raízes, comprimento médio das raízes, número médio de folhas e comprimento médio das folhas. A observação das plântulas foi feita com auxílio de estereomicroscópio binocular Motic SMZ-171 e grade milimetrada. Foram selecionados 16 indivíduos escolhidos ao acaso de cada tratamento para a análise estatística das variáveis após 30 dias da implementação do experimento. Para a análise após 60 dias, devido à escassez de material nos tratamentos Gln1 e Gln2, foram selecionados 10 indivíduos de Gln2 e 13 indivíduos dos demais tratamentos.

2.4 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS COM BAP

Outra parcela de plântulas recuperadas do meio de nivelamento foi direcionada para um experimento de desenvolvimento por suplementação com a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), o qual foi realizado em quatro tratamentos: $0 \text{ }\mu\text{M}$ (controle), $3 \text{ }\mu\text{M}$, $6 \text{ }\mu\text{M}$ e $9 \text{ }\mu\text{M}$. Os tratamentos foram delineados com 10 repetições, cada unidade amostral sendo um frasco com 30 mL de meio de cultura e seis plântulas. O experimento foi realizado em triplicata, totalizando 30 frascos por tratamento. O meio base consistiu de WPM (Caisson Labs) $2,58 \text{ g.L}^{-1}$ + sacarose (Synth) 20 g.L^{-1} . A concentração de citocinina em cada tratamento foi de $0 \text{ }\mu\text{M}$ (BAP0), $3 \text{ }\mu\text{M}$ (BAP3), $6 \text{ }\mu\text{M}$ (BAP6) e $9 \text{ }\mu\text{M}$ (BAP9). Todos os meios foram geleificados com Phytigel® (Sigma-Aldrich) 3 g.L^{-1} após ajuste do pH para 5.8 e, em seguida, autoclavados à 121°C por 20 minutos. Os frascos

foram colocados em sala de crescimento e o desenvolvimento das plântulas foi observado após 30 e 60 dias.

As variáveis avaliadas foram: número médio de brotações laterais, número médio de raízes, comprimento médio das raízes, número médio de folhas e comprimento médio das folhas. A observação das plântulas foi feita com auxílio de estereomicroscópio binocular Motic SMZ-171 e grade milimetrada. Foram selecionados 24 indivíduos de cada tratamento, escolhidos ao acaso, para a análise estatística das variáveis avaliadas após 30 e 60 dias da implementação do experimento.

2.5 ANÁLISE ANATÔMICA

Raízes e folhas foram coletadas de plântulas cultivadas por 30 dias no meio de nivelamento e de plântulas oriundas do experimento com suplementação de glutamina, essas cultivadas por 30 ou 60 dias. Plântulas do meio de nivelamento foram usadas como marcador de tempo zero. Foram coletadas raízes com, pelo menos, quatro milímetros, na porção mais apical, e as folhas receberam um corte na porção basal para melhor posicionamento nas formas de infiltração. As coletas foram realizadas em triplicata, cada tubo contendo seis amostras. As amostras ficaram imersas em solução de fixação contendo paraformaldeído 2,5% e tampão fosfato 0,1 M (1:1) por no mínimo 24 horas em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$. 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 o período de fixação, as amostras foram lavadas com tampão fosfato e submetidas à desidratação seriada com álcool etílico – EtOH 30°, EtOH 50°, EtOH 70°, EtOH 90° – ficando em imersão por 15 minutos, duas vezes, em cada etapa. A última etapa, com EtOH 100°, foi realizada por imersão por 30 minutos, duas vezes. A seguir, foi iniciado o procedimento de infiltração com Histoiresina (Leica Biosystems). Esse processo foi realizado por progressão da proporção Histoiresina:EtOH, sendo essas 1:2, 1:1 e 2:1, cada etapa com duração de duas horas. Por fim, as amostras foram cobertas com solução de Histoiresina pura e colocadas em estufa à vácuo por 24 horas. Após esse período, as amostras foram emblocadas e submetidas à secção no micrótomo de rotação Leica (RM 2142), mantido pelo Laboratório de Botânica Estrutural. As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina 0,05% em solução de tampão fosfato pH 6,8 e Fucsina Básica aquosa 0,06%, conforme os protocolos estabelecidos por O'Brien *et al.* (1964) e Kraus *et al.* (1998), respectivamente. A observação das lâminas foi feita com auxílio de microscópio óptico

Bel Photonics®. Foram obtidas microfotografias com o microscópio óptico Olympus BX40 acoplado à câmera digital Olympus DP71.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados para análise em linguagem e ambiente R versão 4.0.2. Dados morfológicos dos experimentos de desenvolvimento com glutamina ou com BAP foram, primeiramente, submetidos aos testes dos pressupostos da ANOVA – Teste de Levene e Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk – para então seguirem para a Análise de Variância (*one-way* ANOVA). Caso os pressupostos não fossem atendidos, foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferença na distribuição em ao menos um dos grupos. O Teste de Comparação Múltipla de Tukey foi aplicado *post hoc* para casos em que a variância entre as médias dos tratamentos tenha sido apontada como significativa.

3 RESULTADOS

3.1 GERMINAÇÃO

O procedimento de desinfestação superficial da cápsula mostrou-se satisfatório, dado que somente duas placas apresentaram contaminação fúngica, uma de cada tratamento. Esse procedimento já havia sido previamente testado em nosso laboratório com cápsulas da espécie *Dryadella zebrina*, para as quais havia sido eficiente (ANJOS *et al.*, 2021). Em seguida à inoculação, foi possível observar sementes achatadas com formato elipsóide e uma massa clorofilada no centro, a qual corresponde ao embrião, denotando que a cápsula estava suficientemente madura no momento da coleta e que a espécie responde positivamente à autogamia.

A germinação de *P. leucopyramis* é assíncrona. Na FIGURA 1 é perceptível a presença de vários estádios de germinação simultaneamente, desde protocormos recém germinados até as primeiras plântulas com folhas. Considera-se como “germinada” toda semente cujo embrião tenha rompido a testa ao se expandir, gerando um protocormo. Os primeiros protocormos foram observados aos 30 dias após a implementação do experimento, em maior número quando cultivados em meio WPM. Além de uma resposta de germinação mais rápida, o meio WPM também propiciou desenvolvimento dos

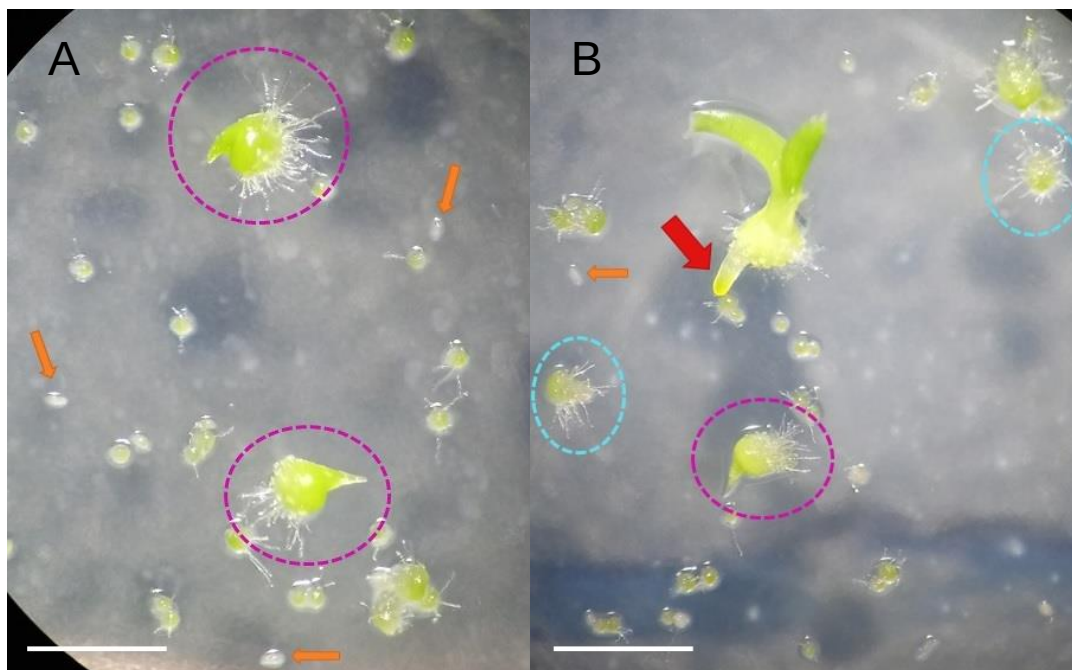
protocormos tanto mais acelerado quanto em maior quantidade, quando comparado com o meio MS/2. O QUADRO 4 traz as frequências absolutas de cada estágio de desenvolvimento das plântulas, observados ao longo de 60, 90, 105 e 120 dias, a partir do estágio III – protocormo expandido com lançamento de rizoides. Ao final dos 120 dias, a taxa de germinação obtida para o meio MS/2 foi de 85,5% e para o meio WPM foi de 97,72%.

FIGURA 1 – OBSERVAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, DENOTANDO SEU PADRÃO ASSÍNCRONO.



LEGENDA: observação ao aumento de 2x no estereomicroscópio. Barra: 2 mm.

FIGURA 2 – DIFERENTES ESTÁDIOS DE PROTOCORMOS OBSERVADOS DURANTE A GERMINAÇÃO DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*.



LEGENDA: A: Observação aos 90 dias de cultivo, em meio WPM. B: Observação aos 105 dias de cultivo, em meio WPM. Setas em laranja apontam para sementes não germinadas. Círculos em azul identificam protocormos em estágio III, e círculos em magenta identificam protocormos em estágio IV. A seta em vermelho aponta a emissão da primeira raiz verdadeira em um indivíduo em estágio V. Barra: 2 mm. Estádio III: protocormo expandido com feixe de rizoides. Estádio IV: protocormo expandido com rizoides e ápice visível. Estádio V: plântula com ao menos uma raiz ou folha.

QUADRO 4 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS DE CADA ESTÁDIO (E) DE DESENVOLVIMENTO DOS PROTOCORMOS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* AO LONGO DAS OBSERVAÇÕES DE 60, 90, 105 E 120 DIAS.

	60 dias			90 dias			105 dias			120 dias		
	E III	E IV	E V	E III	E IV	E V	E III	E IV	E V	E III	E IV	E V
MS/2	95	0	0	165	10	0	167	37	0	426	120	3
WPM	191	0	0	163	116	0	179	257	31	400	584	87

LEGENDA: E III: protocormo expandido com lançamento de rizoides; E IV: protocormo expandido com rizoides e ápice visível; E V: plântula com ao menos uma raiz ou folha.

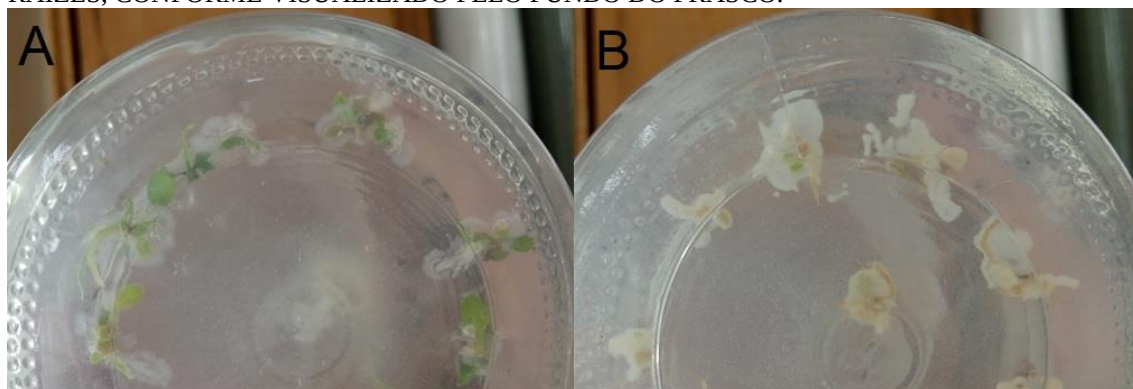
3.2 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS

Foram recuperadas do meio MS/2 um total de 637 plântulas, o que corresponde à 23,65% das sementes germinadas nesse meio, enquanto do meio WPM foram recuperadas 2151 plântulas, correspondendo à 69,88% da germinação nesse meio. As plântulas se mantiveram saudáveis durante os 30 dias de permanência no meio de nivelamento.

3.2.1 Desenvolvimento com glutamina

Os tratamentos com suplementação de glutamina ao meio apresentaram grande contaminação bacteriana ao redor das raízes das plântulas, aparecendo logo durante a primeira semana de cultivo. A contaminação levou à oxidação da maior parte das plântulas nesses frascos (FIGURA 3B). Sinais das colônias bacterianas ao redor das raízes também foram observadas no tratamento Gln0, no entanto não houve espalhamento da contaminação e as plântulas se mantiveram saudáveis (FIGURA 3A).

FIGURA 3 – EXEMPLOS DE FRASCOS COM CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA REGIÃO DAS RAÍZES, CONFORME VISUALIZADO PELO FUNDO DO FRASCO.



LEGENDA: A: sinais de contaminação bacteriana ao redor das raízes das plântulas no tratamento Gln0 (glutamina 0 mM). B: contaminação bacteriana observada no tratamento Gln1 (glutamina 6,8 mM); as plântulas se encontram oxidadas.

As plântulas foram avaliadas após 30 e 60 dias da transferência para os meios de cultura quanto aos comprimentos gerais e quantidades totais de raízes e folhas. Todos os dados apresentaram homogeneidade ($p > 0,05$), com exceção ao comprimento de raiz (CR) após 60 dias. Os valores médios da cada variável foram calculados e o efeito da concentração de glutamina no meio de cultura foi estimado segundo o Teste de Kruskal-Wallis. A maior parte dos dados não apresentava distribuição em curva normal. Somente as variáveis de número médio de raízes (NR) e número médio de folhas (NF), aos 60 dias, forneceram valores de p superiores a 0,05 no Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk, portanto, para esses casos, foi realizada a estimativa de *one-way* ANOVA. O Teste de Comparação Múltipla de Tukey foi aplicado *post hoc* quando as diferenças foram significativas.

TABELA 1 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS PARA NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO DE RAIZ (CR), EM MILÍMETROS, NÚMERO DE FOLHAS (NF) E COMPRIMENTO DE FOLHA (CF), EM MILÍMETROS, DAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* CULTIVADAS POR 30 DIAS, EM CADA TRATAMENTO COM GLUTAMINA.

Tratamento	Média	Levene	Shapiro-Wilk	Kruskal-Wallis
------------	-------	--------	--------------	----------------

				<i>df</i>	χ^2	<i>p</i>
NR ¹						
Gln0	2	0,0938	0,0275	2	10,997	0,004**
Gln1	3					
Gln2	3					
CR						
Gln0	8,77	0,8298	3,51e ⁻⁰³	2	2,396	0,3019
Gln1	8,59					
Gln2	7,40					
NF						
Gln0	3	0,4522	0,0005	2	0,5071	0,776
Gln1	3					
Gln2	3					
CF						
Gln0	4,17	0,4671	0,0006	2	1,0729	0,5848
Gln1	4,38					
Gln2	4,63					

¹Comparação das médias do número de raízes (Kruskal-Wallis ** $p < 0,01$) mostra uma diferença significativa entre os tratamentos.

LEGENDA: Gln0 = glutamina 0 mM; Gln1 = glutamina 6,8 mM; Gln2 = glutamina 13,6 mM.

TABELA 2 – TESTE DE TUKEY *POST HOC* PARA NÚMERO DE RAÍZES DAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, APÓS 30 DIAS, COMPARANDO OS TRATAMENTOS PAR-A-PAR.

Tratamentos	<i>dm</i>	<i>p</i>
Gln1-Gln0	1,4375	0,013a
Gln2-Gln0	1,4375	0,013a
Gln2-Gln1	-8,8818	1,0b

Letras iguais (a, b) não apresentam diferença estatística entre si ao nível de 5% de confiança do teste.

LEGENDA: Gln0 = glutamina 0 mM; Gln1 = glutamina 6,8 mM; Gln2 = glutamina 13,6 mM.

TABELA 3 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS PARA NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO DE RAIZ (CR), EM MILÍMETROS, NÚMERO DE FOLHAS (NF) E COMPRIMENTO DE FOLHA (CF), EM MILÍMETROS, DAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* CULTIVADAS POR 60 DIAS, EM CADA TRATAMENTO COM GLUTAMINA.

Tratamento	Média	Levene	Shapiro-Wilk	Kruskal-Wallis / ANOVA		
				<i>df</i>	χ^2 / F	<i>p</i>
NR ¹						
Gln0	4	0,2133	0,4728	2	6,699	0,0036**
Gln1	6					
Gln2	3					
CR ²						
Gln0	10,33	0,0226	4,98e ⁻⁰⁶	2	21,598	2,04e-05***
Gln1	7,28					

Gln2	5,54					
NF						
Gln0	4	0,286	0,0747	2	1,433	0,253
Gln1	4					
Gln2	3					
CF						
Gln0	4,90	0,348	0,0247	2	2,9376	0,2302
Gln1	5,29					
Gln2	5,70					

¹Comparação das médias do número de raízes por indivíduo (ANOVA ** $p < 0,01$) mostra uma diferença significativa entre os tratamentos.

²Comparação das médias do comprimento de raiz (Kruskal-Wallis *** $p < 0,001$) mostra uma forte diferença significativa entre os tratamentos.

LEGENDA: Gln0 = glutamina 0 mM; Gln1 = glutamina 6,8 mM; Gln2 = glutamina 13,6 mM.

TABELA 4 – TESTE DE TUKEY *POST HOC* PARA NÚMERO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DE RAIZ DAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, APÓS 60 DIAS, COMPARANDO OS TRATAMENTOS PAR-A-PAR.

Tratamentos	<i>dm</i>	<i>p</i>
NR		
Gln1-Gln0	2,2308	0,011a
Gln2-Gln0	-0,2154	0,958b
Gln2-Gln1	-2,4461	0,009a
CR		
Gln1-Gln0	-3,0469	0,001a
Gln2-Gln0	-4,7857	0,00001a
Gln2-Gln1	-1,7388	0,153b

Letras iguais (a, b) dentro de cada conjunto não apresentam diferença estatística entre si ao nível de 5% de confiança no teste.

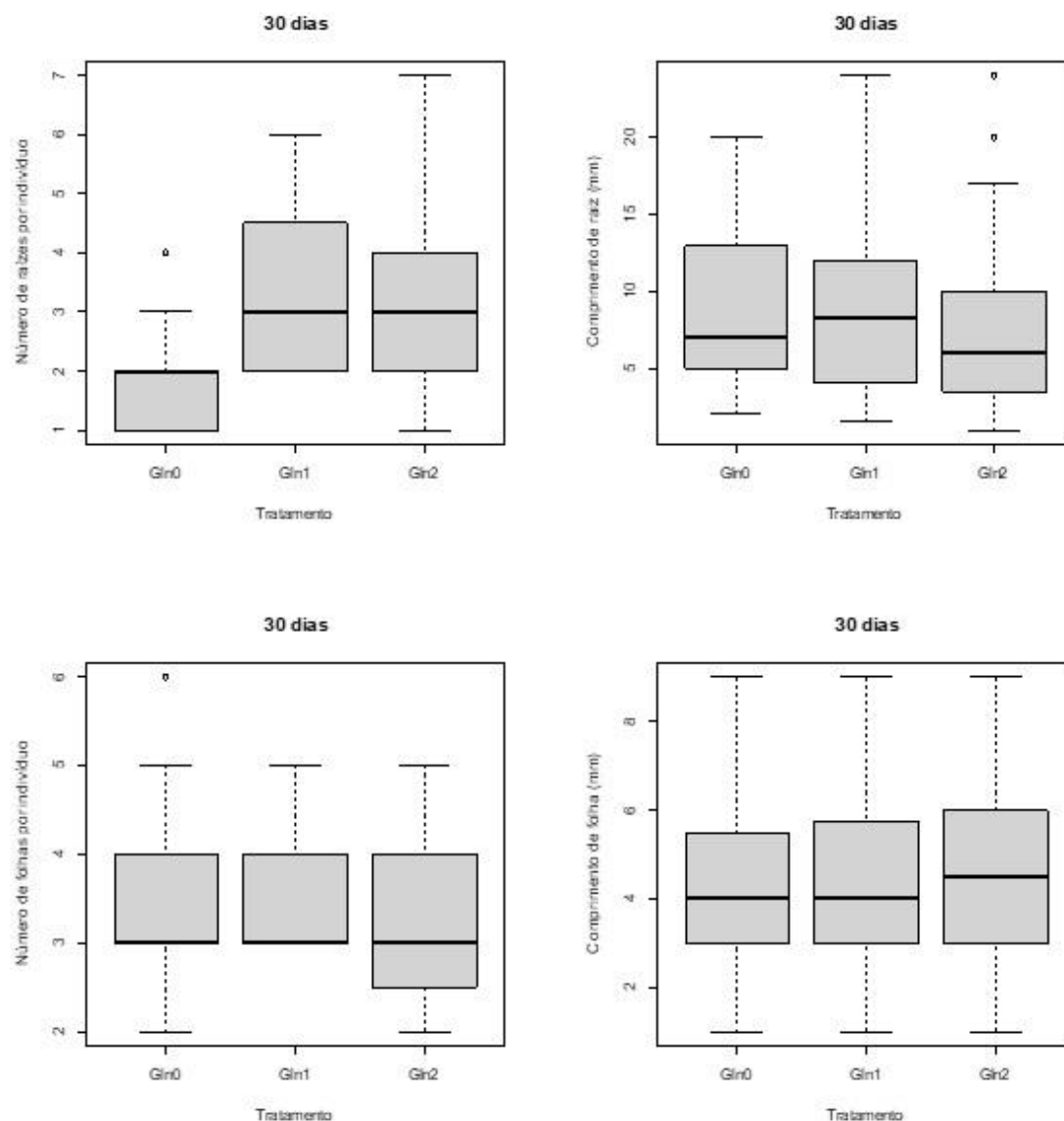
LEGENDA: Gln0 = glutamina 0 mM; Gln1 = glutamina 6,8 mM; Gln2 = glutamina 13,6 mM.

Com 30 dias de experimento, a única diferença observada entre os tratamentos foi em relação ao número de raízes, sendo essa diferença entre Gln0 e os dois tratamentos com suplementação de glutamina. Gln1 e Gln2 não apresentaram diferença entre si para essa variável. Entretanto, no decorrer de 60 dias do experimento, o tratamento Gln1 se diferenciou em relação aos demais, tendo a maior média de número de raízes ($m = 6$). Para essa avaliação, não foi apontada diferença estatística entre Gln0 e Gln2.

O comprimento das raízes apresentou diferença entre os tratamentos na avaliação após 60 dias, com Gln0 tendo a maior média ($m = 10,33$ mm) e se diferenciando de Gln1 e Gln2, que foram estatisticamente equivalentes para essa variável.

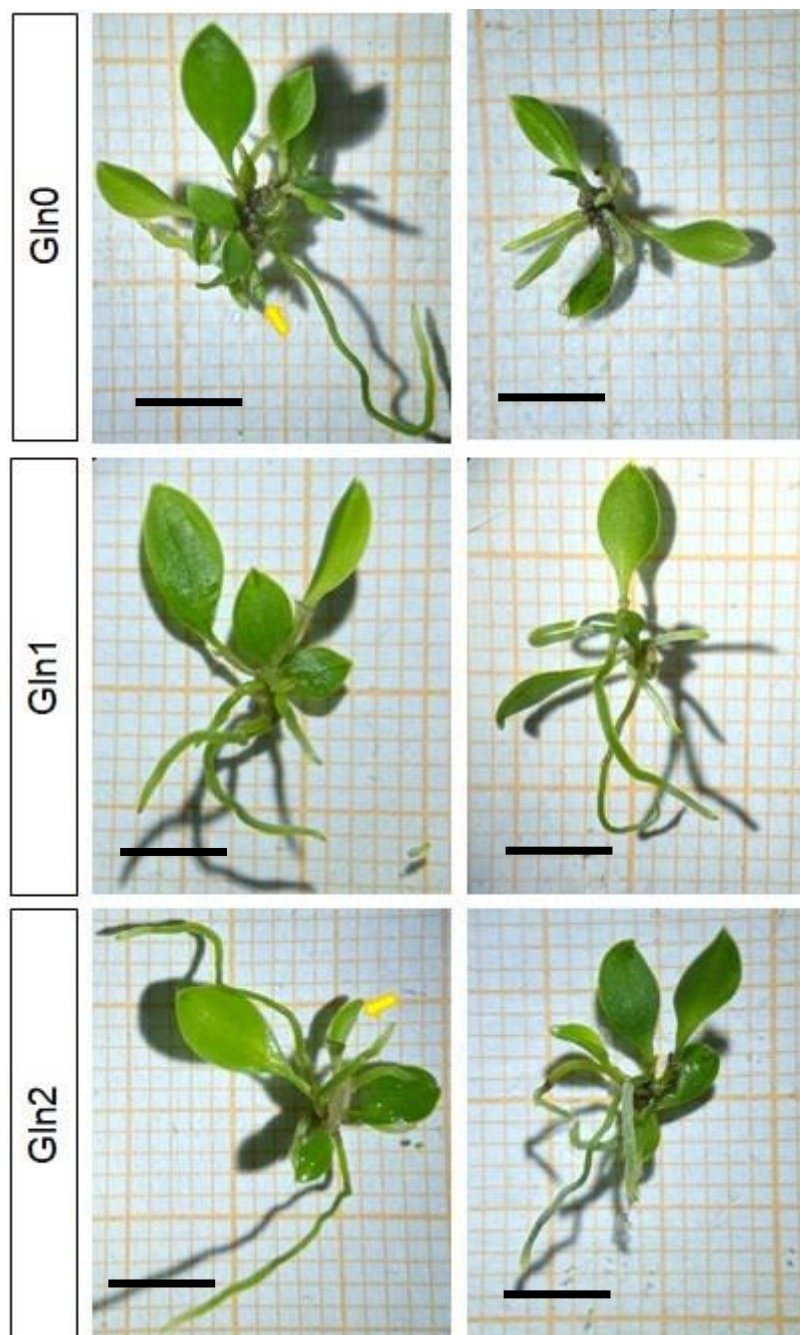
Nas FIGURAS 4 e 5 estão apresentados os gráficos de caixas (*box-plot*) para as variáveis observadas nas avaliações de 30 e 60 dias. O número de folhas e comprimento de folha não foram influenciados pela adição de glutamina ao meio de cultura em nenhuma das concentrações testadas.

FIGURA 4 – BOX-PLOT DAS VARIÁVEIS AVALIADAS NAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS GLN0, GLN1 E GLN2, AOS 30 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.



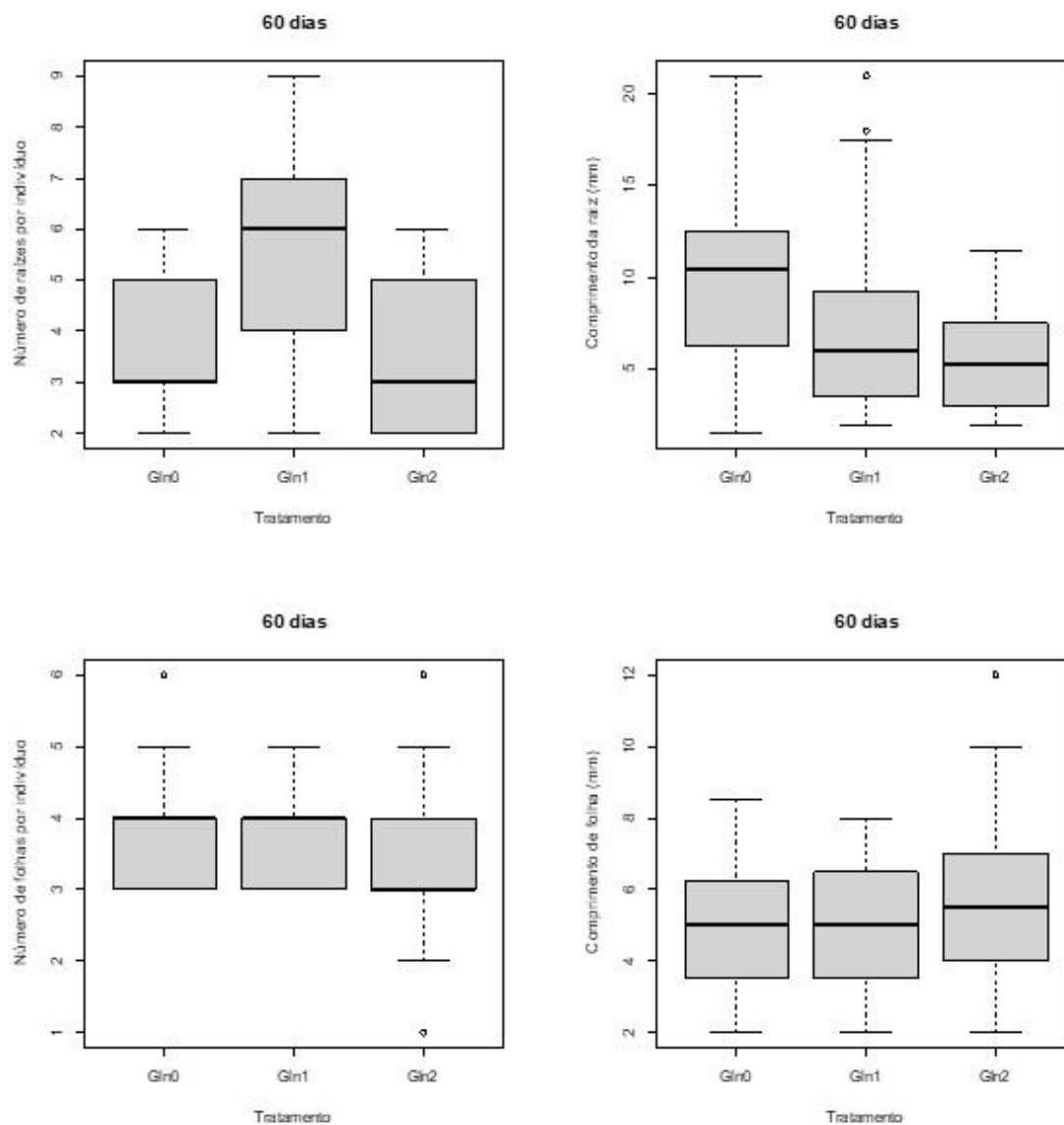
LEGENDA: Gln0 = glutamina 0 mM; Gln1 = glutamina 6,8 mM; Gln2 = glutamina 13,6 mM.

FIGURA 5 – EXEMPLOS DE PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* CULTIVADAS EM CADA UM DOS TRATAMENTOS COM GLUTAMINA, AOS 30 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.



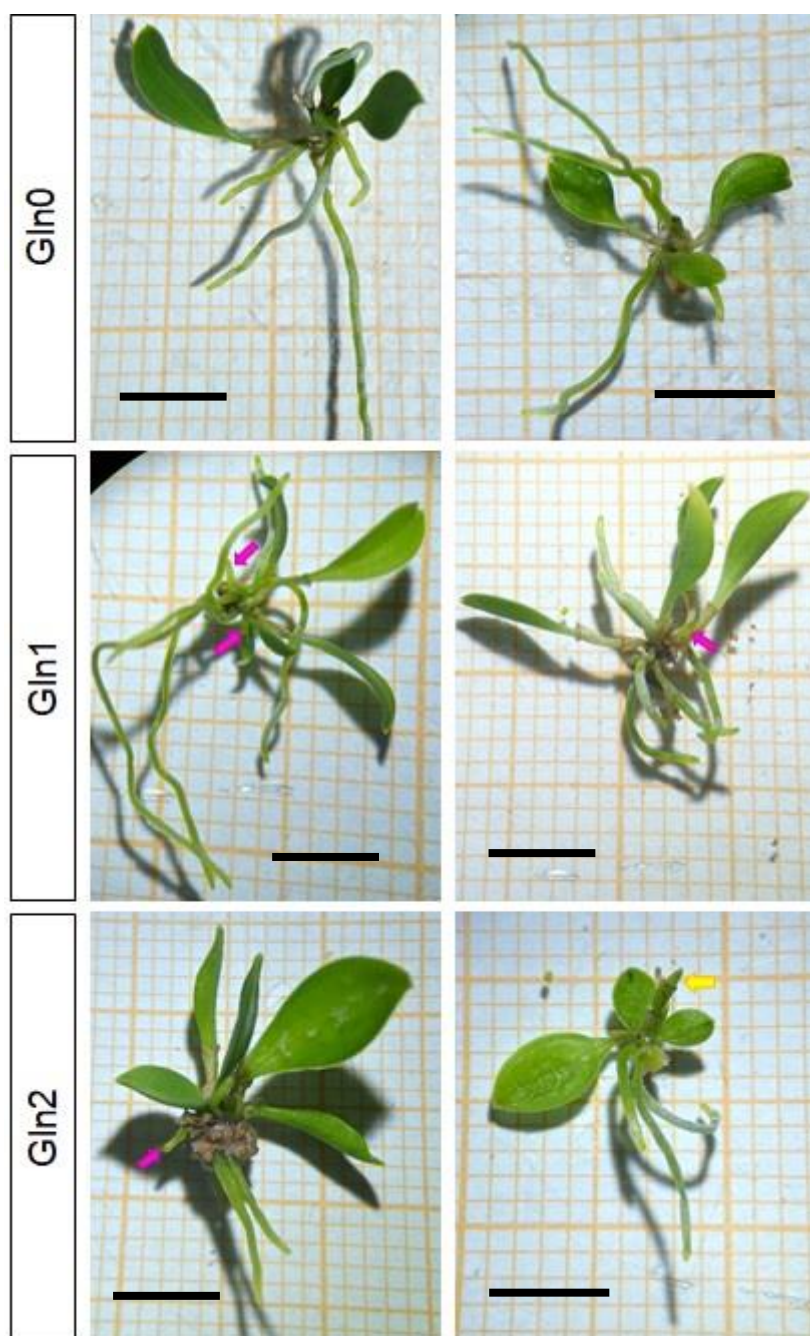
LEGENDA: o menor quadrado na grade milimetrada corresponde a 1 mm. Setas em amarelo apontam para formação de novos brotos. Barra: 5 mm. Gln0 = glutamina 0 mM. Gln1 = glutamina 6,8 mM. Gln2 = glutamina 13,6 mM.

FIGURA 6 – BOX-PLOT DAS VARIÁVEIS AVALIADAS NAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS GLN0, GLN1 E GLN2, AOS 60 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.



LEGENDA: Gln0 = glutamina 0 mM; Gln1 = glutamina 6,8 mM; Gln2 = glutamina 13,6 mM.

FIGURA 7 – EXEMPLOS DE PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* CULTIVADAS EM CADA UM DOS TRATAMENTOS COM GLUTAMINA, AOS 60 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.



LEGENDA: o menor quadrado na grade milimetrada corresponde a 1 mm. Setas em magenta apontam para raízes recém formadas. Setas em amarelo apontam para formação de novos brotos. Barra: 5 mm. Gln0 = glutamina 0 mM. Gln1 = glutamina 6,8 mM. Gln2 = glutamina 13,6 mM.

3.2.2 Desenvolvimento com BAP

Nenhuma das variáveis avaliadas apresentou distribuição em curva normal, portanto todos os dados foram submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis para avaliar o efeito da concentração de BAP sobre cada um dos critérios estabelecidos. Houve inconsistências quanto à homogeneidade de distribuição das variâncias ($p > 0,05$ no Teste

de Levene) entre as avaliações de 30 e 60 dias. As Tabelas a seguir trazem os valores médios calculados para cada tratamento e os dados dos testes estatísticos realizados.

TABELA 5 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS PARA NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO DE RAIZ (CR), NÚMERO DE FOLHAS (NF), COMPRIMENTO DE FOLHA (CF) E NÚMERO DE BROTAÇÕES (NB) DAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, APÓS 30 DIAS, EM CADA TRATAMENTO COM BAP.

Tratamento	Média	Levene	Shapiro-Wilk	Kruskal-Wallis		
				df	χ^2	p
NR ¹						
BAP0	3	0,5004	0,011	3	16,627	0,0008***
BAP3	2					
BAP6	2					
BAP9	2					
CR ²						
BAP0	10,28	0,0212	2,04e ⁻⁰⁸	3	12,087	0,0071**
BAP3	9,34					
BAP6	7,42					
BAP9	7,30					
NF						
BAP0	4	0,3206	0,0149	3	3,1198	0,3735
BAP3	4					
BAP6	3					
BAP9	4					
CF						
BAP0	4,62	0,1692	1,22e ⁻⁰⁷	3	3,0428	0,3851
BAP3	4,88					
BAP6	4,43					
BAP9	4,37					
NB						
BAP0	3	0,1563	0,0029	3	3,3794	0,3367
BAP3	4					
BAP6	4					
BAP9	4					

¹Comparação das médias do número de raízes por indivíduo (Kruskal-Wallis *** $p < 0,001$) mostra uma forte diferença entre os tratamentos.

²Comparação das médias do comprimento de raiz (Kruskal-Wallis ** $p < 0,01$) aponta diferença estatística entre os tratamentos.

LEGENDA: BAP0 = 0 μ M; BAP3 = 3 μ M; BAP6 = 6 μ M; BAP9 = 9 μ M.

TABELA 6 – TESTE DE TUKEY *POST HOC* PARA NÚMERO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DE RAIZ DE PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, APÓS 30 DIAS, COMPARANDO OS TRATAMENTOS PAR-A-PAR.

Tratamento	<i>dm</i>	<i>p</i>
NR		
BAP3-BAP0	-0,9583	0,0248a
BAP6-BAP0	-1,125	0,0057a
BAP9-BAP0	-1,375	0,0004a
BAP6-BAP3	-0,1667	0,9585b
BAP9-BAP3	-0,4167	0,5943b
BAP9-BAP6	-0,25	0,8754b
CR		
BAP3-BAP0	-0,9329	0,7379b
BAP6-BAP0	-2,8505	0,0135a
BAP9-BAP0	-2,9771	0,0127a
BAP6-BAP3	-1,9176	0,2289ab
BAP9-BAP3	-2,0442	0,2038ab
BAP9-BAP6	-0,1267	0,9994b

Letras iguais (a, b) dentro de cada conjunto não apresentam diferença estatística entre si ao nível de 5% de confiança no teste.

LEGENDA: BAP0 = 0 μ M; BAP3 = 3 μ M; BAP6 = 6 μ M; BAP9 = 9 μ M.

TABELA 7 – RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS PARA NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO DE RAIZ (CR), NÚMERO DE FOLHAS (NF), COMPRIMENTO DE FOLHA (CF) E NÚMERO DE BROTAÇÕES (NB) DAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, APÓS 60 DIAS, EM CADA TRATAMENTO COM BAP.

Tratamento	Média	Levene	Shapiro-Wilk	Kruskal-Wallis		
				<i>df</i>	χ^2	<i>p</i>
NR ¹						
BAP0	5	3,68e ⁻⁰⁵	0,0005	3	19,94	0,0002***
BAP3	2					
BAP6	3					
BAP9	2					
CR ²						
BAP0	11,04	0,0004	1,46e ⁻⁰⁷	3	28,113	3,44e ⁻⁰⁶ ***
BAP3	8,37					
BAP6	6,92					
BAP9	7,68					
NF						
BAP0	4	0,0419	7,13e ⁻⁰⁶	3	4,2501	0,3257
BAP3	5					
BAP6	5					
BAP9	5					
CF						
BAP0	5,38	0,2333	2,31e ⁻⁰⁶	3	3,7916	0,2849
BAP3	5,25					

BAP6	5,02					
BAP9	5,58					
NB						
BAP0	1	0,0038	0,0002	3	3,017	0,389
BAP3	1					
BAP6	1					
BAP9	2					

^{1, 2}Comparação das médias para número de raízes e comprimento de raiz (Kruskal-Wallis *** $p < 0,001$) aponta uma forte diferença entre os tratamentos.

LEGENDA: BAP0 = 0 μ M; BAP3 = 3 μ M; BAP6 = 6 μ M; BAP9 = 9 μ M.

TABELA 8 – TESTE DE TUKEY *POST HOC* PARA NÚMERO DE RAÍZES E COMPRIMENTO DE RAIZ DAS PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, APÓS 60 DIAS, COMPARANDO OS TRATAMENTOS PAR-A-PAR.

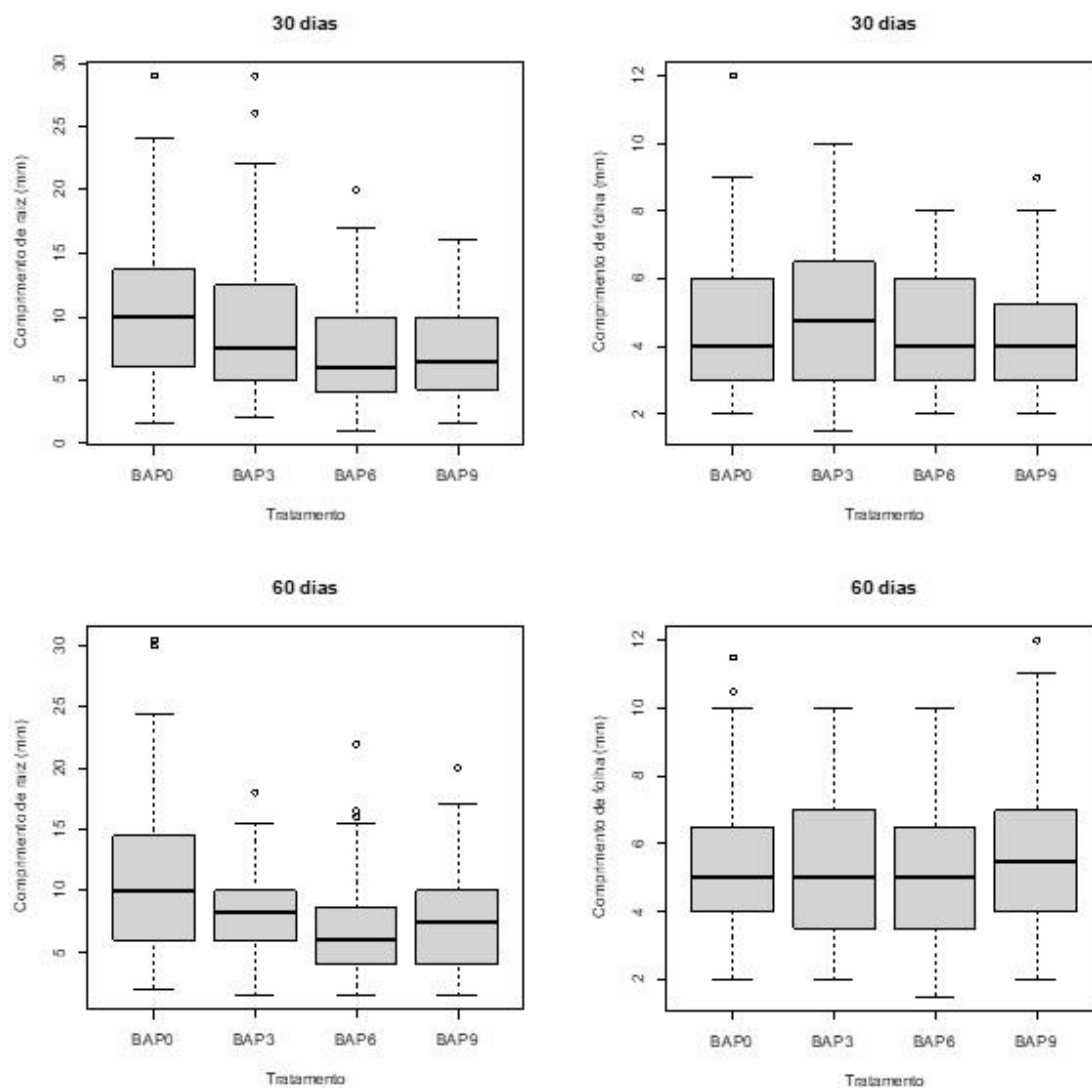
Tratamento	<i>dm</i>	<i>p</i>
NR		
BAP3-BAP0	-2,6667	0,000006a
BAP6-BAP0	-1,7917	0,0038ab
BAP9-BAP0	-2,375	0,00006a
BAP6-BAP3	0,875	0,3211c
BAP9-BAP3	0,2917	0,9402c
BAP9-BAP6	-0,5833	0,6632c
CR		
BAP3-BAP0	-2,6695	0,0102ab
BAP6-BAP0	-4,124	0,0000007a
BAP9-BAP0	-3,3553	0,0003a
BAP6-BAP3	-1,4545	0,3979c
BAP9-BAP3	-0,6858	0,8951c
BAP9-BAP6	0,7687	0,8249c

Letras iguais (a, b, c) dentro de cada conjunto não apresentam diferença estatística entre si ao nível de 5% de confiança no teste.

LEGENDA: BAP0 = 0 μ M; BAP3 = 3 μ M; BAP6 = 6 μ M; BAP9 = 9 μ M.

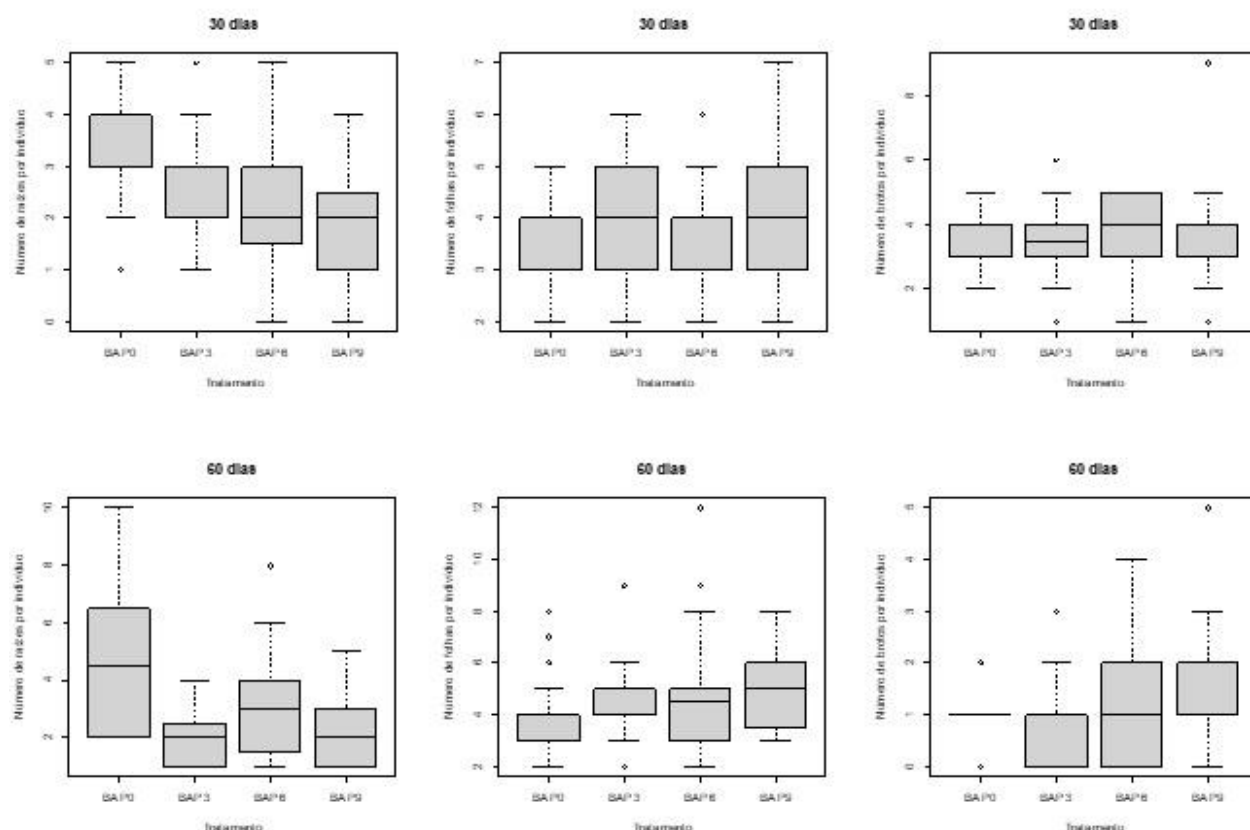
Como esperado, o número e comprimento de raízes foram afetados pela presença da citocinina do meio de cultura. O tratamento controle apresentou as maiores médias tanto no número de raízes ($m = 5$) quanto no comprimento dessas ($m = 11,04$ mm). Os demais tratamentos não resultaram em diferenças significativas entre si para nenhum dos critérios de raízes. No entanto, nenhuma das concentrações de BAP testadas teve efeito significativo sobre o número e comprimento de folhas, nem sobre o número de novas brotações por indivíduo. Apesar disso, foi observada uma tendência de aumento no número de folhas e brotos nos tratamentos com a citocinina em relação ao controle.

FIGURA 8 – BOX-PLOT DOS COMPRIMENTOS DE RAIZ E FOLHA DE PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS BAP0, BAP3, BAP6 E BAP9, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO.



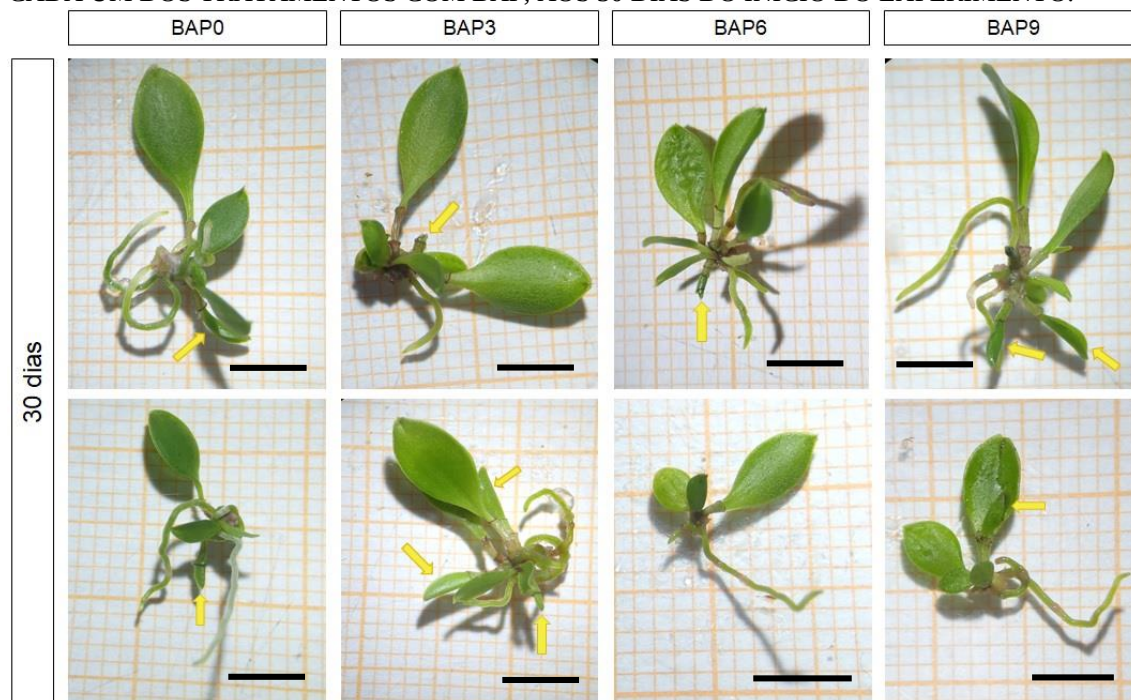
LEGENDA: BAP0 = 0 μ M; BAP3 = 3 μ M; BAP6 = 6 μ M; BAP9 = 9 μ M.

FIGURA 9 – BOX-PLOT DOS NÚMEROS DE RAÍZES, FOLHAS E BROTAÇÕES DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, POR INDIVÍDUO, COM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS BAP0, BAP3, BAP6 E BAP9, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO.



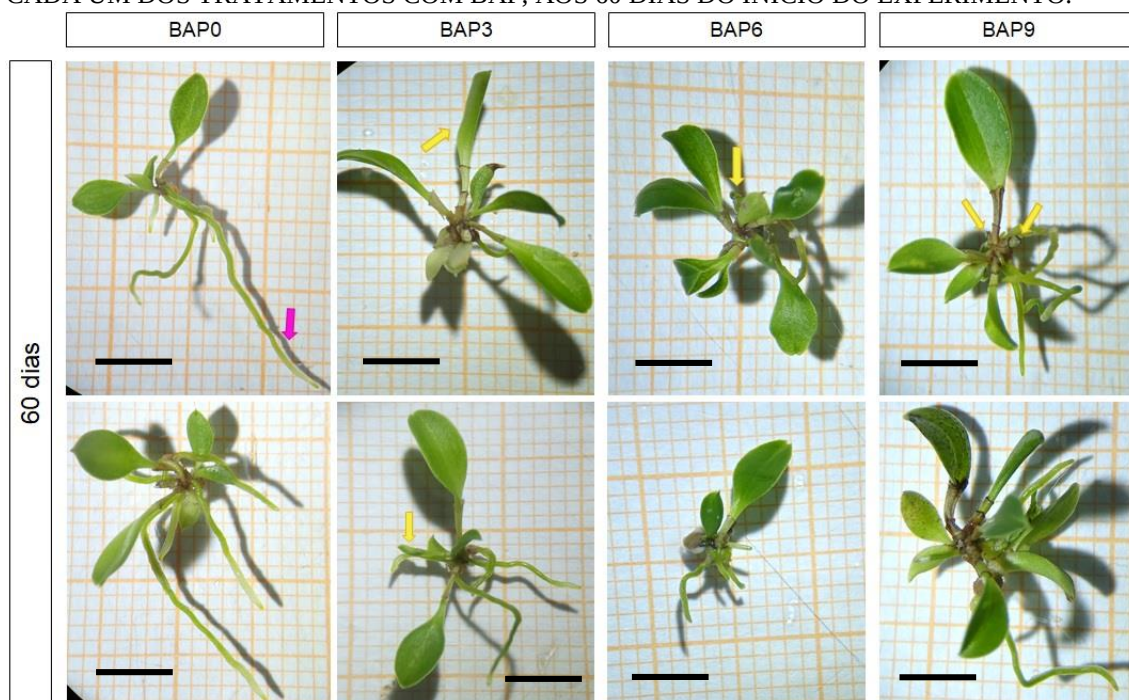
LEGENDA: BAP0 = 0 μM ; BAP3 = 3 μM ; BAP6 = 6 μM ; BAP9 = 9 μM .

FIGURA 10 – EXEMPLOS DE PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* CULTIVADAS EM CADA UM DOS TRATAMENTOS COM BAP, AOS 30 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.



LEGENDA: Setas em amarelo apontam para brotações recém formadas. Barra: 5 mm. BAP0 = 0 μM . BAP3 = 3 μM . BAP6 = 6 μM . BAP9 = 9 μM .

FIGURA 11 – EXEMPLOS DE PLÂNTULAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* CULTIVADAS EM CADA UM DOS TRATAMENTOS COM BAP, AOS 60 DIAS DO INÍCIO DO EXPERIMENTO.



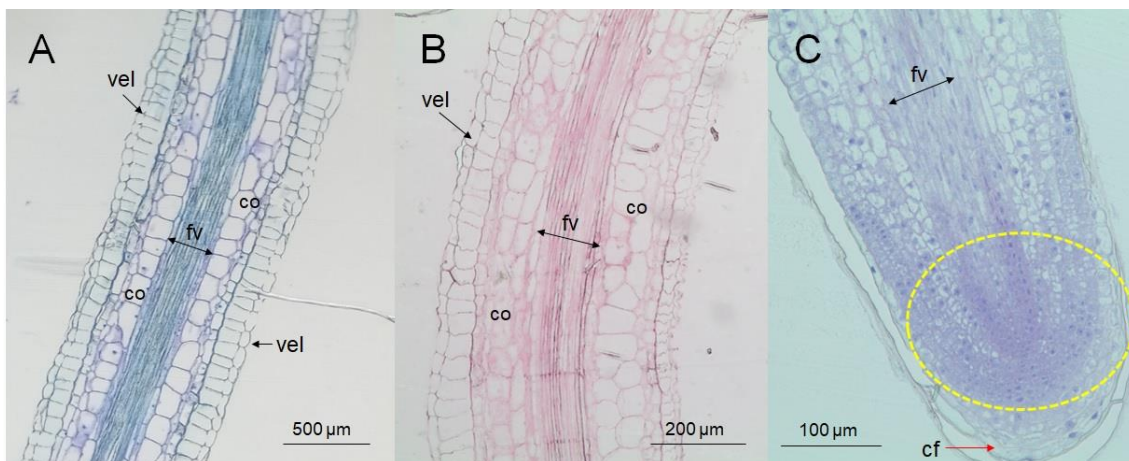
LEGENDA: A seta em magenta aponta para raiz com um dos maiores comprimentos. Setas em amarelo apontam para brotações recém formadas. Barra: 5 mm. BAP0 = 0 μ M. BAP3 = 3 μ M. BAP6 = 6 μ M. BAP9 = 9 μ M.

3.3 ANÁLISE ANATÔMICA

3.3.1 Anatomia radicular

As raízes de *Pabstiella leucopyramis* possuem velame biestratificado. Células do epivelame apresentam formato retangular, achatadas radialmente, com espessamento de parede celular em “O”, enquanto as células do endovelame são maiores e alongadas radialmente. O córtex é heterogêneo, distinto em, pelo menos, dois tipos de células. Idioblastos foram observados nas células do córtex (FIGURA 18). A epiderme é uniestratificada e com paredes celulares finas.

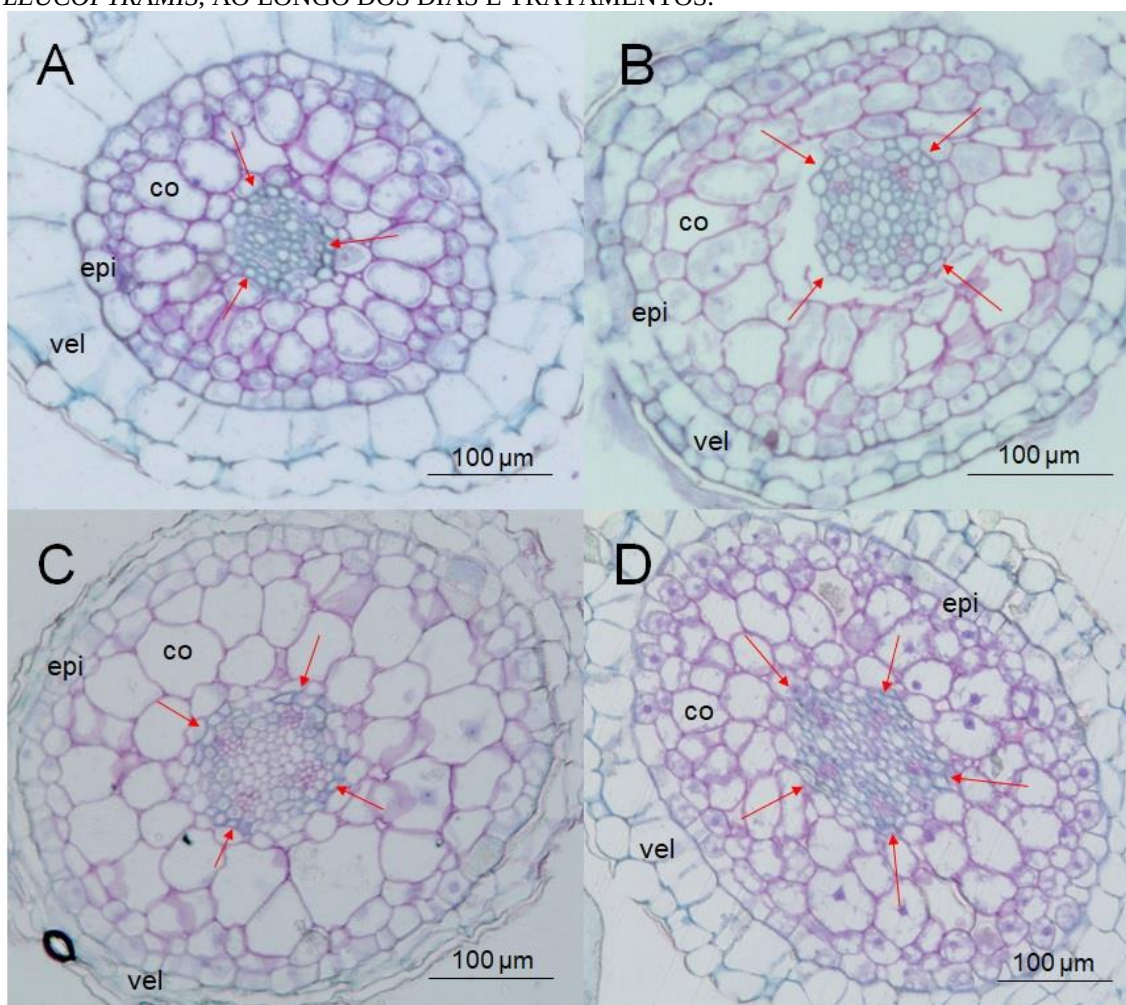
FIGURA 12 – SECÇÕES LONGITUDINAIS DAS RAÍZES DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*.



LEGENDA: A, C: coloração com Azul de Toluidina. B: coloração com Fucsina Básica. O círculo em amarelo (C) demarca a região do meristema apical radicular. co = córtex; vel = velame; fv = feixe vascular; cf = coifa.

A comparação dos cortes transversais entre os tratamentos Gln0, Gln1 e Gln2 revelou uma progressão da organização dos feixes vasculares relacionada tanto com a concentração de glutamina quanto com o tempo de maturação. Em raízes do tempo zero (R0) – correspondentes a plântulas de nove meses de idade –, o cilindro vascular apresentou três polos de protoxilema e algumas células de passagem, sem periciclo definido (FIGURA 13A). Arcos de floema já são visíveis. Após 30 dias (FIGURA 13B), são visíveis quatro arcos de protoxilema, com poucas células de metaxilema precoce, várias células de passagem, porém periciclo incompleto. O mesmo quadro foi observado aos 60 dias. No tratamento com Gln1, aos 30 dias, também foram vistos quatro arcos de protoxilema e poucas células de metaxilema, bem como células de passagem com parede espessada, mas sem separações definidas. Posteriormente, aos 60 dias, observou-se grande definição entre os quatro arcos do protoxilema e os vasos do floema, presença de células de metaxilema precoce e maior número de células de passagem com parede secundária espessada; o periciclo começou a ser definido (FIGURA 13C). A definição dos tecidos provocada por Gln1 aos 60 dias foi equivalente à provocada por Gln2 aos 30 dias, já indicando a maior influência que esse tratamento teria sobre os feixes vasculares. De fato, aos 60 dias (FIGURA 13D), em Gln2, foram visualizados cinco arcos de xilema e de floema, células de metaxilema precoce, estabelecimento da medula e diversas células de passagem com parede celular secundária espessada; o periciclo ainda não estava totalmente definido. Além disso, nesse tratamento (Gln2), as células do córtex eram menores e mais adensadas com relação ao tratamento Gln1 no mesmo tempo.

FIGURA 13 – COMPARAÇÃO DA SECÇÃO TRANSVERSAL DAS RAÍZES DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, AO LONGO DOS DIAS E TRATAMENTOS.



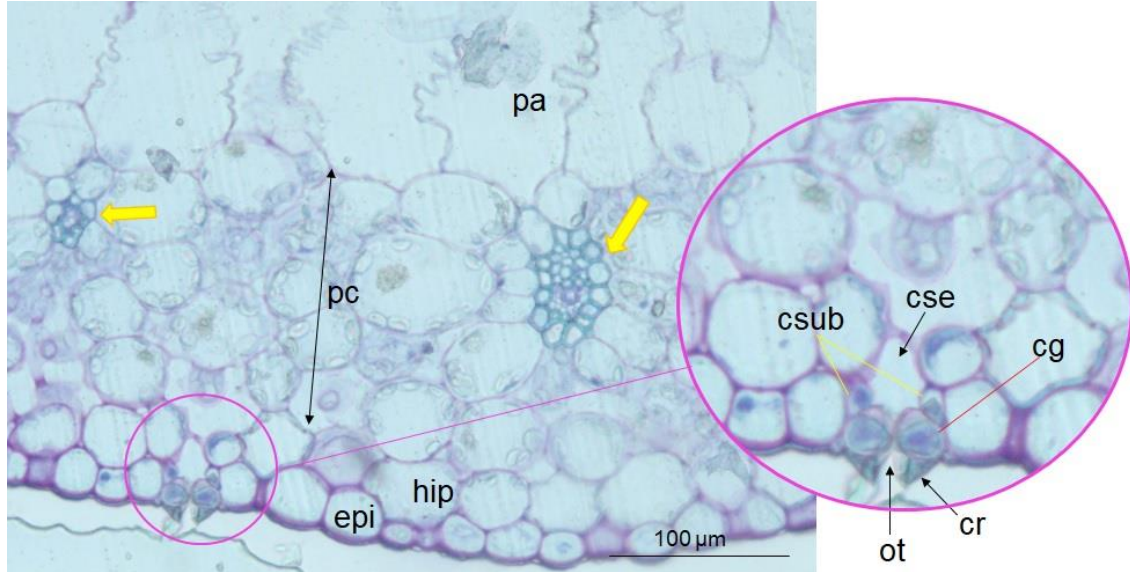
LEGENDA: A: R0. B: Gln0, 30 dias. C: Gln1, 60 dias. D: Gln2, 60 dias. Setas em vermelho apontam para os polos de desenvolvimento dos feixes vasculares. co = córtex; epi = epiderme; vel = velame.

3.3.2 Anatomia foliar

As folhas de *Pabstiella leucopyramis* apresentaramm cutícula conspícua e estriada, em ambas as faces, e epiderme uniestratificada, com células de formato circular, além de uma hipoderme. A margem das folhas era levemente curvada para baixo. Células do mesofilo na face abaxial eram menores do que as na face adaxial. As folhas possuíam sete conjuntos de feixes vasculares, alternando grupos de maior e de menor calibre, apresentando conjuntos de feixes nas extremidades da folha. Todos os feixes vasculares estavam inseridos no parênquima clorofilado, no terço inferior da folha, o qual também apresentou células circulares, sendo heterogêneo. Também foram observadas células grandes com paredes celulares finas e irregulares que, provavelmente, correspondem a um parênquima aquífero, voltado para a face adaxial. Estômatos puderam ser encontrados

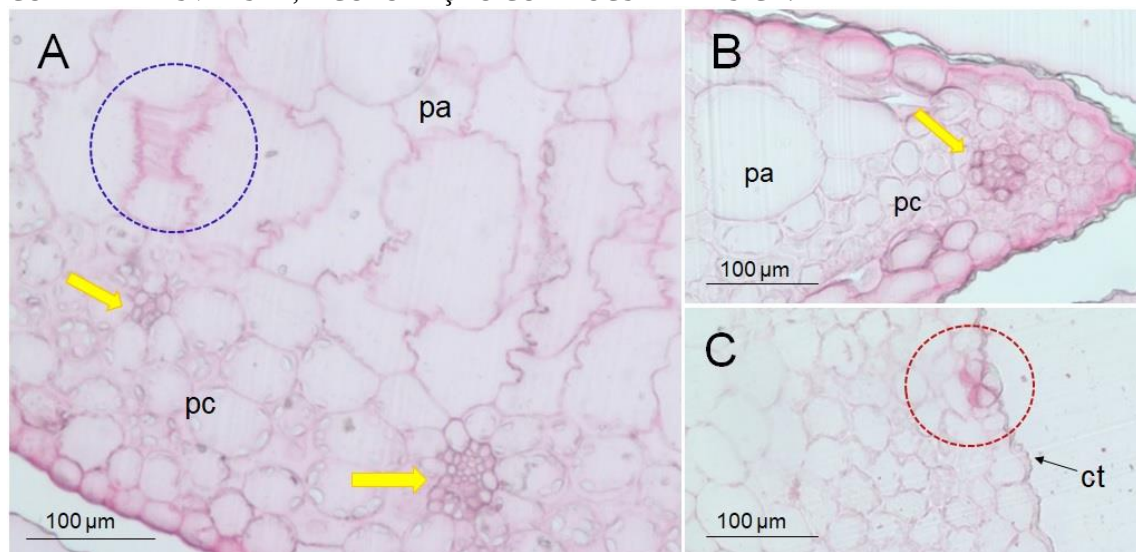
na face abaxial das folhas, localizados na mesma camada que a epiderme, tendo uma crista evidente e uma câmara sub-estomatal que se alonga até a primeira camada do mesofilo (FIGURA 14). Foram observados idioblastos no mesofilo, nas extremidades das folhas (FIGURA 18). Não foram observados tricomas.

FIGURA 14 – ASPECTOS ANATÔMICOS DA FOLHA DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, EM CORTE TRANSVERSAL, E COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUIDINA. AMOSTRA COLETADA DO MEIO DE NIVELAMENTO, CARACTERIZANDO O TEMPO ZERO (F0).



LEGENDA: Setas em amarelo apontam para feixes vasculares em desenvolvimento. Vista geral: pa = parênquima aquífero; pc = parênquima clorofilado; epi = epiderme; hip = hipoderme. Ampliação do estômato: cse = câmara sub-estomatal; csub = células subsidiárias; cg = células-guarda; ot = ostíolo; cr = crista.

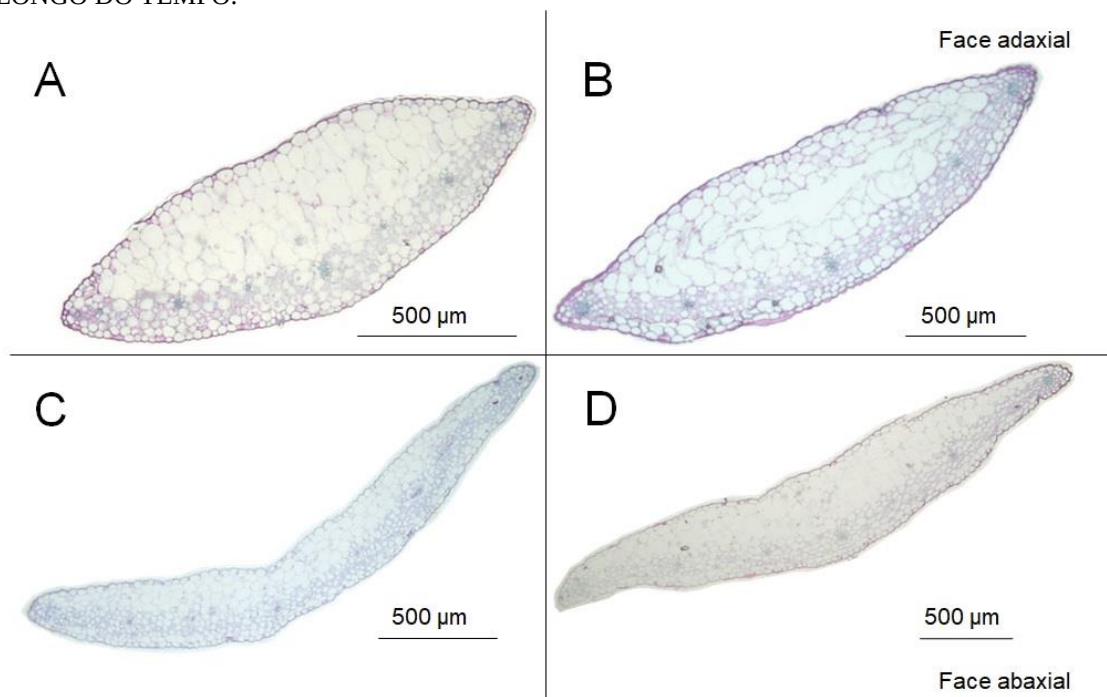
FIGURA 15 – ASPECTOS ANATÔMICOS DA FOLHA DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, EM CORTE TRANSVERSAL, E COLORAÇÃO COM FUCSINA BÁSICA.



LEGENDA: A: espessamento de parede celular em espiral (círculo). B: detalhe do feixe vascular na extremidade da folha. C: detalhe do estômato fechado (círculo). Setas em amarelo apontam feixes vasculares em desenvolvimento. pa = parênquima aquífero; pc = parênquima clorofilado; ct = cutícula.

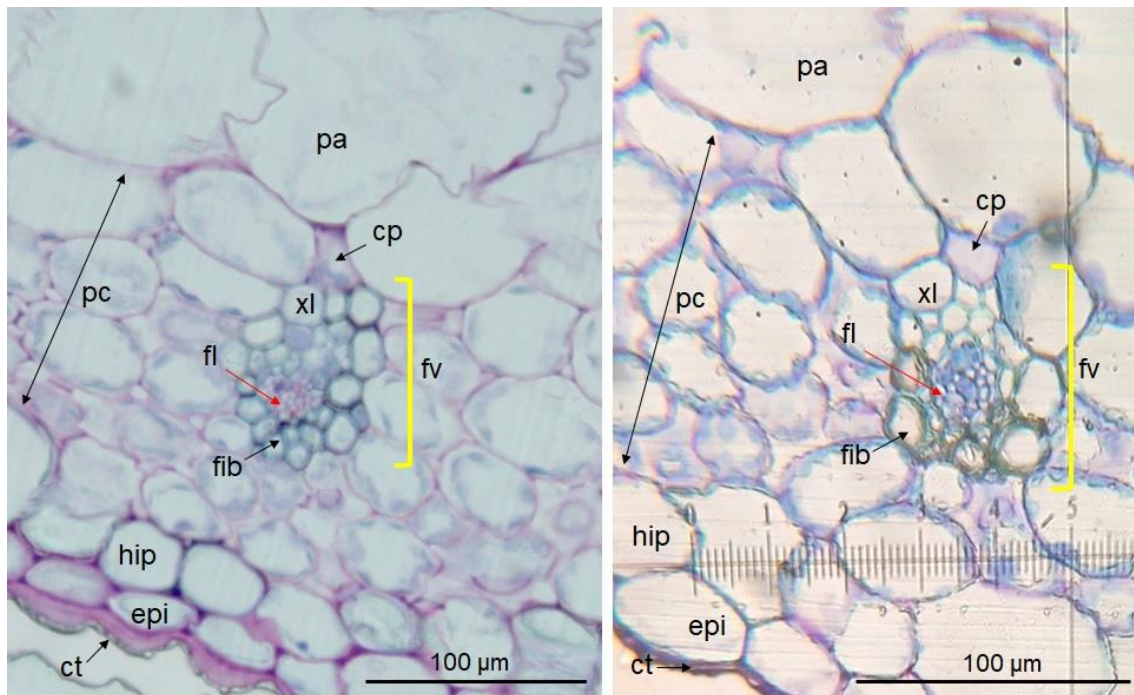
A espessura das folhas teve redução progressiva ao longo dos 30 e 60 dias de experimento, passando de uma forma elíptica a uma planificada alongada (FIGURA 16). Essa mudança de forma foi acompanhada pela diminuição tanto da área ocupada pelo parênquima aquífero quanto do tamanho das células desse tecido, as quais passaram a exibir formas melhor definidas e paredes celulares mais espessas. Os feixes vasculares também apresentaram maior diferenciação e organização com o passar do tempo, com floema, xilema e fibras evidentes, a partir dos 30 dias, em todos os tratamentos (FIGURA 17). Não foram observadas diferenças quanto à deposição de cutícula.

FIGURA 16 – MUDANÇA DE FORMA NAS FOLHAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS* AO LONGO DO TEMPO.



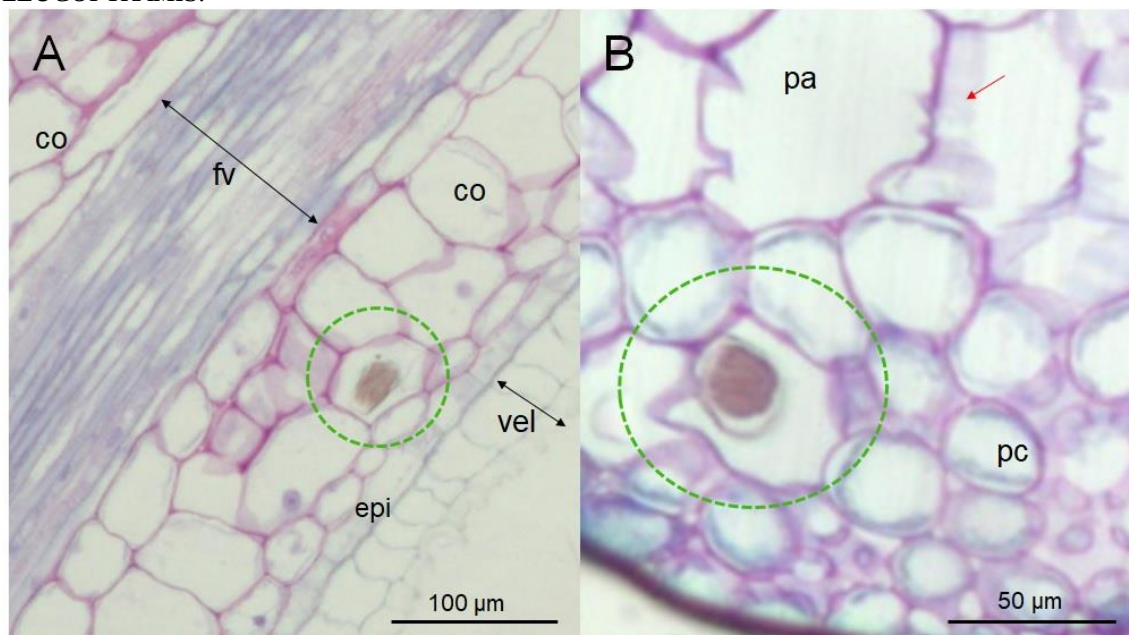
LEGENDA: A: folha do tempo zero. B: folha aos 30 dias no tratamento Gln0. C: folha aos 30 dias no tratamento Gln1. D: folha aos 60 dias no tratamento Gln0.

FIGURA 17 – OBSERVAÇÃO DOS FEIXES VASCULARES DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*, EM COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUIDINA, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO, RESPECTIVAMENTE.



LEGENDA: pa = parênquima aquífero; pc = parênquima clorofilado; hip = hipoderme; epi = epiderme; ct = cutícula; fv = feixe vascular; cp = célula de passagem; xl = xilema; fl = floema; fib = fibra.

FIGURA 18 – IDIOBLASTOS ENCONTRADOS NAS RAÍZES E FOLHAS DE *PABSTIELLA LEUCOPYRAMIS*.



LEGENDA: A: raiz em secção longitudinal. B: Detalhe da folha em secção transversal. Círculos verdes destacam os idioblastos. A seta em vermelho aponta para um espessamento de parede em espiral. co = córtex; epi = epiderme; vel = velame; fv = feixe vascular; pa = parênquima aquífero; pc = parênquima clorofilado.

4 DISCUSSÃO

4.1 GERMINAÇÃO

A ocorrência de auto-incompatibilidade é frequente em Pleurothallidinae. Essa característica foi encontrada em vários gêneros da subtribo, como *Acianthera*, *Anathallis*, *Lepanthes*, *Masdevallia*, *Myoxanthus*, *Octomeria*, *Restrepia*, *Specklinia* e *Stelis* (BARBOSA *et al.*, 2009; BORBA *et al.*, 2011; HUGUES *et al.*, 2018), podendo ser considerada um atributo amplamente distribuído pelas linhagens, notoriamente sobre espécies miofílicas (BORBA *et al.*, 2011). Borba *et al.* (2011) também apontaram como a auto-incompatibilidade é bastante comum na subfamília Epidendroideae como um todo, em contraste com a subfamília Orchidoideae, na qual auto-polinização autônoma é frequente. A síndrome de polinização em *Pabstiella* é dada como sapro-miofílica, baseada em sua morfologia floral (ARÉVALO-RODRIGUES *et al.*, 2022), porém não há relatos da ocorrência de auto-incompatibilidade no gênero uma vez que não existem estudos contemplando a observação de visitantes às flores ou de tipos de polinização no gênero.

Mesmo assim, algumas espécies de Pleurothallidinae foram caracterizadas como auto-compatíveis ou somente parcialmente incompatíveis, como *Acianthera aphthosa*, *Pleurothallis microptera* (HUGHES *et al.*, 2018), *Pleurothallis johaneensis*, *P. teres* e *P. ochreatea* (BORBA *et al.*, 2001) e *Zootrophium atropurpureum* (BORBA *et al.*, 2011).

No estudo de Koene *et al.* (2020), as cápsulas de *Pabstiella fusca* haviam sido obtidas por polinização artificial cruzada entre três ou quatro indivíduos, resultando em uma germinação muito baixa (4%) e incapacidade de progressão a estádios posteriores de desenvolvimento. Explorando a capacidade de germinação *in vitro* de sementes de *Masdevallia ígnea* oriundas de cápsulas formadas por diferentes métodos de polinização artificial, Martínez & Salamanca (2005) observam taxas superiores de germinação em cápsulas de autopolinização (73% no meio mais adequado), em relação aos sistemas de geitonogamia (0%) e polinização cruzada (31%). Os autores caracterizam a espécie como totalmente autocompatível e propõem que tal resultado decorra da coevolução da orquídea com seu polinizador, que teria levado a um quadro de alta endogamia populacional e consequente dificuldade de fluxo genético com outros indivíduos.

A cápsula de *Pabstiella leucopyramis* utilizada nesse trabalho havia sido obtida por autopolinização, utilizando uma única flor. Considerando que a polinização da

cápsula foi artificial, é possível que o impedimento natural fosse somente uma barreira mecânica, dado que a flor é de difícil polinização por apresentar duas membranas que isolam a polínia do estigma (Klingelfus, comunicação pessoal), mas que, vencida essa barreira, a espécie se apresente como autocompatível. Além disso, já foi demonstrado que em *Dendrobium nobile* é possível obter cápsulas normalmente desenvolvidas a partir de autopolinização artificial, embora muitas espécies do gênero *Dendrobium* sejam tidas como auto-incompatíveis. Os pesquisadores atribuem tal comportamento às condições adequadas de água e nutrientes oferecidas para as plantas em cultivo protegido (VASUDEVAN & van STADEN, 2010).

A germinação de *Pabstiella leucopyramis* é assíncrona. Tal padrão de germinação também foi observado para outras espécies de Pleurothallidinae, como *Acianthera prolifera* (KOENE *et al.*, 2019), *Acianthera ochreatea* (KOENE *et al.*, 2020) e *Restrepia brachypus* (MILLNER *et al.*, 2008).

Anjos *et al.* (2021) observaram os primeiros protocormos de *Dryadella zebrina* com rizoides e ápice visível aos 60 dias após a inoculação das sementes, em meio de cultura WPM, obtendo plântulas completas aos 120 dias de cultivo. O desenvolvimento de *Pabstiella leucopyramis* é um pouco mais gradual, porque, embora também tenham sido observados os primeiros feixes de rizoides aos 60 dias, a formação do ápice se deu somente a partir dos 90 dias (QUADRO 4). Mesmo assim, também foi possível recuperar plântulas completas ao final de 120 dias de cultivo.

Concentrações mais baixas de macronutrientes propiciaram maior benefício no desenvolvimento de várias espécies de orquídeas comerciais de grande porte, incluindo melhor formação de raízes (ENDRES JÚNIOR *et al.*, 2014). No presente trabalho, o meio de cultura WPM se mostrou mais eficiente para a germinação de *Pabstiella leucopyramis*, resultando em mais plântulas devidamente desenvolvidas e em menor tempo quando comparado ao meio de cultura MS/2. Diversas espécies de Pleurothallidinae foram satisfatoriamente germinadas em meio WPM, embora poucas tenham prosseguido a estádios posteriores (QUADRO 1). O nitrogênio é um elemento fundamental para o desenvolvimento das plantas, sendo, frequentemente, um fator limitante para seu crescimento. A concentração de nitrogênio inorgânico é mais de duas vezes menor no meio WPM, enquanto a suplementação com fontes orgânicas (mio-inositol, ácido nicotínico e tiamina) é superior ao MS/2. É provável que essa combinação de baixa concentração salina, porém considerável suplementação com vitaminas tenha sido o que permitiu a melhor germinação de *Pabstiella leucopyramis*, cenário que também foi

observado na germinação da espécie *Hadrolaelia grandis*, uma orquídea que também pertence à tribo Epidendreae (VUDALA & RIBAS, 2017).

Segundo Arcidiacono *et al.* (2021), a germinação assimbiótica e formação de protocormos é promovida essencialmente por fontes de nitrogênio orgânico. Ao mesmo tempo, altas concentrações de macronutrientes – incluindo amônio e nitrato – causam efeitos adversos sobre a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas, conferindo uma vantagem de uso de meios de cultura com concentrações salinas mais baixas.

4.2 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS

Hughes *et al.* (2018) relatam a obtenção de plântulas completas de *Masdevallia melanoxantha* e *Pleurothallis microptera* após 20 semanas (150 dias). Sob as atuais condições de estudo, as primeiras plântulas de *Pabstiella leucopyramis* foram observadas aos 105 dias, embora somente no meio WPM (31 indivíduos). Depois, aos 120 dias, plântulas foram observadas nos dois meios avaliados, sendo 87 indivíduos no meio WPM e somente 3 indivíduos no meio MS/2. Esse resultado demonstrou como o meio WPM não só é mais favorável à germinação da espécie como também promoveu melhor o seu desenvolvimento nos estádios subsequentes. Raghavan & Torrey (1964) demonstraram que embriões de *Cattleya* eram incapazes de utilizar nitratos na germinação e nos primeiros estádios de desenvolvimento, adquirindo as enzimas necessárias somente em estádios posteriores. É possível que o mesmo aconteça em *Pabstiella*, de modo que, já tendo a vantagem inicial da germinação devido às vitaminas presentes no meio WPM, as plântulas conseguiram utilizar apropriadamente o nitrato fornecido nesse meio. Além disso, espécies epífitas têm grande capacidade de aproveitamento de nitrogênio, dado que em seu ambiente natural a disponibilidade de nutrientes é muito baixa e inconstante, de tal modo que seu melhor desenvolvimento se deu em meios de cultura com baixa concentração salina (MÜLLER *et al.*, 2020).

4.2.1 Desenvolvimento com glutamina

No presente experimento de suplementação com glutamina, a maior formação de raízes ($m = 6$) foi promovida no tratamento com 6,8 mM desse aminoácido (Gln1), indicando que a disponibilidade de uma fonte de nitrogênio orgânico foi benéfica para o enraizamento de *Pabstiella leucopyramis*. Ao mesmo tempo, concentrações mais altas

podem ser prejudiciais ao desenvolvimento da orquídea, dado que foi observada redução no número de raízes no tratamento com 13,6 mM de glutamina (Gln2). Tal resultado vai ao encontro do observado por Majerowicz *et al.* (2000), em que as plântulas de *Catasetum fimbriatum* com as maiores taxas de crescimento e maior acúmulo de biomassa foram obtidas em meio de cultura com 6 mM de glutamina. Müller *et al.* (2020) demonstraram que, para *Aechmea fasciata* (Bromeliaceae), a fertilização de plantas adultas com glutamina foi prejudicial em todas as concentrações acima de 15 mM, levando à formação de um filme escurecido na base das folhas.

A presença de glutamina no meio de cultura é geralmente benéfica para o desenvolvimento das plantas por se apresentar como uma fonte rapidamente acessível de nitrogênio. Quando o nitrato é absorvido do solo (ou meio de cultura), ele é primeiramente reduzido pela enzima nitrato redutase formando nitrito, composto altamente tóxico para as células vegetais. O nitrito precisa ser rapidamente reduzido a amônia, pela enzima nitrito redutase, a qual pode então ser assimilada em moléculas de glutamina ou glutamato pelo sistema GS/GOGAT. Essa é a rota de assimilação de nitrogênio mais comum em plantas (KAN *et al.*, 2015). Sendo assim, a glutamina é a primeira molécula orgânica derivada da assimilação de nitrogênio inorgânico, e a sua suplementação ao meio de cultura propicia um atalho nessa rota. Assim como o glutamato, esse aminoácido é uma das principais moléculas envolvidas com o Ciclo do Ácido Cítrico, biossíntese de ácidos nucleicos e de outros compostos nitrogenados, favorecendo o ganho de biomassa, processos de desdiferenciação e re-diferenciação e alongamento de brotos e raízes *in vitro* (GREENWELL & RUTER, 2018; HAMASAKI *et al.*, 2005; MAJEROWICZ *et al.*, 2000). Além disso, a glutamina também está envolvida com a sinalização celular a longa distância por resposta à concentração de nitrogênio no ambiente, afetando a expressão de transportadores de amônia e nitrato. No arroz, também foi encontrada correlação entre a presença de glutamina e a regulação da biossíntese de citocininas (KAN *et al.*, 2015)

Em nosso experimento, a glutamina não surtiu efeito no alongamento das folhas de *Pabstiella leucopyramis*. Trabalhando com plântulas de arroz cultivadas em ambiente desprovido de nitrogênio, Kan *et al.* (2015) observaram que a glutamina era absorvida pelas plântulas assim que adicionada ao meio, mas que seu acúmulo se dava somente nas raízes (aumento de cerca de 12 vezes nos níveis endógenos), e não nas folhas. Isso apoia o encontrado no cultivo da micro-orquídea, em que a glutamina teve atuação somente sobre as raízes, não afetando as folhas. Paralelamente, embora a glutamina tenha promovido maior formação de raízes, essas tiveram um alongamento menos expressivo

em comparação ao tratamento controle. É provável que as raízes de Gln1 e Gln2 não conseguiram se alongar tanto por causa do contaminante, que estaria criando um ambiente de competição por essa fonte de nitrogênio. Entretanto, a falta de alongamento das raízes não é necessariamente prejudicial ao desenvolvimento da plântula, uma vez que a maior absorção de água e nutrientes é realizada pelos ápices radiculares, e não pelas regiões maduras da raiz, nas quais há desenvolvimento de uma camada epidérmica hidrofóbica que impede a absorção de água (TAIZ *et al.*, 2017). Dessa forma, durante o cultivo *in vitro*, a vantagem conferida pelo maior número de raízes é superior à de raízes mais longas, tornando-se recomendável a adição de glutamina ao meio de cultura no cultivo de *Pabstiella leucopyramis*.

4.2.2 Desenvolvimento com BAP

O único relato do uso de BAP no desenvolvimento de uma Pleurothallidinae foi de Anjos *et al.* (2021), com a espécie *Dryadella zebrina*. Para essa micro-orquídea, a aplicação de 6 μM resultou no maior número de novas brotações por indivíduo, com uma leve redução no comprimento das folhas correlacionada com o aumento da concentração de BAP no meio de cultura. Os autores também observaram diminuição no número de raízes por indivíduo associada a concentrações maiores desse regulador, resultado consistente com o obtido em *Pabstiella leucopyramis* (Tabela 7). Estudos com *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) também demonstraram que concentrações superiores a 10 μM de BAP levaram à redução no número de raízes por indivíduo nessa espécie (MARTINS *et al.*, 2018). Essa redução no número de raízes é esperada, pois a formação de raízes é geralmente induzida pela maior concentração de auxina em relação a citocinina; caso contrário, o surgimento de novas raízes é inibido pela presença da citocinina. Portanto, as citocininas têm efeito duplo, promovendo novas brotações via estimulação da proliferação de células indiferenciadas nos meristemas apicais caulinares e inibindo a formação de novas raízes por estímulo da diferenciação celular nos meristemas apicais radiculares (SCHALLER *et al.*, 2014).

Embora a ação do BAP sobre a redução do número e comprimento das raízes de *Pabstiella leucopyramis* tenha sido evidente, não foram observadas variações significativas nos números de folhas e brotações ao longo dos tratamentos. A resposta a reguladores vegetais é espécie-específico em Orchidaceae e pode-se concluir que, para a espécie-alvo, as concentrações avaliadas não foram suficientes para gerar a proliferação

desejada dos meristemas apicais caulinares. Apesar disso, os números absolutos de brotações novas em BAP9 apontam para uma tendência de aumento dessas brotações por indivíduo, indicando que concentrações mais elevadas de BAP podem vir a provocar maior efeito de multiplicação no meristema apical caulinar.

4.3 ANÁLISE ANATÔMICA

4.3.1 Anatomia radicular

O velame é uma estrutura característica das raízes de Orchidaceae, embora não esteja restrito à família, tendo sido observado também em espécies de Araceae e outras monocotiledôneas. O velame é um tecido esponjoso formado por camadas de células mortas na maturidade, depositadas sobre a epiderme radicular, atribuindo uma coloração branca translúcida para as raízes (IDRIS *et al.*, 2021; JOCA *et al.*, 2017; ZOTZ & WINKLER, 2013). Esse tecido constitui uma das adaptações ao ambiente epífito, cujas principais restrições são a pouca disponibilidade de água e fornecimento intermitente de nutrientes; para as epífitas, quase todos os nutrientes são obtidos nos primeiros minutos de chuva, pois são carregados junto com a água. O velame auxilia a captação de água e nutrientes nesses momentos de tempestade para posterior translocação às células vivas, uma vez que o tecido é rapidamente saturado com a água, porém resseca muito lentamente, conforme demonstrado por Zotz & Winkler (2013). Íons carregados tanto positivamente quanto negativamente são retidos no velame e liberados lentamente, potencializando a absorção de nutrientes que se apresentam na forma iônica quanto solubilizados nas gotas de chuva. Adicionalmente, a coloração esbranquiçada do velame protege as raízes contra danos mecânicos e efeitos da radiação solar e previne temperaturas muito altas que possam prejudicar os tecidos vivos (JOCA *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2021; ZOTZ & WINKLER, 2013).

O velame também é encontrado nas raízes de orquídeas terrestres que habitam ambientes xerófitos, cuja condição hídrica é semelhante ao das copas das árvores. No entanto, para essas espécies, ele se apresenta como uma única camada de células que envolve o parênquima cortical. Já nas epífitas, o velame apresenta múltiplas camadas, em virtude das plantas estarem consideravelmente mais expostas à dessecação (IDRIS *et al.*, 2021). A espessura do velame é definida pelo número de camadas de células, mas não pelo tamanho das células, e tem relevância taxonômica (JOCA *et al.*, 2017; RODRIGUES

et al., 2021). Porembski & Barthlott (1988) definiram um “tipo *Pleurothallis*” de raiz, associado às orquídeas da subtribo Pleurothallidinae, o qual é caracterizado por velame com uma a três (raramente quatro) camadas de células alongadas radialmente, com as células do epivelame sendo menores, e células da exoderme pouco espessadas. Além disso, espessamentos de parede celular em espiral não ocorreriam no velame e tilossomos seriam apenas ocasionalmente presentes, assim como os idioblastos no córtex. Entretanto, estudos mais recentes contradizem essa classificação, pois foi encontrado que o velame de Pleurothallidinae pode exibir de duas a seis camadas, frequentemente apresentando espessamentos em espiral e tilossomos. Em algumas espécies de *Acianthera*, células da exoderme possuíam paredes consideravelmente espessas (RODRIGUES *et al.*, 2021).

Em *Pabstiella*, o velame é biestratificado, sendo o epivelame (camada externa) caracterizado por células menores com espessamento de parede em “O” ou “U” e o endovelame (camada interna adjacente à epiderme) formado por células alongadas radialmente (anticlinalmente) com paredes celulares mais finas (KEDROVSKI & SAJO, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2021). Esse padrão foi, de fato, observado na espécie-alvo desse trabalho. O velame biestratificado é bastante comum em Pleurothallidinae, sendo encontrado nas oito afinidades da subtribo. O córtex heterogêneo observado em *P. leucopyramis* também vai ao encontro do estabelecido por outros autores (KEDROVSKI & SAJO, 2019).

Kedrovski & Sajo (2019) reportam a ocorrência de tilossomos no endovelame de *Pabstiella*, sob a forma de crescimentos reticulados nas paredes internas das células. Entretanto, essas estruturas só podem ser visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão, de modo que não puderam ser observadas nas lâminas de *Pabstiella leucopyramis*.

Dentro da subtribo, o cilindro vascular de *Pabstiella* é considerado como reduzido, apresentando menos de seis polos de protoxilema em plantas adultas (KEDROVSKI & SAJO, 2019). Sendo assim, os cinco arcos de protoxilema obtidos nas plântulas cultivadas por 60 dias no tratamento Gln2 provavelmente caracterizam raízes próximas do estágio final de maturação. Portanto, a suplementação com glutamina na concentração de 13,6 mM propiciou uma aceleração no desenvolvimento dos feixes vasculares de *Pabstiella leucopyramis*, quando comparado ao desenvolvimento nos outros tratamentos. Esse avanço no desenvolvimento dos feixes certamente se deve pela elevada concentração de nitrogênio orgânico prontamente disponível para a planta,

propiciada pela suplementação com glutamina, conforme comentado também na discussão dos parâmetros morfológicos desse experimento.

4.3.2 Anatomia foliar

Apesar de pertencerem a diferentes afinidades de Pleurothallidinae, as características encontradas nas folhas de *Pabstiella leucopyramis* foram semelhantes às observadas por Avi & Rodrigues (2019) em espécies do gênero *Anathallis*. A presença de uma cutícula conspícua e estriada foi vista em *A. microgema*, *A. obovata* e *A. rubens*, enquanto a presença de hipoderme também foi encontrada em *A. rubens* e *A. sclerophylla*. A irregularidade das paredes celulares observadas no parênquima aquífero, principalmente no tempo zero (F0), provavelmente corresponde ao espessamento de parede celular em espiral. Diferentes padrões de espessamento em espiral foram encontrados nos gêneros *Acianthera*, *Anathallis* e *Specklinia* (AVI & RODRIGUES, 2019), sendo, na verdade, bastante comuns na família Orchidaceae. Posteriormente, nas amostras de 30 e 60 dias, as células adquiriram formatos regulares, dado que já ocorreu o espessamento da parede celular, indicando a necessidade de um período *in vitro* de, pelo menos, 10 meses desde a germinação para que o mesofilo desenvolva a estrutura correspondente a uma folha adulta.

Embora as folhas tenham se tornado mais delgadas, sua largura aumentou ao longo do tempo, notoriamente nos tratamentos Gln1 e Gln2. A glutamina – assim como o glutamato – é um importante precursor da síntese de clorofila e certamente teve atuação na maturação do parênquima clorofilado, uma vez que quase todo o nitrogênio deslocado para as folhas é incorporado em enzimas associadas aos cloroplastos. Silva-Júnior *et al.* (2013) encontraram que a adição de ureia na concentração de 75% foi favorável ao espessamento do mesofilo em *Laelia purpurata*; embora essa seja uma fonte de nitrogênio inorgânico, a ureia é processada pelo metabolismo vegetal em amônio para a produção das moléculas orgânicas nitrogenadas, como o glutamato (TAIZ *et al.*, 2017). Paralelamente, a cutícula de *Laelia purpurata* não sofreu alterações em relação à concentração de ureia, assim como o observado para *Pabstiella leucopyramis* em relação às concentrações de glutamina, indicando que a cutícula não está diretamente relacionada a um aumento da disponibilidade de nitrogênio.

A parede celular das células do parênquima aquífero tornou-se mais espessa nos tratamentos Gln1 e Gln2. As paredes celulares das células vegetais são formadas por

polissacarídeos produzidos a partir do carbono assimilado na fotossíntese (TAIZ *et al.*, 2017). Dessa forma, se a atividade fotossintética das plântulas *in vitro* foi favorecida pela adição de glutamina ao meio de cultura, era esperado que houvesse aumento de deposição de parede celular nas células do mesofilo.

Além do velame, discutido na seção anterior, as orquídeas epífitas apresentam outras estratégias para reduzir a perda de água. A crista dos estômatos forma uma pequena cavidade acima do estômato que retêm uma porção de ar com maior umidade, de modo a diminuir a transpiração por esse poro (AVI & RODRIGUES, 2019). O parênquima aquífero e a hipoderme atuam como reservas de água dentro das folhas, uma vez que as micro-orquídeas da subtribo Pleurothallidinae não possuem pseudobulbos, que são os órgãos mais amplamente usados pelas orquídeas para acumular água (AVI & RODRIGUES, 2019; ZANENGA-GODOY & COSTA, 2003).

Idioblastos são células secretoras internas, geralmente hipertrofiadas, que produzem mucilagem, óleos essenciais e/ou resinas (ASCENSÃO, 2007). Idioblastos contendo cristais ou ráfides de oxalato de cálcio foram reportados nas folhas de várias espécies de orquídeas, e constituem uma forma de defesa contra herbivoria, uma vez que os sais de oxalato conferem gosto amargo e pungente (AVI & RODRIGUES, 2019; ZANENGA-GODOY & COSTA, 2003). Como não foram observadas ráfides nos idioblastos de *Pabstiella leucopyramis*, é provável que a espécie produza substâncias fenólicas nessas estruturas secretoras, constituindo uma prevenção contra oxidação e defesa contra microrganismos.

Espécies de Pleurothallidinae geralmente apresentam tricomas em depressão na epiderme, sendo associados a funções de absorção e secreção. Esses tricomas não foram observados em *Pabstiella leucopyramis*, assim como o reportado para o gênero *Acianthera* (AVI & RODRIGUES, 2019).

5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi apresentada, pela primeira vez, a germinação *in vitro* de *Pabstiella leucopyramis*, de forma eficiente, a partir de uma cápsula obtida por polinização artificial autógama. O padrão de germinação da espécie é assíncrono. O melhor resultado de germinação e desenvolvimento das plântulas foi obtido no meio de cultura WPM, com 97,72% de taxa de germinação de 69,88% de taxa de conversão em

plântulas, em 210 dias. Sendo assim, o meio WPM foi considerado adequado para a germinação e desenvolvimento *in vitro* da micro-orquídea.

O fornecimento de glutamina no cultivo *in vitro* propiciou efeitos distintos de acordo com cada concentração utilizada. Na concentração de 6,8 mM, houve aumento significativo na formação de novas raízes adventícias; no entanto, as raízes mais desenvolvidas funcionalmente – ou seja, com feixes vasculares melhor estruturados – foram recuperadas na concentração de 13,6 mM. Desse modo, a escolha da concentração a ser utilizada depende do objetivo do trabalho a ser desenvolvido. Para fins de aclimatização das plantas, a concentração de 13,6 mM é mais recomendada, pois é provável que as plantas apresentem maior sobrevivência no ambiente *ex vitro*, dado que os feixes vasculares estarão mais desenvolvidos, mesmo que o número de raízes seja inferior ao do promovido pela adição de 6,8 mM de glutamina. Esse trabalho salienta a importância dos estudos anatômicos para uma boa caracterização do estado de desenvolvimento das plântulas *in vitro*.

Nas concentrações avaliadas nesse estudo, a citocinina BAP não surtiu efeito sobre a multiplicação do meristema apical caulinar. É possível que concentrações mais elevadas venham a promover a formação de novas brotações, por isso é recomendado que novos estudos com essa e outras citocininas sejam realizados com a espécie *Pabstiella leucopyramis*.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PARDO, V. M.; FERREIRA, A. G.; NUNES, V. F. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from southern Brazil, *Horticultura Brasileira*, v. 24, n. 2, p. 217-220, 2006.
- ANACLETO, A.; NEGRELLE, R. R. B.; CUQUEL, F. L.; MURARO, D. Profile and behavior of flower consumer: subsidies for marketing actions, *Revista Ceres*, Viçosa, v. 64, n. 6, p. 557-566, 2017.
- 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, n. 4, 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.
- ARÉVALO-RODRIGUES, G.; CARDOSO-GUSTAVSON, P.; BARROS, F. Floral gland diversity in Pleurothallidinae (Epidendroideae-Orchidaceae), *Flora*, v. 297, e152179, 2022.
- ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas – Uma abordagem morfo-anatômica *in* FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. (eds) Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais – Curso teórico-prático, 3ª edição, Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal, 2007.
- AVI, R. C.; RODRIGUES, A. C. Comparative anatomy of the leaf and ramicaule in Pleurothallidinae (Orchidaceae) species, *Journal of the Torrey Botanical Society*, v. 146, n. 3, p. 198-212, 2019.
- BARBERO, A. P. P.; BARROS, F.; SILVA, E. A.; SUZUKI, R. M. Influência do déficit hídrico na germinação de sementes e no desenvolvimento inicial de três espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae), *Revista Brasileira de Botânica*, v. 34, n. 4, p. 593-601, 2011.
- BARBOSA, A. R.; MELO, M. C.; BORBA, E. L. Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species, *Plant Systematics and Evolution*, v. 283, p. 1-8, 2009.
- BARROS, F. A família Orchidaceae na Flora do Estado de São Paulo e suas espécies ameaçadas *in* Livro vermelho das espécies vegetais ameaçadas do estado de São Paulo, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil, p. 47-52, 2007.

- BORBA, E. L.; BARBOSA, A. R.; MELO, M. C.; GONTIJO, S. L.; OLIVEIRA, H. O. Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): evolutionary and systematic implications, *Lankesteriana*, v. 11, n. 3, p. 207-221, 2011.
- BORBA, E. L.; SEMIR, J.; SHEPHERD, G. J. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species, *Annals of Botany*, v. 88, p. 89-99, 2001.
- 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.
- CHIRON, G. R.; GUIARD, J.; VAN DER BERG, C. Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis sensu lato* (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences, *Phytotaxa*, v. 46, p. 34-58, 2012.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants, *Scientia Horticulturae*, v. 122, p. 507-520, 2009.
- CITES. The CITES Appendices. Disponível em: <<https://cites.org/eng/app/appendices.php>> Acesso em: 17 dez. 2022.
- CLAVIJO, C. M. Sexual micropropagation of the critically endangered Christmas orchid *Masdevallia towarensis*, Aragua, Venezuela, *Conservation Evidence*, v. 7, p. 87-90, 2010.
- COGNIAUX, C. A. *Pleurothallis pterophora*, *Flora Brasiliensis*, v. 3, n. 4, fascículo 120, p. 583-584, 1896.
- DAMON, A.; SORIANO, M. P.; RIVERA DEL LOURDES, M. Substrates and fertilization for the rustic cultivation of *in vitro* propagated native orchids in Soconusco, Chiapas, *Renewable Agriculture and Food Systems*, v. 20, n. 4, p. 214-222, 2005.
- ENDRES JÚNIOR, D.; SASAMORI, M. H.; DROSTE, A. *In vitro* propagation of *Anathallis adenochila* (Loefgr.) F. Barros (Orchidaceae), a species endemic to southern and southeastern Brazil, *Acta Botanica Brasilica*, v. 28, n. 4, p. 489-494, 2014.
- 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.
- GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. Plant Cell, Tissue and Organ Culture – Fundamental Methods, Springer Lab Manuals, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Alemanha, 1995.
- GLUSHCHENKO, N. G. V. Germinación asimbiótica y cultivo *in vitro* de la orquídea epífita *Epidendrum jamiesonis* y de la orquídea terrestre *Pleurothallis pulchella*. Trabalho de Graduação, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Equador, 2019.
- GREENWELL, Z. L.; RUTER, J. M. Effect of glutamine and arginine on growth of *Hibiscus moscheutos in vitro*, *Ornamental Horticulture*, v. 24, n. 4, p. 393-399, 2018.

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, p. 383-389, 2005.

HUGHES, O. T. W.; STOYCHEVA, M.; GÓMEZ-LLANO, M. A.; ROWNTREE, J. K.; PREZIOSI, R. F. Asymbiotic and symbiotic germination of five epiphytic orchids from the subtribe Pleurothallidinae – advantage for initial symbiotic germination *in* HUGHES, O. T. W. Orchid – Mycorrhiza relationships, propagation of terrestrial and epiphytic orchids from seed. Tese de Doutorado, Manchester Metropolitan University, Manchester, USA, 2018.

IDRIS, N. A.; ALEAMOTU'A, M.; McCURDY, D. W.; COLLINGS, D. A. The orchid velamen: A model system for studying patterned secondary wall development?, Plants, v. 10, e1358, 2021.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species, Versão 2022-2. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>> Acesso em: 17 dez. 2022.

JOCA, T. A. C.; OLIVEIRA, D. C.; ZOTZ, G.; WINKLER, U.; MOREIRA, A. S. F. P. The velamen of epiphytic orchids: Variation in structure and correlations with nutrient absorption, Flora, v. 230, p. 66-74, 2017.

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, e731, 2015.

KARREMANS, A. P. *Genera Pleurothallidinarum*: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae, Lankesteriana, v. 16, n. 2, p. 219-241, 2016.

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.

KEDROVSKI, H. R.; SAJO, M. G. Caracterização e reconstrução do estado ancestral da raiz na subtribo Pleurothallidinae *in* KEDROVSKI, H. R. Revisão da anatomia radicular e ontogenia de tilossomos em espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, São Paulo, Brasil, 2019.

KNUDSON L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds, The Botanical Gazette, v. 73, n. 1, p. 1-25, 1922.

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.

LIMA, R. A. F.; MORI, D. P.; PITTA, G.; MELITO, M. O.; BELLO, C.; MAGNAGO, L. F.; ZWIENER, V. P.; SARAIVA, D. D.; MARQUES, M. C. M.; OLIVEIRA, A. A.; PRADO, P. I. How much do we know about the endangered Atlantic Forest? Reviewing nearly 70 years of information on tree community surveys, Biodiversity and Conservation, v. 24, p. 2135-2148, 2015.

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.

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.

MALDONADO, G. P.; YARZÁBAL, L. A.; CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; CHICA, E. J.; PEÑA, D. F. Root endophytic fungi promote *in vitro* seed germination in *Pleurothallis coriocardia* (Orchidaceae), Lankesteriana, v. 20, n. 1, p. 107-122, 2020.

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.

MARTÍNEZ, B. A. P.; SALAMANCA, R. A. P. Germinación *in vitro* de la orquídea *Masdevallia ignea* Rchb.f a partir del cultivo de semillas provenientes de diferentes tipos de polinización, Pérez Arbelaezia, v. 16, p. 45-58, 2005.

MARTINS, J. P. R.; SANTOS, E. R.; RODRIGUES, L. C. A.; GONTIJO, A. B. P. L.; FALQUETO, A. R. Effects of 6-benzylaminopurine on photosystem II functionality and leaf anatomy of *in vitro* cultivated *Aechmea blanchetiana*, Biologia Plantarum, v. 62, n. 4, p. 793-800, 2018.

MEAD, J. W.; BULARD, C. Vitamins and Nitrogen requirements of *Orchis laxiflora*, New Phytologist, v. 83, p. 129-136, 1979.

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, n. 4, p. 497-505, 2008.

MORALES, N. G.; TOSCANO DE BRITO, A. L. V.; MAUAD, A. V. S. R.; SMIDT, E. C. Molecular phylogeny and biogeography of *Pabstiella* (Pleurothallidinae: Orchidaceae)

highlight the importance of the Atlantic Rainforest for speciation in the genus, *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.195, n. 4, p. 568-587, 2020.

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.

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.

Orchidaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB179> Acesso em: 12 jul. 2022a

Orchidaceae in The Plant List (2013). Version 1.1. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/> Acesso em: 12 jul. 2022

OSPINA, J. T. O.; BAYMAN, P. Germinación simbiótica y asimbiótica em semillas de orquídeas epífitas, *Acta Agronómica*, v. 58, n. 4, p. 270-276, 2009.

Pabstiella in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB11958> Acesso em: 12 jul. 2022b

PEDROZA-MANRIQUE, J. A. Efecto del medio básico, carbón activado, ácido giberélico y calidad de luz en la germinación *in vitro* de *Masdevallia auropurpurea* Reich, *Revista Científica*, v. 9, p. 117-141, 2007.

PEDROZA-MANRIQUE, J. A.; SERRATO-MUÑOZ, L. C.; CASTAÑO-ROBAYO, M. Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccínea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. *in vitro*, *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 7, n. 2, p. 86-102, 2010.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: An overview, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 55, p. 242-257, 2019.

POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae, *Nordic Journal of Botany*, v. 8, n. 2, p. 117-137, 1988.

R Core Team (v. 4.0.2). R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.

RADEMACHER, W. Plant growth regulators: Background and uses in plant production, *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 34, p. 845-872, 2015.

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.; TESITELOVÁ, T. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements, *Annals of Botany*, v. 116, p. 391-402, 2015.

REICHENBACH, H. G. *Pleurothallis leucopyramis*, *Xenia Orchidaceae*: Beiträge zur Kenntniss der Orchideen, v. 3, fascículo 210, p. 14-15, 1878.

ROBERTS, C. L.; ALVARADO, G. V.; SÁNCHEZ, B. M.; FRANCO, J. B.; LLANOS, M. A.; PORTUGAL, J. Q. Orchids' micropropagation for the sustainable management of native species from Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado Cotapata (PN-ANMI Cotapata), La Paz – Bolivia, *Lankesteriana*, v. 7, p. 299-302, 2007.

RODRIGUES, A. C.; OLIVEIRA, F. M. C.; KEDROVSKI, H. R.; CRUZ, R. Within the roots of Pleurothallidinae (Orchidaceae): An evolutionary analysis, *Flora*, v. 282, e151883, 2021.

SILVA-JÚNIOR, J. M.; RODRIGUES, M.; CASTRO, E. M.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PASQUAL, M. Changes in anatomy and chlorophyll synthesis in orchids propagated *in vitro* in the presence of urea, *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 35, n. 1., p. 65-72, 2013.

SCHALLER, G. E.; STREET, I. H.; KIEBER, J. J. Cytokinin and the cell cycle, *Current Opinion in Plant Biology*, v. 21, p. 7-15, 2014.

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.

UEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; MENEGUCE, B.; ASSIS, A. M. Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore (Gesneriaceae), *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 28, n. 4, p. 503-506, 2006.

VASUDEVAN, R.; van STADEN, J. Fruit harvesting time and corresponding morphological changes of seed integuments influence *in vitro* seed germination of *Dendrobium nobile* Lindl., *Plant Growth Regulation*, v. 60, p. 237-246, 2010.

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

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro, *Acta Botânica Brasílica*, v. 17, n. 1, p. 101-118, 2003.

ZOTZ, G.; WINKLER, U. Aerial roots of epiphytic orchids: The velamen radicum and its role in water and nutrient uptake, *Oecologia*, v. 171, p. 733-741, 2013.