



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**Micropropagação de espécies de *Cyrtopodium* nativas do Cerrado com potencial ornamental comparando dois métodos: Meio gelificado e Biorreator de Imersão Temporária**

**José Herlânio de Lima**

**Orientadora: Professora Dra. Lucia Helena Soares e Silva**

**Brasília  
2022**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**Micropropagação de espécies de *Cyrtopodium* nativas do Cerrado com potencial ornamental comparando dois métodos: Meio gelificado e Biorreator de Imersão Temporária**

**José Herlânio de Lima**

**Orientadora: Professora Dra. Lucia Helena Soares e Silva**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Botânica.

**Brasília  
2022**

Tese intitulada “Micropropagação de espécies de *Cyrtopodium* nativas do Cerrado com potencial ornamental comparando dois métodos: Meio gelificado e Biorreator de Imersão Temporária”, de autoria de José Herlânio de Lima, realizada junto ao Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação da Dra. Lucia Helena Soares e Silva.

**Banca examinadora:**

Presidente: Dra. Lucia Helena Soares e Silva, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica

Membro externo não vinculado: Dr. Nelson Barbosa Machado-Neto, Universidade do Oeste Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias

Membro externo não vinculado: Dr. José Carlos Sorgato, Universidade Federal da Grande Dourados/MS, Faculdade de Ciências Agrárias

Membro vinculado: Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica

Membro vinculado: Dr. Thomas C. Rhys Williams, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica

Suplente: Dr. Sérgio Araújo Figueiredo, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica

...em verde, sozinha,  
antieclidiana,  
uma orquídea forma-se.

Áporo [Carlos Drummond de Andrade]

“A maior riqueza do homem é sua incompletude.”

[Manoel de Barros]

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus pela conquista de mais uma realização em minha vida. Agradeço às mulheres mais importantes da minha vida: minha mãe Narcisa, minha tia Enedina e D. Fátima, que foram fundamentais na minha formação humana e profissional.

Minha gratidão a Dra. Lucia Helena Soares e Silva por me orientar nesse projeto e pelas valiosas lições acadêmicas. À Professora Conceição Eneida dos Santos Silveira pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do CRAD/UnB.

Meus agradecimentos a todos os membros das bancas pelas quais passei, Doutores (as) Micheline Carvalho Silva, Thomas C. Rhys Williams, Hugo Teixeira Gomes, Julcécia Camillo, Luiz Alfredo Rodrigues Pereira, Nelson Barbosa Machado-Neto, José Carlos Sorgato e Sérgio Araújo Figueiredo.

Sou muito grato a Dra. Cássia Beatriz R. Munhoz e ao mestrando Ademar Barbosa Dantas Júnior pela valiosa ajuda com as análises estatísticas, a Dra. Sueli Maria Gomes e a técnica Flávia Regina pelo auxílio no Laboratório de Anatomia Vegetal, ao Dr. Thomas C. Rhys Williams pelo suporte na quantificação de clorofila, às mestrandas Karina Kubota e Margarida Gonçalves pelo auxílio com as fotomicrografias, a técnica do CRAD, M.Sc. Aliny Ribeiro pelo constante suporte no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, ao técnico Natanael M. Gonçalves pelo suporte nas questões administrativas. Também deixo meus agradecimentos ao M.Sc. Luciano Bianchetti pelas valorosas discussões sobre as Orchidaceae, e ao Dr. João Batista Teixeira pelas sugestões na montagem do biorreator.

Sou imensamente grato aos meus irmãos de sangue, espirituais e amigos que me acompanharam e me motivaram nessa jornada: Sr. Airton, D. Abadia, D. Ivone Sabbatini, Sr. Mário da paz (*in memoriam*), Aline Sabbatini, Ari, Ayrton Júnior, Guilherme, Heliton Marçal, Júlio, Pacífico Carvalho, Maiquel, Márcia, Marina, Luciana, Paula, Rodrigo, Ruan, Sheila. Estendo também meus agradecimentos aos colegas de serviço, Maria Gabriela, Marcel Oliva, Pedro Henrique, Angélica Dantas (grato demais pela ajuda com os textos em alemão), Fernando Augusto, Quitéria Niksic, ao meu chefe Wislei Gustavo. E por último, meus agradecimentos especiais às pessoas que me inspiraram e me incentivaram a trilhar o caminho da orquidologia e orquidofilia: Sr. Mário Nakayama (*in memoriam*), Gilvânia Marques, Professora Ivete Valente Lima, Eunice (*in memoriam*), Aldo Luciano.

## RESUMO

As Orchidaceae são reconhecidas por suas flores de singular beleza. Em razão disso, são amplamente usadas como plantas ornamentais, seja como flores de corte ou plantas de vasos. O processo de produção de mudas se inicia com a germinação assimbiótica de suas sementes, seguido de uma fase de multibrotação e do alongamento das plantas cultivadas *in vitro*, e posterior aclimatização. Cada uma dessas etapas requer o uso de meio de cultivo e reguladores de crescimento adequados a cada espécie. Assim, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de protocolos para todas as fases do cultivo *in vitro* de duas espécies de *Cyrtopodium* nativas do Cerrado com potencial ornamental: *C. parviflorum* Lindl. e *C. withneri* L.C. Menezes. Inicialmente foi medida a viabilidade das sementes por meio do teste do tetrazólio (TTC) em duas condições de pré-condicionamento por 24 h, embebição em água destilada ou em solução de sacarose a 10 %, e dois tipos de coloração com TTC a 1 %, diluído em água ou em tampão de fosfatos, e como controle foi feita a coloração direta em TTC a 1 % sem embebição. Após essa etapa foi realizada a germinação assimbiótica das sementes, onde foram testados três meios de cultivo Knudson C (KC) e Murashige & Skoog (MS), na concentração normal e com metade dos sais (½ MS), com e sem adição de carvão ativado (CA). Protocormos obtidos a partir da germinação assimbiótica foram cultivados em meio de cultivo sem adição de CA, em 10 combinações de ácido naftaleno acético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) a fim de verificar a melhor concentração para indução de multibrotação. Brotos oriundos da fase de multibrotação com 2-2,5 cm de altura foram alongados em dois sistemas: i. meio gelificado com e sem CA; ii. Biorreator de Imersão Temporária (BIT) com imersão por 3 minutos a cada 2, 4 ou 8 h, sem reguladores de crescimento, exceto para 8 h. Plantas então obtidas na fase de alongamento foram transferidas para casa de vegetação e cultivadas em substrato de vermiculita por 100 dias para que fossem aclimatizadas. Foram extraídas amostras de folhas de plantas ao final das fases de alongamento e aclimatização para quantificação dos teores de clorofilas e carotenoides. Amostras de folhas dessas fases também foram fixadas em FAA 50, e posteriormente foi realizada a dissociação das epidermes para contagem dos estômatos e determinação da densidade estomática. O teste de viabilidade por meio do TTC apresentou diferenças entre as espécies e entre os tratamentos utilizados, em especial quanto a embebição. O tratamento mais uniforme foi aquele com embebição em solução de sacarose a 10 % e coloração em TTC a 1 % diluído em água. A germinação ocorreu com elevado percentual nos três meios analisados, com efeito positivo da adição de CA. Entretanto, o uso do meio KC para germinação não se mostrou viável, uma vez que ocorreu a morte de praticamente todos os protocormos desenvolvidos. *Cyrtopodium parviflorum* mostrou preferência para a germinação em MS, enquanto que para *C. withneri* a preferência se deu em ½ MS, ambos os meios adicionados de CA. A fase de multibrotação apresentou elevada sobrevivência das duas espécies nas concentrações mais baixas de BAP, com redução expressiva em 2 e 4 mg/L (T7-T10). A produção de brotos também

foi afetada pelo aumento na concentração de BAP, principalmente em *C. parviflorum*, que teve o desenvolvimento de raízes inibido em qualquer concentração empregada (0,5-4,0 mg/L). Os demais parâmetros avaliados também indicaram o efeito deletério da citocinina usada. O emprego de ANA também não mostrou ser vantajoso, já que o cultivo sem adição de reguladores de crescimento apresentou, de forma geral, os melhores resultados. A fase de alongamento apresentou diferenças contrastantes entre os dois sistemas. No sistema de BIT a mortalidade dos explantes foi quase que integral, enquanto que em meio gelificado houve sobrevivência superior a 90 %. Em meio gelificado os explantes se desenvolveram com sucesso, apresentando altura maior do que é descrito pela literatura. A aclimatização foi realizada apenas com plantas alongadas em meio gelificado com e sem CA. *Cyrtopodium withneri* apresentou 100 % de sobrevivência e *C. parviflorum* 94 %. As plantas desenvolveram completamente seus pseudobulbos, e algumas novas brotações. O substrato empregado, vermiculita, se mostrou adequado para esta etapa. Ao final dos 100 dias de aclimatização, houve diferença no tamanho das plantas, tendo *C. withneri* atingido o dobro da altura das plantas de *C. parviflorum*. Essa diferença de altura pode ser apenas a manifestação das características genéticas de cada espécie. Com isso, a aclimatização de *C. parviflorum* e *C. withneri* pode ser conduzida em casa de vegetação com 50 % de luminosidade e irrigação diária, e emprego de vermiculita como substrato. A quantificação das clorofilas e carotenoides mostrou aumento significativos desses pigmentos ao passar da fase de alongamento para o fim da aclimatização. Os teores desses pigmentos variaram durante as fases, sendo maiores para *C. parviflorum* ao final da aclimatização, e para *C. withneri* ao fim do alongamento. A densidade estomática praticamente não apresentou diferença entre as espécies e tratamentos, bem como quando comparada com plantas cultivadas em condição de campo. De forma geral, a densidade estomática das duas espécies foi elevada, sendo uma característica delas, pois na literatura há espécies com elevada densidade e outras com baixa densidade estomática. Ao final do trabalho pôde ser verificado que a produção *in vitro* de mudas de *C. parviflorum* e *C. withneri* pode ser realizada com sucesso com o emprego dos protocolos aqui avaliados, sendo recomendado a germinação, a multibrotação e alongamento em MS para *C. parviflorum* e em ½ MS para *C. withneri*, e aclimatização em vermiculita. O uso de reguladores de crescimento e o alongamento em BIT não são recomendados, em razão da baixa resposta das espécies a essas substâncias e ao sistema de alongamento.

**Palavras-chave:** aclimatização, alongamento, Arduino, Biorreator de Imersão Temporária, *Cyrtopodium*, germinação assimbiótica

## ABSTRACT

The Orchidaceae are recognized for their uniquely beautiful flowers. Because of this, they are widely used as ornamental plants, either as cut flowers or pot plants. The seedling production process begins with the asymbiotic germination of their seeds, followed by a multibrotting phase and the elongation of the plants grown *in vitro*, and later acclimatization. Each of these stages requires the use of culture medium and growth regulators appropriate for each species. Thus, this work aimed to develop protocols for all phases of *in vitro* cultivation of two *Cyrtopodium* species native to the Cerrado with ornamental potential: *C. parviflorum* Lindl. and *C. withneri* L.C. Menezes. Initially, seed viability was measured using the tetrazolium (TTC) test in two conditions of preconditioning for 24 h, soaking in distilled water or in 10% sucrose solution, and two types of staining with 1% TTC, diluted in water or in a phosphate buffer, and as a control, direct staining with 1% TTC without soaking was performed. After this step the asymbiotic germination of the seeds was performed, where three Knudson C (KC) and Murashige & Skoog (MS) culture media were tested, in normal concentration and with half salts ( $\frac{1}{2}$  MS), with and without the addition of activated charcoal (AC). Protocorms obtained from asymbiotic germination were grown on medium without addition of AC, in 10 combinations of naphthalene acetic acid (NAA) and 6-benzylaminopurine (BAP) in order to verify the best concentration for induction of multibrotting. Buds from the multibrotting stage with 2-2.5 cm height were elongated in two systems: i. gelled medium with and without AC; ii. Temporary Immersion Bioreactor (TIB) with immersion for 3 min every 2, 4 or 8 h, without growth regulators except for 8 h. Plants then obtained in the elongation phase were transferred to a greenhouse and grown in vermiculite substrate for 100 days for acclimatization. Leaf samples were extracted from plants at the end of the elongation and acclimation phases to quantify chlorophyll and carotenoid levels. Leaf samples from these phases were also fixed in FAA 50, and later the epidermis was dissociated to count stomata and determine stomatal density. The viability test using the TTC showed differences among the species and among the treatments used, especially regarding soaking. The most uniform treatment was the one with soaking in 10% sucrose solution and staining in 1% TTC diluted in water. The germination occurred with high percentage in the three analyzed media, with positive effect of the addition of AC. However, the use of KC medium for germination was not viable, since the death of practically all the developed protocorms occurred. *Cyrtopodium parviflorum* showed preference for germination on MS, while for *C. withneri* the preference was for  $\frac{1}{2}$  MS, both media with AC added. The multibrotting phase showed high survival of both species at lower concentrations of BAP, with a significant reduction at 2 and 4 mg/L (T7-T10). The production of shoots was also affected by the increase in BAP concentration, especially in *C. parviflorum*, which had root development inhibited at any concentration employed (0.5-4.0 mg/L). The other parameters evaluated



also indicated the deleterious effect of the cytokinin used. The use of NAA also did not prove to be advantageous, since cultivation without the addition of growth regulators showed, in general, the best results. The elongation phase presented contrasting differences between the two systems. In the TIB system the mortality of the explants was almost complete, while in the gelled medium there was survival higher than 90%. In the gelled medium, the explants developed successfully, with greater height than described in the literature. The acclimatization was performed only with elongated plants in gelled medium with and without AC. *Cyrtopodium withneri* showed 100% survival and *C. parviflorum* 94%. The plants fully developed their pseudobulbs, and some new sprouts. The substrate used, vermiculite, was adequate for this stage. At the end of the 100 days of acclimatization, there was a difference in the size of the plants, with *C. withneri* reaching twice the height of *C. parviflorum* plants. This difference in height may just be the manifestation of the genetic characteristics of each species. Thus, the acclimatization of *C. parviflorum* and *C. withneri* can be conducted in a greenhouse with 50% light, daily irrigation, and the use of vermiculite as substrate. The quantification of chlorophylls and carotenoids showed significant increases of these pigments when passing from the elongation phase to the end of the acclimatization. The contents of these pigments varied during the phases, being higher for *C. parviflorum* at the end of acclimatization, and for *C. withneri* at the end of elongation. Stomatal density showed practically no difference among species and treatments, as well as when compared to plants grown in field conditions. In general, the stomatal density of the two species was high, being a characteristic of them, because in the literature there are species with high density and others with low stomatal density. At the end of the study it could be verified that the *in vitro* production of seedlings of *C. parviflorum* and *C. withneri* can be successfully performed with the use of the protocols evaluated here, being recommended the germination, multibrotting and elongation in MS for *C. parviflorum* and ½ MS for *C. withneri*, and acclimatization in vermiculite. The use of growth regulators and elongation in TIB are not recommended, due to the low response of the species to these substances and to the elongation system.

**Keywords:** acclimatization, Arduino, asymbiotic germination, *Cyrtopodium*, elongation, Temporary Immersion Bioreactor

## SUMÁRIO

Resumo	v
Abstract	vii
Lista de tabelas	x
Lista de quadros	xiii
Lista de figuras	xiv
Capítulo I	
Desenvolvimento de protocolos para germinação assimbiótica e micropropagação de espécies de <i>Cyrtopodium</i> nativas do Cerrado com potencial ornamental	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Orchidaceae e o gênero <i>Cyrtopodium</i>	5
2.2. Sementes – armazenamento e avaliação de viabilidade pelo teste do Tetrazólio	7
2.3. Morfologia e germinação assimbiótica das sementes das Orchidaceae	12
2.4. Hormônios vegetais (fitormônios) e reguladores de crescimento	16
2.5. Hormônios vegetais na cultura de tecidos	19
2.6. Biorreatores	22
2.7. Automação de Biorreatores	26
2.8. Aclimatização de plantas obtidas a partir do cultivo <i>in vitro</i>	30
3. JUSTIFICATIVA	32
4. HIPÓTESES	33
5. OBJETIVOS	33
5.1. Objetivos gerais	33
5.2. Objetivos específicos	33
6 MATERIAL E MÉTODOS	34
6.1. Espécies estudadas	34
6.2. Coleta do material vegetal e manutenção das plantas	34
6.3. Obtenção das sementes	36
6.4. Avaliação da viabilidade das sementes	36
6.5. Germinação assimbiótica	38
6.6. Avaliação da germinação das sementes	38
6.7.. Indução de multibrotações em protocormos	39
6.8. Construção de um Biorreator de Imersão Temporária	40
6.9. Alongamento de brotos em meio de cultura gelificado e em biorreator	41

6.10. Quantificação dos teores de clorofila e carotenoides	42
6.11. Densidade estomática	42
6.12. Aclimatização das plântulas	43
6.13. Análise dos dados	43
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
7.1. Coletas e <i>status</i> de ocorrência das espécies estudadas	43
7.2. Estimativa da viabilidade de sementes pelo teste do tetrazólio	48
7.3. Avaliação da germinação de <i>C. parviflorum</i> e <i>C. withneri</i> em diferentes meios de cultura	50
7.4. Avaliação da Multibrotação em protocormos de <i>C. parviflorum</i> e <i>C. withneri</i>	54
7.5. Alongamento em BIT e em meio gelificado com e sem adição de carvão ativado	64
7.6. Aclimatização em casa de vegetação de plantas micropropagadas	72
7.7. Comparação entre as fases de alongamento e aclimatização	83
7.8. Aspectos fisiológicos e anatômicos das fases de alongamento <i>in vitro</i> e aclimatização <i>ex vitro</i>	87
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>100</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	<b>102</b>
<b>Capítulo II</b>	
Manuscrito submetido à publicação no Periódico Acta Scientiarum. Technology (ISSN on-line: 1807-8664)	138
Title: Automation of a temporary immersion bioreactor using an Arduino microcontroller: an efficient low-cost system for ornamental plant micropropagation	138
<b>Anexo I</b>	
Código desenvolvido para automação com Arduino das linhas de cultivo do Biorreator de Imersão Temporária com intervalos entre imersões de 2, 4 e 8 h	157

## Lista de tabelas

- Tabela 1.** Composição das soluções de Pfeffer e B de Knudson usadas como meio de cultura para orquídeas. Adaptada de (Knudson 1922).\_\_\_\_\_ **15**
- Tabela 2.** Composição dos principais meios de cultura empregados na micropropagação de orquídeas e outras espécies vegetais. Concentração em mg.L<sup>-1</sup>.\_\_\_\_\_ **17**
- Tabela 3.** Informações sobre endemismo, ameaça, distribuição e características morfológicas das espécies selecionadas para o estudo, segundo Menezes (2000), Romero-González *et al.* (2008), Luz & Oliveira (2012), IUCN (2012) e Flora do Brasil (2020).\_\_\_\_\_ **35**
- Tabela 4.** Concentrações, em mg.L<sup>-1</sup> e µmol.L<sup>-1</sup>, dos reguladores de crescimento usados na etapa de indução de multibrotações em *Cyrtopodium* spp. para cada tratamento.\_\_\_\_\_ **39**
- Tabela 5.** Viabilidade de três espécies de *Cyrtopodium* estimada por meio do teste de tetrazólio em diferentes condições de pré-condicionamento e coloração. Valores expressos em porcentagem.\_\_\_\_\_ **48**
- Tabela 6.** Percentual de sementes germinadas de *C. parviflorum* e *C. withneri* em diferentes formulações de meios de cultura.\_\_\_\_\_ **52**
- Tabela 7.** Sobrevivência de protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri* cultivados em diferentes combinações de reguladores de crescimento (RC) em mg.L<sup>-1</sup>. Valores de sobrevivência expressos em porcentagem.\_\_\_\_\_ **55**
- Tabela 8.** Medidas de brotos e raízes de *C. parviflorum* e *C. withneri* originados de protocormos cultivados em diferentes combinações de reguladores de crescimento. Altura da parte aérea (APA), Diâmetro da menor e maior dimensão do conjunto de brotações (DMe e DMA, respectivamente), Comprimento da maior raiz (CMaR), Comprimento das raízes (CR) e Diâmetro da maior raiz (DMAr). Valores em cm. Concentrações, em mg.L<sup>-1</sup>, de ANA/BAP usados nos tratamentos: T1 (0,0/0,0), T2 (0,5/0,0), T3 (0,0/0,5), T4 (0,5/0,5), T5 (0,0/1,0), T6 (0,5/1,0), T7 (0,0/2,0), T8 (0,5/2,0), T9 (0,0/4,0), T10 (0,5/4,0).\_\_\_\_\_ **56**
- Tabela 9.** Massa fresca e seca da parte aérea de brotos e raízes brotos obtidos pela multibrotação de protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri* cultivados em diferentes combinações de reguladores de crescimento. Massa fresca (MF) e Massa seca (MS) estão expressas em g. Concentrações, em mg.L<sup>-1</sup>, de ANA/BAP

usados nos tratamentos: T1 (0,0/0,0), T2 (0,5/0,0), T3 (0,0/0,5), T4 (0,5/0,5), T5 (0,0/1,0), T6 (0,5/1,0), T7 (0,0/2,0), T8 (0,5/2,0), T9 (0,0/4,0), T10 (0,5/4,0).\_\_\_\_\_ 60

**Tabela 10.** Dados de brotações e raízes geradas por protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri* cultivados em diferentes combinações de reguladores de crescimento. Valores de Explantes com PLB (Exp\_PLB), Explante com brotos (Exp\_Broto) e Explante com raízes (Exp\_Raiz) estão expressos em porcentagem. Número de PLB, Brotos e Raízes por explante (PLB/Exp), (Broto/Exp) e Raízes por broto (Raiz/Broto), respectivamente. Concentrações, em  $\text{mg.L}^{-1}$ , de ANA/BAP usados nos tratamentos: T1 (0,0/0,0), T2 (0,5/0,0), T3 (0,0/0,5), T4 (0,5/0,5), T5 (0,0/1,0), T6 (0,5/1,0), T7 (0,0/2,0), T8 (0,5/2,0), T9 (0,0/4,0), T10 (0,5/4,0).\_\_\_\_\_ 61

**Tabela 11.** Sobrevivência de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* micropropagadas submetidas a diferentes sistemas de alongamento. Carvão ativado (CA), BIT = Biorreator de imersão temporária com intervalos entre as imersões de 2, 4 e 8 h. RC = Reguladores de crescimento ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA).\_\_\_\_\_ 65

**Tabela 12.** Dados sobre a parte aérea de brotos de *C. parviflorum* e *C. withneri* submetidos a diferentes sistemas de alongamento. Carvão ativado (CA), Biorreator de imersão temporária com intervalos entre as imersões de 2, 4 e 8 h (BIT 2h, 4h e 8h, respectivamente), Reguladores de crescimento na combinação de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA (RC). Número de brotos maiores e menores que 1 cm ( $\text{Brotos}^{+1\text{cm}}$  e  $\text{Brotos}^{-1\text{cm}}$ , respectivamente), Número de folhas (NF), Altura da parte aérea em cm (APA).\_\_\_\_\_ 67

**Tabela 13.** Dados sobre raízes de brotos de *C. parviflorum* e *C. withneri* submetidos a diferentes sistemas de alongamento. Carvão ativado (CA), Biorreator de imersão temporária com intervalos entre as imersões de 2, 4 e 8 h (BIT 2h, 4h e 8h, respectivamente), Reguladores de crescimento na combinação de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA (RC). Número de raízes (NR); Comprimento da maior raiz (CMaR), Diâmetro da maior raiz (DMaR) e Comprimento das raízes (CR) expressos em cm.\_\_\_\_\_ 69

- Tabela 14.** Sobrevivência aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Valores em porcentagem. \_\_\_\_\_ **76**
- Tabela 15.** Dados sobre a parte aérea aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Número de brotos maiores e menores que 1 cm (Brotos<sup>+1cm</sup> e Brotos<sup>-1cm</sup>, respectivamente), Número de folhas (NF), Altura da parte aérea em cm (APA). \_\_\_\_\_ **79**
- Tabela 16.** Dados sobre raízes aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Número de raízes (NR); Comprimento da maior raiz (CMaR), Diâmetro da maior raiz (DMaR) e Comprimento das raízes (CR) expressos em cm. \_\_\_\_\_ **81**

## Lista de quadros

- Quadro 1.** Trabalhos publicados sobre cultivo *in vitro* de espécies de *Cyrtopodium*.\_\_\_\_\_ **9**
- Quadro 2.** Vantagens e desvantagens/limitações do teste do tetrazólio, segundo BRASIL (2009), Milošević *et al.* 2010; Hosomi *et al.* (2012; 2017), França-Neto & Krzyzanowski (2019).\_\_\_\_\_ **13**
- Quadro 3.** Meios de cultura usados e espécies estudadas por Knudson (1922).\_\_\_\_\_ **15**
- Quadro 4.** Funções dos Hormônios vegetais/Reguladores de crescimento na cultura de tecidos vegetais, segundo Hopkins & Hüner (2008), Kerbauy (2008), Taiz *et al.* (2021) e Cid & Teixeira (2014).\_\_\_\_\_ **20**
- Quadro 5.** Trabalhos de micropropagação ou cultura de tecidos realizados em Biorreatores de imersão temporária. Adaptado de Watt (2012) e De Carlo *et al.* (2021). \*Orchidaceae.\_\_\_\_\_ **26**
- Quadro 6.** Tratamentos realizados para avaliação da viabilidade de sementes de três espécies de *Cyrtopodium* por meio do teste do Tetrazólio.\_\_\_\_\_ **37**
- Quadro 7.** Equações de Wellburn (1994) utilizadas para calcular os teores de clorofila a e b, clorofila total e carotenoides em µg/mL. A663,8, A646,8 e A480 correspondem às absorbâncias medidas nos comprimentos de onda de 663,8, 646,8 e 480 nm, respectivamente. \_\_\_\_\_ **42**

## Lista de figuras

- Figura 1.** Distribuição mundial das Orchidaceae. Extraída de Stevens (2001).\_\_\_\_\_ 1
- Figura 2.** Climatologia do Cerrado. **A.** Precipitação média anual (mm.ano-1). **B.** Distribuição espacial das tendências de precipitação (TSA) (mm.ano-1). Adaptado de Campos & Chaves (2020). Os triângulos representam as estações meteorológicas.\_\_\_\_\_ 2
- Figura 3.** Climatologia do Cerrado. **A.** Temperatura média anual (° C). **B.** Distribuição média espacial anual de umidade do ar (%). Adaptado de Nascimento & Novais (2020).\_\_\_\_\_ 3
- Figura 4.** Jardins localizados no Rio de Janeiro, RJ, onde foram utilizadas mudas de *Cyrtopodium glutiniferum* para compor o paisagismo. **A.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **B.** Parque Madureira. **C.** Sítio Burle Marx. Crédito das fotos: J.H. Lima.\_\_\_\_\_ 5
- Figura 5.** Reação de redução do sal de tetrazólio que resulta na alteração de coloração em células vivas de sementes e de outros organismos. Adaptada de Braissant *et al.* (2020).\_\_\_\_\_ 11
- Figura 6.** Exemplos de auxinas. **A-D.** Naturais. **E-H.** Sintéticas. Adaptado de Hopkins & Hüner (2008).\_\_\_\_\_ 21
- Figura 7.** Exemplos de citocininas. **A-D.** Naturais. **E-H.** Sintéticas. Adaptado de Taiz & Zeiger (2013).\_\_\_\_\_ 21
- Figura 8.** Efeitos na cultura de tecidos vegetais resultantes da interação entre auxina e citocinina em diferentes proporções. Adaptada de George *et al.* (2008).\_\_\_\_\_ 22
- Figura 9.** Funcionamento de um biorreator do tipo Twin-Flask. **A.** O meio de cultura encontra-se completamente armazenado em seu reservatório (frasco da direita). **B.** Iniciada a pressurização do frasco de armazenamento, o meio é transferido para o reservatório de cultivo (frasco da esquerda). **C.** O período de imersão se inicia com a transferência completa do meio para o recipiente de cultivo. **D.** Finalizado o período de imersão, o frasco de cultivo é pressurizado e o meio é drenado para o reservatório do meio de cultura, finalizando o ciclo. Adaptado de (Georgiev *et al.* 2014).\_\_\_\_\_ 27
- Figura 10.** Diagrama conceitual de aplicação de controladores. Adaptado de Byan & Bryan (1997).\_\_\_\_\_ 28



- Figura 11.** Alguns modelos de CLPs disponíveis no Brasil. **A.** WEG (<https://www.weg.net/institutional/BR/pt/>). **B.** SIEMENS (<https://www.new.siemens.com>). **C.** Schneider (<https://www.se.com>). **D.** Tholz (<http://tholz.com.br>). Obs.: CLPs próximos do tamanho real. \_\_\_\_\_ **29**
- Figura 12.** Microcontrolador Arduino® Uno em escala real (6,86 x 5,34 cm). Extraído de Arduino (2022). \_\_\_\_\_ **30**
- Figura 13.** Flores das espécies de *Cyrtopodium* selecionadas para o presente estudo. **A.** *C. parviflorum*. **B.** *C. virescens*. **C.** *C. withneri*. Crédito das fotos: A. Aldo Luciano. B, C. J.H. Lima. \_\_\_\_\_ **35**
- Figura 14.** Lâmina montada para contagem de sementes viáveis com malha de 5 x 5 mm evidenciada. **A.** Aumento de 8x. **B.** Aumento de 20x. Crédito das fotos: J.H. Lima. \_\_\_\_\_ **37**
- Figura 15.** Biorreator de imersão temporária do tipo Twin-Flask desenvolvido pela Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1-3. Frascos de cultivo. 4-6. Frascos de armazenamento de meio). 7-12. Filtro de ar com poros igual ou menor que 0,44 micrômetro. 13-16 e 26. Válvulas solenóides. 24. Frasco de borbulhamento com carvão ativo em suspensão aquosa. 19 e 20. Temporizadores. 21. Fluxômetro. 22 e 25. Fonte de pressão positiva (tanque de ar comprimido ou cilindro de ar artificial). 23. Filtro de ar/óleo. 27-29. Eletrodos para monitoramento do meio. Extraído de Teixeira (2001). \_\_\_\_\_ **40**
- Figura 16.** Locais de coleta das espécies estudadas e habitats alterados e/ou suprimidos. Sistema de coordenadas UTM; Datum SIRGAS 2000/EPSS 4674. \_\_\_\_\_ **44**
- Figura 17.** *Cyrtopodium withneri* no habitat na APA de Cafuringa. **A.** Visão da fitofisionomia de ocorrência da espécie. **B.** Espécie *in situ*. **C.** Broto em desenvolvimento. **D.** Inflorescência. Crédito das fotos: J.H. Lima. \_\_\_\_\_ **45**
- Figura 18.** *Cyrtopodium parviflorum* no habitat na Floresta Nacional de Brasília-DF. **A.** Campo limpo úmido onde a espécie foi coletada. **B.** Espécime queimado alguns dias após incêndio no habitat. **C.** Espécime iniciando brotação após incêndio de de 2017. **D.** Indivíduo com brotação em estado adiantado. Crédito das fotos: J.H. Lima. \_\_\_\_\_ **46**
- Figura 19.** *Cyrtopodium virescens* no habitat no Vale da Lua, Alto Paraíso de Goiás-GO após o incêndio do ano de 2017. **A.** visão geral do habitat. **B.** Espécimes crescendo em

- bolsões de solo entre rochas em simpatria com *Dyckia lunaris* Leme. **C.** Detalhe do pseudobulbo em desenvolvimento. Crédito das fotos: J.H. Lima. \_\_\_\_\_ 47
- Figura 20.** Avaliação do teste de tetrazólio nas sementes das espécies estudadas. **A.** Sementes de *C. withneri* congeladas e mantidas em freezer a -20 °C (40 x) antes do teste do TTC. **B-F.** Sementes submetidas ao teste do TTC. **B.** *C. virescens* (35 x). **C, D.** *C. parviflorum* (ambas 35 x). **E, F.** *C. withneri* (20 e 35 x, respectivamente). Setas indicam ar no interior das sementes. Crédito das fotos: J.H. Lima. \_\_\_\_\_ 49
- Figura 21.** Protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri* resultantes da germinação assimbiótica. **A, B.** *C. parviflorum*. **C-F.** *C. withneri*. **A.** Frascos contendo protocormos originados a partir de sementes germinadas (esquerda) e protocormos colocados em frasco para a etapa de multibrotação. **B.** Detalhes de frasco com protocormos para a etapa de multibrotação. **C.** Frascos em estante de cultivo. **D.** Frasco de cultivo em destaque. **E, F.** Protocormos em destaque evidenciando sua morfologia. \_\_\_\_\_ 51
- Figura 22.** Massa total de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* submetidas a diferentes métodos de alongamento. Carvão ativado (CA), Biorreator de imersão temporária com intervalos entre as imersões de 2, 4 e 8 h (BIT 2h, 4h e 8h, respectivamente), Reguladores de crescimento na combinação de 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (RC). Massa expressa em gramas. Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \_\_\_\_\_ 71
- Figura 23.** Valores médios das massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular de plântulas micropropagadas de *C. parviflorum* e *C. withneri* alongadas em dois sistemas de alongamento, Ágar e Ágar + Carvão ativado (CA). Valores expressos em gramas. Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \_\_\_\_\_ 72
- Figura 24.** Primeiro dia de aclimatização em casa de vegetação. **A.** Visão das bandejas contendo as plantas dos quatro tratamentos analisados. **B.** Plantas de *C. parviflorum* provenientes da etapa de alongamento em ágar e ágar adicionado de carvão ativado (CA). **C.** Plantas de *C. withneri* provenientes da etapa de alongamento em ágar e ágar adicionado de carvão ativado (CA). \_\_\_\_\_ 73

- Figura 25.** Centésimo dia de aclimatização em casa de vegetação. **A.** Visão das bandejas contendo as plantas dos quatro tratamentos analisados. **B.** Plantas de *C. parviflorum* provenientes da etapa de alongamento em ágar e ágar adicionado de carvão ativado (CA). **C.** Plantas de *C. withneri* provenientes da etapa de alongamento em ágar e ágar adicionado de carvão ativado (CA).\_\_\_\_\_ **74**
- Figura 26.** Plantas com 100 dias de aclimatização. **A** e **C.** *C. parviflorum* e *C. withneri* com alongamento realizado em ágar sem adição de carvão ativado; **B** e **D.** *C. parviflorum* e *C. withneri* com alongamento realizado em ágar com adição de carvão ativado.\_\_\_\_\_ **75**
- Figura 27.** Destaque dos bulbos de plantas com 100 dias de aclimatização. **A** e **C.** *C. parviflorum* e *C. withneri* com alongamento realizado em ágar sem adição de carvão ativado; **B** e **D.** *C. parviflorum* e *C. withneri* com alongamento realizado em ágar com adição de carvão ativado. Barra de escalas em cm: **A.** 1,1; **B.** 1,2; **C.** 1,4 e **D.** 1,8.\_\_\_\_\_ **76**
- Figura 28.** Massa total aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Massa expressa em gramas. Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.\_\_\_\_\_ **82**
- Figura 29.** Massa fresca e seca aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação da parte aérea e sistema radicular de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Valores expressos em gramas. Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.\_\_\_\_\_ **83**
- Figura 30.** Sobrevivência medida ao fim do alongamento e no centésimo dia de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Valores expressos em porcentagem.\_\_\_\_\_ **84**
- Figura 31.** Dados relativos a brotações e parte aérea ao fim do alongamento e no centésimo dia de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão

- ativado (CA). Número de brotos maiores e menores que 1 cm (Brotos<sup>+1cm</sup> e Brotos<sup>-1cm</sup>, respectivamente), Número de folhas (NF), Altura da parte aérea em cm (APA).\_\_\_\_\_ 85
- Figura 32.** Dados relativos a raízes ao fim do alongamento (Pré) e no centésimo dia de aclimatização (Pós) em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Número de raízes (NR); Comprimento da maior raiz (CMaR), Diâmetro da maior raiz (DMaR) e Comprimento das raízes (DR) expressos em cm.\_\_\_\_\_ 86
- Figura 33.** Massa total ao fim do alongamento (Pré) e no centésimo dia de aclimatização (Pós) e o incremento de massa durante essas duas fases de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Massa expressa em gramas e incremento de massa em porcentagem.\_\_\_\_\_ 86
- Figura 34.** Massa fresca e seca ao fim do alongamento (Pré) e no centésimo dia de aclimatização (Pós) em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Massa expressa em gramas.\_\_\_\_\_ 87
- Figura 35.** Teores de clorofilas e carotenóides de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* micropropagadas oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Valores expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Carvão ativado (CA); Biorreator de imersão temporária com intervalos de imersão de 8 h (BIT 8 h). Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.\_\_\_\_\_ 89
- Figura 36.** Teores de clorofilas e carotenóides aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Valores expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.\_\_\_\_\_ 90
- Figura 37.** Comparativo entre os teores de clorofilas e carotenóides ao fim do alongamento (Pré-aclimatização) e no centésimo dia de aclimatização (Pós-aclimatização) em

- casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Valores expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .\_\_\_\_\_ 90
- Figura 38.** Densidade estomática (número de estômatos. $\text{mm}^{-2}$ ) de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* cultivadas em condições de campo (Campo), ao fim do alongamento (0d) e no centésimo dia de aclimatização em casa de vegetação (100d) oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de Carvão ativado (CA). Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.\_\_\_\_\_ 92
- Figura 39.** Fotomicrografia de epiderme foliar dissociada de plantas cultivadas em condições de campo evidenciando a morfologia dos estômatos. **A.** *C. parviflorum*. **B.** *C. withneri*. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . Aumento 20x.\_\_\_\_\_ 95
- Figura 40.** Fotomicrografia de epiderme foliar dissociada de *C. parviflorum*. **A.** Plantas após o alongamento em ágar. **B.** Plantas após o alongamento em ágar com adição de carvão ativado (CA). **C.** Plantas oriundas do alongamento em ágar após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. **D.** Plantas oriundas do alongamento em ágar com adição de CA após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . Aumento de 20x.\_\_\_\_\_ 96
- Figura 41.** Fotomicrografia de epiderme foliar dissociada de *C. withneri*. **A.** Plantas após o alongamento em ágar. **B.** Plantas após o alongamento em ágar com adição de carvão ativado (CA). **C.** Plantas oriundas do alongamento em ágar após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. **D.** Plantas oriundas do alongamento em ágar com adição de CA após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . Aumento de 20x.\_\_\_\_\_ 97
- Figura 42.** Fotomicrografia da epiderme foliar dissociada de plantas cultivadas em condições de campo evidenciando a morfologia dos estômatos. **A.** *C. parviflorum*. **B.** *C. withneri*. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . Aumento de 40x.\_\_\_\_\_ 98
- Figura 43.** Fotomicrografia de epiderme foliar dissociada evidenciando a morfologia dos estômatos. **A, C, E, G.** *C. parviflorum*. **B, D, F, H.** *C. withneri*. **A, B.** Plantas após o alongamento em ágar. **C, D.** Plantas após o alongamento em ágar com adição de carvão ativado (CA). **E, F.** Plantas oriundas do alongamento em ágar após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. **G, H.** Plantas oriundas do alongamento em

ágar com adição de CA após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação.

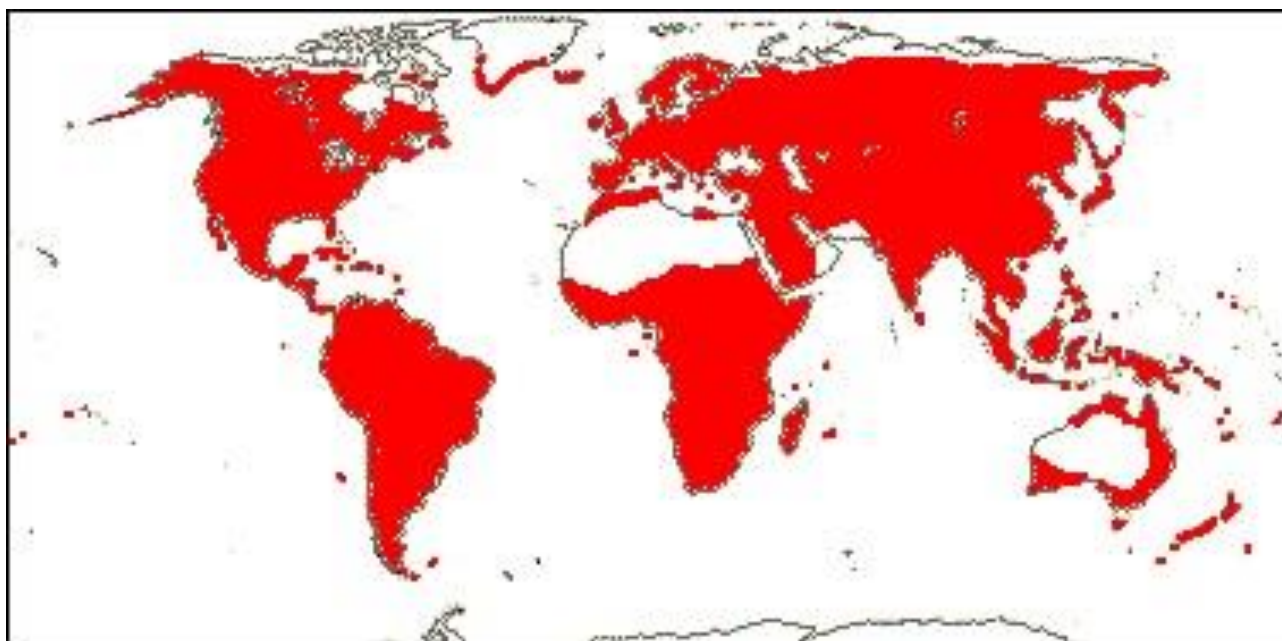
Escala: 30  $\mu\text{m}$ . Aumento 40x. \_\_\_\_\_ **99**

## Capítulo I

### Desenvolvimento de protocolos para germinação assimbiótica e micropropagação de espécies de *Cyrtopodium* nativas do Cerrado com potencial ornamental

#### 1. INTRODUÇÃO

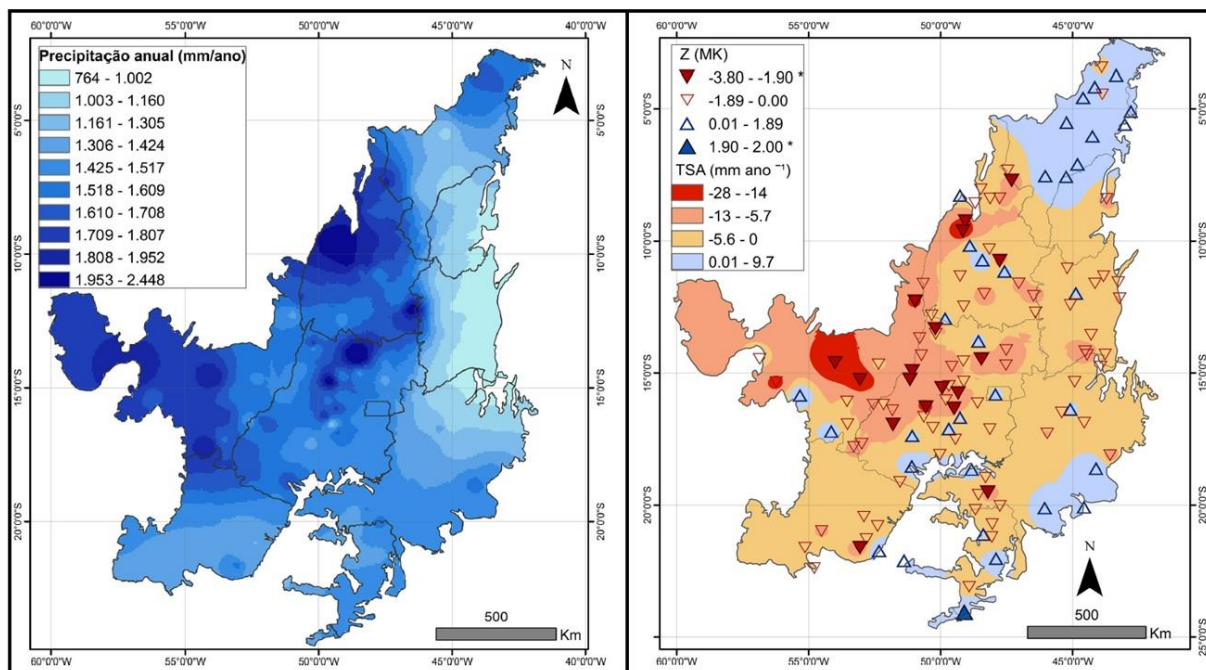
As Orchidaceae apresentam distribuição cosmopolita, sendo encontradas em diversos habitats, exceto nos extremamente desérticos e nos antárticos (Stevens 2001; Givnish *et al.* 2016) (Figura 1). A família possui 29.485 espécies, sendo a segunda em número de espécies, superada apenas por Asteraceae com 34.060 espécies (WFO 2022). O hábito herbáceo é constante, com grande variação no tamanho das plantas, dependendo da espécie: desde poucos milímetros até mais de três metros de altura (Dressler 1981). Na família predomina o hábito epifítico, com aproximadamente 70% das espécies (Gravendeel *et al.* 2004), as demais espécies apresentam hábito terrícola, rupícola e saprófita (Dressler 1981). Por fim, orquídeas apresentam extraordinária diversidade floral, com impressionantes adaptações a diferentes polinizadores proximamente aparentados, selecionando-os por meio da precisa colocação de pacotes de pólen (polínea ou o polinário) em diferentes partes de seus corpos (Givnish *et al.* 2015).



**Figura 1.** Distribuição mundial das Orchidaceae. Extraída de Stevens (2001).

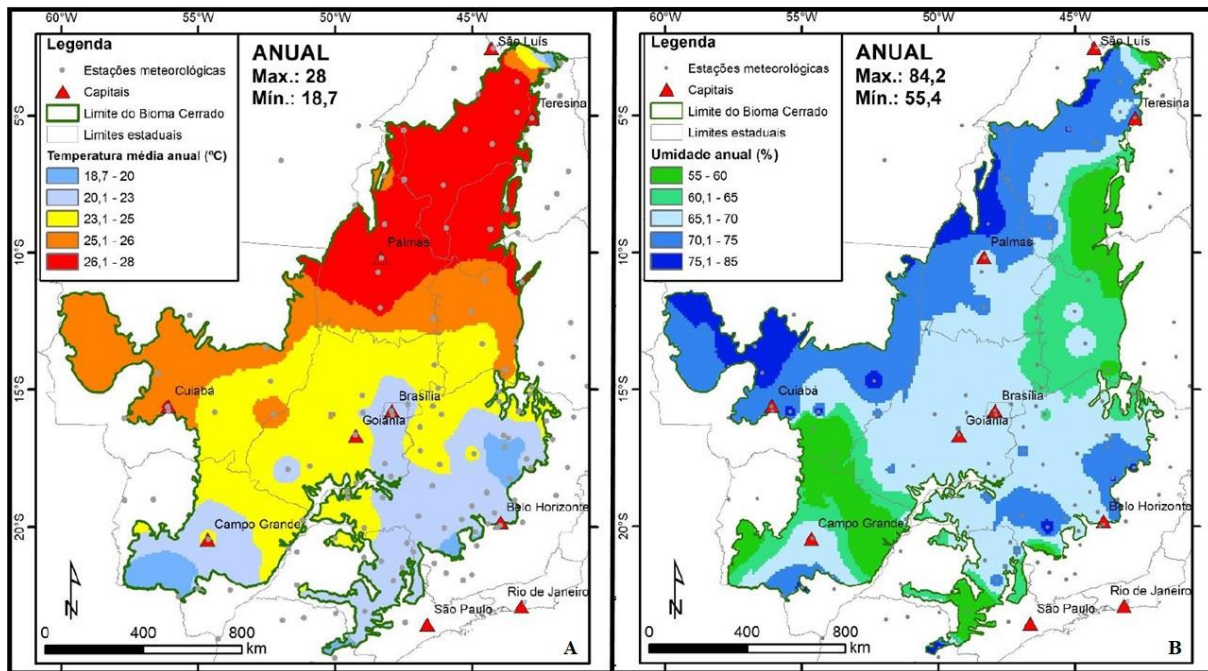
Atualmente a família é dividida em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae (Zhang *et al.* 2021; Wong & Peakall 2022). No Brasil, Orchidaceae é representada por 2.678 espécies, apenas superada por Fabaceae, com 3.033 espécies

(Flora e Funga do Brasil 2022). O bioma Cerrado abriga 641 espécies de orquídeas, das quais, 384 (ca. 60%) são terrícolas (Flora e Funga do Brasil 2022). Essa proporção pode ser explicada pelo clima predominante no bioma, do tipo Aw de Köppen, com chuvas concentradas no verão e estiagem nos meses de inverno, tendo junho e julho como os meses mais secos (Silva *et al.* 2008; Alvares *et al.* 2014). A pluviosidade média anual do bioma é de 1486 mm, variando de 1339 a 1633 mm, com tendência de queda na série histórica (Campos & Chaves 2020), (Figura 2). As médias anuais de temperatura e umidade relativa do ar são de 24 °C e 66,5%, respectivamente (Nascimento & Novais 2020), (Figura 3). Tais condições climáticas não favorecem o desenvolvimento de epífitos vasculares, inclusive orquídeas, que no Cerrado se restringem em sua maioria às matas ribeirinhas (Ribeiro & Walter 2001; Benzing 1987). Soma-se a isso o fato que grande parte do bioma é coberto por vegetação campestre ou savânica de baixa ou nenhuma cobertura arbórea, e incêndios sazonais naturais que também dificultam a ocupação dessas áreas por orquídeas (Ribeiro & Walter 2008). Dessa forma, as orquídeas terrícolas que habitam as fitofisionomias não florestais do Cerrado apresentam algumas adaptações para resistir ao período de estiagem e aos incêndios, como crescimento apenas durante o período chuvoso, sobrevivendo, na seca, apenas das reservas armazenadas em órgãos subterrâneos e pela presença de vigorosos pseudobulbos capazes de resistir ao fogo e dormentes durante a seca (Menezes 2000; Oliveira 2008). Dentre as espécies de orquídeas adaptadas às condições mencionadas, destacam-se as pertencentes ao gênero *Cyrtopodium* R. Br., subfamília Epidendroideae.



**Figura 2.** Climatologia do Cerrado. **A.** Precipitação média anual (mm.ano<sup>-1</sup>). **B.** Distribuição espacial das tendências de precipitação (TSA) (mm.ano<sup>-1</sup>). Adaptado de Campos & Chaves (2020). Os triângulos representam as estações meteorológicas.





**Figura 3.** Climatologia do Cerrado. **A.** Temperatura média anual (°C). **B.** Distribuição média espacial anual de umidade do ar (%). Adaptado de Nascimento & Novais (2020).

O gênero *Cyrtopodium* compreende cerca de 48 espécies distribuídas desde o sul da Flórida até o norte da Argentina, com maior concentração no Brasil (Menezes 2000; Romero-González *et al.* 2008; WFO 2022). No Brasil o gênero está representado por 37 espécies, das quais 28 ocorrem no Cerrado, sendo 15 endêmicas do bioma (Flora e Funga do Brasil 2022). De acordo com Menezes (2000), as plantas de *Cyrtopodium* possuem pseudobulbos que variam de 3-120 cm de altura, completamente enterrados, semienterrados ou totalmente expostos, a depender da espécie. São principalmente terrícolas (aqui incluídas as saxícolas e paludícolas), com algumas poucas espécies epífitas (3) e rupícolas (8). Ainda de acordo com Menezes (2000), o comprimento das inflorescências varia de 40-160 cm, podendo ser simples ou compostas. A coloração predominante das flores é amarela ou amarelo-esverdeada, com algumas espécies apresentando máculas castanhas ou vermelhas. O diâmetro das flores varia de 2,5 a 4,0 cm. Algumas espécies do gênero são tidas como medicinais, dentre elas: *C. glutiniferum* Raddi, *C. punctatum* (L.) Lindl., *C. paranaense* Schltr., *C. andersoni* (Lamb. ex Andrews) R. Br, *C. palmifrons* Rchb. f. & Warm., *C. macrobulbon* (La Llave & Lex.) G.A. Romero & Carnevali e *C. paniculatum* (Ruiz & Pav.) Garay (Silva *et al.* 2013a; Morales-Sánchez *et al.* 2014; Auberon *et al.* 2016; 2017; Araújo-Lima *et al.* 2020; Quiñonez-Bastidas & Navarrete 2021)

Apesar das espécies de *Cyrtopodium* possuírem flores vistosas e estarem adaptadas às condições do Cerrado, elas ainda são pouco exploradas comercialmente como plantas de vaso ou como plantas empregadas diretamente no paisagismo (Paiva 2008; Lorenzi 2015; Sousa *et al.* 2020).

O que existe hoje no mercado é um número limitado de espécies do gênero provenientes de sementeira. As plantas ofertadas, principalmente em comércio eletrônico, sugerem que foram coletadas de habitats naturais (plantas vendidas por particulares sem indicar a procedência e/ou método de obtenção das mudas), procedimento ilegal que atinge os *Cyrtopodium* e outras orquídeas (Menezes 2000; Seaton 2007; Seaton *et al.* 2013; Rodrigues *et al.* 2015; Hinsley *et al.* 2016).

Em estudo realizado por Carvalho *et al.* (2013), foi verificado que Orchidaceae lidera o esforço de pesquisa em plantas ornamentais no Brasil com 31,2% dos trabalhos publicados em Congressos de flores e plantas ornamentais. Dentro dessa família, os gêneros nativos mais estudados foram: *Cattleya*, (56,1%), *Epidendrum* (6,1%) e *Oncidium* e *Catasetum*, ambos com (4,0%), podendo-se inferir que há um número limitado de estudos sobre propagação *in vitro* para espécies de *Cyrtopodium*. Os estudos existentes, principalmente os mais antigos, eram direcionados à produção de mudas para exploração do potencial fitoterápico de algumas espécies do gênero. Apenas recentemente estudos com foco na produção de mudas para exploração comercial tem ganhado força (Araújo *et al.* 1999; Caramaschi 2001; Rego-Oliveira & Faria 2005; Dutra *et al.* 2009; Lima 2012; Picolotto 2013; Silva *et al.* 2013b; Rodrigues *et al.* 2015; Picolotto *et al.* 2017). Nesse sentido, a produção de mudas de *Cyrtopodium* para uso ornamental poderia ser estimulada, e tais mudas poderiam fazer parte da cadeia produtiva de plantas e flores ornamentais.

A cadeia de plantas e flores ornamentais tem forte componente social, pois é capaz de empregar um grande número de trabalhadores rurais, 14,2 empregados.propriedade<sup>-1</sup> e 3,7 empregos.ha<sup>-1</sup> (Souza *et al.* 2020). Ela também tem o potencial de gerar renda para produtores rurais e comerciantes urbanos, pois eles poderão complementar sua renda participando da cadeia produtiva de um produto de alto valor agregado (Duval 2014), que em 2015 movimentou cerca de R\$ 10,2 bilhões (R\$ 4,5 bilhões do Produto Interno Bruto - PIB), com crescimento de 43% no ano de 2017, passando para R\$ 14,6 bilhões, o que equivale a um PIB de R\$ 7,16 bilhões (MAPA 2015; CEPEA/IBRAFLOR 2022).

Dessa forma, o presente projeto tem como objetivo desenvolver protocolos adequados para a propagação *in vitro* de espécies de *Cyrtopodium* com potencial ornamental, para aplicação direta no paisagismo (Figura 4), ou compor coleções de orquidófilos, evitando a retirada de plantas da natureza, e assim contribuir para o equilíbrio entre biodiversidade e demandas de mercado (Pujasatria *et al.* 2020).



**Figura 4.** Jardins localizados no Rio de Janeiro, RJ, onde foram utilizadas mudas de *Cyrtopodium glutiniferum* para compor o paisagismo. **A.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **B.** Parque Madureira. **C.** Sítio Burle Marx. Crédito das fotos: J.H. Lima.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Orchidaceae e o gênero *Cyrtopodium*

Orchidaceae foi descrita em 1789 por A.L. Jussieu, e tradicionalmente sua origem era atribuída ao sudeste asiático (Dahlgren *et al.* 1985). Estudos mais recentes revelaram que o ancestral mais antigo da família surgiu na Austrália há 112 milhões de anos e que Apostasioideae foi o primeiro clado a divergir (Givnish *et al.* 2016). Os demais clados divergiram depois, em um intervalo de tempo menor do que se estimava (Zhang *et al.* 2017).

Plantas dessa família são usadas em cerimônias culturais ou religiosas: *Coelogyne nitida* (Wall. ex D.Don) Lindl., *Lycaste skinneri* var. *alba* Dombrain, *Papilionanthe teres* Schltr., *Peristeria elata* Hook., *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume, *Vanda roxburghii* R.Br., e várias espécies dos gêneros

*Laelia* Lindl., *Schomburgkia* Lindl., *Cymbidium* Sw., *Dendrobium* Sw. (De & Pathak 2018); diretamente na alimentação humana: diversas espécies de *Brachycorythis* Lindl., *Disa* P.J.Bergius, *Eulophia* R.Br., *Habenaria* Willd., *Roepocharis* Rchb.f. e *Satyrium* Sw. (Veldman *et al.* 2018; Guiné *et al.* 2020); como especiarias: *Vanilla planifolia* Andrews, *V. pompona* Schiede, *V. tahitensis* J.W. Moore, *Himantoglossum affine* Schltr., *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq., e algumas espécies de *Orchis* L. e *Anacamptis* Rich., (Rao & Ravishankar 2000; Chambers 2017; Sen *et al.* 2019); medicinais: *Ansiella africana* Lindl, *Angraecum augustipetallum* Rendle, *Habenaria procera* (Afzel. ex Sw.) Lindl., *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl., e várias espécies pertencentes aos gêneros *Bulbophyllum* Thouars, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Calanthe* R.Br., *Polystachya* Hook., entre outras espécies (Deb *et al.* 2009; Silva *et al.* 2013a; Shengji & Zhiwei 2018; Fonge *et al.* 2019), e principalmente, como plantas ornamentais, em especial as espécies pertencentes aos gêneros *Bulbophyllum*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Calanthe*, *Catasetum* Rich. ex Kunth, *Cattleya* Lindl., *Coelogyne* Lindl., *Epidendrum* L., *Gomesa* R.Br., *Laelia*, *Oncidium* Sw., *Vanda* Jones ex R.Br. (Stancato *et al.* 2001; Cardoso 2014; De & Medhi 2017; Mirani *et al.* 2017; Williams *et al.* 2018).

Seaton *et al.* (2013) alertam que devido esse potencial ornamental, espécies dessa família vêm sendo coletadas descontroladamente desde a era Vitoriana. Estes autores relatam que em 1909, o estado de Pernambuco exportou para a Europa cerca de 15.000 plantas de *Cattleya labiata* Lindley coletadas da natureza. Outro caso de coleta sem controle ocorreu com *Paphiopedilum fairrieatum* (Lindl.) Stein, espécie que se distribuía desde a Índia até o Butão, na porção leste do Himalaia, mas que hoje encontra-se reduzida a apenas uma população com pouco mais de 50 indivíduos restritos ao estado de Assam, na Índia. Segundo Menezes (2000), há vários relatos de apreensões de plantas de *Cyrtopodium*, extraídas diretamente de seus habitats, pela fiscalização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

A coleta sem controle há muito despertou o interesse de pesquisadores em reproduzir orquídeas, porém pelo fato de as sementes das plantas dessa família serem minúsculas, quase um pó, dificultou a obtenção de resultados por métodos convencionais (Yam & Arditti 2009). Segundo estes autores, em 1822 foi relatada a germinação espontânea e desenvolvimento de plântulas de *Prescottia plantaginea* Lindl. pela primeira vez em um estabelecimento comercial da Inglaterra. A partir desse momento foi verificado que seria possível multiplicar orquídeas fora do habitat natural. De acordo com Arditti (2008) e Yam & Arditti (2009), o primeiro cultivo *in vitro* de uma orquídea ocorreu em 1899, desenvolvido por Noël Bernard, que usou um fungo micorriza para germinar sementes de *Neottia nidus-avis* (L.) Rich. No século XX, Lewis Knudson, na Universidade de Cornell em Nova York, Estados Unidos, cultivou assimbioticamente embriões de orquídeas em meio nutritivo (Knudson 1922). Posteriormente, este pesquisador trabalhou para aprimorar sua fórmula que é a mais

conhecida para cultivo de orquídeas, o meio Knudson C (Knudson 1946). Mais tarde Rotor (1949 *apud* Yam & Arditti 2009) regenerou, *in vitro*, uma planta inteira de *Phalaenopsis* Blume a partir de gemas provenientes de inflorescências. Morel (1960 *apud* Torres *et al.* 1998) produziu plantas de *Cymbidium* Sw. livres de vírus a partir de ápices caulinares. Trabalhos sobre a micropropagação se desenvolveram após essas publicações. O primeiro estudo sobre micropropagação do gênero *Cyrtopodium* foi realizado no fim da década de 1980 por Sanchez (1988), que regenerou plantas inteiras de *Cyrtopodium punctatum*, a partir de ápices radiculares. Após esse trabalho, outros estudos foram desenvolvidos sobre micropropagação de *Cyrtopodium*, contudo, ainda não abrangeram um número significativo de espécies (Quadro 1). Apesar de um número significativo de trabalhos sobre micropropagação de vários gêneros de Orchidaceae, há ainda muitas incertezas sobre essa técnica, em particular a respeito da influência dos reguladores de crescimento (Novak *et al.* 2014), o que justifica a realização de pesquisas sobre as espécies do gênero.

## **2.2. Sementes – armazenamento e avaliação de viabilidade pelo teste do Tetrazólio**

A agricultura apenas se desenvolveu pela capacidade dos povos, em diferentes partes do mundo, de armazenar sementes (Muschick 2010; Barbedo *et al.* 2013). Ela teria surgido de forma independente em pelo menos 11 partes do mundo, com o registro mais antigo entre 11 e 9 mil anos a.C. na região do oriente médio conhecida como crescente fértil (Evert & Eichhorn 2014). A maior oferta de alimentos possibilitou um aumento populacional expressivo nos locais onde existiam esses centros agrícolas (Harari 2017), e isso levou a uma série de ondas migratórias em direção à Europa e Ásia (Cavalli-Sforza 2003), e mais recentemente, possibilitou o estabelecimento de colonizadores nas Américas e Oceania (Crosby 2011).

Os bancos de sementes podem ser empregados para armazenar sementes de uma grande gama de espécies, mas seus resultados apresentam limitações quanto a tolerância da semente ao dessecamento (Pritchard 2004). Na década de 1970 as sementes foram classificadas em duas categorias: ortodoxas e recalcitrantes, baseado na tolerância das mesmas ao dessecamento sem perda da capacidade de germinar (Barbedo *et al.* 2013). Tal classificação, embora tenha trazido muita clareza acerca do comportamento de um grande número de sementes, não abrangia aquelas que não podiam ser enquadradas em nenhum dos dois extremos. Esta situação foi esclarecida apenas uma década depois, em 1980, e essas sementes passaram a ser classificadas como intermediárias (Barbedo *et al.* 2013; Walters 2015).

Segundo Walters (2004), essas três categorias possuem comportamentos de sobrevivência que podem ser monitorados à medida que vão perdendo seu conteúdo hídrico, e por isso, devem ser armazenadas em condições específicas:

- Ortodoxas: podem sobreviver por muitos meses e até anos com uma Umidade Relativa (UR) em torno de 5%. O armazenamento geralmente ocorre em UR de 15-25%, com variação de 2-10%, e temperaturas abaixo de 5 °C, sendo mais comum a -18 °C. A longevidade pode variar de uma década até um século.

- Intermediárias: a perda da viabilidade da semente ocorre em poucos dias quando estão em UR menor que 20%. O armazenamento pode ocorrer em UR entre 40 e 60%, em uma faixa de temperatura de 5 a 25 °C. A longevidade varia inversamente com a temperatura de armazenamento: 1 - 6 meses a 5 °C e de 2-5 anos em 25 °C.

- Recalcitrantes: perdem a viabilidade em poucos dias quando expostas a UR abaixo de 90%. Em razão da sensibilidade à dessecação, essas sementes devem ser armazenadas em condições de UR entre 92 e 98%, e geralmente em temperaturas não mais baixas que 15 °C. A viabilidade das sementes pode ser prolongada para seis meses até dois anos.

Tradicionalmente, o armazenamento de sementes é mais conhecido em propriedades rurais e tem o propósito de preservar os estoques de sementes para semeadura na estação seguinte (FAO 2018). Entretanto, em algumas situações é necessário o armazenamento de sementes por duas ou mais estações: para manter estoques reguladores, aguardar condições climáticas mais favoráveis para cultivo, preservar variedades com características agrícolas desejáveis, etc. Outra necessidade do armazenamento de sementes se aplica à realização de experimentos científicos em momento oportuno, para avaliar o próprio método de armazenamento, e para a conservação *ex situ* de espécies ou variedades de interesse ecológico ou agrícola (Pritchard 2004; Kaviani 2011). Em propriedades rurais o armazenamento ocorre em silos ou armazéns graneleiros, em condições de menor controle das condições ambientais, repercutindo diretamente no tempo de conservação dessas sementes (Villela & Peres 2004).

Para o armazenamento de sementes a médio ou a longo prazo, pode-se recorrer a dois métodos principais: criopreservação, que é realizada em temperatura ultrabaixa (Kaviani 2011), ou bancos de sementes (Fu 2017; Solberg *et al.* 2020). O primeiro método consiste em manter sementes em temperaturas abaixo de -100 °C, mas geralmente a -196 °C, em nitrogênio líquido ou em sua fase de vapor a -150 °C, mediante certos métodos de pré-condicionamento: dessecação, vitrificação, encapsulamento-desidratação; encapsulamento-vitrificação, pré-crescimento, pré-crescimento-dessecação e "droplet freezing" (Pritchard 2004; Kaviani 2011). Para bancos de sementes, o material

é dessecado até atingir cerca de 3-7% de umidade, empacotado e armazenado entre -18° °C e -20 °C (Vertucci & Roos 1990; Solberg *et al.* 2020).

**Quadro 1.** Trabalhos publicados sobre cultivo *in vitro* de espécies de *Cyrtopodium*.

<b>Espécie</b>	<b>Tipo de explante/método</b>	<b>Referência</b>
<i>C. punctatum</i> (L.) Lindl.	ápices radiculares	Sanchez (1988)
<i>C. punctatum</i>	ápices radiculares	Hoelters & Zimmer (1991)
<i>C. palmifrons</i> Rchb. f. & Warm.	sementes	Araújo <i>et al.</i> (1999)
<i>C. cristatum</i> Lindl., <i>C. eugenii</i> Rchb. f. & Warm. e <i>C. vernum</i> Rchb. f. & Warm.	sementes, ápices caulinares e radiculares	Caramaschi (2001)
<i>C. paranaense</i> Schl.	sementes	Rego-Oliveira & Faria (2005)
<i>C. hatschbachii</i> Pabst	criopreservação de sementes	Surenciski <i>et al.</i> (2007)
<i>C. punctatum</i>	sementes	Dutra <i>et al.</i> (2009)
<i>C. paranaense</i>	ápices radiculares	Guo <i>et al.</i> (2010)
<i>C. glutiniferum</i> Raddi	sementes	Vogel & Macedo (2011)
<i>C. hatschbachii</i>	criopreservação de sementes	Surenciski <i>et al.</i> (2012)
<i>C. aliciae</i> L. Linden & Rolfe	sementes	Freitas <i>et al.</i> (2013)
<i>C. brandonianum</i> Barb. Rodr.	ápices radiculares	Flachsland <i>et al.</i> (2011)
<i>C. glutiniferum</i>	germinação simbiótica	Guimarães <i>et al.</i> (2013)
<i>C. paludicolum</i> Hoehne	sementes e ápices radiculares	Picolotto (2013)
<i>C. saintlegerianum</i> Rchb. f.	sementes	Silva <i>et al.</i> (2013b)
<i>C. paranaense</i>	ápices radiculares e segmentos foliares	Bellaver <i>et al.</i> (2015)
<i>C. saintlegerianum</i>	protocormos, multibrotação	Mendes <i>et al.</i> (2015)
<i>C. glutiniferum</i>	germinação simbiótica	Pereira <i>et al.</i> (2015)
<i>C. saintlegerianum</i>	sementes	Rodrigues <i>et al.</i> (2015)
<i>C. paludicolum</i>	ápices radiculares	Picolotto <i>et al.</i> (2017)
<i>C. saintlegerianum</i>	sementes	Silva <i>et al.</i> (2017)
<i>C. paludicolum</i>	germinação simbiótica	Carvalho <i>et al.</i> (2018)
<i>C. saintlegerianum</i>	germinação simbiótica	Sousa <i>et al.</i> (2019)
<i>C. flavum</i> Link & Otto	protocormos, multibrotação	Stefanello <i>et al.</i> (2020)
<i>C. cachimboense</i> L.C. Menezes	germinação assimbiótica	Paulino <i>et al.</i> (2021)
<i>C. paludicolum</i>	germinação assimbiótica, segmentos caulinares	Ferreira <i>et al.</i> (2022)
<i>C. aliciae</i>	germinação assimbiótica	Oliveira <i>et al.</i> (2023)

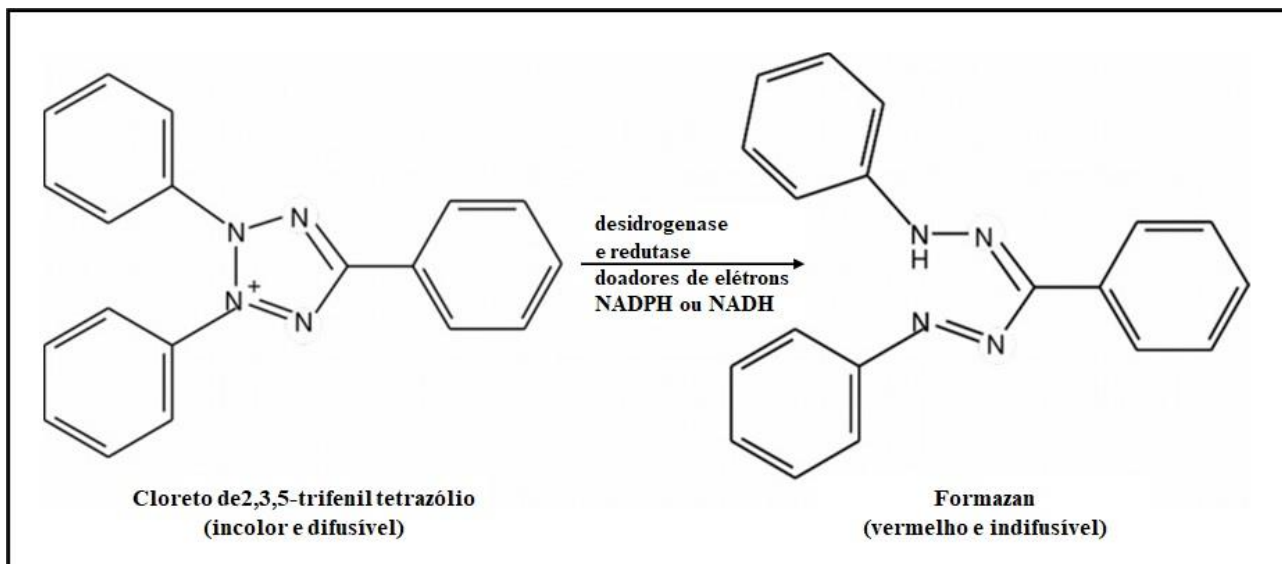
As sementes das Orchidaceae também podem ser agrupadas nas categorias acima (Machado-Neto & Custódio 2005), e desde que sejam levadas em consideração as características de cada espécie, elas podem ser armazenadas empregando técnicas de criopreservação (Thammasiri & Soamkul 2007; Surenciski *et al.* 2012; Vendrame *et al.* 2014; Suzuki *et al.* 2018), ou mais comumente em bancos de sementes em faixa de temperatura -20 e -18 °C, (Seaton & Pritchard 2011; Hosomi *et al.* 2012; Franceschi *et al.* 2019), mas isso não é uma regra (Kendon *et al.* 2017).

Outro aspecto importante de ser testado diz respeito às condições fisiológicas das sementes disponíveis para a produção. Os primeiros estudos sobre a fisiologia da germinação tiveram início em 1869, quando o Professor Johan Friedrich Nobbe publicou os primeiros procedimentos para avaliar a pureza e o vigor de sementes, tendo baseado seus estudos em lotes de sementes vendidos em mercados locais da Alemanha (Muschick 2010; Marcos-Filho 2015). A partir deste estudo uma série de testes foram desenvolvidos considerando a avaliação de dados físicos, fisiológicos e/ou bioquímicos das sementes (Mc Donald 1975 *apud* Milošević *et al.* 2010). Em 1931 foram publicadas pela International Seed Testing Association (ISTA) as Regras para Testagem de Sementes (Regras da ISTA), primeiro documento para a padronização de testes para avaliação de amostragem, pureza, germinação, condições sanitárias, conteúdo de umidade, etc. (Muschick 2010).

Muitos desses testes recaíam sobre características específicas das sementes, como cor, aparência geral, peso volumétrico, densidade, taxa de embebição, condutividade elétrica e taxa respiratória, cujos resultados tinham pouca acurácia (Moore 1969 *apud* França-Neto & Krzyzanowski 2019). Com a finalidade de superar essa limitação, pesquisadores passaram a aprimorar os estudos feitos em Turina, em 1922, na Sérvia (antiga Iugoslávia) e em Neljubow, em 1925, na Rússia sobre a avaliação da viabilidade de sementes por meio de estudos de reações de suas enzimas sobre determinados corantes (Marcos-Filho 2015). Inovações foram publicadas por Hasegawa (1937 *apud* França-Neto & Krzyzanowski 2019) em seu trabalho sobre coloração de sementes com selênio, método Eidmann-Hasegawa. Porém o selênio era venenoso e um substituto deveria ser encontrado. Vários sais foram testados e a partir do trabalho de Kühn e Jerchel em 1941, Georg Lakon concluiu que o melhor substituto para o selênio seria o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC), publicando esses dados em 1950 (Muschick 2010; Marcos-Filho 2015).

De acordo com França-Neto & Krzyzanowski (2019) o teste do TTC determina, de forma indireta, a atividade respiratória dos tecidos da semente. Esse teste avalia a atividade de enzimas desidrogenases que catalisam reações nas mitocôndrias durante a glicólise e o ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico). Essas enzimas quando entram em contato com o TTC promovem sua redução para formazan (Figura 5).





**Figura 5.** Reação de redução do sal de tetrazólio que resulta na alteração de coloração em células vivas de sementes e de outros organismos. Adaptada de Braissant *et al.* (2020).

No interior do embrião podem ser encontrados vários tecidos com atividade da cadeia respiratória: cotilédones, plúmula e adjacências, primórdio radicular, endosperma, entre outros (Roberts 1950). Assim, o teste consiste em imergir as sementes em solução de TTC (2,3,5-trifenil tetrazólio), que é incolor e com capacidade de se difundir, e por meio da ação de desidrogenases ou redutases, ocorre a redução desse sal incolor para trifenilformazan ou formazan, um sal vermelho e sem capacidade de difusão (França-Neto & Krzyzanowski 2019; Braissant *et al.* 2020). O teste do TTC, como qualquer outro teste, apresenta vantagens e desvantagens ou limitações (Milošević *et al.* 2010; França-Neto & Krzyzanowski 2019) (Quadro 2). Atualmente o teste do TTC é usado para avaliar a viabilidade e as condições de armazenamento de sementes de importância agrônômica: milho, soja, feijão, etc. (BRASIL 2009), espécies florestais e lenhosas: Imburana (Guedes *et al.* 2010), Andiroba (Amoêdo & Ferraz 2017), Peroba-rosa (Cunha *et al.* 2021), Baru (Silva *et al.* 2021), Guapuruvu (Espitia-Camacho *et al.* 2021), Fava-arara (Costa *et al.* 2018); palmeiras: Macaúba (Ribeiro *et al.* 2010), Palmito-juçara e Jerivá (Brancalion *et al.* 2011), Pupunha (Belniaki *et al.* 2020); ornamentais: Rabo de raposa, Cravina, Mosquitinho, Ervilha de cheiro, Cravo-amarelo (Holubowicz *et al.* 2001), *Crocus* spp. (Haspolat *et al.* 2013), Cactos (Assis *et al.* 2015), Bromélias (Anastácio & Santana 2010; Coelho *et al.* 2011; Elizalde *et al.* 2017); Orquídeas: *Cypripedium acaule* Aiton (Lauzer *et al.* 1994), *Cypripedium reginae* Walter, *Cypripedium parviflorum* Salisbury e *Platanthera grandiflora* (Bigelow) Lindley (Vujanovic *et al.* 2000), *Hoffmannseggella cinnabarina* (Batem. ex Lindl.) H.G. Jones (Suzuki *et al.* 2012), *Cattleya* (Hosomi *et al.* 2012; 2017; Soares *et al.* 2014; Ribeiro *et al.* 2021), *Brassavola tuberculata* Hooker e *Dendrobium antenatum* Lindley (Soares *et al.* 2014), *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó e *Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner (Custódio *et al.*

2016), *Hadrolaelia grandis* (Lindl & Paxton) Chiron & V.P. Castro (Vudala & Ribas 2017), *Vanilla* spp. (Alomía *et al.* 2017; Halim *et al.* 2017), Oncidiinae (Franceschi *et al.* 2019), *Epidendrum* spp (Mercado *et al.* 2019; 2020), *Miltonia flavescens* Lindl. e *Schomburgkia crispa* Lindl. (Soares *et al.* 2021), entre outros trabalhos.

### 2.3 Morfologia e germinação assimbiótica das sementes das Orchidaceae

Sementes de orquídeas possuem características singulares que as tornam únicas dentre as plantas com flores: são produzidas em grande número, tamanho e peso bastante reduzidos, ausência quase que completa de endosperma e germinação micotrófica obrigatória (Arditti 1980). O número de sementes produzidas por fruto nas diferentes espécies varia consideravelmente, de 376 a 4.000.000, com tamanho que pode variar de 0,05 mm à 6 mm de comprimento, com massa variando de 0,3-0,4 µg até 14-17 µg (Arditti & Ghani 2000). Essas características de peso e tamanho são consequências da estrutura reduzida das sementes das orquídeas. O número de células do envoltório (testa) difere bastante entre gêneros, com algumas espécies apresentando um número bastante reduzido, cinco ou apenas duas, e outras espécies com várias células formando a testa (Barthlott *et al.* 2014). Já o embrião pode ter de 8-700 células, com pouco ou, geralmente, nenhum endosperma (Yeung 2017).

O fato de orquídeas terem sementes pulverulentas e pouco visíveis influenciou para que estudos mais aprofundados só fossem apresentados tardiamente. O primeiro tratado sobre o tema foi publicado em seis volumes na obra *Herbarium Amboinense*, entre 1654 e 1702, escrito por Georgius Everhadus Rumphius (Yam & Arditti 2009). Essa característica marcante deu espaço a muitos mistérios e lendas sobre o processo germinativo dessas plantas, merecendo destaque duas histórias pitorescas (Arditti 1980):

1. Pelo fato de algumas flores de orquídeas europeias do gênero *Satyrium* exalarem um forte odor de cabra, ocasionado pela presença de ácido caprótico, se imaginava que essas plantas se originassem de fluidos espermáticos liberados por cabras que fermentavam no solo;
2. Orquídeas se originavam de corpos de animais em decomposição que continham alguma virtude seminal.

**Quadro 2.** Vantagens e desvantagens/limitações do teste do tetrazólio, segundo BRASIL (2009), Milošević *et al.* 2010; Hosomi *et al.* (2012; 2017), França-Neto & Krzyzanowski (2019).

Vantagens	Desvantagens ou limitações
O teste exclui a maioria dos distúrbios ambientais que afetariam o crescimento das plântulas e a avaliação de teste como o de germinação.	Requer treinamento especializado e conhecimento sobre a estrutura da semente para a adequada interpretação do teste.
Avaliação focada nas condições físicas e fisiológicas de cada estrutura do embrião da semente.	É tedioso devido o exame individual de cada semente que requer paciência e experiência.
Proporciona resultado rápida para a avaliação: menos de 20 h para a maioria das culturas.	Consome mais tempo por amostra que o teste padrão de germinação a despeito de ser um teste rápido.
Permite a identificação do nível de vigor da semente.	Não mostra a eficácia ou a potencial toxicidade de um determinado tratamento a que a semente é submetida. Também não informa a presença de patógenos.
Diagnóstico da (s) causa (s) de deterioração das sementes.	Proporciona valores altos de viabilidade, mas não mede se a semente de fato teria a capacidade de germinar, pois o resultado não separa sementes normais das anormais.
Requer equipamentos simples e baratos.	Causa dificuldades na identificação de plântulas anormais, i.e., coleótilos separados, geotropismo negativo, etc.
O teste não é afetado por fatores como dormência.	Algumas sementes necessitam de pré-tratamentos específicos: embebição, escarificação, etc.
Um analista experiente pode analisar de 4-5 amostras de 50 sementes com duas repetições em cada hora.	
Apresenta mais informações sobre a qualidade da semente do que o teste padrão de germinação.	

Na Inglaterra, cerca de 150 anos depois da publicação de Rumphius, foi vista a primeira plântula de orquídea originada da germinação de semente em uma casa de vegetação (Arditti 1980). Essa descoberta impulsionou os estudos sobre os processos germinativos das orquídeas. E em 1844 David Moore, pesquisador do Jardim Botânico de Glasnevin, Dublin, Irlanda, iniciou sua pesquisa sobre germinação de sementes de orquídeas. No ano de 1849 ele publicou o primeiro trabalho que descrevia a germinação simbiótica de orquídeas em condições controladas (Yam & Arditti 2009). O método consistiu em espalhar sementes maduras (oriundas de cápsulas que tiveram deiscência natural) em três tipos de substratos: i. com plantas em cultivo; ii. usado em cultivos anteriores; iii. novo, sem qualquer tipo de cultivo presente ou anterior (Moore 1849).

Exatos 50 anos depois do experimento de David Moore, o francês Noël Bernard iniciou sua vida acadêmica, passando a publicar importantes trabalhos no campo da germinação das sementes

das orquídeas (Yam & Arditti 2009). Seus dois primeiros trabalhos mostraram que sementes de *Neottia nidus-avis* (L.) Rich. germinadas em seu habitat natural apresentavam em seu interior hifas espiraladas de micorrizas (pelotons) aprisionadas em determinado grupo de células, e que após certo tempo eram digeridas e formavam aglomerados marrons, demonstrando a germinação simbiótica das sementes desta espécie (Bernard 1899; 1900). Este autor foi o primeiro a empregar o termo pelotons, bem como relatar a presença deles no interior das sementes de orquídeas (Selosse *et al.* 2017). Alguns anos depois foi publicado o seu trabalho mais importante, o primeiro protocolo para propagação simbiótica *in vitro* de orquídeas (Bernard 1909), em que foi usada uma decocção de “salep” como meio de cultura para o cultivo *in vitro* de sementes de *N. nidus-avis* e inóculos de fungos associados a orquídeas (Yam & Arditti 2009). “Salep” é um pó obtido de túberas secas e trituradas de algumas orquídeas dos gêneros *Anacamptis* Rich., *Himantoglossum* Spreng., *Orchis* L., *Ophrys* L., *Serapias* L., entre outros (Sen *et al.* 2019), com a seguinte composição: 16-61% de mucilagem, 0,5-25% de amido (que não pode ser hidrolisado pelas sementes de orquídeas), 0,9-2,7% de açúcares redutores (podem ser absorvidos), 0,2-1,4% de sacarose (componente que suporta a germinação), 5% de proteínas, e baixos níveis de substâncias nitrogenadas (Knudson 1922). Este talvez tenha sido o primeiro método para propagação *in vitro* para plantas. Na ocasião foi usado o que havia de mais moderno e avançado em procedimentos microbiológicos. O trabalho de Bernard foi o primeiro a reconhecer a relação simbiótica, e não parasítica, entre orquídeas e fungos, bem como o fato de que os fungos podiam viver apartados das orquídeas, porém a orquídea não poderia (Yam & Arditti 2009).

A partir do trabalho de Bernard (1909), outro salto foi dado no estudo da germinação de sementes de orquídeas: a germinação assimbiótica (Arditti 1967). Lewis Knudson usou os dados de Bernard (1909) sobre a capacidade dos fungos para inverter açúcares e concluiu que a germinação de sementes de orquídeas era estimulada pela quebra de amido e outras macromoléculas (Arditti 1980). Assim, Knudson (1922) elaborou um robusto estudo sobre a influência de sete meios de cultura na germinação assimbiótica de algumas espécies de orquídeas, investigando, inclusive, o papel de alguns tipos de açúcares e suas concentrações no processo de germinação (Quadro 3). Neste estudo também foi testada a esterilização de sementes com hipoclorito de cálcio.

Apesar de não ter certeza do papel das formas nitrogenadas na nutrição das orquídeas, Knudson (1922) considerou que havia espécies que preferiam meios com nitrogênio em forma de amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) ou de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), e por isso ele modificou a solução de Pfeffer (Pfeffer 1900) para a Solução B (Tabela 1). Segundo Zhang *et al.* (2018b) tanto as orquídeas terrícolas quanto as epífitas são capazes de absorver as duas formas nitrogenadas, contudo, a taxa de absorção difere entre os dois grupos, com as terrícolas apresentando maior taxa de absorção para  $\text{NO}_3^-$  e as epífitas para  $\text{NH}_4^+$ . Entretanto, Ponert *et al.* (2013) e Figura *et al.* (2020) verificaram que orquídeas terrícolas são bastante

sensíveis a nitratos, que mesmo em baixas concentrações são capazes de impedir a germinação de suas sementes e o desenvolvimento de plantas desse grupo.

O principal resultado obtido por Knudson (1922) foi que açúcares são as substâncias responsáveis pela germinação assimbiótica de sementes de orquídeas, sem os quais ela não ocorre. Todo esse estudo é o procedimento pioneiro para propagação axênica de uma planta (Arditti 2008).

**Quadro 3.** Meios de cultura usados e espécies estudadas por Knudson (1922).

Meio	Composição	Espécie estudada
1	Extrato turfa de pântano	<i>Cattleya schroederiae</i> x <i>C. gigas</i>
2	Túberas de <i>Canna sp</i> cozidas	<i>Cattleya schroederiae</i> x <i>C. gigas</i>
3	Extrato de cenoura	<i>Cattleya labiata</i> x <i>C. aurea</i>
4	Meio de Pfeffer	<i>Cattleya mossiae</i>
5	Meio de Pfeffer + 1% sacarose	<i>Cattleya mossiae</i>
6	Solução B + 2% glicose	<i>Cattleya intermedia</i> x <i>C. lawrenceana</i>
7	Solução B + 2% sacarose	<i>Cattleya intermedia</i> x <i>C. lawrenceana</i>

**Tabela 1.** Composição das soluções de Pfeffer e B de Knudson usadas como meio de cultura para orquídeas. Adaptada de (Knudson 1922).

Solução de Pfeffer	Solução B
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> : 4 g	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> : 1 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 1 g	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 0,25 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O : 1 g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O : 0,25 g
KNO <sub>3</sub> : 1 g	Fe <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> : 0,05 g
KCl : 0,5 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 0,5 g
FeCl <sub>3</sub> : 0,04 g	H <sub>2</sub> O : 1 L
H <sub>2</sub> O : 5 L	

Após a elucidação do papel dos nutrientes na germinação assimbiótica de sementes de orquídeas por Knudson, vários meios foram desenvolvidos ou modificados, o papel de certos açúcares foi melhor esclarecido, e passou-se a empregar misturas complexas na preparação de meios de cultura: água de côco, peptona, extrato de levedura, polpa de banana ou de outras frutas (Arditti 2008). Desse conjunto de conhecimentos e experimentações surgiram os principais meios de cultura usados na germinação e micropropagação de orquídeas e outras espécies: Knudson C (Knudson 1946), Vacin & Went (Vacin & Went 1949), MS (Murashige e Skoog 1962), WPM (Lloyd & McCown 1980), P723 (PHYTOTECH 2022) (Tabela 2).

## 2.4 Hormônios vegetais (fitormônios) e reguladores de crescimento

O desenvolvimento e o crescimento vegetal são influenciados pela integração de diversos fatores ambientais e endógenos, cuja regulação ocorre por meio de respostas induzidas por fitormônios, que em última análise governam forma e função ao longo da vida da planta (Gray 2004; Novak *et al.* 2014). Essas respostas podem ser induzidas por um único fitormônio ou pela interação de mais de um deles (Rahman 2013).

Classicamente, fitormônios são definidos como moléculas endógenas de ocorrência natural nas plantas em concentrações muito baixas (Sauer *et al.* 2013), cuja biossíntese ocorre em um tecido e sua ação se dá sobre sítios-alvos de outros tecidos (Taiz *et al.* 2021). Caso essas moléculas tenham as mesmas características, mas sejam sintéticas, elas são chamadas de reguladores de crescimento (Cid & Teixeira 2014). Os estudos sobre essas substâncias tiveram início no século XIX, com a pesquisa sobre os fenômenos de gravitropismo e senescência foliar (Hopkins & Hüner 2008).

A identificação do primeiro fitormônio se deu a partir de questões levantadas por Charles Darwin e seu filho Francis Darwin (Darwin & Darwin 1880) ao revisarem um estudo sobre a perda e a reativação do gravitropismo em raízes cujos ápices foram retirados (Ciesielski 1872; Tivendale & Cohen 2015). Went (1928) aprofundou os estudos sobre o gravitropismo, demonstrando que o crescimento do ápice de coleótilos de aveia (*Avena sativa* L.) era regulado por um promotor químico. Mais tarde soube-se tratar do ácido indol-3-acético (AIA) (Bonner & Bandurski 1952). Em 1934 esta substância foi isolada pela primeira vez a partir de amostras de urina de mulheres grávidas (Kögl & Kostermans 1934 *apud* Tivendale & Cohen 2015), e em 1944 ocorreu a primeira extração em uma planta superior, em grãos maduros de milho (Berger & Avery 1944).

No início do século XIX as respostas fisiológicas não eram bem compreendidas (Nakayama *et al.* 2017). Por exemplo a perda de folhas em árvores situadas próximas a fontes que emitiam gases resultantes da queima de combustíveis (Burg 1973; Chaves & Mello-Farias 2006), fenômeno primeiramente relatado por Fahnstock (1858). Este autor descreveu os efeitos da ação do gás de iluminação sobre uma coleção particular de plantas exóticas, que em sua maioria, perderam suas folhas. Neljubov (1901 *apud* Argueso *et al.* 2007) também observou que os caules de plântulas de ervilha crescidas no escuro, dentro do laboratório, exibiam sintomas do que foram denominados de tripla resposta: inibição do alongamento, aumento do crescimento lateral (intumescimento) e crescimento horizontal, vindo em seguida a identificar que o etileno era o responsável por essas respostas. Em 1910, Cousins (1910 *apud* Bakshi *et al.* 2015) inferiu que o etileno produzido por laranjas seria capaz de promover o amadurecimento precoce de bananas. Além disso, Gane (1934) identificou quimicamente o etileno como um produto natural do metabolismo, e por causa dos seus

efeitos dramáticos nas plantas, essa molécula foi classificada como hormônio vegetal (Bleeker & Kende 2000).

**Tabela 2.** Composição dos principais meios de cultura empregados na micropropagação de orquídeas e outras espécies vegetais. Concentração em mg.L<sup>-1</sup>.

Componentes	Ano/Meio de cultura							
	1884 Knop	1900 Pfeffer	1922 KB	1946 KC	1949 VW	1962 MS	1980 WPM	2000 P723
<b>Macroelementos</b>								
Sulfato de amônio			500	500	500			
Nitrato de cálcio	800	800	1000	1000			556	
Fosfato de cálcio					200			
Sulfato de magnésio	200	200	250	250	250	370	370	75,18
Cloreto de potássio		100						
Nitrato de potássio	200	200			525	1900		475
Nitrato de amônio						1650	400	412,5
Fosfato de potássio	200	200	250	250	250		170	42,5
Cloreto de cálcio						440	96	83
Sulfato de potássio							990	
<b>Ferro</b>								
Cloreto férrico		8						
Fosfato férrico	traço		50					
Sulfato ferroso				25		27,8	27,8	13,93
Tartarato férrico					28			
<b>Agente quelante</b>								
Sódio EDTA						37,3	33,6	18,65
<b>Microelementos</b>								
Ácido bórico						6,2	6,2	1,65
Sulfato de manganês				7,5	7,5	22,3	22,3	4,23
Ácido molibdicó								0,0625
Molibdato de sódio						0,23	0,25	
Sulfato de zinco						8,6	8,6	2,65
Sulfato de cobre						0,025	0,25	0,0063
Cloreto de cobalto						0,025		0,0063
Iodeto de potássio								0,2075
<b>Orgânicos</b>								
Sacarose		1%	2%	2%	2%	3%	2%	2%
Glicina						2	2	
Mio-inositol						100	100	100
Ácido nicotínico						0,5	0,5	1
Pirodoxina						0,5	0,5	1
Tiamina						0,1	0,1	10
Peptona de carne								2000

No mesmo período em que Went (1928) realizava seus estudos sobre o AIA, pesquisadores do Japão se dedicavam para compreender a doença chamada “Bakanae”, causada pelo fungo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw., que ataca plantas de arroz (Hedden & Sponsel 2015). O principal sintoma dessa doença é o hiperalongamento do caule, que pode levar a planta à morte, mas caso ela sobreviva, leva à produção de sementes estéreis, vazias (Naeem *et al.* 2016). Em 1926 Eiichi Kurosawa demonstrou que os sintomas causados pela doença poderiam ser replicados por meio da aplicação de culturas estéreis do fungo (Kurosawa 1926). Nove anos mais tarde, Yabuta (1935) obteve uma amostra purificada da substância com alta atividade biológica, que foi chamada de giberelina, em razão de sua origem fúngica. Sua estrutura química foi proposta apenas em 1956, e revisada em 1961, tendo sido renomeada em língua inglesa para ácido giberélico (GA ou GA<sub>3</sub>) (Thomas *et al.* 2005; Taiz *et al.* 2021).

Nesse período a cultura de tecidos vegetais atraiu a atenção de fisiologistas vegetais, que passaram a buscar outras substâncias envolvidas no desenvolvimento vegetal (Hopkins & Hüner 2008). Em razão disso, estudos levaram a descoberta de uma substância envolvida na proliferação celular (citocinese). Carlos Miller, Folke Skoog e outros colaboradores isolaram uma substância obtida da autoclavagem de DNA de leveduras, que possuía grande capacidade de promover intensa multiplicação celular em medula de tabaco cultivada *in vitro* (Mok & Mok 2001; Amasino 2005). Essa substância, a 6-furfurilaminopurina, foi chamada de cinetina (Miller *et al.* 1955a). Em seguida, esses cientistas determinaram sua estrutura e conseguiram sintetizá-la (Miller *et al.* 1955b, 1956). Posteriormente compostos com atividade biológica igual a cinetina foram denominadas citocininas, em razão dessas substâncias serem promotoras de citocinese em vegetais (Skoog & Strong 1965). Em 1973 foi isolada a primeira citocinina natural a partir de extrato de milho verde (*Zea mays* L.), tendo sido denominando de zeatina (Letham 1973).

À medida que os estudos sobre os fitormônios já conhecidos avançavam, novas moléculas com atividade hormonal em plantas foram descobertas. Em 1953 Bennet-Clark e Kefford reportaram que extratos de algumas plantas continham uma substância capaz de cessar o crescimento de seções de cotilédones, a qual denominaram inibidor-β (Hopkins & Hüner 2008; Kerbauy 2008). Estudos posteriores observaram a ação dessa substância como promotora de dormência em vários órgãos vegetais: gemas de bulbos, plantas lenhosas, dormência apical, e em sementes (Hopkins & Hüner 2008). Em 1964 foi proposto o termo “dormina” para substâncias capazes de induzir dormência, mas em 1967, durante a Conferência Internacional de Substâncias no Crescimento de Plantas, foi proposto o termo ácido abscísico (ABA), hoje empregado universalmente (Hopkins & Hüner 2008, Cutler *et al.* 2010).



Após a descoberta dos hormônios vegetais já mencionados, alguns outros foram identificados. Na década de 1970 foram identificadas substâncias com forte atividade no crescimento vegetal - os brassinosteróides (Clouse & Sasse 1998; Bajguza & Tretynb 2003; Taiz *et al.* 2021; Coll *et al.* 2015). Em 1973, Nello Bagni e sua esposa Donatella Serafini-Fracassini, ambos da Universidade de Bolonha, publicaram um artigo que pela primeira vez mencionava a ação regulatória de poliaminas em plantas (Galston & Sawhney 1990), e que hoje se sabe estarem envolvidas em diversos processos biológicos, como desenvolvimento floral, embriogênese, organogênese, respostas a estresses bióticos e abióticos, entre outros (Handa *et al.* 2018; Chen *et al.* 2019). No final da década de 1980 outro hormônio, o ácido jasmônico, foi identificado (Babenko *et al.* 2015), reconhecido por regular respostas a estresses bióticos, como herbivoria e ataque de patógenos, e abióticos como injúrias e radiação ultravioleta (Turner *et al.* 2002; Gomi 2020; Wang *et al.* 2020). O ácido salicílico (Dempsey & Klessig 2017; Koo *et al.* 2020; Lefever *et al.* 2020) e o triacantanol (Hangarter & Ries 1978; Naeem *et al.* 2012) também são moléculas que exercem atividade hormonal em plantas e tem ganhado destaque nos últimos anos.

## 2.5 Hormônios vegetais na cultura de tecidos

Como visto no tópico anterior, os hormônios vegetais estão envolvidos em inúmeros processos nas células e no corpo das plantas. Alguns desses fitormônios são empregados diretamente na cultura de tecidos vegetais com maior ou menor amplitude (Quadro 4). Dos fitormônios clássicos, as giberelinas, o ácido abscísico e o etileno tem funções bem específicas na cultura de tecidos vegetais, e por isso praticamente não são usados na micropropagação de plantas, especialmente de orquídeas (Arditti 2008; Kauth *et al.* 2008; Smith 2013). Contudo, auxinas e citocininas são amplamente empregadas na cultura de tecidos vegetais, agricultura e outras áreas da biotecnologia vegetal (Arditti 2008; Faria *et al.* 2012; Sauer *et al.* 2013; Raspor *et al.* 2021).

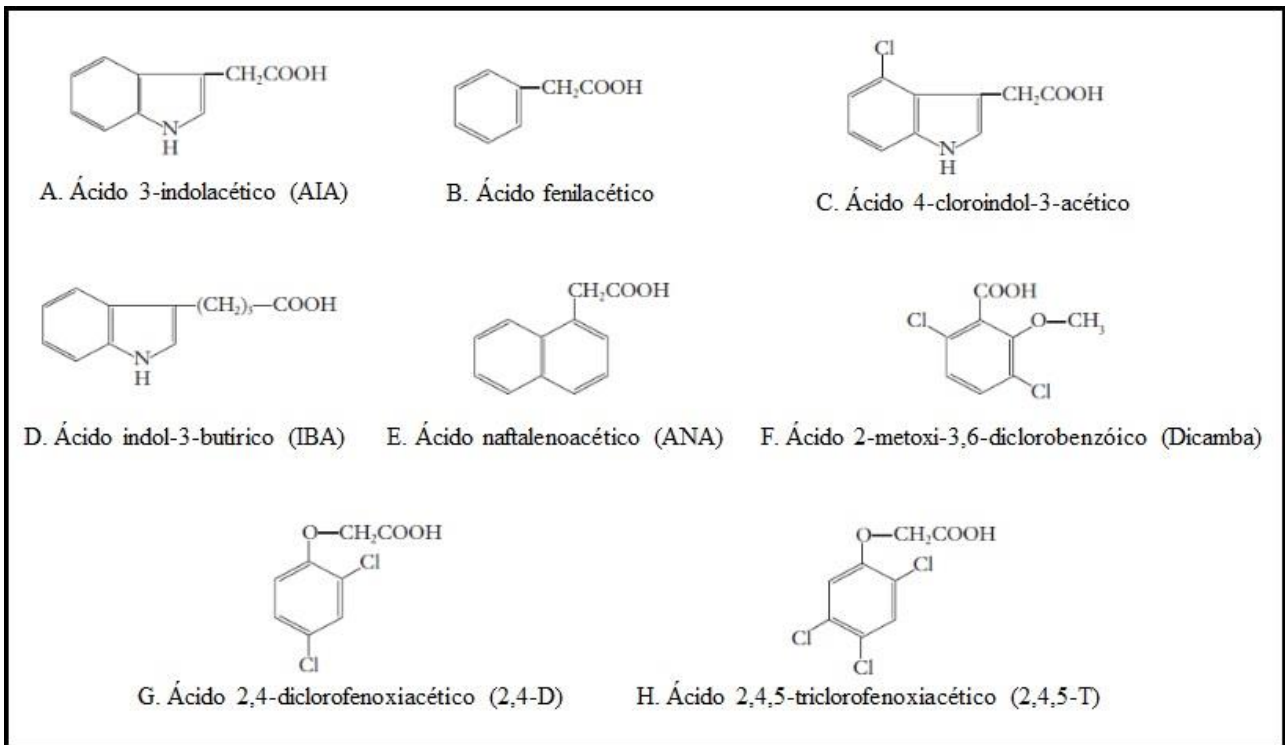
Auxinas e citocininas usadas na cultura de tecidos podem ter ocorrência natural ou serem sintéticas (Taiz *et al.* 2021) (Figuras 6 e 7), sendo as mais utilizadas na cultura de tecidos vegetais, e em especial na micropropagação de orquídeas, as auxinas ácido 3-indolacético (AIA), ácido indolbutírico (IBA), ácido naftaleno acético (ANA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 4-amino-3,5,6-tricloro-picolínico (Picloran), e as citocininas 6- $\gamma$ - $\gamma$ -dimetilalilamino-purina (2i-P), Zeatina, 6-furfurilaminopurina (Cinetina), 6-benzilaminopurina (BAP ou BA), dimetilaminopurina (DMAP) e 1-fenil-3(1,2,3-tiadiazol-5-il)-uréia (Tidiazuron ou TDZ) (Arditti 2008; Davey & Anthony 2010). Alguns desses hormônios são mais suscetíveis a degradação pelo calor no processo de esterilização, como o AIA, zeatina, 2i-P (Arditti 2008; Davey & Anthony 2010; Smith 2013). O TDZ ora é tratado

como termo lábil (Picolotto *et al.* 2017; Novikova *et al.* 2020; Chung & Ouyang 2021), ora como termo estável (Aggarwal *et al.* 2012; Erland *et al.* 2020; Karyanti *et al.* 2021).

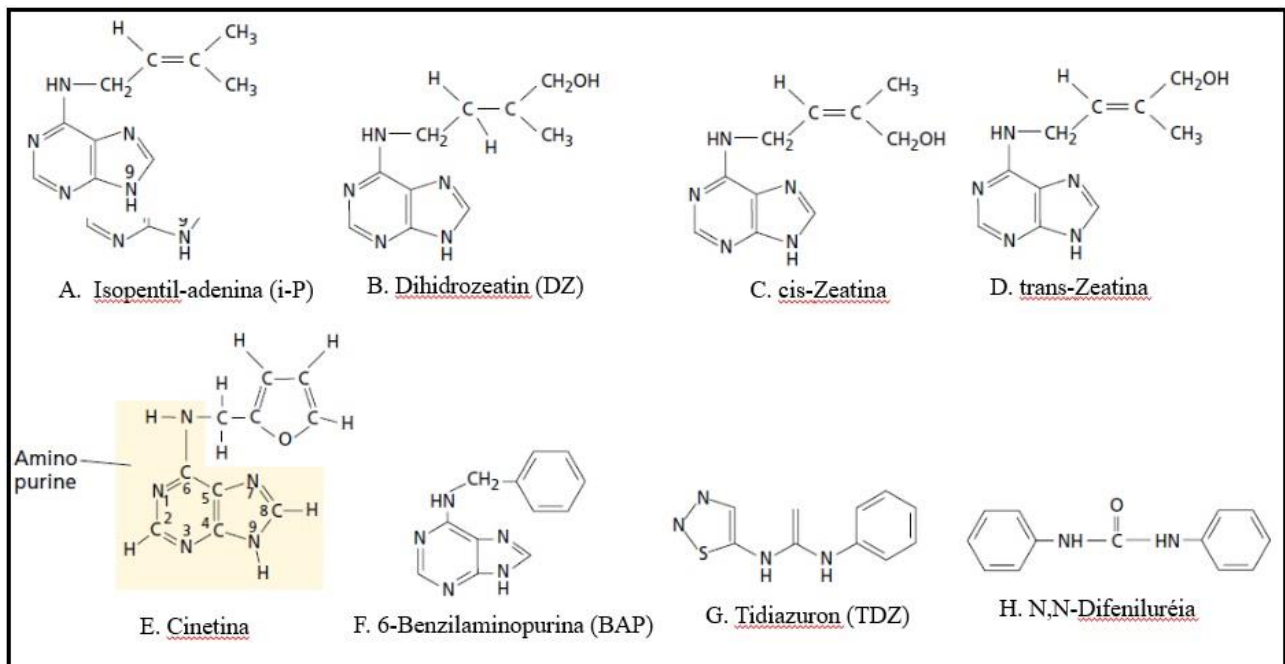
**Quadro 4.** Funções dos Hormônios vegetais/Reguladores de crescimento na cultura de tecidos vegetais, segundo Hopkins & Hüner (2008), Kerbauy (2008), Taiz *et al.* 2021 e Cid & Teixeira (2014).

<b>Reguladores de crescimento/Hormônios</b>	<b>Principais funções na cultura de tecidos</b>
<b>Auxinas</b>	Indução de calos em explantes; enraizamento a partir de brotos.
<b>Citocininas</b>	Indução de brotos a partir de calos; multibrotação a partir de gemas axilares ou apicais; podem inibir a indução de raízes em plântulas.
<b>Giberelinas</b>	Promoção do alongamento em brotos; promoção da germinação de sementes imaturas.
<b>Etileno</b>	Pouco usado na cultura de tecidos, pois geralmente causa efeitos indesejáveis, tais como: oxidação fenólica, queda foliar e vitrificação; em alguns casos é promotor de organogênese.
<b>Ácido abscísico (ABA)</b>	Impede a germinação precoce de embriões zigóticos, a embriogênese somática ou a poliembriogênese.
<b>Brassinosteróides</b>	Regeneração de plantas <i>in vitro</i> .
<b>Ácido jasmônico</b>	Efeitos indiretos sobre a organogênese; ação direta na produção de metabólitos secundários em calos.
<b>Poliaminas</b>	Pode ser um substituto do tratamento com auxinas.
<b>Triacontanol</b>	Regeneração de plantas <i>in vitro</i> .

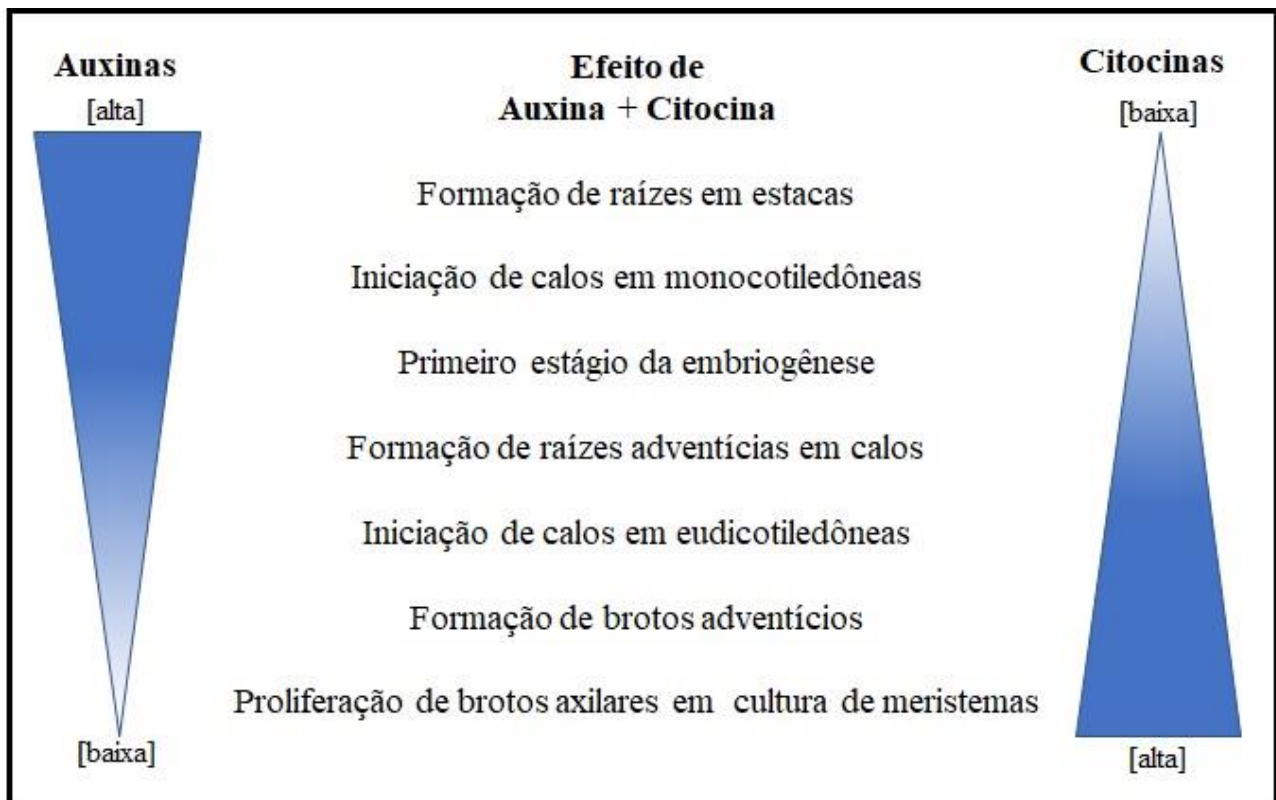
Aparentemente a divisão celular é regulada por auxinas e citocininas agindo em momentos distintos do ciclo celular. A primeira aumentaria a replicação do DNA, enquanto que a última controlaria os eventos que levam à mitose (George *et al.* 2008). Esses efeitos têm impacto direto na cultura de tecidos ou propagação *in vitro* de plantas, pois esses fitormônios promovem a multiplicação celular (Paque & Weijers 2016). Quando usadas de forma isolada, auxinas tem o propósito de promover a indução de calos e enraizamento de plântulas micropropagadas, enquanto que as citocininas são usadas na indução de brotos adventícios a partir de calos ou para induzir multibrotação a partir de gemas axilares ou apicais (Cid & Teixeira 2014). Entretanto, o trabalho de Skoog & Miller (1957 *apud* Raspor *et al.* 2021) mostrou que a regeneração completa *in vitro* de uma planta, a partir de explantes, depende do balanço adequado de auxina e citocinina, e não da ação isolada de apenas um dos hormônios. Mais ainda, este trabalho demonstrou que a maior relação citocinina/auxina promove o desenvolvimento de brotos, uma relação equivalente de citocinina/auxina aumenta a proliferação de calos indiferenciados e uma menor relação citocinina/auxina levaria ao enraizamento de brotos (George *et al.* 2008; Murai 2014), (Figura 8).



**Figura 6.** Exemplos de auxinas. **A-D.** Naturais. **E-H.** Sintéticas. Adaptado de Hopkins & Hüner (2008).



**Figura 7.** Exemplos de citocininas. **A-D.** Naturais. **E-H.** Sintéticas. Adaptado de Taiz & Zeiger (2013).



**Figura 8.** Efeitos na cultura de tecidos vegetais resultantes da interação entre auxina e citocinina em diferentes proporções. Adaptada de George *et al.* (2008).

Após a divulgação dos referidos estudos, a interação sinérgica entre auxina e citocinina passou a ser mais estudada. Valvekens *et al.* (1988) aplicaram a sinergia entre essas substâncias em dois momentos distintos da regeneração de brotos, o que é conhecido como regeneração em dois passos, e que atualmente é amplamente aplicado na multiplicação *in vitro* de plantas. Esse protocolo consiste em usar alta concentração de auxina e baixa de citocinina na fase inicial do cultivo (primeiro passo), e em seguida empregar na cultura alta concentração de citocinina e baixa concentração de auxina (segundo passo). A consequência esperada dessa sequência é que no primeiro momento ocorra grande multiplicação de calos indiferenciados, e no segundo momento esses calos se diferenciem em brotos com enraizamento subsequente (Raspor *et al.* 2021). Com esse procedimento, hoje é possível obter, por exemplo, batatas livres de vírus e orquídeas a baixo custo (Paque & Weijers 2016).

## 2.6. Biorreatores

A propagação *in vitro* de plantas obteve seus primeiros resultados positivos em 1902 com o trabalho de Gottlieb Haberlandt, que cultivou células de tecidos somáticos de várias espécies em solução nutritiva (Haberlandt 1902; Torres *et al.* 1998; Sussex 2008). Após este, muitos trabalhos foram realizados, e no ano de 1956 os principais fundamentos para a consolidação da propagação e

cultivo *in vitro* de plantas já haviam sido estabelecidos (Torres *et al.* 1998). Também em 1956, Routien e Nickell obtiveram a primeira patente para o cultivo *in vitro* de células de várias espécies vegetais em sistema de imersão realizado em recipientes de 20 litros (Georgiev *et al.* 2014). Isso despertou o interesse de vários pesquisadores e até da Agência Espacial dos Estados Unidos - NASA (National Aeronautics and Space Administration), e levou ao aperfeiçoamento de sistemas para o cultivo *in vitro* em larga escala de plantas e células vegetais (Georgiev *et al.* 2014). Esses sistemas foram denominados Biorreatores (Etienne & Berthouly 2002).

Os primeiros biorreatores desenvolvidos para o cultivo de células vegetais consistiam em adaptações de equipamentos já disponíveis no mercado - os fermentadores usados no cultivo de fungos e bactérias (Etienne & Berthouly 2002; Teixeira & Cid 2014). Após a metade da década de 1970, projetos específicos para a cultura de tecidos vegetais começaram a ser desenvolvidos, até que em 1981 foi construído um biorreator específico para micropropagação de uma planta, *Begonia x hiemalis* (Takayama & Misawa 1981).

De acordo com Paek *et al.* (2005), em um contexto bioquímico, biorreatores usualmente são descritos como ambientes independentes e estéreis, projetados para o cultivo intensivo de células e tecidos vegetais, que se beneficiam do fluxo de recirculação de nutrientes líquidos ou líquidos/gasosos, que maximizam a oportunidade de controle e monitoramento das condições ambientais (agitação, aeração, temperatura, oxigênio e gás carbono dissolvidos, pH, etc.). Sob uma perspectiva industrial, Georgiev *et al.* (2014) definem biorreatores como equipamentos tecnológicos, baseados em um sistema de vasos de cultivos e um bloco de automação, que são projetados para o cultivo intensivo regulando vários fatores físicos e/ou nutricionais (luminosidade, nível do meio de cultivo, pH, etc.).

Após o desenvolvimento do primeiro biorreator, muitos tipos foram projetados para o desempenho de atividades gerais ou muito específicas na micropropagação e/ou cultura de tecidos vegetais, como o cultivo de embriões somáticos, de células em suspensão, alongamento de explantes, produção de metabólitos secundários, etc. (Eibl & Eibl 2008; Georgiev & Weber 2014). Apesar dessa diversidade, Georgiev *et al.* (2014) classificam os biorreatores em quatro categorias principais: biorreator de fase líquida, biorreator de fase gasosa, sistemas de imersão temporária e biorreatores híbridos. Segundo Teixeira & Cid (2014), essa classificação diz respeito ao contato do material em cultivo com o meio de cultura. No biorreator de fase líquida o material cultivado permanece continuamente imerso no meio de cultura. No biorreator de fase gasosa, o material em cultivo é posicionado sobre uma tela e o meio de cultura é pulverizado sobre ele, e em seguida é drenado. Já nos sistemas de imersão temporária, o material em cultivo entra em contato com o meio de cultura

apenas por certo intervalo de tempo e após isso o meio é drenado e o material em cultivo deixa de ter contato direto com o meio de cultura.

A despeito das vantagens do uso de biorreatores, o uso de meio líquido geralmente promove a vitrificação ou hiperhidricidade dos tecidos vegetais em cultivo (Mehrotra *et al.* 2007). Com o intuito de evitar o contato permanente dos explantes com o meio de cultivo, ocorreu o desenvolvimento de vários sistemas de imersão temporária (Teixeira & Cid 2014). De acordo com Teisson *et al.* (1999), os sistemas de imersão temporária devem cumprir, dentre outros, os seguintes requisitos:

1. Evitar a imersão contínua, que de forma adversa afeta o crescimento e a morfogênese;
2. Promover a oxigenação adequada;
3. Proporcionar agitação adequada;
4. Limitar os níveis de cisalhamento (força resultante das tensões paralelas à secção transversal de um objeto, que tem a função de causar a deformação de um corpo);
5. Habilitar mudanças sequenciais de meio e automação;
6. Reduzir contaminação;
7. Baixo custo.

Além da redução da vitrificação, Etienne & Berthouly (2002), Paek *et al.* (2005) e Teixeira & Cid (2014) apontam para uma série de vantagens dos sistemas de imersão temporária em relação aos sistemas de fase líquida (imersão contínua) e tradicionais, especialmente em termos de produção:

- Uso de meio líquido, que permite melhorar a nutrição do tecido vegetal, e taxa de crescimento, além de acelerar o crescimento das plantas. Cabe destacar que o cultivo em meio líquido dispensa o uso de ágar, o componente mais caro dos meios de cultura gelificados;
- Renovação adequada do ar no interior do frasco de cultivo;
- Uso de frascos grandes, que possibilitam o maior desenvolvimento e manutenção dos agregados de gemas ou multibrotos, dispensando a divisão antes da transferência para o meio de alongamento/enraizamento, o que reduz significativamente o envolvimento de mão-de-obra;
- Maior uniformidade das mudas no final do processo;
- Menor estresse gasoso e mecânico, com reflexos positivos no crescimento e no vigor das mudas;
- Redução significativa do emprego de mão-de-obra, diminuindo expressivamente os custos de produção;
- Possibilidade de vários graus de automação do sistema, ampliando muito a possibilidade de produção de mudas em escala industrial.

Segundo Georgiev *et al.* (2014), os sistemas de imersão temporária transferem o meio de cultura para o material em cultivo por meio de força pneumática, gravitacional, hidráulica e mecânica, isoladas ou combinadas. Alguns desses sistemas de imersão temporária foram patenteados e já são encontrados no mercado, tendo demonstrado bons resultados na cultura de tecidos vegetais ou micropropagação (Quadro 5), como o Twin Flasks BIT® (Escalona *et al.* 1999), RITA® (Ducos *et al.* 2007; Pérez *et al.* 2013), Plantform bioreactor (Welander *et al.* 2014; 2017), entre outros (De Carlo *et al.* 2021). Segundo Loyola-González *et al.* (2019), os sistemas de imersão temporária mais difundidos são os que usam apenas força pneumática, em especial o do tipo Twin-Flask. De acordo com Georgiev *et al.* (2014), esse sistema possui as seguintes vantagens competitivas: é amplamente acessível, de construção simples, de fácil operação, manutenção das condições estéreis por longos períodos e baixo custo de investimento. As desvantagens desse sistema estão ligadas a uma automação mais complexa, sem possibilidade de realizar ventilação forçada e enriquecimento de CO<sub>2</sub>, menor umidade na câmara de crescimento e sem possibilidade de renovação do meio de cultivo. Segundo Teixeira & Cid (2014) as vantagens superam as desvantagens, em especial na facilidade de operação e significativa redução do custo de mão-de-obra.

O sistema do tipo Twin-Flask consiste em dois frascos de tamanho variando entre 250 mL a 10 L (Etienne & Berthouly 2002), um contendo meio de cultura líquido e o outro o material de cultivo, os quais estão conectados por meio de uma mangueira (Georgiev *et al.* 2014). A transferência do meio de cultura do frasco de armazenamento para o frasco de cultivo se dá da seguinte forma: por meio de um compressor é exercida pressão no frasco que contém o meio, que é forçado a passar para o recipiente que contém o material em cultivo, submergindo-o. Após o tempo de imersão estabelecido, pressão é exercida no frasco que contém o material e o líquido é drenado para seu recipiente original (Figura 9).

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolveu um sistema de imersão temporária do tipo Twin-Flask (Teixeira 2002). Esse sistema é bastante versátil e possui baixo custo de construção (Teixeira & Cid 2014), e por isso vem sendo empregado na produção de várias plantas como café (Teixeira 2001), abacaxi (Silva *et al.* 2007), orquídeas (Scheidt *et al.* 2009b; Moreira *et al.* 2013), eucalipto (Mendonça *et al.* 2016), abacaxi ornamental (Reis *et al.* 2018), e amora-preta (Ayub *et al.* 2019), com obtenção de bons resultados.

Até o momento não há estudos para o gênero *Cyrtopodium* que tenham sido realizados em qualquer tipo de biorreator.

**Quadro 5.** Trabalhos de micropropagação ou cultura de tecidos realizados em Biorreatores de imersão temporária. Adaptado de Watt (2012) e De Carlo *et al.* (2021). \*Orchidaceae.

<b>Espécie</b>	<b>Sistema</b>	<b>Trabalho</b>
<i>Musa sp.</i>	Twin-Flask	Lemos <i>et al.</i> 2001
<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd.) Müll. Arg.	RITA®	Martre <i>et al.</i> 2001
<i>Crescentia cujete</i> L.	RITA	Murch <i>et al.</i> 2004
<i>Anthurium andreanum</i> Linden	RITA®	Ruffoni & Savona 2005
<i>Heliconia champneiana</i> Griggs	RITA® similar	Rodrigues <i>et al.</i> 2006
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Twin-Flask	Quiala <i>et al.</i> 2006
<i>Musa sp.</i>	Twin-Flask	Aragón <i>et al.</i> 2009
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	RITA®	Scheidt <i>et al.</i> 2009a
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	RITA®	Oliveira <i>et al.</i> 2011
<i>Saccharum officinarum</i> L.	Twin-Flask	Maluta <i>et al.</i> 2013
<i>Quercus suber</i> L.	RITA®	Pérez <i>et al.</i> 2013
* <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews	RITA®	Ramos-Castellá <i>et al.</i> 2014
<i>Bambusa vulgaris</i> Schrad ex Wendl.	Twin-Flask	Ribeiro <i>et al.</i> 2016
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	RITA®	Quiala <i>et al.</i> 2016
* <i>V. planifolia</i>	Twin-Flask	Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu 2016
<i>Rhododendron tomentosum</i> Harmaja	RITA®	Jesionek <i>et al.</i> 2017
* <i>V. planifolia</i>	RITA®	Spinoso-Castillo <i>et al.</i> 2017
<i>Olea europaea</i> L.	Plantform	Benelli & De Carlo 2018
<i>Bambusa vulgaris</i> Schrad ex Wendl.	Twin-Flask	García-Ramírez <i>et al.</i> 2019
<i>Capparis spinosa</i> L.	Plantform	Gianguzzi <i>et al.</i> 2019
* <i>Cattleya forbesii</i> Lindl.	RITA®	Ekmekçigil <i>et al.</i> 2019
* <i>Epipactis flava</i> Seidenf.	Twin-Flask	Kunakhonnuruk <i>et al.</i> 2019
* <i>Guarianthe skinneri</i> (Bateman) Dressler & W.E. Higging	Twin-Flask	Leyva-Ovalle <i>et al.</i> (2020)
<i>Phoenix dactylifera</i> L.	Plantform	Abahmane 2020
<i>Curcuma longa</i> L.	Twin-Flask	Marchant <i>et al.</i> 2021
* <i>V. planifolia</i>	SETIS™	Ramírez-Mosqueda & Bello-Bello 2021
<i>Colocasia esculenta</i> L. Schott	SETIS™	Mancilla-Alvarez <i>et al.</i> 2021

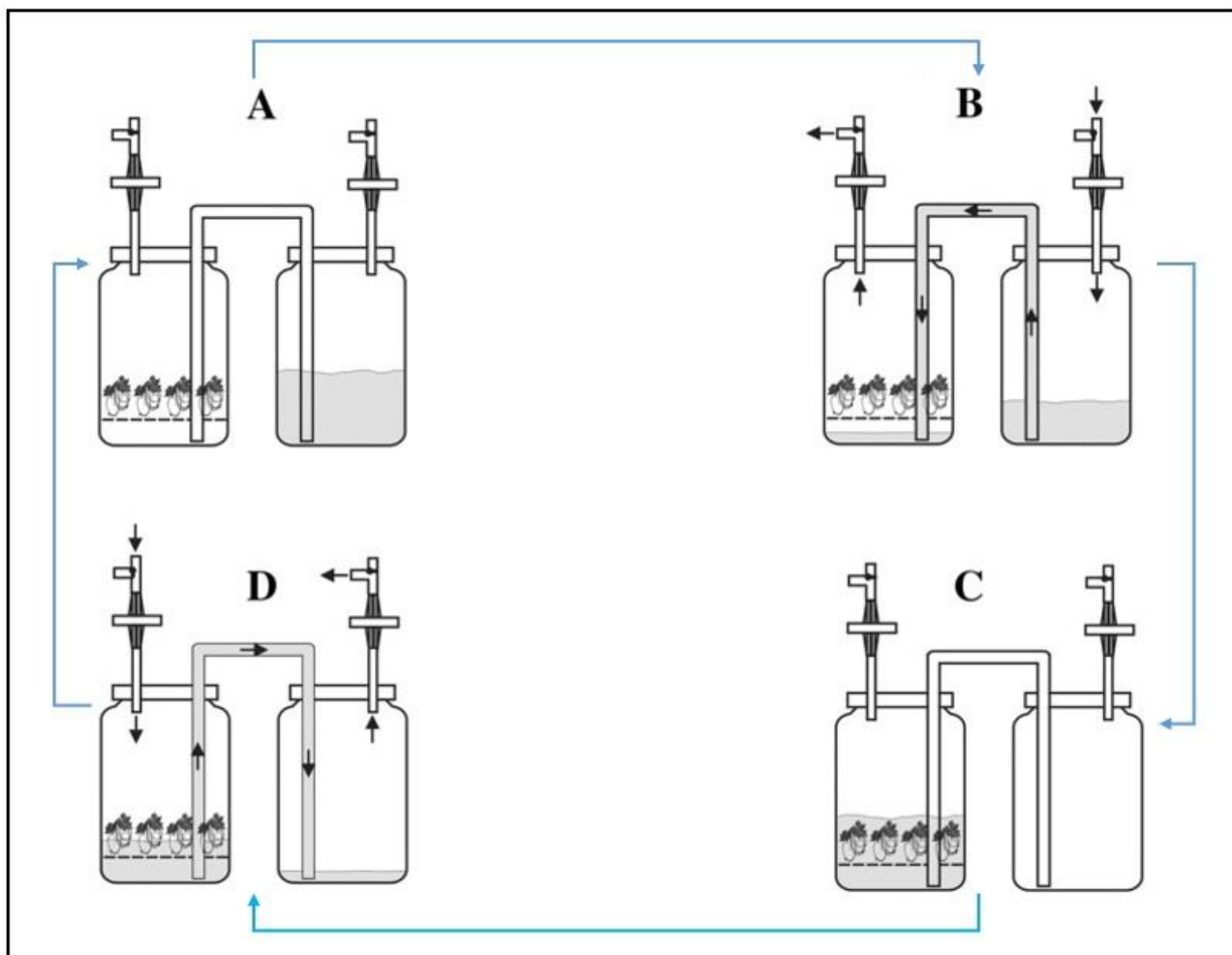
## 2.7. Automação de Biorreatores

Segundo (Georgiev *et al.* 2014), um biorreator consiste de um sistema de cultivo em vaso e um bloco de controle automatizado. Este bloco de controle é um sistema computadorizado, completa ou parcialmente automatizado, designado para monitorar as condições de cultivo. O tipo de controlador do biorreator vai depender da complexidade do sistema a ser automatizado. Se a operação de todas as linhas de cultivo for simultânea, um temporizador residencial pode ser usado (Georgiev



*et al.* 2014). Mas se a operação das linhas de cultivo não for simultânea, controladores mais complexos devem ser empregados no controle, como um microcontrolador Arduino® (Zanlorensi 2016) ou controlador lógico programável (Loyola-González *et al.* 2019).

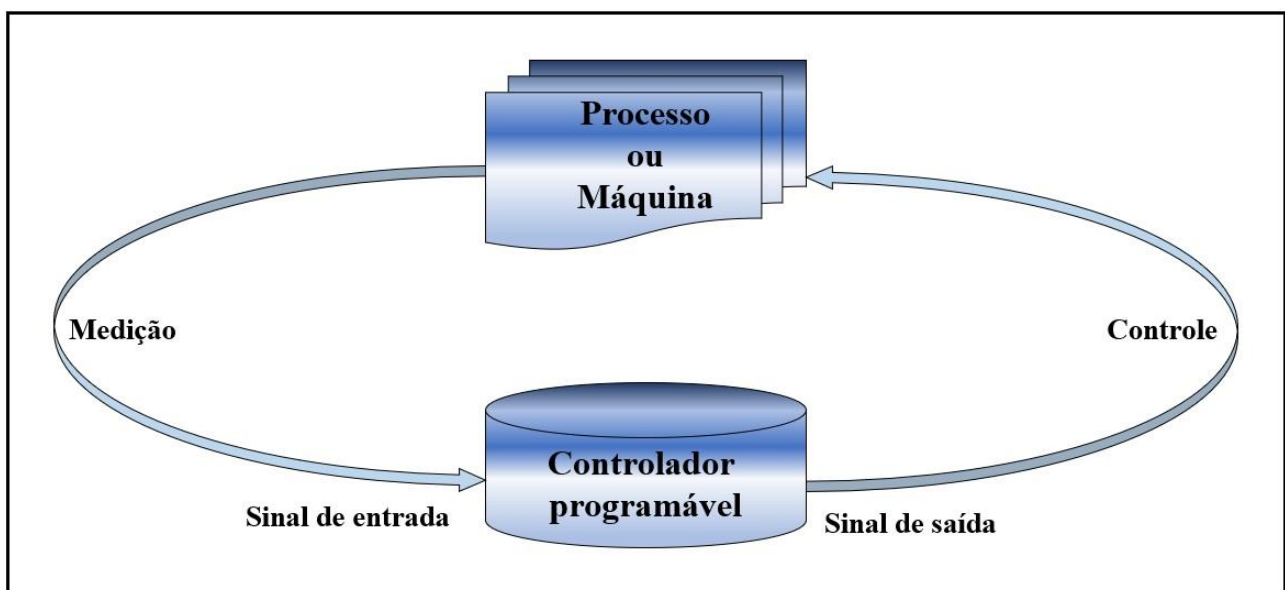
Controladores Lógicos Programáveis (CLP) foram introduzidos na década de 1970, inicialmente como sistemas de controle de relés, e após isso passaram por processos de modernização, sendo atualmente aplicados no controle de processos de pequena complexidade ou até mesmo em grandes linhas de produção em plantas industriais (Milik & Hryniewicz 2012).



**Figura 9.** Funcionamento de um biorreator do tipo Twin-Flask. A. O meio de cultura encontra-se completamente armazenado em seu reservatório (frasco da direita). B. Iniciada a pressurização do frasco de armazenamento, o meio é transferido para o reservatório de cultivo (frasco da esquerda). C. O período de imersão se inicia com a transferência completa do meio para o recipiente de cultivo. D. Finalizado o período de imersão, o frasco de cultivo é pressurizado e o meio é drenado para o reservatório do meio de cultura, finalizando o ciclo. Adaptado de (Georgiev *et al.* 2014).

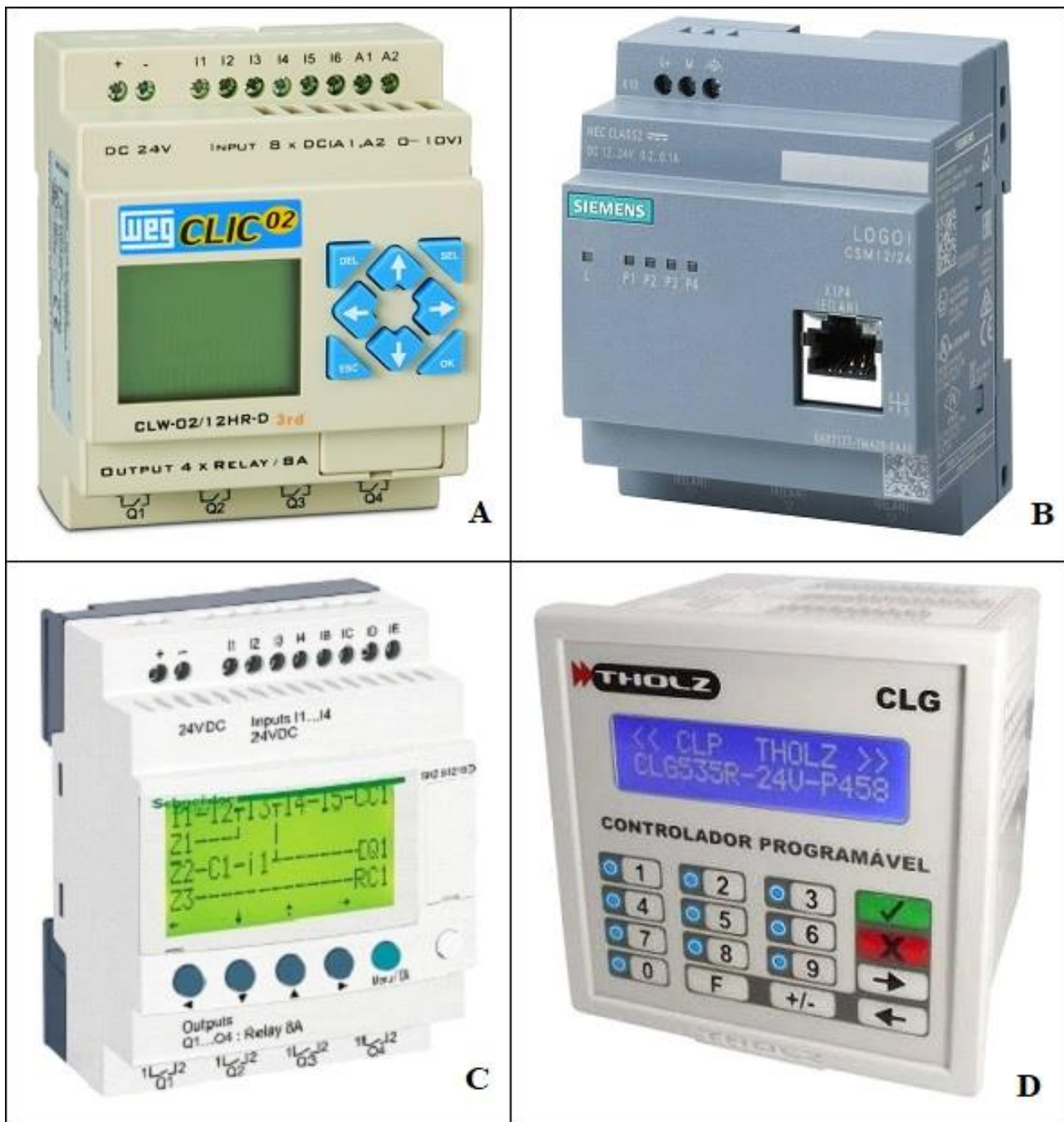
Uma outra opção que pode ser usada como o bloco de automação de biorreatores é o microcontrolador Arduino® (Arduino 2022), ou simplesmente Arduino (Zanlorensi 2016). Este dispositivo foi desenvolvido em 2005, e consiste de uma plataforma de fonte aberta (*open source*)

que pode ser facilmente apagada e reprogramada para o desenvolvimento de projetos de interatividade (Louis 2016). Este equipamento é composto de uma placa de circuito impresso onde estão incorporados um microprocessador, entradas de alimentação de dados e de energia, pinos digitais e/ou analógicos de entrada para recebimento de informações de outros dispositivos e pinos digitais e/ou analógicos de saída para controle de outros equipamentos (Nowrot & Solecka 2018). A linguagem de programação do Arduino é baseada em C/C++ (McRoberts 2011). De acordo com Louis (2016), o Arduino é capaz de agir como um minicomputador, exatamente como outros controladores, um CLP por exemplo, recebendo sinais de entrada, interpretando-os e controlando os sinais de saída para uma variedade de dispositivos eletrônicos: relés, motores, contadores, entre outros, (Figura 10).

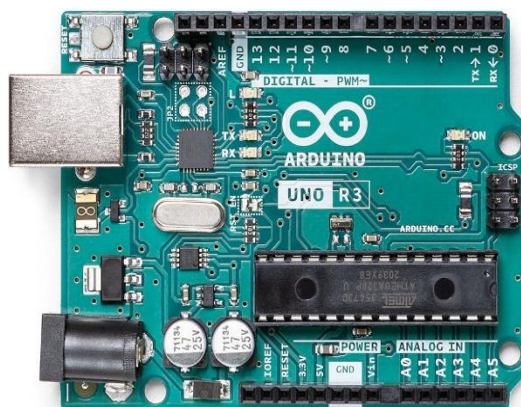


**Figura 10.** Diagrama conceitual de aplicação de controladores. Adaptado de Byan & Bryan (1997).

Esses controladores se diferenciam, principalmente, na aplicação e no preço. CLPs são usados, principalmente, em processos industriais, como no controle de máquinas em linhas de montagem ou em processos de contagem (Bedi *et al.* 2015). O Arduino ainda é pouco empregado em processos industriais (Kaswan *et al.* 2020), tendo suas principais aplicações em projetos educacionais (Guzmán-Fernández *et al.* 2021, Lopez-Rodriguez & Cuesta 2021), e acadêmicos (Devarakonda, *et al.* 2016; Aguiar *et al.* 2020). Em relação ao preço, os CLP disponíveis no mercado nacional custam aproximadamente USD 230,00 (Figura 11), enquanto que um Arduino custa USD 23,00 (Figura 12), tornado o Arduino bem mais acessível que os CLP.



**Figura 11.** Alguns modelos de CLPs disponíveis no Brasil. **A.** WEG (<https://www.weg.net/institucional/BR/pt/>). **B.** SIEMENS (<https://www.new.siemens.com>). **C.** Schneider (<https://www.se.com>). **D.** Tholz (<http://tholz.com.br>). Obs.: CLPs próximos do tamanho real.



**Figura 12.** Microcontrolador Arduino® Uno em escala real (6,86 x 5,34 cm). Extraído de Arduino (2022).

## 2.8. Aclimatização de plantas obtidas a partir do cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* pode ser resumido em seis fases: 1) estabelecimento do explante; 2) indução de multibrotação; 3) individualização dos brotos; 4) crescimento dos brotos; 5) alongamento e 6) enraizamento (Arditti 2008; Faria *et al.* 2012; Arellano-García *et al.* 2020). Em orquídeas os explantes podem ser obtidos a partir de ápices caulinares de brotações novas, segmentos de folhas e de raízes, gemas laterais, meristemas e gemas florais (Costa *et al.* 2013), ou ainda, de protocormos obtidos da germinação assimbiótica de sementes *in vitro* (Mathews & Rao 1985; Mohanty *et al.* 2012; Rittirat *et al.* 2018). Após as plântulas cultivadas *in vitro* atingirem tamanho desejável e possuírem partes aérea e radicular vigorosas, elas são transferidas para o cultivo *ex vitro*, geralmente em estufas ou casas de vegetação (Faria *et al.* 2010; 2012; Breda & Ferraz 2011; Juras *et al.* 2019). Esta etapa é denominada aclimatização, e pode ser definida como processo de adaptação pelo qual as plântulas micropropagadas passam de uma condição heterotrófica para uma condição autotrófica, se adaptando às condições de maior intensidade luminosa, baixa umidade, regulando seus processos respiratórios, transpiratórios e fotossintéticos (Irsyadi 2021). Segundo Hazarika (2003), esta etapa é bastante crítica dentro do processo de micropropagação, pois plantas cultivadas *in vitro* estão em condição de alta umidade, e em razão disso apresentam folhas com baixa deposição de cera, estômatos anômalos e descontinuidade na cutícula. Nesse sentido, até que as mesmas sejam capazes de superar essas limitações e possam regular, adequadamente, a transpiração e a foto respiração, há elevada mortalidade de plântulas nesse processo. De acordo com Chandra *et al.* (2010), a mortalidade de plântulas durante o processo de aclimatização está relacionada a estresses abióticos (temperatura, luminosidade, umidade, tipo de substrato e adubação empregados) e bióticos (patógenos no substrato).

Plantas cultivadas *in vitro* experimentam no laboratório uma condição de luminosidade entre 1.200–3.000 lux e temperatura de  $25 \pm 2$  °C, e ao passarem para a aclimatização, em estufas ou casas de vegetação, estarão expostas a uma luminosidade de 4.000–12.000 lux e temperaturas de 26–36 °C, o que pode levar a carbonização das folhas e murchamento das plântulas (Chandra *et al.* 2010). Isso acontece porque plântulas cultivadas *in vitro* possuem estômatos e cutícula com algum tipo de deficiência, e por isso, algumas práticas são aplicadas aos meios de cultivos ou após a retirada das plantas dos frascos (Hazarika 2003). O método mais empregado para superar essa adversidade é gradativamente aumentar a luminosidade e diminuir a umidade atmosférica (Faria *et al.* 2010; 2012). Há também outras técnicas que podem ser empregadas durante o alongamento *in vitro* ou na fase de aclimatização.

Na fase de alongamento podem ser usadas as seguintes técnicas: 1) preparação dos meios de cultivo com concentração menor de sacarose, uma vez que concentrações maiores de sacarose diminuem os teores de clorofila das plantas, e conseqüentemente diminuem suas taxas fotossintéticas (Dignart *et al.* 2009); ou 2) adição de paclobutrasol, pois essa substância promove nas plântulas o espessamento das raízes, o encurtamento do caule, redução da abertura estomática, aumento na cera epicuticular e aumento na concentração de clorofila fazendo com que ocorra a redução do percentual de murchamento de plântulas durante a fase de aclimatização (Chandra *et al.* 2010). Na fase de aclimatização, com as plântulas já envasadas e transferidas para casa de vegetação, pode ser aplicado algum antitranspirante, a fim de diminuir a perda de água e a conseqüente murcha, dos quais os mais conhecidos são o ácido abscísico (ABA), o acetato-fenilmercúrico (Hazarika 2003) e o quitosan (Pitoyo *et al.* 2015).

Outro aspecto importante é a adubação, pois ela fornece os minerais necessários para o crescimento das plântulas e aumento da resistência a pragas e doenças (Rodrigues *et al.* 2010). Esta pode ser feita com diversas formulações de adubos N-P-K (Moraes *et al.* 2002; Dutra *et al.* 2009) por meio de adubação foliar, associada ou não a adubos de liberação lenta (Figueiredo & Kolb 2013; Febriani *et al.* 2019), aplicação sobre o substrato de adubos orgânicos ou do tipo N-P-K, sozinhos ou combinados (Rodrigues *et al.* 2010), aplicação da própria solução nutritiva usada na fase de micropropagação sem adição de sacarose (Chandra *et al.* 2010).

Há ainda dois fatores relacionados à aclimatização que devem ser observados: o tipo de substrato e o desenvolvimento de pragas e doenças no cultivo. De acordo com Vence (2008), um substrato para plantas pode ser definido como todo material poroso, usado só ou combinado com outros, que, colocado em um recipiente proporciona ancoragem e níveis adequados de água e oxigênio para o desenvolvimento das plantas que nele crescem. Segundo Takane *et al.* (2013), os substratos podem usar matérias-primas de origem orgânica (casca de pinus, casca de arroz, fibra de

côco, etc.), mineral (vermiculita, areia, argila expandida, solo mineral, entre outros) ou sintética (isopor triturado, espuma fenólica e outras espumas).

Os substratos para plantas devem ainda ter as seguintes características adequadas para o desenvolvimento das plantas/plântulas: 1) físicas: granulometria e densidade próprias para a cultura, boa capacidade de retenção de água, porosidade e espaço de aeração que permita a oxigenação das raízes e durabilidade (Takane *et al.* 2013; Zorzeto *et al.* 2014); 2) químicas: baixa salinidade, pH dentro da faixa de crescimento da planta e capacidade de troca de cátions (Schmitz *et al.* 2002; Silber & Bar-Tal 2008); e 3) biológicas: tanto quanto possível, os substratos devem estar isentos de patógenos causadores de doenças (Takane *et al.* 2013), já que plantas recém transplantadas são muito suscetíveis aos danos causados por esses organismos (Chandra *et al.* 2010), além de possuírem a capacidade de permitir o desenvolvimento de organismos benéficos como fungos micorrízicos arbusculares (Klein 2015), uma vez que esses fungos aumentam a atividade fotossintética e a resistência a doenças das plântulas transplantadas (Berruti *et al.* 2016). O desenvolvimento desses fungos no substrato pode ocorrer por meio da colonização natural ou pela aplicação de inóculos comerciais (Kokkoris & Hart 2019).

### 3. JUSTIFICATIVA

A propagação *in vitro* de espécies é uma forma de preservar a flora nativa pela conservação *ex situ*, pois permite que plantas obtidas por essa técnica sejam preservadas em coleções públicas e privadas, evitando a retirada de plantas de seus habitats (Seaton 2007; Seaton *et al.* 2013). Esta técnica também é empregada na produção de mudas de plantas ornamentais, possibilitando que propriedades rurais participem do mercado de plantas ornamentais, tendo sido observado o aumento da participação da agricultura familiar nesse nicho de mercado (Duval 2014). Entre as diversas mudas de plantas ornamentais produzidas *in vitro*, as orquídeas são umas das que apresentam maior rentabilidade, com receita líquida em torno de 52%, e esse percentual só não é maior devido ao custo elevado da mão-de-obra empregada na produção (Stancato *et al.* 2001). A redução desse custo pode ser alcançada com o emprego de protocolos mais eficientes, o que possibilitaria aos produtores, inclusive, entrar no mercado de exportação de plantas ornamentais (Cardoso 2013).

Uma solução para reduzir o custo de mudas micropropagadas é o emprego da biorreator no cultivo *in vitro*. De acordo com Teixeira & Cid (2014), essa técnica pode reduzir significativamente o custo de produção, por aumentar a produtividade e reduzir o emprego de mão-de-obra no processo, especialmente na agricultura familiar, que possui menos recursos financeiros para contratar funcionários. Outro aspecto a ressaltar é que plantas de *Cyrtopodium*, se caracterizam por apresentar

baixa demanda hídrica, e por isso, podem ser empregadas em jardins. Essa característica é muito importante, diante da necessidade de redução do consumo de água pela população em razão da diminuição das chuvas nas regiões Sudeste e Centro-oeste nos últimos anos (Bizari & Cardoso 2016; Cantelle *et al.* 2018; Castro 2022), e que se agravou no Distrito Federal a partir de 2016 (Distrito Federal 2016; Passos *et al.* 2020).

#### **4. HIPÓTESES**

1. A sinergia entre auxinas e citocininas é fundamental para a etapa de multibrotação na micropropagação;
2. A cultura *in vitro* com emprego de biorreator é capaz de produzir um maior número de mudas de *Cyrtopodium* do que o sistema de micropropagação em meio gelificado;
3. Plantas obtidas em biorreator apresentam maior sobrevivência durante a aclimatização do que aquelas obtidas em meio gelificado.
4. As espécies estudadas podem ser aclimatizadas empregando-se apenas vermiculita como substrato.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivos gerais**

1. Desenvolver protocolos adequados para as diversas etapas de micropropagação de três espécies de *Cyrtopodium* nativas do Cerrado com potencial ornamental;
2. Realizar o alongamento de plântulas de *Cyrtopodium* micropropagadas utilizando dois métodos diferentes: meio gelificado e meio líquido em biorreator de imersão temporária;
3. Aclimatizar plantas de *Cyrtopodium* micropropagadas empregando vermiculita;
4. Obter mudas aclimatizadas de espécies de *Cyrtopodium*.

##### **5.2 Objetivos específicos**

1. Estimar a viabilidade das sementes por meio do teste de tetrazólio.
2. Quantificar a germinação das sementes em três diferentes meios de culturas: Knudson C, MS na concentração padrão e com metade dos nutrientes (1/2 MS), e a influência de carvão ativado adicionado aos meios de cultura;

3. Verificar a influência da auxina ANA (ácido alfa-naftaleno acético) e a citocinina BAP (6-benzilaminopurina) na indução de multibrotação em protocormos, bem como a sinergia desses reguladores de crescimento;
4. Construir um Biorreator de imersão temporária totalmente automatizado com três linhas de cultivo independentes;
5. Comparar o alongamento *in vitro* de plântulas de espécies *Cyrtopodium* em dois sistemas de micropropagação: meio gelificado e meio líquido em biorreator de imersão temporária;
6. Quantificar os teores de clorofilas em folhas de plântulas alongadas nos dois sistemas de alongamento;
7. Verificar a densidade estomática em epidermes de folhas de plantas das duas espécies em três condições de cultivo: i. condições de campo; ii. ao final da fase de alongamento; iii. ao final da aclimatização.
8. Calcular a sobrevivência de mudas obtidas *in vitro* e aclimatizadas em casa de vegetação usando vermiculita como substrato.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Espécies estudadas

Foram estudadas três espécies de *Cyrtopodium* em razão de suas características ornamentais<sup>1</sup>, em especial a altura das inflorescências (Hunhof *et al.* 2016). As espécies escolhidas foram: *C. parviflorum* Lindl., *C. virescens* Rchb. F. & Warm. e *C. withneri* L.C. Menezes (Figura 13, Tabela 3). Essas espécies não apresentam o *status* de ameaçadas, de acordo com os critérios da IUCN (2012) e da “Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção” (BRASIL 2014).

### 6.2. Coleta do material vegetal e manutenção das plantas

As coletas de plantas e/ou cápsulas foram realizadas em excursões aos locais de ocorrência das espécies estudadas no Distrito Federal e Goiás. Os locais de ocorrência foram obtidos por meio de

---

<sup>1</sup> Originalmente o projeto propunha o estudo de quatro espécies de *Cyrtopodium*. Porém, as plantas de *Cyrtopodium braemii* L.C. Menezes que estavam sendo mantidas em cultivo na CENARGEN/EMBRAPA tiveram as cápsulas arrancadas durante a manutenção da casa de vegetação. Assim, durante a defesa do Projeto de pesquisa, a banca argumentou que não seria interessante aguardar mais seis meses para realizar nova polinização das flores e mais um ano para a coleta das cápsulas com sementes. Assim, a retirada dessa espécie deixaria o tempo gasto com sua propagação disponível para outros estudos interdisciplinares, e que isto agregaria mais conhecimento ao projeto.



fotos de coleções disponíveis no Specieslink (CRIA 2017), e análise dos seguintes herbários: UB, CEN, HEPH e IBGE, acrônimos de acordo com Thiers (continuously updated).



**Figura 13.** Flores das espécies de *Cyrtopodium* selecionadas para o presente estudo. **A.** *C. parviflorum*. **B.** *C. virescens*. **C.** *C. withneri*. Crédito das fotos: A. Aldo Luciano. B, C. J.H. Lima.

**Tabela 3.** Informações sobre endemismo, ameaça, distribuição e características morfológicas das espécies selecionadas para o estudo, segundo Menezes (2000), Romero-González *et al.* (2008), Luz & Oliveira (2012), IUCN (2012) e Flora e Funga do Brasil (2022).

Espécie	<i>C. parviflorum</i>	<i>C. virescens</i>	<i>C. withneri</i>
Altura total da planta (cm)	30-50	50-70	60-90
Tipo da inflorescência	simples ou pouco ramificada	ramificada	ramificada
Altura da inflorescência (cm)	100	80-90	100-110
Diâmetro das flores (cm)	2,2-2,5	3,2	3,2
Coloração das flores	fundo amarelo com máculas castanho-vináceas	amarelo-esverdeadas com máculas castanho-vináceas	amarelo-esverdeadas
Época de floração	agosto-outubro	outubro-novembro	agosto
Habitat	campos de solo hidromórfico	campos secos ou em solo sobre rochas	fendas de rochas em matas mesofíticas
Posição dos bulbos	acima do solo	acima do solo ou semi-enterrados	acima do solo
Distribuição no Brasil	RR, AM, PA, TO, BA, SE, MT, GO, DF, MG, SP, PR	PA, MA, TO, MT, MS, GO, DF, MG	GO, DF, MG
Endêmica do Brasil	não	não	sim
Critério IUCN	Pouco preocupante	Não avaliado	Não avaliado

Quando as plantas não portavam cápsulas, indivíduos foram coletados e mantidos em cultivo até sua floração na casa de vegetação do Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD/UnB), em vasos com solo/substrato do local de coleta,

conforme indicação de Caramaschi (2001), com o propósito de manter as plantas em condições de cultivo o mais próximo possível do ambiente natural. O mapa de localização das coletas realizadas foi confeccionado com o *software* QGis 2.18.0.

A licença para coleta foi concedida pelo SISBIO/ICMBio, em 20/10/2017, sob o nº 60494-4.

### **6.3. Obtenção das sementes**

Nesta etapa foram usadas cápsulas com aproximadamente nove meses de desenvolvimento, as quais foram consideradas maduras, conforme estudo de Picolotto (2013). As cápsulas maduras, resultantes de polinização natural no campo ou por polinização cruzada entre plantas mantidas em casa de vegetação, foram coletadas e levadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos do CRAD, onde foram realizadas todas as etapas desta pesquisa. As cápsulas foram lavadas em água corrente, e em seguida desinfestadas por imersão em solução de etanol 70% (v/v), por dois minutos, lavagem em água destilada, imersão em solução de NaOCl (2-2,5% de cloro ativo) por 15 minutos, seguida por tripla lavagem com água destilada; e então postas para secar à temperatura ambiente (Surenciski *et al.* 2012; Picolotto 2013; Rodrigues *et al.* 2015). Depois de secas, as cápsulas foram colocadas em sacos de papel e mantidas à temperatura ambiente até sua deiscência (Hosomi *et al.* 2012; Hosomi *et al.* 2017). As sementes foram secas em um dessecador com solução saturada de cloreto de cálcio, por sete dias, até que atingissem um conteúdo de umidade entre 4 e 6%, conforme preconizado pelo OSSSU - ORCHID SEED STORES FOR SUSTAINABLE USE (Seaton & Pritchard 2001). O armazenamento seguiu a metodologia de Hosomi *et al.* (2017) e Seaton *et al.* (2018), que estabelece o acondicionamento das sementes em microtubos, que devem ser colocados em recipiente contendo sílica gel e armazenados em freezer com temperatura entre -18 e -20°C.

### **6.4. Avaliação da viabilidade das sementes**

Nesta etapa foi avaliada a viabilidade das sementes de *C. parviflorum*, *C. virescens* e *C. withneri* armazenadas sob as condições relatadas acima por meio do teste do cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC ou tetrazólio). Foram usadas sementes armazenadas por um período de seis meses, as quais foram submetidas a cinco tratamentos com duas repetições para cada tratamento (Quadro 6). Para cada tratamento foram utilizados 20 mg sementes. As sementes foram pré-condicionadas por 24 h em temperatura ambiente em 1,5 mL de água destilada ou de solução de sacarose a 10% em microtubos de 2 mL (Hosomi *et al.* 2012). Transcorrido esse período, as soluções usadas nos pré-

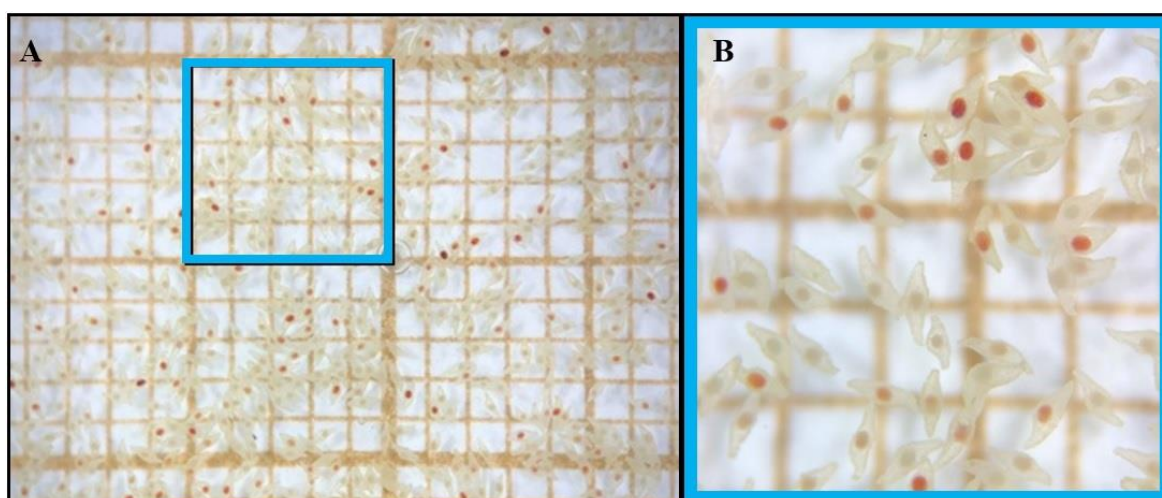
condicionamentos foram descartadas e substituídas por 1,5 mL de dois tipos de solução de TTC a 1%: diluído em água destilada ou em tampão de fosfato, e então incubadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz (Soares *et al.* 2014) por 24 h (Hosomi *et al.* 2017). Nesta etapa ainda foi realizado o tratamento de coloração direta em TTC a 1% diluído em água destilada (T5), ou seja, sem pré-condicionamento. A solução de tampão de fosfato foi preparada de acordo com Souza (1994). Passadas essas 24 h, foi realizada a contagem das sementes coradas.

**Quadro 6.** Tratamentos realizados para avaliação da viabilidade de sementes de três espécies de *Cyrtopodium* por meio do teste do Tetrazólio.

Solução de pré-condicionamento	Solução de Tetrazólio a 1%	Tratamento
Água destilada	Tampão fosfato	T1
	Água destilada	T2
Sacarose a 10%	Tampão fosfato	T3
	Água destilada	T4
-	Água destilada	T5

A contagem das sementes coradas foi feita em lâminas de vidro, observadas e fotografadas em estereomicroscópio Leica EZ4HD. Para cada tratamento foram montadas duas lâminas. A montagem das lâminas foi adaptada de Dutra *et al.* (2009), e consistiu em colocar 165  $\mu$ L de água destilada sobre a lâmina e adicionar cerca de 30  $\mu$ L de sementes que se encontravam na solução de TTC, e, então, cobrir com lamínula.

Ao fundo de cada lâmina foi colocado papel milimetrado e quatro campos de 5 x 5 mm foram demarcados aleatoriamente com o emprego da função “ALEATÓRIOENTRE” do software Microsoft Excel® para a contagem das sementes coradas (Figura 14). Sementes congeladas foram fotografadas com microscópio Leica DM750 e câmera Leica MC170 HD.



**Figura 14.** Lâmina montada para contagem de sementes viáveis com malha de 5 x 5 mm evidenciada. **A.** Aumento de 8x. **B.** Aumento de 20x. Crédito das fotos: J.H. Lima.

## 6.5. Germinação assimbiótica

A germinação assimbiótica<sup>2</sup> foi realizada com sementes armazenadas por seis meses nas condições de armazenamento já descritas. A semadura foi realizada em placas de Petri (90 x 15 mm) para avaliar a germinação, e em frascos de policarbonato de 250 mL (70 x 80 mm) para obtenção de protocormos para a próxima etapa. Foram testados três tipos de meios de cultura Knudson C (Knudson 1946), MS (Murashige & Skoog 1962) na concentração padrão e com metade dos nutrientes (½ MS), adicionados de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, na presença e ausência de 3 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e gelificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar (Picolotto 2013; Rodrigues *et al.* 2015). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição de ágar e esterilizados em autoclave (121 °C por 20 minutos). Antes da inoculação as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 0,4% por cinco minutos. O procedimento foi realizado de acordo com Alvarez-Pardo *et al.* (2006), e consistiu em dispor 20 mg de sementes e adicionar 1,5 mL de hipoclorito em microtubos de 2 mL. Após o tempo, o hipoclorito foi descartado e foi feita a tripla lavagem em água destilada. Cada recipiente (placas de Petri e frascos de policarbonato) recebeu 30 mL de meio de cultivo e 20 mg de sementes desinfestadas. As sementes foram espalhadas sobre o meio gelificado com auxílio de alça bacteriológica, também chamada de alça de Kolle (Dutra *et al.* 2009). Após a inoculação os frascos e as placas de Petri foram vedados com filme PVC e incubadas em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 h, densidade de fluxo de fótons 30 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ± 2 °C (Costa *et al.* 2013; Rodrigues *et al.* 2015). Para cada tratamento foi feita a semadura em seis frascos e três placas de Petri.

## 6.6. Avaliação da germinação das sementes

A avaliação da germinação de cada tratamento foi realizada após 90 dias da semadura. Para a contagem das sementes germinadas também se adotou a metodologia adaptada a partir de Dutra *et al.* (2009) e Hosomi *et al.* (2017). Dessa forma, foram demarcados 16 campos a partir do centro de cada placa. Cada campo consistiu de um quadrado de 1 x 1 cm. Foram contadas as sementes germinadas e não germinadas em cinco campos distintos e calculada a porcentagem de sementes germinadas. Os campos foram aleatoriamente sorteados com o emprego da função

---

<sup>2</sup> Em razão de vários incêndios ocorridos nos locais de ocorrência de *C. virescens*, somado ao fechamento das Unidades de conservação durante a pandemia da COVID-19, não foi possível coletar material suficiente dessa espécie para a realização das demais etapas do projeto. Assim, a germinação assimbiótica e as demais etapas do trabalho foram realizadas apenas com *C. parviflorum* e *C. withneri*.

“ALEATÓRIOENTRE” do software Microsoft Excel®. Foram consideradas germinadas as sementes com embrião intumescido e clorofilado (Harrison & Arditti 1978; Yamazaki & Miyoshi 2006).

### 6.7. Indução de multibrotações em protocormos

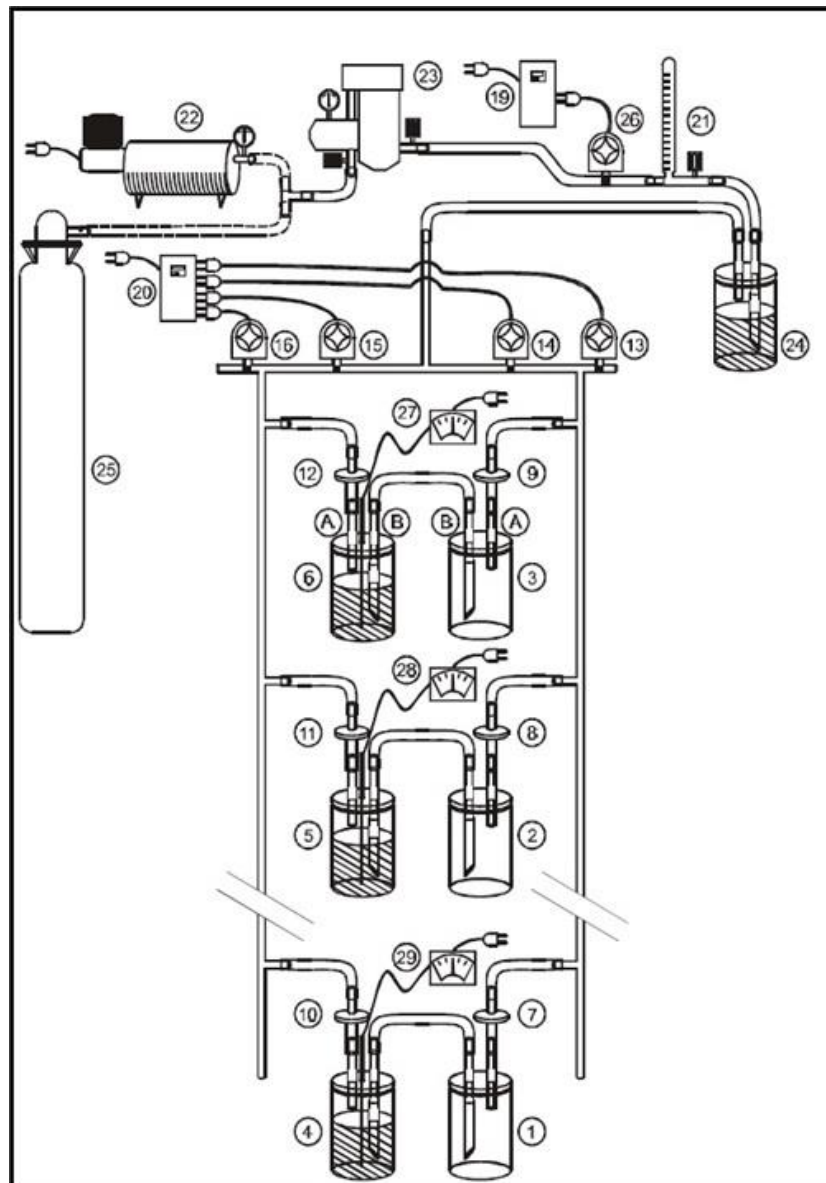
Após 120 dias de semeadura protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundos dos meios com maior germinação, MS e ½ MS, respectivamente, foram transferidos para frascos de policarbonato de 250 mL (70 x 80 mm) contendo 40 mL de meio de cultivo com e sem suplementação de reguladores de crescimento, e selados com filme PVC (Rodrigues *et al.* 2015). O preparo dos meios de cultivo seguiu o mesmo procedimento usado na etapa de germinação assimbiótica e não houve adição de carvão ativado. Os reguladores de crescimentos usados na suplementação dos meios foram 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido alfa-naftaleno acético (ANA) (Tabela 4). O experimento foi inteiramente casualizado, com dez tratamentos e nove repetições com 15 protocormos cada. O cultivo dos protocormos ocorreu nas mesmas condições em que as sementes foram postas para germinar. Após 120 dias de cultivo as plântulas foram avaliadas em relação aos seguintes parâmetros: sobrevivência dos explantes; porcentagem de explantes com Protocorm-like Body (PLB), brotos e raízes; PLB/explante, brotos/PLB e raízes/brotos; altura dos brotos, dimensões do conjunto de brotações, comprimento e diâmetro das raízes (medido na região do terço médio); massa seca e fresca de raízes e parte aérea.

**Tabela 4.** Concentrações, em mg.L<sup>-1</sup> e µmol.L<sup>-1</sup>, dos reguladores de crescimento usados na etapa de indução de multibrotações em *Cyrtopodium* spp. para cada tratamento.

Tratamento	6-benziladenina (BAP)		ácido alfa-naftaleno acético (ANA)	
	[mg.L <sup>-1</sup> ]	[µmol.L <sup>-1</sup> ]	[mg.L <sup>-1</sup> ]	[µmol.L <sup>-1</sup> ]
<b>T1</b>	0	0	0	0
<b>T2</b>	0	0	0,5	2,685
<b>T3</b>	0,5	2,22	0	0
<b>T4</b>	0,5	2,22	0,5	2,685
<b>T5</b>	1	4,44	0	0
<b>T6</b>	1	4,44	0,5	2,685
<b>T7</b>	2	8,88	0	0
<b>T8</b>	2	8,88	0,5	2,685
<b>T9</b>	4	17,76	0	0
<b>T10</b>	4	17,76	0,5	2,685

## 6.8. Construção de um Biorreator de Imersão Temporária

Como sistema alternativo para o alongamento *in vitro* de plântulas obtidas por micropropagação, foi construído o biorreator de imersão temporária (BIT) desenvolvido pela EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Teixeira 2002) (Figura 15). Esse equipamento consiste em dois frascos de 5 L, um contendo meio de cultivo líquido (frasco de meio) e o outro, o material em cultivo (frasco de cultivo).



**Figura 15.** Biorreator de imersão temporária do tipo Twin-Flask desenvolvido pela Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1-3. Frascos de cultivo. 4-6. Frascos de armazenamento de meio). 7-12. Filtro de ar com poros igual ou menor que 0,44 micrômetro. 13-16 e 26. Válvulas solenóides. 24. Frasco de borbulhamento com carvão ativado em suspensão aquosa. 19 e 20. Temporizadores. 21. Fluxômetro. 22 e 25. Fonte de pressão positiva (tanque de ar comprimido ou cilindro de ar artificial). 23. Filtro de ar/óleo. 27-29. Eletrodos para monitoramento do meio. Extraído de Teixeira (2001).

Para que o BIT realizasse a imersão das plântulas em três períodos de tempos distintos, (intervalos de 2, 4 e 8 h), foi necessário construir um sistema de automação para controlar o acionamento dos relés, compressor de ar e das válvulas solenoides (válvulas com um eletroímã que regulam o fluxo de ar que sai do compressor e vai para as linhas de cultivo). Para o controle da automação foi utilizado um microcontrolador Arduino® (Zanlorensi 2016). Um código foi escrito para que o microcontrolador fosse programado para emitir sinais elétricos que acionam os relés. Quando estes relés são acionados, eles deixam passar corrente elétrica (como interruptores de lâmpadas domésticas), e assim, acionam o compressor de ar e as válvulas solenóides no horário estabelecido. Na construção do BIT deste projeto foram empregados relés de estado sólido, válvulas solenóides para processos industriais e compressor de ar isento de óleo, dispensando o uso de filtro de ar/óleo e frasco de borbulhamento com carvão ativo em suspensão aquosa, respectivamente, itens 23 e 24 do projeto de Teixeira (2001).

### **6.9. Alongamento de brotos em meio de cultura gelificado e em biorreator**

Para esta etapa foram usadas plântulas com 120 dias oriundas dos tratamentos de maior sobrevivência da fase de multibrotação. Foram selecionadas plântulas com 2-2,5 cm de altura que tiveram as raízes excisadas. No sistema de alongamento em meio gelificado foram usados frascos de 1 L (125 x 115 mm), e no de imersão temporária frascos de 5 L (323 x 155 mm). O preparo dos meios de cultivo seguiu os procedimentos e parâmetros usados na etapa de germinação. Os meios de cultivos usados foram os mesmos da etapa de germinação, ou seja, MS para *Cyrtopodium parviflorum* e ½ MS para *C. withneri*. Em ambos os sistemas foram usados 40 mL de meio/plântula, sendo que no sistema convencional cada recipiente recebeu oito plântulas e no BIT 10 plântulas (Escalona *et al.* 1999; Silva *et al.* 2016; Reis *et al.* 2018). As condições de cultivo foram as mesmas descritas para a germinação assimbiótica.

O alongamento em meio gelificado foi avaliado na presença e na ausência de carvão ativado. No BIT a imersão dos explantes foi de 3 min, tendo sido avaliados os intervalos entre as imersões de 2, 4 e 8 h sem adição de RC e de 8 h com adição de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (Silva *et al.* 2007; Scheidt *et al.* 2009b; Moreira *et al.* 2013). Para cada tratamento foram feitas 4 repetições.

Após 120 dias foram avaliados o número total de brotações, comprimento dos brotos, número de raízes, comprimento das raízes e o comprimento da maior raiz; massa fresca e seca das raízes e parte aérea (Scheidt *et al.* 2009b; Moreira *et al.* 2013; Esyanti *et al.* 2016).

## 6.10. Quantificação dos teores de clorofilas e carotenóides

Nesta etapa foram utilizadas plântulas de *Cyrtopodium parviflorum* e *C. withneri* oriundas dos diferentes tratamentos de alongamento. Para a determinação dos teores clorofila e carotenoides foram utilizadas a segunda, ou terceira, folha a partir do ápice (Dignart *et al.* 2009). De cada tratamento foram escolhidas três lâminas foliares, das quais foram retirados fragmentos de 6 x 6 mm (Barbieri Junior *et al.* 2010), que foram colocados em microtubos de 2 mL de cor âmbar contendo 1,5 mL de N-N-dimetilformamida (DMF), e mantidos em geladeira por 48 h (Moran & Porath 1980). Após o tempo de extração foram feitas as leituras em espectrofotômetro da Thermo Scientific, modelo Evolution 201, em comprimentos de onda definidos em 663,8, 646,8 e 480 nm. Os teores de clorofila a e b, clorofila total e carotenoides foram calculados por meio das equações de Wellburn (1994) (Quadro 7).

**Quadro 7.** Equações de Wellburn (1994) utilizadas para calcular os teores de clorofila a e b, clorofila total e carotenoides em µg/mL.  $A_{663,8}$ ,  $A_{646,8}$  e  $A_{480}$  correspondem às absorbâncias medidas nos comprimentos de onde de 663,8, 646,8 e 480 nm, respectivamente.

Pigmento	Equação
Clorofila a ( $C_a$ )	$C_a = 12A_{663,8} - 3,11A_{646,8}$
Clorofila b ( $C_b$ )	$C_b = 20,78A_{646,8} - 4,88A_{663,8}$
Clorofila total ( $C_{total}$ )	$C_{total} = C_a + C_b$
Carotenóides ( $C_{car}$ )	$C_{car} = (1000A_{480} - 1,12C_a - 34,07C_b)/245$

## 6.11. Densidade estomática

O estudo da densidade de estômatos foi feito por meio da dissociação da epiderme. Para isso foram analisadas plantas oriundas de condições de campo, da etapa de alongamento e da aclimatização. Foram usadas quatro plantas de cada repetição dos diferentes tratamentos, tendo sido usado para estudo o terço médio da segunda, ou terceira, folha a partir do ápice (Dignart *et al.* 2009). Este material foi fixado em FAA por 72 h e armazenado em etanol 70% (Johansen 1940). A dissociação foi feita com o emprego do protocolo de Franklin (Kraus & Arduim 1997), tendo as amostras colocadas em solução de ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio na proporção de 1:1 e mantidas por 24 h em estufa a 60 °C. Após esse período as amostras foram lavadas cinco vezes em água destilada e coradas com safranina alcoólica (Bukatsch 1972) e montadas entre lâmina e lamínula com solução aquosa de glicerina na proporção de 1:1 (Santos *et al.* 2020). Ao final foi avaliada a densidade de estômatos a partir da adaptação dos trabalhos de Labouriau *et al.* (1961) e Zahara & Win (2019), onde foram contados o número de estômatos em seis campos dos quatro indivíduos selecionados.



As fotomicrografias foram feitas microscópio óptico Olympus modelo BX40F-3 com câmera acoplada Olympus modelo U-TV0.5XC-3.

## 6.12. Aclimatização das plântulas

Após a etapa de alongamento em meio gelificado com e sem adição de carvão ativado, plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri*, uniformes e dentro do comprimento médio, foram transplantadas em células individuais de bandejas de Poliestireno preenchidas com 60 mL de brita tamanho 1 (dreno) e 90 mL de vermiculita para aclimatização. As plantas foram mantidas na casa de vegetação do CRAD, em luminosidade de 50%, com irrigação feita por microaspersores uma vez ao dia, às 07:00 manhã, e adubação semanal (Dutra *et al.* 2009; Rodrigues *et al.* 2015; Picolotto *et al.* 2017). A adubação foi feita com fertilizante Plantafol<sup>®</sup>, na formulação NPK 20-20-20, sendo aplicados 25 mL.célula<sup>-1</sup> de uma solução de 0,25 g.L<sup>-1</sup>, o que equivale a um quarto da dose recomendada pelo fabricante (Rodrigues *et al.* 2010). De cada método de alongamento foram selecionadas 15 plantas para esta etapa de aclimatização.

Após 100 dias foram avaliados a sobrevivência, o número total de brotações, comprimento dos brotos, número de raízes, comprimento das raízes e o comprimento da maior raiz; massa fresca e seca das raízes e parte aérea (Scheidt *et al.* 2009b; Moreira *et al.* 2013; Esyanti *et al.* 2016).

## 6.13. Análise dos dados

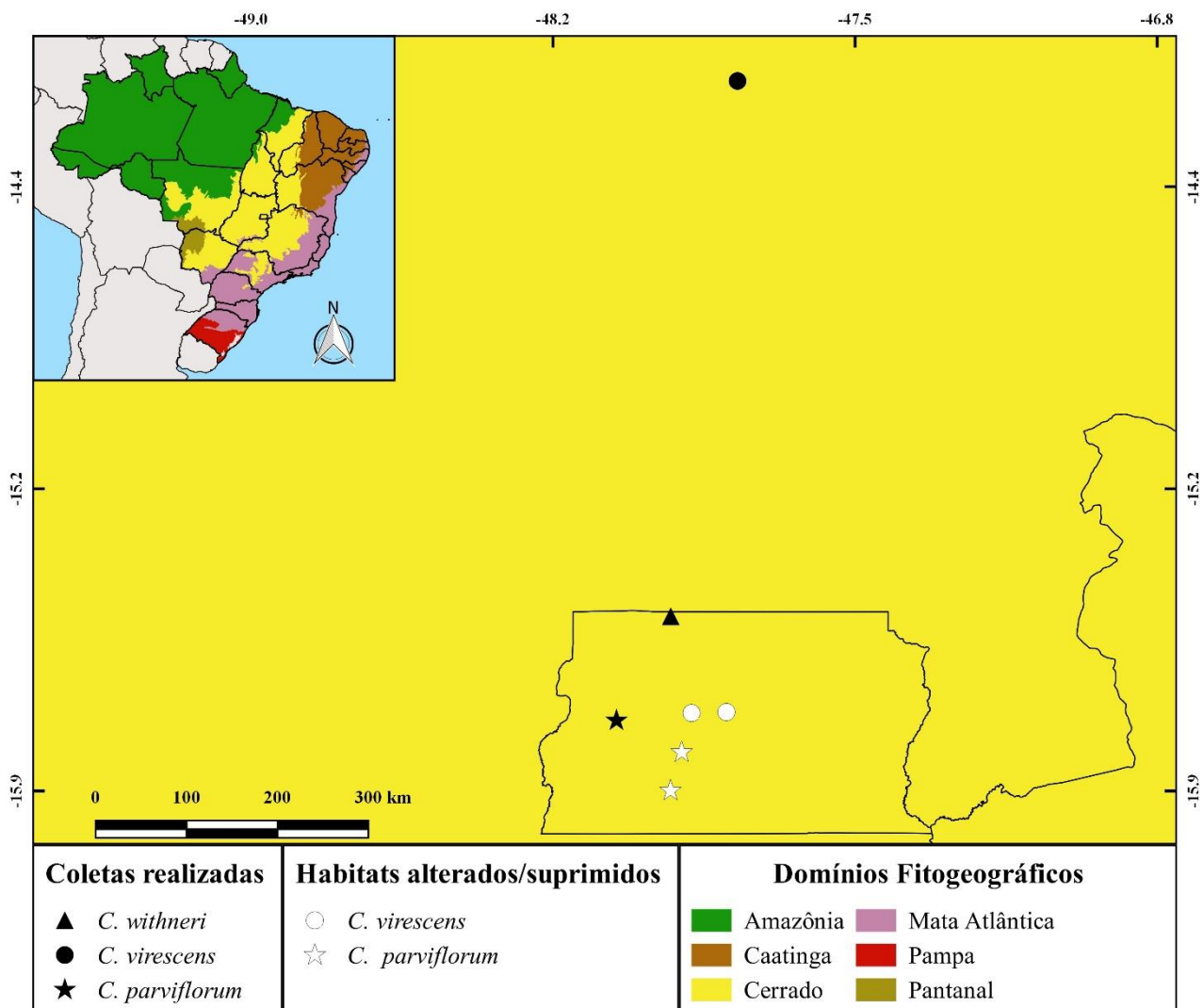
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias entre tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os dados obtidos em porcentagens foram transformados para valores angulares ( $\arcseno\sqrt{x/100}$ ), antes da análise de variância (ANOVA) e o teste das médias. A análise estatística foi executada no *software* SISVAR (Ferreira 2011).

# 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 7.1. Coletas e *status* de ocorrência das espécies estudadas

Das três espécies estudadas, *Cyrtopodium withneri* ocorre no Distrito Federal em áreas de afloramentos calcários na Área de Proteção Ambiental de Cafuringa (Figuras 16 e 17). A espécie foi localizada no local citado por Micheline Carvalho-Silva 239 (CEN). A expedição para coleta ocorreu

em 06/09/17. No local havia apenas duas plantas, das quais, apenas uma estava florida. Foram coletados três pseudobulbos de cada planta para cultivo no CRAD. Em flores da planta fértil foi feita autopolinização em campo, resultando na formação de cápsulas, coletadas nove meses depois.



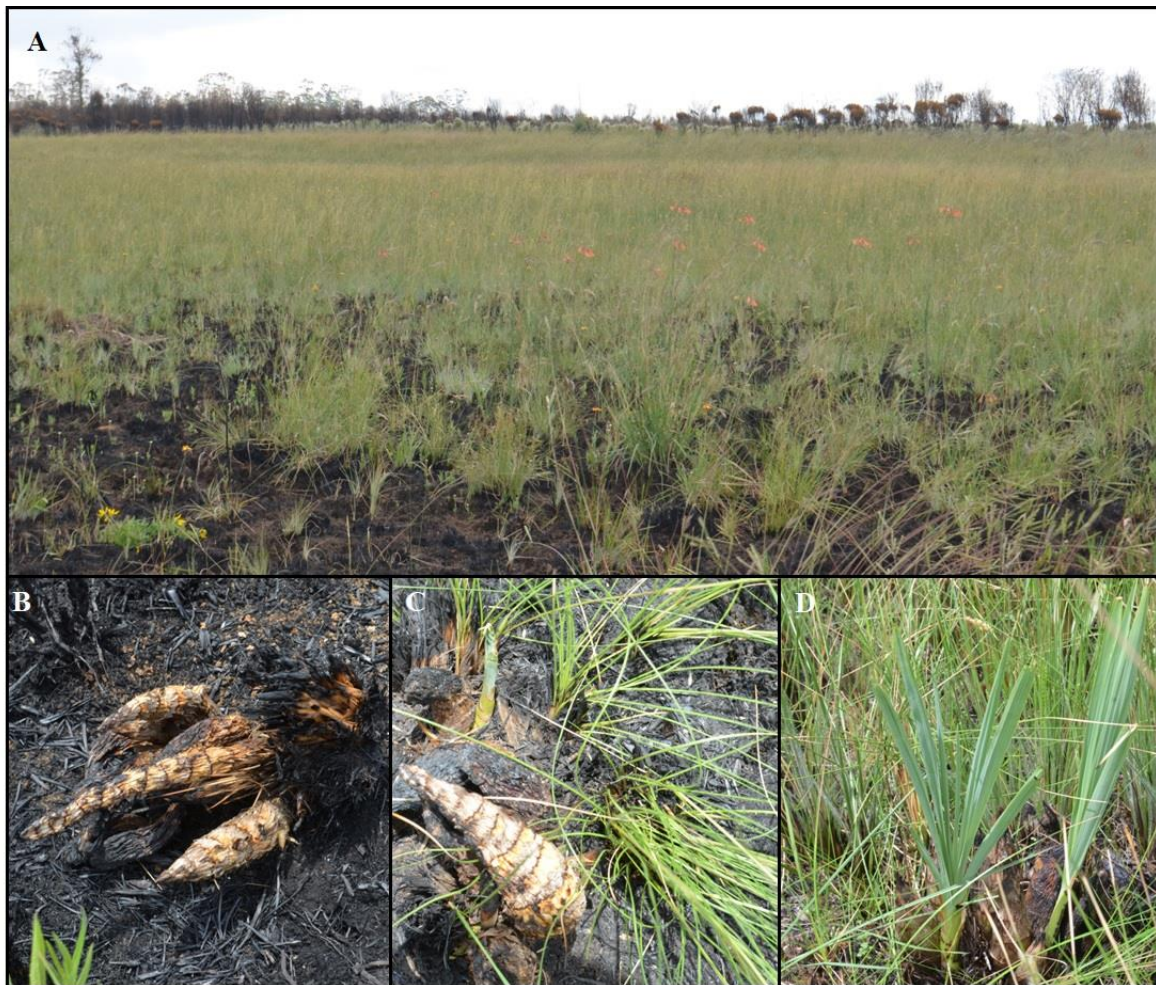
**Figura 16.** Locais de coleta das espécies estudadas e habitats alterados e/ou suprimidos. Sistema de coordenadas UTM; Datum SIRGAS 2000/EPGS 4674.

Registros em herbários e no Specieslink (CRIA 2017) indicaram a ocorrência de *C. parviflorum* em campos úmidos em várias localidades do DF. Entretanto, nas excursões a alguns desses locais, foi constatado que vários deles sofreram profundas alterações ou foram totalmente suprimidos pela urbanização dessas localidades. O habitat descrito por J.A.N. Batista 613 (CEN), margem direita do balão de acesso ao Aeroporto Internacional de Brasília, foi completamente alterado para a construção de novas pistas no local. Da mesma forma o local de ocorrência da coleta J.A.N. Batista 1170 (CEN) na quadra 16 do Park Way, às margens do Córrego do Cedro. Este local foi bastante alterado e parcialmente suprimido por construções no local. No entanto, a espécie foi

exitosamente coletada na área citada por J.H. Lima 9 (UB), na Floresta Nacional de Brasília (FLONA-DF). A primeira expedição a este local ocorreu em 31/10/2017, logo após uma grande queimada que ocorreu naquela Unidade de Conservação (Figuras 16 e 18). No local não havia plantas com flores ou frutos, já que o fogo queimou toda a população daquele local, não sendo possível a coleta de qualquer material. Em nova visita realizada em 09/08/18, foram encontradas várias plantas em floração. Em 17/05/2019 foi feita excursão para a coleta de cápsulas.



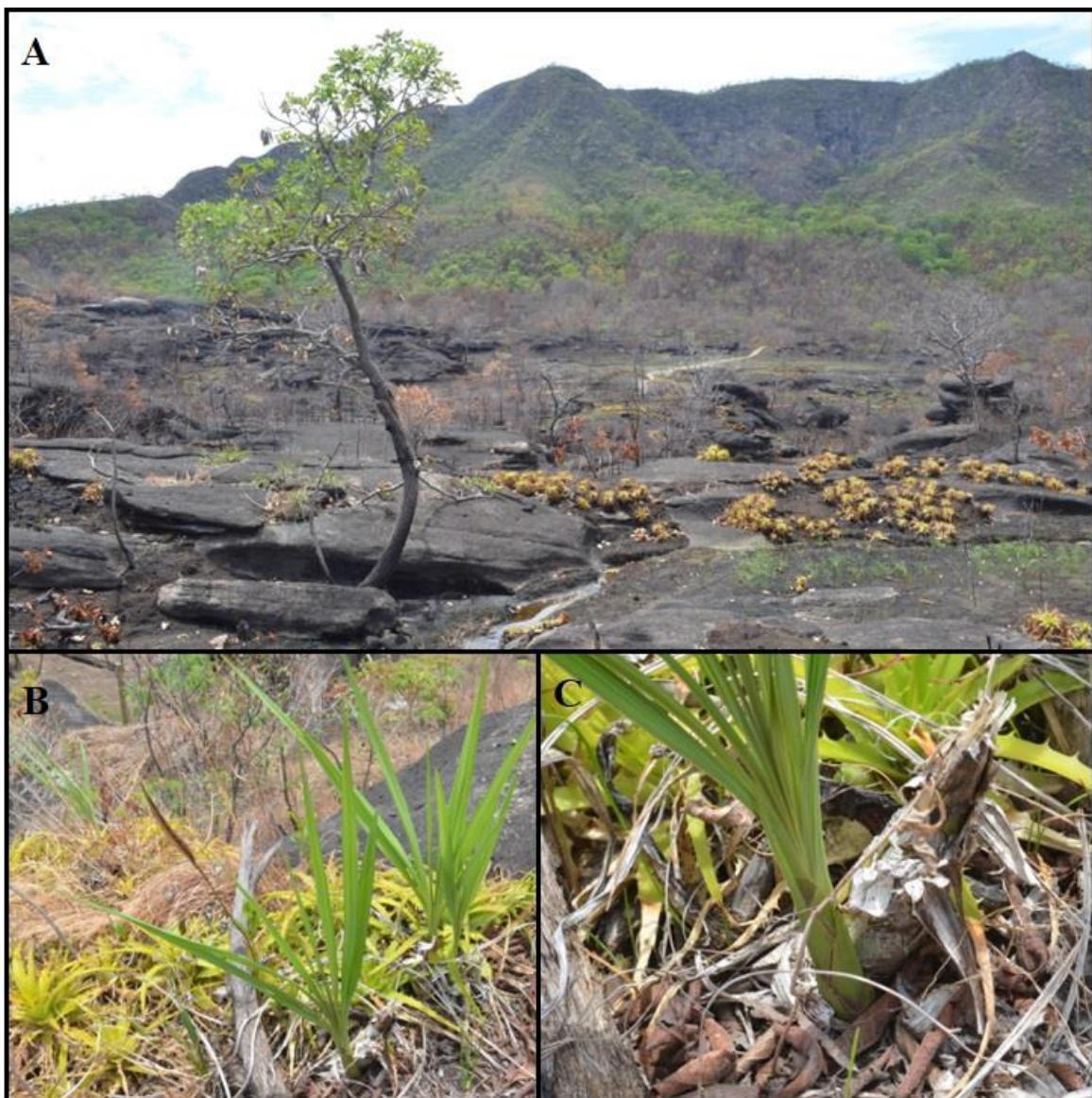
**Figura 17.** *Cyrtopodium withneri* no habitat na APA de Cafuringa. **A.** Visão da fitofisionomia de ocorrência da espécie. **B.** Espécie *in situ*. **C.** Broto em desenvolvimento. **D.** Inflorescência. Crédito das fotos: J.H. Lima.



**Figura 18.** *Cyrtopodium parviflorum* no habitat na Floresta Nacional de Brasília-DF. **A.** Campo limpo úmido onde a espécie foi coletada. **B.** Espécime queimado alguns dias após incêndio no habitat. **C.** Espécime iniciando brotação após incêndio de 2017. **D.** Indivíduo com brotação em estado adiantado. Crédito das fotos: J.H. Lima.

Segundo os registros, *C. virescens* ocorre no DF nas fitofisionomias campo limpo, campo sujo e cerrado *stricto sensu*. A planta apresenta pseudobulbos parcial ou completamente enterrados, o que dificulta sua localização em estado vegetativo. Foram feitas excursões a várias das localidades mencionadas nas coleções, porém a espécie não foi localizada. A espécie era bem comum no local em que hoje está ocupado pelo Setor Noroeste, segundo registo de J.A.N. Batista 1312 (CEN). A planta também era comum na MI-6, Lago Norte, J.A.N. Batista 1257 (CEN), entretanto, em excursão ao local foram verificadas severas alterações e supressão da vegetação causadas por loteamentos irregulares. Em função da não localização de indivíduos da espécie no Distrito Federal, recorreu-se ao estado de Goiás, onde há registros para o Vale da Lua, município de Alto Paraíso de Goiás, L.B. Bianchetti 1512 (CEN). Neste habitat a planta ocorre em bolsões de húmus entre os afloramentos rochosos (Figuras 16 e 19). A primeira excursão ao Vale da Lua foi feita em 03/11/2017, logo após um grande incêndio que consumiu grande parte da vegetação da Chapada dos Veadeiros. Nesta excursão foi encontrada apenas uma planta em final de floração. A planta foi coletada e levada para

o CRAD, onde foi realizada a polinização entre flores desse indivíduo, porém não houve formação de frutos. Em 18/05/19 foi feita nova excursão ao local, quando foram encontradas apenas duas cápsulas. As mesmas foram coletadas e levadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do CRAD. Em razão da pequena quantidade de cápsulas coletadas, outra visita foi feita ao local em 07/09/20, mas sem êxito. A última excursão ao referido local ocorreu em 21/05/21, ocasião em que foi encontrada apenas uma cápsula, a qual foi coletada e mantida em temperatura ambiente até que ocorresse sua deiscência, que ocorreu em 05/10/21. Cabe destacar que a cápsula teve que ser colhida nessa época para evitar que fosse atingida por incêndios que tem se tornado frequentes no local. Acrescenta-se que o Vale da Lua foi atingido novamente por um incêndio no dia 12/09/21.



**Figura 19.** *Cyrtopodium virescens* no habitat no Vale da Lua, Alto Paraíso de Goiás-GO após o incêndio do ano de 2017. **A.** visão geral do habitat. **B.** Espécimes crescendo em bolsões de solo entre rochas em simpatria com *Dyckia lunaris* Leme. **C.** Detalhe do pseudobulbo em desenvolvimento. Crédito das fotos: J.H. Lima.

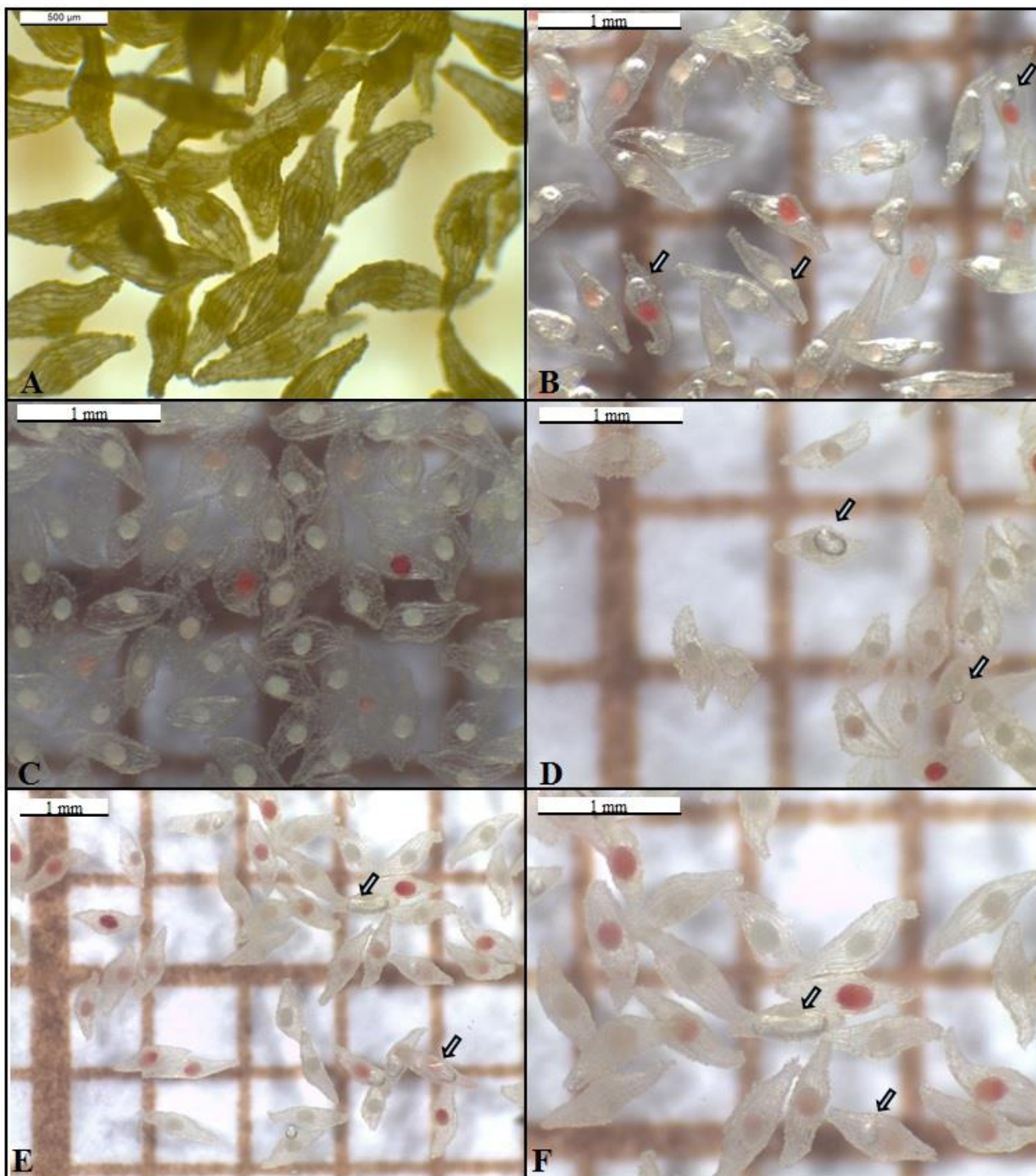
## 7.2. Estimativa da viabilidade de sementes pelo teste do tetrazólio

Os resultados obtidos mostram que houve respostas estatisticamente diferentes aos tipos de tratamentos realizados, para a mesma espécie e entre as diferentes espécies submetidas ao mesmo tratamento (Tabela 5). *Cyrtopodium virescens* apresentou a maior taxa de sementes viáveis, 87,37% (T5). Para esta espécie o menor resultado de viabilidade foi 13,34% (T3). Para *C. withneri*, T4 foi o tratamento mais eficiente (77,01%), e T1, o menos eficiente (4,93%). *Cyrtopodium parviflorum* apresentou valores de viabilidade, mínimo e máximo, de 3,11% (T1) e 20,06% (T4), respectivamente. As diferentes respostas de cada espécie aos tratamentos de coloração podem ter ocorrido em razão da presença de bolhas de ar dentro das sementes das três espécies, o que faz com que as sementes flutuem durante as fases do teste de TTC (Figura 20). Foi observado que essas bolhas podem persistir em algumas sementes mesmo após terem sido coradas. Contudo, sementes que passaram por período de pré-condicionamento praticamente não apresentaram bolhas após a coloração. Apesar de ser rápido e eficiente, França-Neto & Krzyzanowski (2019) destacam que o teste do TTC possui algumas limitações: pode ser afetado por tratamentos pelos quais as sementes foram submetidas, influenciando o próprio resultado e também possui algumas limitações: requer treinamento especializado e conhecimento sobre a estrutura da semente para a adequada interpretação do teste; é tedioso devido o exame individual de cada semente que requer paciência e experiência; consome mais tempo por amostra que o teste padrão de germinação a despeito de ser um teste rápido; não mostra a eficácia ou a potencial toxicidade de um determinado tratamento a que a semente é submetida. Também não informa a presença de patógenos.

**Tabela 5.** Viabilidade de três espécies de *Cyrtopodium* estimada por meio do teste de tetrazólio em diferentes condições de pré-condicionamento e coloração. Valores expressos em porcentagem.

Pré-condicionamento	água		sacarose 10%		-
	tampão de fosfato	água	tampão de fosfato	água	
Tratamento	T1	T2	T3	T4	T5
<i>C. parviflorum</i>	3,11 Cd	10,81 Bbc	14,10 Aab	20,06 Ca	7,76 Ccd
<i>C. virescens</i>	15,34 Ac	44,70 Ab	13,34 Ac	45,41 Bb	87,37 Aa
<i>C. withneri</i>	4,93 Bd	53,75 Ab	12,26 Ac	77,01 Aa	13,52 Bc

Médias na mesma linha acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias na mesma coluna seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 20.** Avaliação do teste de tetrazólio nas sementes das espécies estudadas. **A.** Sementes de *C. withneri* congeladas e mantidas em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (40 x) antes do teste do TTC. **B-F.** Sementes submetidas ao teste do TTC. **B.** *C. virescens* (35 x). **C, D.** *C. parviflorum* (ambas 35 x). **E, F.** *C. withneri* (20 e 35 x, respectivamente). Setas indicam ar no interior das sementes. Crédito das fotos: J.H. Lima.

Na literatura, é relatado que os principais fatores que afetam, positiva ou negativamente, a viabilidade em Orchidaceae são: a idade das sementes, o armazenamento e o protocolo usado na realização do teste. Suzuki *et al.* (2012) observaram que a viabilidade de sementes de

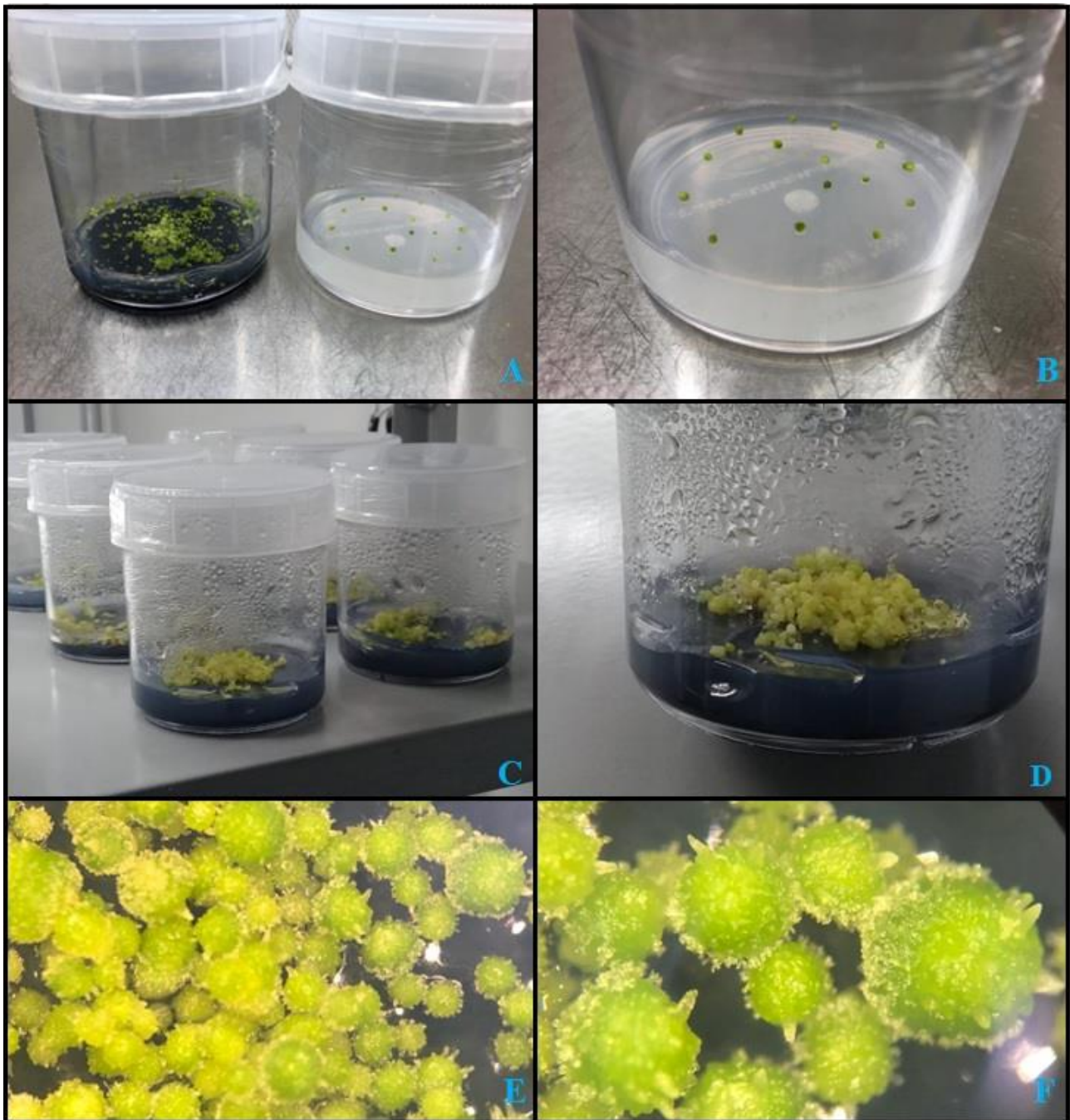
*Hoffmannseggella cinnabarina* (Batem. ex Lindl.) H.G. Jones varia com o grau de maturidade das mesmas. Segundo esses autores, sementes colhidas com menos de seis meses de idade apresentaram menor viabilidade, independente da temperatura de armazenamento. Hosomi *et al.* (2012) verificaram no seu estudo sobre a viabilidade de sementes de 10 espécies de *Cattleya*, que o armazenamento a -18 °C não interferiu negativamente na viabilidade das sementes, ao contrário, por vezes aumentou os valores de viabilidade. Vudala & Ribas (2017) e Franceschi *et al.* (2019) também observaram que o armazenamento a baixas temperaturas (-20 e -80 °C), de sementes de quatro espécies de *Oncidiinae* e de *Hadrolaelia grandis* (Lindl & Paxton) Chiron & VP Castro, não influenciaram negativamente o teste de viabilidade. Por outro lado, trabalhos de deterioração controlada mostram que o armazenamento em temperaturas mais altas, entre 40-43 °C, é deletério à manutenção da viabilidade de sementes de *Orchidaceae* (Hay *et al.* 2010; Fileti *et al.* 2015). Segundo Fileti *et al.* (2021), que estudaram o armazenamento de sementes de três espécies do gênero *Cattleya* Lindl. nas temperaturas de 41, 43 e 45 °C, a taxa de declínio da viabilidade das sementes é maior à medida que a temperatura de armazenamento aumenta.

Em relação aos tipos de pré-condicionamento, Hosomi *et al.* (2012) verificaram que sementes armazenadas a -18 °C apresentaram maior viabilidade do que aquelas que não foram armazenadas nessa temperatura, independentemente do tipo de pré-condicionamento. Entretanto, em outro estudo, foi observado que a embebição em sacarose ou glicose, ambas a 10%, promoveram melhores resultados, e que a coloração não foi afetada pela dissolução do TTC em água ou em tampão de fosfatos (Hosomi *et al.* 2017). Os dados aqui obtidos apontam que o resultado do teste é bastante influenciado pelo tipo de tratamento empregado (embebição, diluição do TTC, etc.), de forma similar ao que foi descrito por Soares *et al.* (2014).

### **7.3. Avaliação da germinação de *C. parviflorum* e *C. withneri* em diferentes meios de cultura**

No presente estudo foi avaliada a germinação de *C. parviflorum* e *C. withneri* em três meios de cultivo, KC, MS e ½ MS, com e sem a adição de carvão ativado (CA). O início da germinação ocorreu em tempos diferentes. Em ambas formulações de KC, ela se iniciou por volta dos 45 dias após a sementeira (Figura 21). Já nas duas formulações de MS e de ½ MS, o início ocorreu em torno de 60 dias depois da sementeira.





**Figura 21.** Protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri* resultantes da germinação assimbiótica. **A, B.** *C. parviflorum*. **C-F.** *C. withneri*. **A.** Frascos contendo protocormos originados a partir de sementes germinadas (esquerda) e protocormos colocados em frasco para a etapa de multibrotação. **B.** Detalhes de frasco com protocormos para a etapa de multibrotação. **C.** Frascos em estante de cultivo. **D.** Frasco de cultivo em destaque. **E, F.** Protocormos em destaque evidenciando sua morfologia.

A avaliação da porcentagem de sementes germinadas ocorreu aos 90 dias após a semeadura, onde foram observados valores acima de 60% para todos os tratamentos (Tabela 6). Para as duas espécies foram observadas maiores porcentagens de germinação nos meios com adição de carvão. A única inversão ocorreu entre T3 e T4 para *C. parviflorum*, respectivamente, ½ MS com e sem adição

de carvão ativado, onde houve menor percentual de germinação no meio com carvão, embora sem diferença estatística entre os tratamentos.

**Tabela 6.** Percentual de sementes germinadas de *C. parviflorum* e *C. withneri* em diferentes formulações de meios de cultura.

Meio de cultivo	MS		1/2MS		KC	
Tratamento	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Carvão ativado	+	-	+	-	+	-
<i>C. parviflorum</i>	97.95 Aa	61.39 Ac	74.75 Bbc	80.18 Bbc	93,01 Bab	70.17 Bc
<i>C. withneri</i>	93.25 Bb	61.80 Ac	99.71 Aa	86.03 Ab	99.76 Aa	90.37 Ab

Médias na mesma linha acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias na mesma coluna seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para *C. parviflorum* os maiores valores de germinação foram observados nas formulações com carvão ativado de MS e KC, respectivamente, T1 (97,95%) e T5 (93,01%), não havendo diferença estatística entre eles. O tratamento com menor germinação foi T2 (61,39%), MS sem adição de carvão, sem, no entanto, diferir estatisticamente de T3 (74,75%), T4 (80,18%) e T6 (70,17%).

No caso de *C. withneri*, T3 e T5, respectivamente, ½ MS e KC, ambos com carvão ativado, tiveram maior germinação, seguidos de T1 e T6, sendo que todos esses tratamentos apresentaram valores de germinação acima de 90%. Os menores foram observados nas preparações sem carvão de MS e ½ MS, respectivamente, T2 (61,80%) e T4 (86,03%).

A maior diferença entre as formulações estudadas foi em relação à morte de protocormos. Aos 90 dias da germinação, foi observada elevada mortalidade de protocormos em todos os meios sem adição de carvão. Contudo, em KC, mesmo suplementado com carvão, também ocorreu elevada mortalidade de protocormos (dados não quantificados).

O sucesso e o tempo de germinação *in vitro* de sementes de orquídeas são afetados por diversos fatores, tais como: ausência/presença de luz e fotoperíodo, umidade, fonte de carbono, maturidade das sementes, sais presentes nos meios de cultura, entre outros (Arditti 1967). O carvão ativado parece não ser um componente essencial na germinação, mas geralmente atua de forma positiva nesta etapa e no desenvolvimento dos protocormos (Thomas 2008).

A presença ou ausência de luz, seu comprimento de onda e fotoperíodo podem ter efeito pronunciado na germinação e desenvolvimento de protocormos de algumas espécies, como em *Cyrtopodium punctatum* (Dutra *et al.* 2009), *C. glutiniferum* (Vogel & Macedo 2011) e *Chloraea crispa* Lindl. (Quiroz *et al.* 2017). Para algumas orquídeas terrestres, a presença de luz pode inibir completamente a germinação (Nadarajan *et al.* 2012).

A composição de sais é a principal variável dos diversos meios utilizados, notadamente as fontes de nitrogênio (Arditti 2008). A capacidade de metabolizar as diferentes formas de nitrogênio presentes nos meios (nitrato ou amônio) varia consideravelmente entre as espécies de orquídeas, afetando sua germinação e desenvolvimento *in vitro* (Arditti 1967; Zeng *et al.* 2011; Srivastava *et al.* 2015; Ferreira *et al.* 2018). De acordo com Stewart (1989 *apud* Ferreira *et al.* 2018), as orquídeas se dividem em dois grupos: (i) espécies com aptidão para germinar em meios com maior concentração de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), e (ii) espécies com aptidão para germinar em meios com mais nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Meios como VW - Vacin and Went (Vacin & Went 1949) e KC apresentam maior relação  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ , 1,46 e 0,89, respectivamente, enquanto que ambos, MS e P723 (PhytoTechnology Orchid Seed Sowing Medium), apresentam relação de 0,52.

Dutra *et al.* (2009) verificaram que *Cyrtopodium punctatum* apresentou maior germinação nos meios P723 e VW (27,3 e 26,1%, respectivamente), quando comparado com  $\frac{1}{2}$  MS (12,9%), KC (10,0%). Como os meios P723 e VW tem relações inversas de  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ , é possível que outros fatores tenham influenciado a germinação, especialmente a presença/ausência de luz e o fotoperíodo, escopo do trabalho desses pesquisadores. Situação semelhante foi observada por Rittirat *et al.* (2018) no estudo da germinação de *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. em KC e VW, dois meios com maior relação  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ . Neste estudo, os maiores percentuais de germinação verificados em KC e VW foram, respectivamente, 38,4 e 83,8%, o que pode indicar o envolvimento de outro fator, que não nitrato, influenciando a germinação das sementes desta espécie. Franceschi *et al.* (2019) observaram que nas espécies estudadas, WPM (Lloyd & McCown 1980), com relação  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$  igual a 1, foi o meio com melhor germinação (78-94%), seguido por  $\frac{1}{2}$  MS (75,7-90%), MS (70,3-82,5%) e KC (51-62,5%). Desses meios, KC e MS foram os que apresentaram maior mortalidade de protocormos. Vudala & Ribas (2018) também constaram que MS é mais eficiente na germinação que KC, mas, em MS houve elevada mortalidade de protocormos, o que não ocorreu em KC. Já nos trabalhos de Mohanty *et al.* (2012) e Paul *et al.* (2012), MS promoveu maior germinação do que KC, e os protocormos gerados naquele meio possuíam melhor qualidade fisiológica. Ferreira *et al.* (2018), no estudo sobre a germinação de *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth não detectaram diferença estatística entre os meios estudados, MS,  $\frac{1}{2}$  MS, KC e VW.

Suzuki *et al.* (2012) observaram que para *Hoffmannseggella cinnabarina* (Bateman ex Lindl.) H.G. Jones a germinação variou em relação à maturidade das sementes, fotoperíodo e ao meio utilizado. Aos 9 meses de maturação (a maior idade verificada) MS foi o meio mais eficiente (98,3%), mas sem diferença estatística para KC. Para *Nothodoritis zhejiangensis* Z.H. Tsi, a germinação foi maior em KC (40,3%) do que em MS (15,7%) (Zeng *et al.* 2011). Em *Pseudorchis albida* (L.) Á.

Löve & D. Löve, a presença de nitrato, mesmo em baixa concentração (2 mg.L<sup>-1</sup>), inibiu a germinação da espécie estudada (Ponert *et al.* 2013).

Na revisão feita por Thomas (2008), foi verificado que, de maneira geral, o carvão ativado atua positivamente na germinação de sementes e em outras etapas do desenvolvimento *in vitro* de orquídeas, mas que em alguns estudos o carvão afetou positiva ou negativamente uma mesma espécie, ou apenas negativamente. Em razão das várias influências que o carvão ativado pode gerar no meio de cultura como adsorção de vitaminas, minerais, reguladores de crescimento, etc., por vezes é difícil estabelecer qual a melhor concentração a ser utilizada (Thomas 2008). Isso foi verificado por Sorgato *et al.* (2020), que constataram que, embora tenha ocorrido germinação das sementes das duas espécies estudadas, *Dendrobium Phalaenopsis* Fitzg. e *Dendrobium nobile* Lindl., em todos os meios analisados (KC, MS, ½ MS e VW), não foi possível estabelecer uma concentração ideal de carvão ativado na germinação dessas espécies, nem tampouco verificar um padrão na germinação quando carvão foi adicionado aos meios.

Pacek-Bieniek *et al.* (2010), Schneiders *et al.* (2012) e Rodrigues *et al.* (2015) estudaram a influência do carvão ativado em um único meio de cultura. Pacek-Bieniek *et al.* (2010) verificaram que o carvão ativado atua positivamente na germinação de *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. em meio MS. No estudo de Schneiders *et al.* (2012) sobre *Cattleya forbesii* Lindl., a germinação em meio MS adicionado de carvão foi de 90%, contra 45% no mesmo meio sem carvão. Rodrigues *et al.* (2015) ao analisarem a germinação de *Cyrtopodium saintlegerianum*, observaram que a percentagem de germinação em KC, aos 30 dias, com e sem carvão, foi de 100 vs. 30. No estudo sobre germinação *in vitro* de *Dendrobium taurulinum* J. J. Smith, Nurfadilah (2016) analisou três meios de cultura: KC, VW e MS, e o efeito da adição de carvão ativado a esses meios, tendo observado que os maiores valores ocorreram nos meios com adição de carvão. Os valores obtidos para os meios com adição de carvão e sem carvão foram: KC (99,3 vs. 81,2%), MS (96,2 vs. 87,7%) e VW (91,5 vs. 87,8%). A análise estatística não detectou significância entre os tratamentos. Este resultado se assemelha ao obtido no presente estudo para a germinação de *C. parviflorum* e *C. withneri* em MS, ½ MS e KC e o efeito do carvão ativado (Tabela 6).

#### **7.4. Avaliação da Multibrotação em protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri***

Ao final dos 120 dias da fase de indução de multibrotação em protocormos, os tratamentos estudados (listados nas Tabelas 4 e 7) foram avaliados quanto à sobrevivência, valores das dimensões, massa fresca e seca da parte aérea e das raízes, número de brotações, de Protocorm-like Body (PLB) e de raízes. Os tratamentos estudados apresentaram sobrevivência entre 45,19 e 100% (T9 e T1,

respectivamente) para *C. parviflorum*, e entre 33,33 e 100% (T10 e T5, respectivamente) para *C. withneri* (Tabela 7). Para *C. parviflorum* os tratamentos com maior sobrevivência variaram de 95,56-100% (T5-T1), e não apresentaram diferença estatística entre eles. No caso de *C. withneri*, T5 apresentou a maior sobrevivência (100%), sem diferença estatística para T6 (98,52%). Ao comparar os resultados do mesmo tratamento para as duas espécies, foi verificado que T1, T3, T8 e T9 não apresentaram diferença estatística.

**Tabela 7.** Sobrevivência de protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri* cultivados em diferentes combinações de reguladores de crescimento (RC) em mg.L<sup>-1</sup>. Valores de sobrevivência expressos em porcentagem.

RC		Tratamento	Sobrevivência	
[BAP]	[ANA]		<i>C. parviflorum</i>	<i>C. withneri</i>
0	0	T1	100,00 Aa	94,07 Aab
0	0,5	T2	99,26 Aa	82,22 Bbcd
0,5	0	T3	99,26 Aa	95,56 Aab
0,5	0,5	T4	99,26 Aa	91,11 Babc
1	0	T5	95,56 Ba	100,00 Aa
1	0,5	T6	73,33 Bb	98,52 Aa
2	0	T7	48,89 Bcd	71,11 Acde
2	0,5	T8	62,22 Abcd	51,85 Aef
4	0	T9	45,19 Ad	59,26 Adef
4	0,5	T10	68,15 Abc	33,33 Bf

Médias na mesma coluna acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias na mesma linha acompanhadas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Arellano-Garcia *et al.* (2020) realizaram a indução de multibrotação em protocormos da orquídea *Stanhopea hernandezii* (Kunth) Schltr., e observaram valores de sobrevivência entre 2 e 12%, não tendo sido verificado diferença estatística entre esses resultados. Neste estudo, a combinação que resultou em maior sobrevivência dos protocormos foi 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA sem adição de BAP, o que equivale a T2 do nosso estudo. Já a combinação com menor sobrevivência foi 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Os dados deste trabalho mostraram grande diferença na sobrevivência de protocormos de *S. hernandezii* em relação a *C. parviflorum* e *C. withneri*, uma vez que a menor sobrevivência observada no presente estudo é de quase o triplo do valor da maior sobrevivência do trabalho de Arellano-Garcia *et al.* (2020). Em relação à influência dos reguladores de crescimento (RC), foi verificado que, de forma geral, valores maiores que 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP afetou negativamente a sobrevivência de *C. parviflorum* e de *C. withneri*. Outros trabalhos com Orchidaceae usaram protocormos como explantes para a indução de multibrotação, mas não apresentaram dados acerca da sobrevivência: *Cyrtopodium glutiniferum* (Vogel & Macedo 2011), *Cymbidium mastersii* Griff. ex Lindl. (Mohanty *et al.* 2012), *Esmeralda clarkei* Rchb.f. (Paudel & Pant 2012),

*Grammatophyllum speciosum* Blume (Samala *et al.* 2014), *Cyrtopodium saintlegerianum* (Rodrigues *et al.* 2015).

Os resultados obtidos sobre as dimensões da parte aérea e das raízes evidenciaram o efeito inibitório do aumento da concentração de BAP sobre crescimento de brotos e raízes nos protocormos (Tabela 8). O crescimento das raízes foi severamente afetado pelo BAP, em especial em *C. parviflorum*, onde apenas em T2 foi observado o desenvolvimento de raízes, cuja média do comprimento foi de 0,86 cm. Em *C. withneri* raízes se desenvolveram apenas em T1-T5, com comprimentos de 0,84, 0,36, 0,02, 0,03 e 0,13 cm, respectivamente.

**Tabela 8.** Medidas de brotos e raízes de *C. parviflorum* e *C. withneri* originados de protocormos cultivados em diferentes combinações de reguladores de crescimento. Altura da parte aérea (APA), Diâmetro da menor e maior dimensão do conjunto de brotações (DMe e DMA, respectivamente), Comprimento da maior raiz (CMaR), Comprimento das raízes (CR) e Diâmetro da maior raiz (DMaR). Valores em cm. Concentrações, em mg.L<sup>-1</sup>, de ANA/BAP usados nos tratamentos: T1 (0,0/0,0), T2 (0,5/0,0), T3 (0,0/0,5), T4 (0,5/0,5), T5 (0,0/1,0), T6 (0,5/1,0), T7 (0,0/2,0), T8 (0,5/2,0), T9 (0,0/4,0), T10 (0,5/4,0).

	Tratamento	APA	DMe	DMA	CMaR	CR	DMaR
<i>C. parviflorum</i>	T1	0,35 Bb	0,30 Aa	0,34 Aa	0 Bb	0 Bb	0 Bb
	T2	1,07 Ba	0,42 Aa	0,50 Aa	1,16 Aa	0,86 Aa	0,15 Aa
	T3	0,14 Bb	0,34 Aa	0,51 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	T4	0,11 Bb	0,34 Aa	0,38 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	T5	0 Bb	0,19 Ba	0,23 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	T6	0,16 Bb	0,19 Ba	0,22 Ba	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	T7	0 Ab	0,47 Aa	0,52 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	T8	0 Bb	0,47 Aa	0,60 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	T9	0 Ab	0,51 Aa	0,53 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	T10	0 Ab	0,17 Ba	0,34 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab
<i>C. withneri</i>	T1	2,32 Aa	0,37 Aa	0,40 Aa	1,15 Aa	0,84 Aa	0,08 Aa
	T2	1,55 Aab	0,37 Aa	0,45 Aa	0,36 Bb	0,36 Bab	0,04 Bab
	T3	0,97 Abc	0,41 Aa	0,49 Aa	0,04 Ab	0,02 Ab	0 Ac
	T4	0,96 Abc	0,34 Aa	0,97 Aa	0,03 Ab	0,03 Ab	0,01 Abc
	T5	0,79 bc	0,30 Aa	0,36 Aa	0,13 Ab	0,13 Ab	0,01 Abc
	T6	0,79 Abc	0,27 Aa	0,34 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ac
	T7	0,48 Ac	0,38 Aa	0,65 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ac
	T8	0,34 Ac	0,40 Aa	0,49 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ac
	T9	0,20 Ac	0,43 Aa	0,52 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ac
	T10	0,13 Ac	0,48 Aa	0,69 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ac

Dentro da mesma coluna, médias relativas à espécie acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias relativas ao mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tanto para *C. parviflorum* quanto para *C. withneri*, ocorreu a multiplicação dos protocormos, que foi avaliado por meio da dimensão maior (DMA) e da dimensão menor (DMe) das brotações

desenvolvidas. Em *C. parviflorum* essa multiplicação não implicou em diferenciação e crescimento de brotos nos tratamentos T7-T10. A altura da parte aérea também se mostrou negativamente influenciada pelo aumento da concentração de BAP nas duas espécies estudadas. Valores de altura da parte aérea maiores que 1 cm foram registrados apenas em T2 (1,07 cm) para *C. parviflorum*, e em T1 (2,32 cm) e T2 (1,55 cm) para *C. withneri*. Esses resultados contrastam com os apresentados por Paudel & Pant (2012), em estudo sobre multibrotação de *Esmeralda clarkei* com avaliação de dez combinações de ANA e BAP. Esses autores observaram que a altura dos brotos variou de 1,75-3,67 cm, cujos maiores valores observados são equivalentes a T2, T1, T8 e T3 do nosso trabalho. As comparações entre os dois estudos mostram que o alongamento dos brotos das espécies de *Cyrtopodium* aqui estudadas são negativamente afetadas pelo BAP, enquanto que em *E. clarkei*, esse RC afetou positivamente o alongamento dos brotos, e ainda ocorreu sinergia com ANA.

A formação de raízes ocorreu apenas nos tratamentos correspondentes a T1 e T2 do nosso estudo, com comprimentos médios, respectivos, de 0,5 e 2,37 cm. O comprimento de brotos do nosso estudo apresentou similaridade com o este estudo, com exceção do desenvolvimento de brotos em T8, que não ocorreu no nosso estudo. Paudel & Pant (2012) obtiveram raízes maiores que 2 cm, valor bastante significativo em relação ao nosso estudo, onde não se registrou raízes maiores que 1 cm. No trabalho de Mohanty *et al.* (2012) em protocormos de *Cymbidium mastersii*, o menor comprimento das raízes produzidas, 1,10 cm, foi observado no cultivo apenas com ANA na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  (0,93  $\text{mg.L}^{-1}$ ), e o maior, 3,46 cm, ocorreu no uso isolado de Ácido Indol-3-Butírico (AIB) a 10,0  $\mu\text{M}$  (2,03  $\text{mg.L}^{-1}$ ). No nosso estudo, não foi usada essa concentração de ANA ou AIB. No nosso trabalho o uso isolado de ANA a 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  produziu o maior comprimento de parte aérea para *C. parviflorum* (1,07 cm) e o segundo maior valor para *C. withneri* (1,55 cm).

Em um estudo com *Dactylorhiza hatagirea* (D.Don) Soo (Warghat *et al.* 2014), o menor comprimento de brotos, 7,80 cm, foi observado no meio BM-1 (Basal medium from HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India), sem adição de RC. Já o maior comprimento, 17,80 cm, ocorreu no cultivo em MS com adição de 3  $\text{mg.L}^{-1}$  Ácido Indol-3-Butírico (AIB) e 1  $\text{mg.L}^{-1}$  de Cinetina. O comprimento das raízes apresentou menor variação, com o menor comprimento, 5,34 cm, no tratamento com MS adicionado de 3  $\text{mg.L}^{-1}$  AIB, e o maior comprimento, 8,02 cm, foi observado no cultivo em MS combinado com 3  $\text{mg.L}^{-1}$  de AIB e 1  $\text{mg.L}^{-1}$  de Cinetina. Os valores apresentados por esses autores são bem diferentes daqueles encontrados em nosso estudo e a outros revisados. Duas possíveis explicações podem ser levantadas: i. *D. hatagirea* pertence a outra subfamília, Orchidoideae, caracterizada quase que exclusivamente por plantas terrestres com órgão de armazenamento tuberiformes (Pridgeon *et al.* 2003); e ii. O uso de RC menos comumente usados na multibrotação de orquídeas. Então, o uso de RC menos comuns pode ter estimulado a rizogênese e

diferenciação de brotos em uma planta de um grupo diferente das plantas estudadas, duas Epidendroideae.

Devi *et al.* (2015) no estudo de multibrotação de *Taprobanea spathulata* (L.) Christenson em meio MS adicionado de RC isolados ou combinados, verificaram que para o comprimento dos brotos, o uso de BAP isolado a 2 mg.L<sup>-1</sup> foi o mais eficiente, produzindo brotos de 1,74 cm. Já a combinação de RC com maiores brotos, 2,33 cm, ocorreu com 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 2 mg.L<sup>-1</sup> de Ácido Indol Acético (AIA). Para RC isolados, as maiores raízes se desenvolveram no tratamento sem adição dos RC. As maiores raízes para combinações de RC, 0,99 cm, ocorreram no meio adicionado de 1 mg.L<sup>-1</sup> de Cinetina e 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA.

O trabalho de Rodrigues *et al.* (2015) sobre *Cyrtopodium saintlegerianum* apresentou informações sobre dimensões de raízes e parte aérea. Esses autores usaram o meio KC e avaliaram os efeitos de RC na indução de multibrotação em sete tratamentos com BAP e ANA, dos quais, quatro apresentam as mesmas concentrações usadas no presente estudo: T1, T6, T7 e T8. O maior comprimento dos brotos (2,60 cm) foi observado no tratamento com adição apenas de ANA a 2 mg.L<sup>-1</sup>, mas sem diferença estatística para T1 (2,30 cm). O menor comprimento de brotos se deu em T8 (0,66 cm). Em relação às raízes, o menor e o maior comprimento, foram observados em T7 (0,44 cm) e em T1 (2,75 cm), respectivamente. O desenvolvimento de raízes foi observado em todos os tratamentos, e quatro deles apresentaram raízes maiores que 1 cm, tendo T1 apresentado o maior comprimento, 2,75 cm. Ao comparar os dois estudos, percebe-se que as três espécies tiveram comportamento parecido em relação ao aumento da concentração de BAP, que influenciou negativamente o crescimento tanto de brotos como de raízes.

No presente estudo, brotos maiores que 1 cm foram observados em *C. parviflorum* apenas em T2 (1,07 cm), e em *C. withneri* em T1 (2,32 cm) e T2 (1,55 cm), sem diferença entre eles. Os valores relativos à maiores alturas da parte aérea foram similares ao observado por Rodrigues *et al.* (2015) em *C. saintlegerianum*. O menor tamanho dos brotos de *C. parviflorum* pode ser uma característica genética, uma vez que *C. withneri* e *C. saintlegerianum* possuem, quando adultas, pseudobulbos de até duas vezes o comprimento dos pseudobulbos de *C. parviflorum* (Menezes 2000). Em relação ao comprimento das raízes, neste estudo nenhuma das duas espécies produziu raízes maiores que 1 cm, e *C. parviflorum* produziu raízes apenas em T7. Por sua vez, Rodrigues *et al.* (2015) observaram o desenvolvimento de raízes em todos os tratamentos, e quatro deles apresentaram raízes maiores que 1 cm, tendo T1 apresentado o maior comprimento, 2,75 cm. Ao comparar os dois estudos, percebe-se que as três espécies tiveram comportamento parecido em relação ao aumento da concentração de BAP, que influenciou negativamente o crescimento tanto de brotos como de raízes.



A quantificação da massa fresca e seca da parte aérea e das raízes das duas espécies estudadas mostrou diferença entre alguns tratamentos (Tabela 9). Em *C. parviflorum*, as maiores massas fresca e seca da parte aérea foram observadas para T2, 0,05671 e 0,00598 g, respectivamente. Contudo, não houve diferença estatística para em relação a T1, T3 e T4. Em relação a *C. withneri*, T7 apresentou a maior fresca e seca, 0,14745 e 0,01147 g, respectivamente, mas sem diferir dos demais tratamentos. No caso de *C. parviflorum*, o único tratamento que produziu raízes foi T2, com valores de massa fresca e seca de 0,03987 e 0,00307 g, respectivamente. *Cyrtopodium withneri* desenvolveu raízes em T1, T2, T4 e T5. O tratamento T1 apresentou os maiores valores de massa fresca e seca, 0,01983 e 0,00189 g, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Em ambas as espécies foi possível verificar que o aumento na concentração de BAP afetou negativamente a produção de raízes. Esse efeito foi mais pronunciado em *C. parviflorum*, onde não ocorreu a formação de raízes nos tratamentos com esse RC. Em *C. withneri* foi observado o desenvolvimento de raízes em concentrações intermediárias de BAP, T4 e T5, 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A comparação dos dados de massa fresca e seca com outros trabalhos não foi possível, pois a literatura consultada, ou usou metodologia diferente para esta etapa (Mohanty *et al.* 2012; Picolotto 2013; Maharjan *et al.* 2019; An *et al.* 2021; Latunra *et al.* 2021), ou quando usou a mesma metodologia, não realizou a análise desse tipo de dado (Paudel & Pant 2012; Warghat *et al.* 2014; Rodrigues *et al.* 2015; Arellano-Garcia *et al.* 2020).

A proporção de Protocorm-like Bodies (PLB), brotos e raízes originados a partir de protocormos observados para *C. parviflorum* e *C. withneri* apresentou diferença tanto entre tratamentos quanto entre as duas espécies (Tabela 10). Em todos os tratamentos ocorreu o desenvolvimento de PLB para ambas as espécies, inclusive em T1, que não contou com a adição dos reguladores de crescimento. A formação de PLB em T1 se deu, provavelmente, pelo balanço hormonal endógeno.

*Cyrtopodium parviflorum* apresentou a maior porcentagem de explantes com PLB nos tratamentos sem adição de BAP, ou seja, T1 (91,85%) e T2 (92,59%), os quais não apresentaram diferença estatística entre si, mas diferiram dos demais tratamentos. O tratamento T3 (40%) diferiu estatisticamente de T4-T10, que não apresentaram diferença estatística entre si, e variaram de 4,44% (T5) a 17,04% (T4). Para *C. withneri*, os tratamentos T1-T6 apresentaram as maiores porcentagens de explantes com PLB e não diferiram estatisticamente, tendo em T6 a maior frequência, 73,33%. O tratamento com menor ocorrência de explantes com PLB foi T10 (31,11%). Em relação à presença de brotos nos explantes, foi observado em todos os tratamentos para *C. withneri*, e nos tratamentos T5 e T1-T7 para *C. parviflorum*. Para esta espécie, T2, com 60%, foi o tratamento com maior ocorrência de brotos, e os demais tratamentos com presença de brotos tiveram valores abaixo de 4%.

Em relação a *C. withneri*, T1, com 83,70%, foi a maior ocorrência de brotos por explante, e T8-T10 as menores porcentagens, não diferindo entre si. A presença de raízes nos explantes foi observada em *C. parviflorum* apenas em T2 (41%), e em todos os tratamentos de *C. withneri*, exceto T8 e T9, sendo T1 (55,56 %) o tratamento com maior ocorrência de brotos nos explantes cultivados. A relação PLB/Explante foi maior em T2 (4,52) e T1 (3,14) para *C. parviflorum*, e em T1 (2,02) para *C. withneri*, destacando que o tratamento T1 não teve adição de reguladores de crescimento. O número de Brotos/Explante foi similar ao de PLB/Explante, com T2 resultando na maior relação para *C. parviflorum* (0,26) e T1 (2,79) para *C. withneri*. Acerca da relação Raiz/Broto, T2 foi o único tratamento que desenvolveu raízes em *C. parviflorum*, e resultou em 0,17 Raiz/Broto. No caso de *C. withneri*, T10 produziu o meio número de raízes (1,17), mas não diferiu dos demais tratamentos.

**Tabela 9.** Massa fresca e seca da parte aérea de brotos e raízes brotos obtidos pela multibrotação de protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri* cultivados em diferentes combinações de reguladores de crescimento. Massa fresca (MF) e Massa seca (MS) estão expressas em g. Concentrações, em mg.L<sup>-1</sup>, de ANA/BAP usados nos tratamentos: T1 (0,0/0,0), T2 (0,5/0,0), T3 (0,0/0,5), T4 (0,5/0,5), T5 (0,0/1,0), T6 (0,5/1,0), T7 (0,0/2,0), T8 (0,5/2,0), T9 (0,0/4,0), T10 (0,5/4,0).

	Tratamento	MF <sub>aérea</sub>	MS <sub>aérea</sub>	MF <sub>raiz</sub>	MS <sub>raiz</sub>
<i>C. parviflorum</i>	T1	0,02275 Bab	0,00397 Aabc	0 Bb	0 Bb
	T2	0,05671 Aa	0,00598 Aa	0,03987 Aa	0,00307 Aa
	T3	0,03814 Aa	0,00535 Aab	0 Ab	0 Ab
	T4	0,02805 Aab	0,00342 Aabc	0 Ab	0 Ab
	T5	0,00938 Ab	0,00123 Abc	0 Ab	0 Ab
	T6	0,00592 Bb	0,00063 Ac	0 Ab	0 Ab
	T7	0,01459 Bb	0,00058 Bc	0 Ab	0 Ab
	T8	0,00336 Bb	0,00029 Bc	0 Ab	0 Ab
	T9	0,00475 Bb	0,00059 Ac	0 Ab	0 Ab
	T10	0,00459 Bb	0,00043 Bc	0 Ab	0 Ab
<i>C. withneri</i>	T1	0,08705 Aa	0,00683 Aa	0,01983 Aa	0,00189 Aa
	T2	0,0586 Aa	0,00511 Aa	0,00477 Bb	0,00052 Bb
	T3	0,0479 Aa	0,00906 Aa	0 Ab	0 Ab
	T4	0,08665 Aa	0,0068 Aa	0,00049 Ab	0,00005 Ab
	T5	0,06538 Aa	0,00416 Aa	0,00114 Ab	0,00011 Ab
	T6	0,09035 Aa	0,00789 Aa	0 Ab	0 Ab
	T7	0,14745 Aa	0,01147 Aa	0 Ab	0 Ab
	T8	0,08381 Aa	0,00542 Aa	0 Ab	0 Ab
	T9	0,05701 Aa	0,00882 Aa	0 Ab	0 Ab
	T10	0,10592 Aa	0,00577 Aa	0 Ab	0 Ab

Dentro da mesma coluna, médias relativas à espécie acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias relativas ao mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 10.** Dados de brotações e raízes geradas por protocormos de *C. parviflorum* e *C. withneri* cultivados em diferentes combinações de reguladores de crescimento. Valores de Explantes com PLB (Exp\_PLB), Explante com brotos (Exp\_Broto) e Explante com raízes (Exp\_Raiz) estão expressos em porcentagem. Número de PLB, Brotos e Raízes por explante (PLB/Exp), (Broto/Exp) e Raízes por broto (Raiz/Broto), respectivamente. Concentrações, em mg.L<sup>-1</sup>, de ANA/BAP usados nos tratamentos: T1 (0,0/0,0), T2 (0,5/0,0), T3 (0,0/0,5), T4 (0,5/0,5), T5 (0,0/1,0), T6 (0,5/1,0), T7 (0,0/2,0), T8 (0,5/2,0), T9 (0,0/4,0), T10 (0,5/4,0).

	Tratamento	Exp_PLB	Exp_Broto	Exp_Raiz	PLB/Exp	Broto/Exp	Raiz/Broto
<i>C. parviflorum</i>	T1	91,85 Aa	3,70 Bb	0,00 Bb	3,14 Ab	0,01 Bb	0,00 Bb
	T2	92,59 Aa	60,00 Aa	41,00 Aa	4,52 Aa	0,26 Ba	0,17 Ba
	T3	40,00 Bb	2,22 Bb	0,00 Ab	0,84 Bc	0,04 Bb	0,00 Bb
	T4	17,04 Bc	0,74 Bb	0,00 Bb	0,24 Bc	0,02 Bb	0,00 Bb
	T5	4,44 Bc	0,00 Bb	0,00 Bb	0,07 Bc	0,00 Bb	0,00 Ab
	T6	8,15 Bc	1,48 Bb	0,00 Bb	0,17 Bc	0,04 Bb	0,00 Bb
	T7	8,89 Bc	0,74 Bb	0,00 Ab	0,11 Bc	0,03 Bb	0,00 Ab
	T8	15,56 Bc	0,00 Ab	0,00 Ab	0,24 Bc	0,00 Ab	0,00 Ab
	T9	10,37 Bc	0,00 Bb	0,00 Ab	0,14 Bc	0,00 Bb	0,00 Ab
	T10	11,11 Bc	0,00 Ab	0,00 Ab	0,18 Bc	0,00 Ab	0,00 Ab
<i>C. withneri</i>	T1	66,67 Bcd	83,70 Ad	55,56 Ac	2,02 Bd	2,79 Ac	0,50 Aa
	T2	71,11 Bd	50,37 Ac	25,19 Ab	1,82 Acd	0,87 Aab	0,56 Aa
	T3	75,56 Ad	36,30 Ac	0,74 Aa	1,65 Abcd	1,02 Aab	0,01 Aa
	T4	65,93 Acd	41,48 Ac	7,41 Aa	1,36 Aabcd	1,26 Ab	0,12 Aa
	T5	72,59 Ad	45,19 Ac	5,19 Aa	1,49 Abcd	1,13 Aab	0,08 Aa
	T6	73,33 Ad	42,22 Ac	4,44 Aa	1,61 Abcd	1,44 Ab	0,06 Aa
	T7	45,19 Aab	28,15 Ac	0,74 Aa	1,02 Aab	1,10 Aab	0,00 Aa
	T8	42,22 Aab	8,15 Aa	0,00 Aa	1,07 Aabc	0,42 Aab	0,00 Aa
	T9	50,37 Abc	14,07 Aab	0,00 Aa	1,35 Aabcd	0,44 Aab	0,00 Aa
	T10	31,11 Aa	5,93 Aa	5,19 Aa	0,70 Aa	0,18 Aa	1,17 Aa

Dentro da mesma coluna, médias relativas à espécie acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias relativas ao mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Protocorm-like Bodies, ou protocormos secundários (Bustam *et al.* 2014; Mohanty *et al.* 2014), são embriões somáticos formados diretamente da superfície ou a partir de células subdermais de explantes (Lee *et al.* 2013). São formados quase que exclusivamente na cultura de tecido das Orchidaceae (Cui *et al.* 2008; Fang *et al.* 2016). De acordo com Cardoso *et al.* (2022), o emprego de reguladores de crescimento é fundamental para que ocorra a indução de PLB em explantes. Arellano-Garcia *et al.* (2020) relatam que há poucos casos de indução de PLB sem adição de reguladores de crescimento ao meio de cultivo. Na revisão da literatura foram encontrados trabalhos com orquídeas onde PLB foram induzidos sem a presença de reguladores de crescimento no meio. O trabalho de Vogel & Macedo (2011) realizado com *C. glutiniferum* não apresentou a frequência de explantes com

PLB, contudo, registrou 0,45 PLB/Explante, relação bem inferior ao obtido neste trabalho para *C. parviflorum* (3,14) e *C. withneri* (2,02).

Samala *et al.* (2014) estudaram a multibrotação em *Grammatophyllum speciosum* em meio ½ MS livre de RC e com adição de 1 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e ANA, e o efeito da adição de carvão ativado a esses meios. Os meios com CA apresentaram frequências e número de PLB/Explante ligeiramente maiores do que os que não continham CA. Nos meios sem RC foram observados os seguintes valores de frequências e número PLB/Explante nos meios sem e com adição de CA, respectivamente: 21,7% e 2,91; e 28,3% e 4,63. Por sua vez, os meios com RC apresentaram frequências e número PLB/Explante de 46,7% e 5,84; e 63,3% e 6,87, respectivamente na ausência e de presença de CA.

Este trabalho não avaliou o efeito do CA na multibrotação, contudo possui dois tratamentos em comum com o trabalho de Samala *et al.* (2014), quais sejam: T1 e T6. Dessa forma, o confronto dos dados obtidos para a frequências e número PLB/Explante em T1: *C. parviflorum* (91,85% e 3,14), *C. withneri* (66,67% e 2,02) e *G. speciosum* (21,7% e 2,91), e em T6: *C. parviflorum* (8,15% e 0,17), *C. withneri* (73,3% e 1,61) e *G. speciosum* (46,7% e 5,84), permitem constatar que as duas espécies de *Cyrtopodium* apresentaram maiores frequências de PBL em T1 do que *G. speciosum*, e relação PLB/Explante próximas umas das outras, com discreta redução para *C. parviflorum*. Para T6 *C. withneri* a frequência de PLB foi bem maior que as outras duas espécies, notadamente maior que *C. parviflorum*. Relativo ao número de PLB/Explantes, *G. speciosum* teve melhor resposta neste tratamento do que as outras espécies.

Devi *et al.* (2015) estudaram a indução de PLB em *Taprobanea spathulata* em meio ½ MS sob dois contextos: i. sob influência de três aditivos orgânicos: peptona, suco de tomate, água de côco, isolados e com adição da citocinina Cinetina na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>; ii. combinações de BAP com Ácido Indol Acético (AIA), e Cinetina com ANA ou AIA. No primeiro contexto, todos os tratamentos produziram PLB nos explantes. Dois tratamentos apresentaram os maiores valores PLB/Explante sem diferença estatística entre eles: 14,64 (peptona a 0,5%) e 16,84 (peptona a 0,125% adicionada de Cinetina). No segundo contexto, a combinação de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de Cinetina e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> AIA foi a que resultou no maior número de PLB/Explante, 22,40, diferindo estatisticamente das outras combinações empregadas, que variaram de 1,40-17,40. O número PLB/Explante observado em *T. spathulata* superou aquele obtido no presente estudo: 0,07-4,52 para *C. parviflorum* e 0,70-2,02 para *C. withneri*.

Em um estudo sobre *Cymbidium mastersii*, Mohanty *et al.* (2014) obtiveram 2,45 PLB/Explante sem o uso de RC, e 20,55 como melhor resultado com o emprego de RC, na combinação de 5,0 µM (1,125 mg.L<sup>-1</sup>) de BAP e 2,5 µM (0,565 mg.L<sup>-1</sup>) de ANA, sendo esses valores

próximos ao usado em T6 do presente estudo. Neste caso, a indução em meio livre de RC resultou em valores próximos aos deste estudo, e valores bem maiores aos encontrados com o emprego de RC, em especial em T6, e de forma similar ao descrito para *T. spathulata*.

Por último, Warghat *et al.* (2014) ao estudarem a produção de PLB em *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo cultivada em dez meios de cultura sem adição de RC, observaram que nove desses meios induziram o desenvolvimento de PLB. O meio PT139 foi o único que não promoveu a indução de PLB. Os meios com frequências de indução acima de 10% foram: LD (23,4%), TP039 (21,4%), BM1 (20,4%) e ½ MS (18,6%). Esses valores são bem menores aos encontrados para *C. parviflorum* (91,85%) e *C. withneri* (66,67%) no estudo aqui apresentado (Tabela 10).

Os dados obtidos sobre o número de Brotos/Explante e Raiz/Explante mostram que os tratamentos utilizados foram pouco efetivos na indução de brotos a partir de protocormos ou PLB e de raízes em brotos. Em *C. parviflorum*, em todos os tratamentos a relação Brotos/Explante ficou abaixo de 1,00, com T2 apresentado a maior relação, 0,26. Em *C. withneri*, essa relação variou de 0,18 (T10) a 2,79 (T1). O número de Raiz/Explante foi baixo, sendo de 0,17 (T2) em *C. parviflorum*, cabendo destacar que este foi o único tratamento que produziu raízes. No caso de *C. withneri*, T10 apresentou relação acima de 1,00, precisamente 1,17. Vogel & Macedo (2011) relataram 0,04 Raiz/Explante no cultivo em meio sem RC e 0,65 no cultivo apenas em AIA na concentração de 1 µM (0,175 mg.L<sup>-1</sup>). Os tratamentos com TDZ, sozinho ou combinado com AIA, não produziram raízes. Esses valores baixos também foram observados no nosso estudo, e parece ser uma característica do gênero, já que os trabalhos desses autores foi sobre *C. glutiniferum*. Paudel & Pant (2012), obtiveram resultados significativos na indução de brotos em explantes em comparação com nosso trabalho. Esses autores registraram os maiores valores de Brotos/Explante 14,00, 13,75, 11,50 e 14,00, para o cultivo em meio MS com adição apenas de BAP nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A combinação de BAP com ANA se mostrou menos eficiente que o uso isolado de BAP na indução de brotos nos explantes. Já a produção de raízes ocorreu apenas em dois tratamentos, no meio sem RC e no meio adicionado apenas de ANA na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, equivalentes a T1 e T2 deste trabalho, com número de Raiz/Explante iguais a 0,75 e 3,00, respectivamente. Em nosso estudo, T1 não levou à produção de raízes em *C. parviflorum*, mas produziu 0,50 Raiz/Explante em *C. withneri*, mesmo valor do estudo em discussão. Já em T2, houve produção de raízes em *C. parviflorum* e em *C. withneri*, com valores de Raiz/Explante de 0,17 e 0,56, respectivamente, valores inferiores ao de Paudel & Pant (2012). No estudo sobre *Cymbidium mastersii* realizado por Mohanty *et al.* (2014), o uso isolado de Ácido Indol-3-Butírico (AIB) nas concentrações de 10,0 µM (2,03 mg.L<sup>-1</sup>) e 20,0 µM (4,06 mg.L<sup>-1</sup>) produziram o maior e o menor valor de Raiz/Explante: 7,46 e 2,03, respectivamente.

Os dados aqui apresentados mostraram que a indução de multibrotação em *C. parviflorum* e *C. withneri* guardaram similaridade com a maior parte dos trabalhos analisados. Destacou-se no nosso estudo a frequência de PLB nos explantes, que foi mais elevada que a dos trabalhos comparados (Samala *et al.* 2014; Warghat *et al.* 2014), e foi induzida sem a necessidade de RC. O emprego de BAP em concentrações mais altas se mostrou inibitório, de maneira similar ao demonstrado por Rodrigues *et al.* (2015) e de forma antagônica ao que foi apresentado por Paudel & Pant (2012). Warghat *et al.* (2014) obtiveram os maiores comprimentos de brotos e raízes em relação a este e aos demais trabalhos, cuja explicação pode estar no emprego de RC diferentes dos comumente empregados na indução de multibrotação ou no fato da espécie estudada pertencer a uma mesma subfamília das espécies estudadas neste e nos trabalhos comparados. De forma geral, os dados obtidos se mostraram compatíveis com os dados da literatura. Além disso, eles se mostraram promissores para a produção de explantes para as próximas fase de reprodução *in vitro* das duas espécies estudadas, em especial a produção de PLB, pois essas estruturas têm grande importância na produção em massa de plantas clonais, tanto para produção de plantas de vasos quanto para flores de corte (Cardoso *et al.* 2022). Eventuais resultados negativos podem ser ajustados, já que diversos fatores podem influenciar a fase de multibrotação: temperatura, pH, intensidade luminosa e qualidade da luz, além da composição do meio (adição de CA e componentes orgânicos, fontes de carboidratos, etc.) e da influência dos reguladores de crescimento isolados ou combinados (Vogel & Macedo 2011; Wang & Irving 2011; Lin *et al.* 2020; Nazir *et al.* 2022).

### **7.5. Alongamento em BIT e em meio gelificado com e sem adição de carvão ativado**

O alongamento de orquídeas micropropagadas possui algumas regras gerais, contudo, seria esperado que cada planta ou grupo de plantas aparentadas tivessem necessidades próprias e demandassem procedimentos específicos para essa etapa (Arditti 2008; Sarmah *et al.* 2017; Mayo-Mosqueda *et al.* 2022). Protocolos individuais ou *clusters* de PLB (Samala *et al.* 2014; Parthibhan *et al.* 2015; Picolotto *et al.* 2017; Silva *et al.* 2017; An *et al.* 2021) podem ser cultivados em meio apropriado até que ocorra o completo desenvolvimento da parte aérea e das raízes. Outra possibilidade é a aplicação da metodologia aperfeiçoada por Valvekens *et al.* (1988), conhecida como regeneração em dois passos. Nessa metodologia, o primeiro passo consiste em estimular a multiplicação dos explantes e no segundo momento estimular o alongamento do caule e indução de raízes. Esse resultado é obtido por meio da inversão do balanço Auxina/Citocinina em cada etapa. Esta técnica talvez seja a mais difundida, com diversos trabalhos que a empregaram: Das *et al.* (2007), Rodrigues

*et al.* (2015), Maharjan *et al.* (2019), Bhowmik *et al.* (2020a; 2020b), Souza *et al.* (2021), Vendrame *et al.* (2022), Zanello *et al.* (2022).

No presente estudo foram avaliados dois sistemas de alongamento por 120 dias: em meio gelificado com ágar e em Biorreator de Imersão Temporária (BIT). No primeiro sistema foi testado o alongamento com e sem adição de carvão ativado (CA). Para o alongamento em BIT, foram avaliados três intervalos entre as imersões: 2, 4 e 8 h. Para este último intervalo foi avaliado o efeito da combinação de 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (mesma combinação usada no tratamento T6 da fase de indução de multibrotação). Também foram avaliados os dados sobre brotos e raízes desenvolvidos nesta etapa, teores de clorofilas e pigmentos carotenoides e densidade estomática.

A sobrevivência dos explantes foi maior no alongamento em meio gelificado (Tabela 11), para ambas as espécies estudadas, não havendo diferença estatística entre os tratamentos e entre as duas espécies. Para *C. parviflorum*, o meio sem CA apresentou 100,00% de sobrevivência, enquanto que no meio com CA esse valor foi de 93,75%. No caso de *C. withneri*, os valores de sobrevivência para os meios sem e com CA foram de 93,75 e 100,00%, respectivamente. Ao final do alongamento em BIT, apenas dois tratamentos continham plântulas vivas: 4 e 8 h, ambos sem RC. *Cyrtopodium withneri* apresentou sobrevivência de 2,50 e 10,00% para 4 e 8 h, respectivamente. Para a *C. parviflorum* a sobrevivência observada foi de 2,50% apenas no intervalo de imersão de 8 h. Os explantes que morreram no alongamento em BIT se mostraram totalmente despigmentados ou ficaram castanhos ao final desta fase.

**Tabela 11.** Sobrevivência de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* micropropagadas submetidas a diferentes sistemas de alongamento. Carvão ativado (CA), BIT = Biorreator de imersão temporária com intervalos entre as imersões de 2, 4 e 8 h. RC = Reguladores de crescimento (1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA).

Alongamento	Ágar	Ágar + CA	BIT 2h	BIT 4h	BIT 8h	BIT 8h + RC
<i>C. parviflorum</i>	100,00 Aa	93,75 Aa	0,00 Ab	0,00 Ab	2,50 Ab	0,00 Ab
<i>C. withneri</i>	93,75 Aa	100,00 Aa	0,00 Ab	2,50 Ab	10,00 Ab	0,00 Ab

Médias na mesma linha acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias na mesma coluna seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados observados no presente trabalho, acerca do alongamento em meio gelificado, se mostraram similares aos observados na literatura analisada, com valores de sobrevivência elevados: *Dendrobium transparens* Wall ex Lindl (Bhowmik & Rahman 2020a), *Aerides multiflora* Roxb. (Bhowmik & Rahman 2020b), híbridos de *Phalaenopsis* (Zanello *et al.* 2022).

Mancilla-Álvarez *et al.* 2021 em seu trabalho com Inhame, *Colocasia esculenta* (L.) Schott, obtiveram sobrevivência de explantes próximas a 100% ao fim do alongamento em BIT e em meio

gelificado, sem diferença entre esses tratamentos. Esse resultado diferente completamente ao observado neste estudo em relação ao alongamento em BIT, onde a sobrevivência máxima, de 10%, ocorreu em apenas um tratamento. Por sua vez, a maioria dos tratamentos em BIT deste trabalho apresentou mortalidade de todos os explantes, resultado similar ao apresentado por Rodrigues *et al.* (2006) em trabalho sobre *Heliconia champneiana* Griggs cv. Splash., onde no intervalo de seis horas entre as imersões houve elevada mortalidade dos explantes e no intervalo de oito horas ocorreu a morte de 100% dos explantes, com completa oxidação do material.

Vários estudos relatam sucesso no alongamento em BIT, como o trabalho de Ramos-Castellá *et al.* (2014) sobre *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae), no qual avaliaram três métodos de alongamento: meio gelificado, imersão parcial em meio líquido e BIT, com alta sobrevivência dos explantes nos três métodos, não havendo diferença. Esses autores destacaram que apesar de não ter tido diferença estatística entre os métodos, as plantas produzidas em BIT apresentavam mais vigor. Em outro estudo sobre *V. planifolia*, Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu (2016) avaliaram três sistemas de imersão temporária e obtiveram elevadas taxas de sobrevivência de explantes, de maneira semelhante a outros estudos: Escalona *et al.* (1999), Parthibhan & Kumar (2015), Arellano-García *et al.* (2020), Zhang *et al.* (2022).

Mesmo exibindo bons resultados, o alongamento em BIT pode ocasionar dois graves problemas na cultura de tecidos: necrose (Vidal & Sánchez 2019) ou hiperhidricidade (Yancheva *et al.* 2019). Para solucionar esses problemas ajustes devem ser feitos na composição do meio de cultivo, como a alteração nas concentrações do RC e de açúcares, adição de cálcio e boro (Martin *et al.* 2007; Machado *et al.* 2014; Silva *et al.* 2020); e ajustes no intervalo entre as imersões (Debnath 2011; Zhang *et al.* 2018a).

De maneira similar ao observado sobre a sobrevivência dos brotos de *C. parviflorum* e *C. withneri* em diferentes sistemas de alongamentos, a quantidade de brotos e o número de folhas produzidas e a altura da parte aérea dos brotos, os tratamentos em BIT se mostraram pouco efetivos (Tabela 12). Para *C. parviflorum*, o maior número de brotos ocorreu no alongamento realizado em ágar sem adição de CA. Em *C. withneri*, o maior número de brotos também ocorreu no cultivo em ágar sem CA, mas não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Para ambas as espécies, os brotos desenvolvidos no alongamento em BIT ocorreram no intervalo entre imersões de 8 h para as duas espécies, e também no intervalo de 4 h para *C. withneri*. O número de folhas não apresentou diferença entre as duas espécies no cultivo em meio gelificado com e sem a adição CA, variando de 5,00-5,13 cm, sem diferir estatisticamente. A altura da parte aérea para as duas espécies também foi maior no alongamento em meio gelificado, tendo *C. withneri* apresentado as maiores alturas, 16,66 e 16,32 cm para o cultivo com e sem CA, respectivamente, sem diferença estatística entre elas.



*Cyrtopodium parviflorum* apresentou diferença estatística entre os valores das duas maiores alturas observadas: 9,10 e 7,54 cm, em meio com e sem CA, respectivamente.

**Tabela 12.** Dados sobre a parte aérea de brotos de *C. parviflorum* e *C. withneri* submetidos a diferentes sistemas de alongamento. Carvão ativado (CA), Biorreator de imersão temporária com intervalos entre as imersões de 2, 4 e 8 h (BIT 2h, 4h e 8h, respectivamente), Reguladores de crescimento na combinação de 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (RC). Número de brotos maiores e menores que 1 cm (Brotos<sup>+1cm</sup> e Brotos<sup>-1cm</sup>, respectivamente), Número de folhas (NF), Altura da parte aérea em cm (APA).

	Tratamento	Brotos <sup>+1cm</sup>	Brotos <sup>-1cm</sup>	NF	APA
<i>C. parviflorum</i>	Agar	0,94 Aa	0,63 Aa	5,00 Aa	7,54 Bb
	Agar + CA	0,44 Ab	0,25 Aab	5,06 Aa	9,10 Ba
	BIT 2h	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Ac
	BIT 4h	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Ac
	BIT 8h	0,03 Ab	0,03 Ab	0,18 Ab	0,21 Ac
	BIT 8h + RC	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Ac
<i>C. withneri</i>	Agar	0,88 Aa	0,50 Aa	5,06 Aa	16,32 Aa
	Agar + CA	0,56 Aa	0,44 Aa	5,13 Aa	16,66 Aa
	BIT 2h	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
	BIT 4h	0,00 Aa	0,03 Aa	0,00 Aa	0,12 Ab
	BIT 8h	0,03 Aa	0,10 Aa	0,68 Ab	0,86 Ab
	BIT 8h + RC	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa

Dentro da mesma coluna, médias relativas à espécie acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias relativas ao mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Samala *et al.* (2014) analisaram o alongamento de brotos de *Grammatophyllum speciosum* em meio ½ MS adicionado de CA com e sem a suplementação de 1 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e ANA, respectivamente. A adição dos RC promoveu a proliferação dos *cluster* e não proporcionou o alongamento dos brotos, gerando 7,60 brotos menores que 3 cm e 2,00 brotos maiores que 3 cm. Por sua vez, o alongamento em ½ MS sem RC gerou 6,67 brotos maiores que 3 cm e 1,40 broto menor que 3 cm. Esses resultados superam os obtidos no presente estudo, uma vez que o número de brotos em todos os tratamentos não passou de 1,00. No trabalho de Parthibhan *et al.* (2015) sobre *Dendrobium aqueum* Lindley, os autores avaliaram o efeito de quatro citocininas, BAP, N6-[2-isopentil] adenina (2iP), Cinetina e Tidiazuron (TDZ) na fase de alongamento. O número de brotos variou de 0,80-5,00, sendo (2iP) a citocinina mais eficiente. Apenas dois tratamentos produziram brotos iguais ou maiores que 1 cm, 3 e 7 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ, respectivamente com 1,00 e 1,37 cm de comprimento.

Em todos os tratamentos deste trabalho foram produzidos brotos, cujo o menor comprimento, 0,45 cm, ocorreu no tratamento com adição de 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. A produção de brotos menores de 1 cm se apresentou como uma diferença significativa em relação ao comportamento de

*C. parviflorum* e *C. withneri*, uma vez que essas espécies só produziram brotos desse tamanho em três e quatro tratamentos, respectivamente. Contudo, ambas as espécies produziram brotos maiores que 1 cm em três tratamentos, sendo que dois desses tratamentos, meio gelificado sem e com adição de CA, tiveram médias, respectivamente, de 7,54 e 9,10 cm para *C. parviflorum* e de 16,32 e 16,66 cm para *C. withneri*.

O trabalho de Arellano-García *et al.* (2020) apresentou elevado número de brotos e alturas máximas de parte aérea com certa similaridade ao nosso trabalho. Esses autores realizaram o alongamento de explantes em três condições diferentes: i. em meio ½ MS gelificado com oito combinações de ANA e BAP; ii. em meio ½ MS gelificado com seis combinações do fertilizante orgânico Chitosan; iii. Em BIT do tipo RITA<sup>®</sup> com imersão por 1 min a cada 6 h, tendo usado meio líquido com as mesmas seis concentrações de Chitosan de ii. O número de brotos foi avaliado apenas nas duas últimas condições de cultivo. No cultivo em meio semissólido com adição de Chitosan o número de brotos variou de 2,00 (5 e 20 mg.L<sup>-1</sup>) a 2,60 (10 mg.L<sup>-1</sup>). O alongamento em BIT resultou em um número de brotos que variou de 18,00 (20 mg.L<sup>-1</sup>) a 48,00 (10 mg.L<sup>-1</sup>). Em relação à altura da parte aérea, o menor e o maior comprimento foram os seguintes: meio gelificado com adição de RC: 4,10-5,73 cm; meio gelificado adicionado de Chitosan 9,00-17,06 cm; e alongamento em BIT com adição de Chitosan: 12,80-15,40 cm. Bhowmik & Rahman (2020a) em seu estudo sobre *Dendrobium transparens* testaram 18 combinações diferentes de RC (BAP, Cinetina, Picloram, ANA, AIA e AIB) e sacarose para cultivo em meio gelificado, e obtiveram brotos variando de 4,48-4,97 cm de altura. Dutra *et al.* (2009) no seu estudo acerca de *Cyrtopodium punctatum*, analisou o efeito de três diferentes fotoperíodos sobre a espécie, e observou que os tratamentos apresentaram o seguinte número de brotos em relação ao número de horas de luz: 1,06 (8 h), 1,23 (12 h) e 1,28 (16 h). Para esses tratamentos a altura da parte aérea foi: 6,20, 5,93 e 7,00 cm, respectivamente.

Em relação ao número de folhas, os tratamentos analisados apresentaram 4,51 4,49 e 4,33, respectivamente. Os dados de Paulino *et al.* (2021) sobre *Cyrtopodium cachimboense* L.C. Menezes obtiveram resultados próximos ao de Dutra *et al.* (2009), com brotos variando de 5,52-8,34 cm e número de folhas de 3,6-5,0. Tanto *C. parviflorum*, quanto *C. withneri* apresentaram a parte aérea maior que a de *C. punctatum* e *C. cachimboense*, em especial *C. withneri*, que apresentou mais que o dobro da maior altura dessas duas espécies. Esse é um dado significativo, pois as três espécies têm portes similares quando adultas, evidenciando um maior crescimento de *C. withneri* (Menezes 2000; Dutra *et al.* 2009). Oliveira *et al.* (2023) no estudo sobre *Cyrtopodium aliciae* L. Linden & Rolfe realizaram o alongamento e enraizamento em uma etapa única, 270 dias, sem emprego de RC. Foi avaliado o desenvolvimento em três meios VW, KC e ½ MS, com obtenção, respectivamente, de 1,50, 1,30 e 1,60 broto acima de 1 cm. Esses valores são superiores aos observados no nosso trabalho.

Por último, o estudo de Rodrigues *et al.* (2015) sobre *C. saintlegerianum* avaliou o alongamento em meio gelificado contendo Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>), tendo obtido crescimento em todos os tratamentos. A menor e a maior altura observadas foram de 2,29 cm (0 mg.L<sup>-1</sup>) e 8,10 cm (10 mg.L<sup>-1</sup>), respectivamente. Apesar da indução de brotos em todos os tratamentos, *C. saintlegerianum* apresentou a maior altura da parte aérea em meio com RC, enquanto que *C. parviflorum* e *C. withneri* tiveram alongamento da parte aérea sem RC, cabendo destacar que *C. saintlegerianum* possui tamanho adulto similar ao de *C. withneri* e praticamente o dobro de *C. parviflorum* (Menezes 2000).

A fase de alongamento produziu raízes apenas nos meios gelificados com e sem adição de CA (Tabela 13). Não houve diferença estatística entre o número de raízes nos dois tratamentos para a mesma espécie e entre o mesmo tratamento para as duas espécies. Entre os tratamentos, houve diferença no comprimento da maior raiz (CMaR) para as duas espécies, e no caso de *C. withneri*, o comprimento médio das raízes (CR) apresentou diferença.

**Tabela 13.** Dados sobre raízes de brotos de *C. parviflorum* e *C. withneri* submetidos a diferentes sistemas de alongamento. Carvão ativado (CA), Biorreator de imersão temporária com intervalos entre as imersões de 2, 4 e 8 h (BIT 2h, 4h e 8h, respectivamente), Reguladores de crescimento na combinação de 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (RC). Número de raízes (NR); Comprimento da maior raiz (CMaR), Diâmetro da maior raiz (DMaR) e Comprimento das raízes (CR) expressos em cm.

	Tratamento	NR	CMaR	DMaR	CR
<i>C. parviflorum</i>	Agar	5,50 Aa	5,11 Ab	0,15 Aab	2,79 Aa
	Agar + CA	4,75 Aa	6,09 Aa	0,41 Aa	3,03 Ba
	BIT 2h	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ab	0,00 Ab
	BIT 4h	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ab	0,00 Ab
	BIT 8h	0,13 Ab	0,02 Ac	0,01 Ab	0,01 Ab
	BIT 8h + RC	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ab	0,00 Ab
<i>C. withneri</i>	Agar	4,00 Aa	5,83 Ab	0,30 Aa	3,37 Ab
	Agar + CA	4,75 Aa	7,78 Aa	0,18 Aab	4,97 Aa
	BIT 2h	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac
	BIT 4h	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ab	0,00 Ac
	BIT 8h	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ab	0,00 Ac
	BIT 8h + RC	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ab	0,00 Ac

Dentro da mesma coluna, médias relativas à espécie acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias relativas ao mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na rotina dos laboratórios de cultura de tecidos vegetais geralmente se emprega a indução de raízes após a indução de multibrotação e alongamento dos brotos (Costa *et al.* 2013). Dessa forma, há um número bem menor de trabalhos cuja fase de alongamento e enraizamento ocorrem de forma concomitante.

Sopalum *et al.* (2010) não obtiveram êxito no enraizamento de plântulas de *Grammatophyllum speciosum* em meio sem adição de RC. O comprimento das raízes variou de 0,4-2,2 cm, com o melhor resultado para duas combinações de ANA/BAP: 0,5/2,0 e 1,0/1,0 mg.L<sup>-1</sup>. Paudel & Pant (2012) avaliaram o enraizamento de *Esmeralda clarkei* em três auxinas diferentes, ANA, AIA e AIB. Para esses tratamentos, o número de raízes variou, respectivamente, da seguinte forma: 1,25-3,00; 2,00-2,33; e 1,33-2,25, não havendo informações sobre diferença entre esses tratamentos. Para o comprimento das raízes, os referidos tratamentos apresentaram os respectivos comprimentos de raízes: 1,97-2,94; 1,25-1,67; e 1,00-1,75 cm, também sem mencionar diferenças estatísticas. Tanto *C. parviflorum* quanto *C. withneri* apresentaram número de raízes maior que quatro, tendo *C. parviflorum* cultivado em meio sem CA apresentado número de raízes maior que cinco. As duas espécies estudadas apresentaram comprimento de raízes maiores que 3 cm, exceto *C. parviflorum* em meio gelificado sem CA. *Cyrtopodium withneri* apresentou o maior comprimento de raiz entre as duas espécies, 4,97 cm.

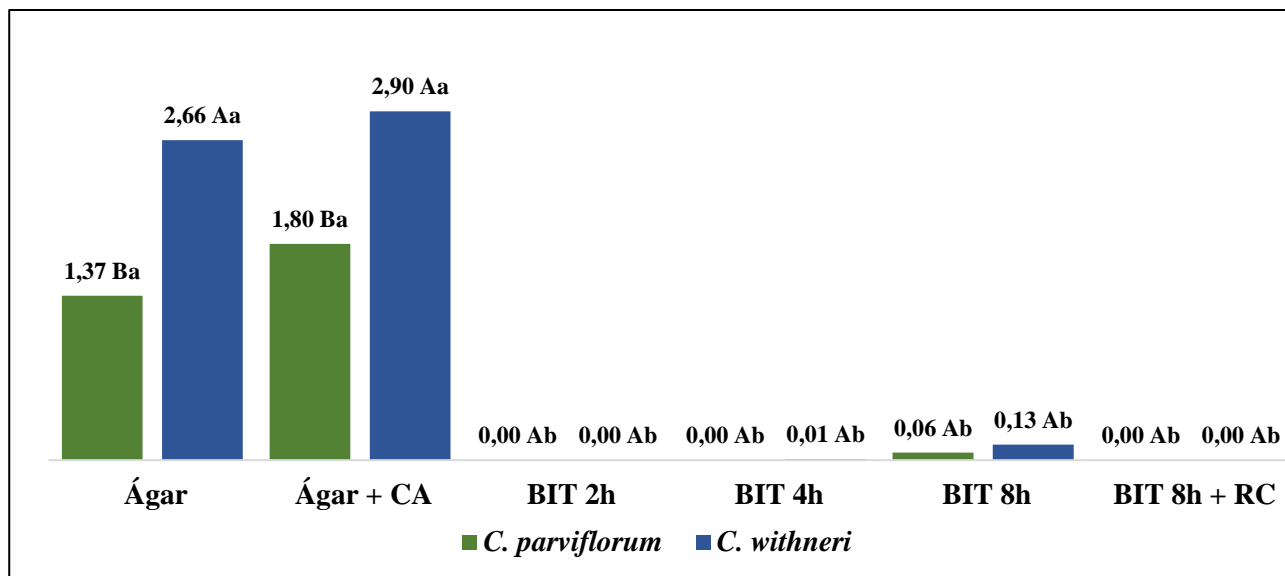
Bhowmik & Rahman (2020a) obtiveram resultados similares aos de Paudel & Pant (2012), tendo observado enraizamento de brotos de *Dendrobium transparens* em todas as concentrações de ANA, AIB e AIA usadas, e no meio sem adições dessas auxinas. O enraizamento em meio sem RC foi o segundo mais eficiente com 1,56 raiz e 2,18 cm de comprimento. A concentração de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIA promoveu o maior número de raiz, 1,74, e maior comprimento médio das raízes, 3,27 cm.

Em trabalhos sobre espécies de *Cyrtopodium*, o maior comprimento de raízes foi obtido por Dutra *et al.* (2009), 8,71 cm, com maior média do número de raízes de 4,45 raízes, ambos para fotoperíodo de 16 h. O maior número de raízes foi observado por Rodrigues *et al.* (2015) no alongamento sem adição de GA<sub>3</sub> foi 6,60, e maior comprimento de raízes para 5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> foi 4,62 cm. Paulino *et al.* (2021) obtiveram os melhores resultados para raízes no alongamento em meio com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, ca. 5,30 raízes e 2,70 cm de comprimento.

Os trabalhos sobre *Cyrtopodium* apresentaram dados compatíveis com os resultados aqui obtidos, tendo ambas as espécies se comportado de maneira mais próxima a *C. cachimboense*. Contudo, os trabalhos comparados empregaram métodos diferentes para a indução de raízes: maior fotoperíodo, adição de RC e aumento na concentração de carboidratos. Dessa forma, é possível que em condições semelhantes o comportamento dessas espécies seja diverso do apresentado nos respectivos estudos.

Os dados de massa total mostraram que apenas os tratamentos realizados em meio gelificado foram eficientes (Figura 22). As plantas alongadas em BIT tiveram massa registrada apenas para o intervalo entre imersões de 8 h. *Cyrtopodium withneri* apresentou maior quantidade de massa fresca nos dois tratamentos em meio gelificado, sem diferença entre esses tratamentos, mas diferiu em

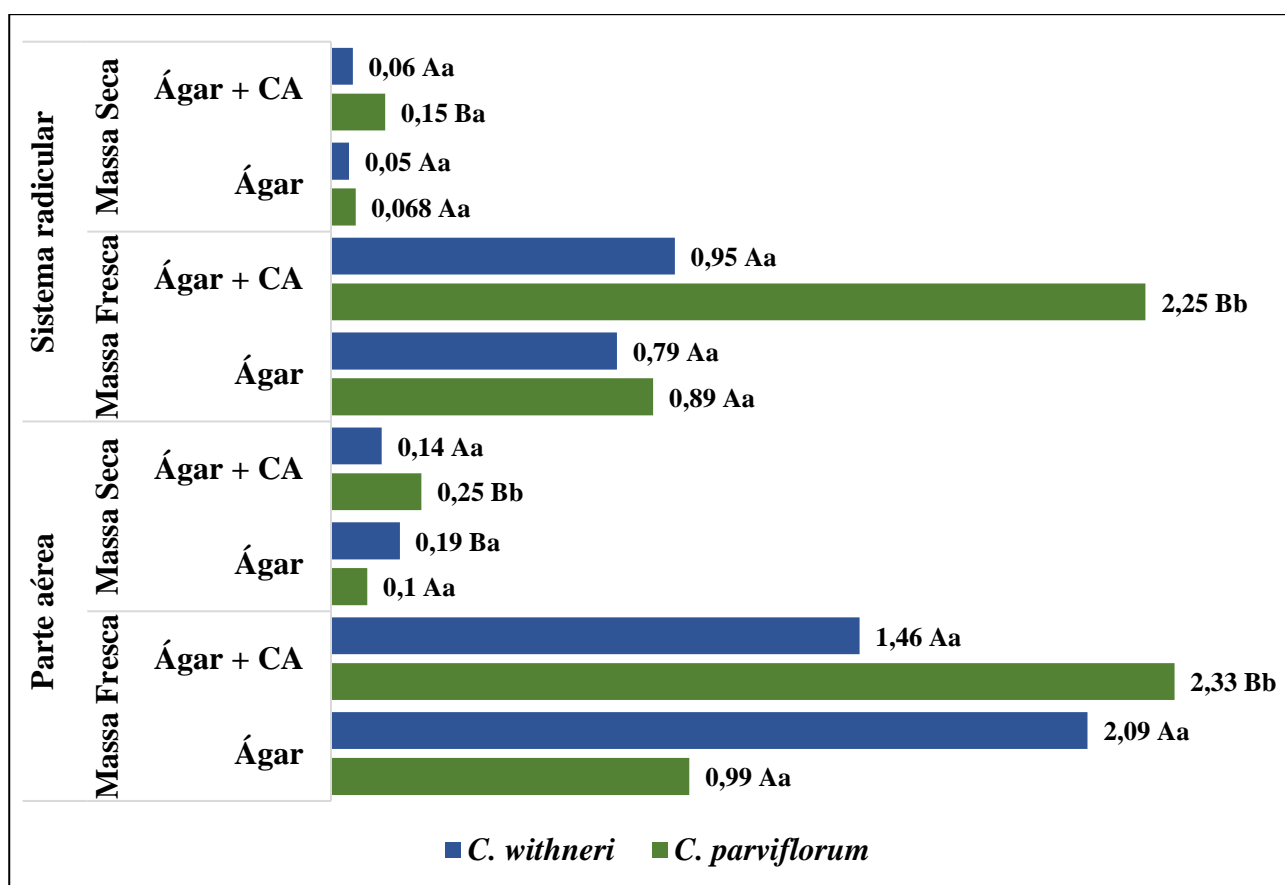
relação a *C. parviflorum*. Para ambas espécies, a maior massa registrada ocorreu no alongamento no meio com adição de CA, 1,80 g para *C. parviflorum* e 2,90 g para *C. withneri*. A partição de massa fresca e seca entre parte aérea e sistema radicular apresentou comportamento diferente (Figura 23). Os valores de massa fresca de parte aérea e sistema radicular de *C. withneri* não apresentaram diferença entre os cultivos na presença de ou ausência de CA. Para *C. parviflorum*, a massa fresca da parte aérea e do sistema radicular foi maior em meio com CA, diferindo do meio sem adição de CA. A massa de ambas porções seguiu a mesma proporcionalidade das massas fresca para ambas espécies.



**Figura 22.** Massa total de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* submetidas a diferentes métodos de alongamento. Carvão ativado (CA), Biorreator de imersão temporária com intervalos entre as imersões de 2, 4 e 8 h (BIT 2h, 4h e 8h, respectivamente), Reguladores de crescimento na combinação de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA (RC). Massa expressa em gramas. Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dutra *et al.* (2008; 2009) estudaram a influência de três fotoperíodos, 8, 12 e 16 h, no alongamento de *Bletia purpurea* (Lamark) DC e *Cyrtopodium punctatum*. Os resultados de massa fresca total registrados para os três fotoperíodos foram, respectivamente, 0,19; 0,28; e 0,36 g, para a primeira espécie, e 0,021, 0,023 e 0,029 g, para a segunda espécie. Utami & Hariyanto (2019) avaliaram o alongamento de plântulas de *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm em meio VW com água de côco e quatro concentrações diferentes de homogenato de banana, tendo observado valores de massa fresca total de 0,012-0,016 g. Para *C. cachimboense* (Paulino *et al.* 2021), a massa fresca total observada variou de valores 0,34-0,80 g. Para *Cyrtopodium aliciae*, Oliveira *et al.* (2023) obtiveram a maior massa fresca total, ca. 1,7 g, no cultivo em  $\frac{1}{2}$  MS. A massa fresca total obtida para VW e KC, ca. 0,8 g, não apresentou diferença entre os dois tratamentos. Nota-se que os valores de massa fresca total apresentados nos trabalhos analisados estiveram abaixo de 1 g, com exceção de *C. aliciae*, cujo

valor se assemelha ao de *C. parviflorum*. Os valores de massa fresca total para *C. withneri* foram maiores que 2 g, chegando quase a 3 g no cultivo em meio adicionado de CA. A partição de massa de *C. parviflorum* e *C. punctatum* se mostrou semelhante, com maior proporção no sistema radicular. Para *C. withneri* foi observado o inverso, i.e., maior alocação de massa fresca na parte aérea, de forma similar ao visto em *Bletia purpurea*. A partição da massa seca não apresentou diferenças neste estudo ou nos demais analisados. De acordo com Peres *et al.* (2001) o padrão na partição de massa entre parte aérea e sistema radicular pode variar não apenas entre espécies, mas dentro da mesma espécie, com genótipos tendo preferência de alocação de massa no sistema radicular e outro na parte aérea.

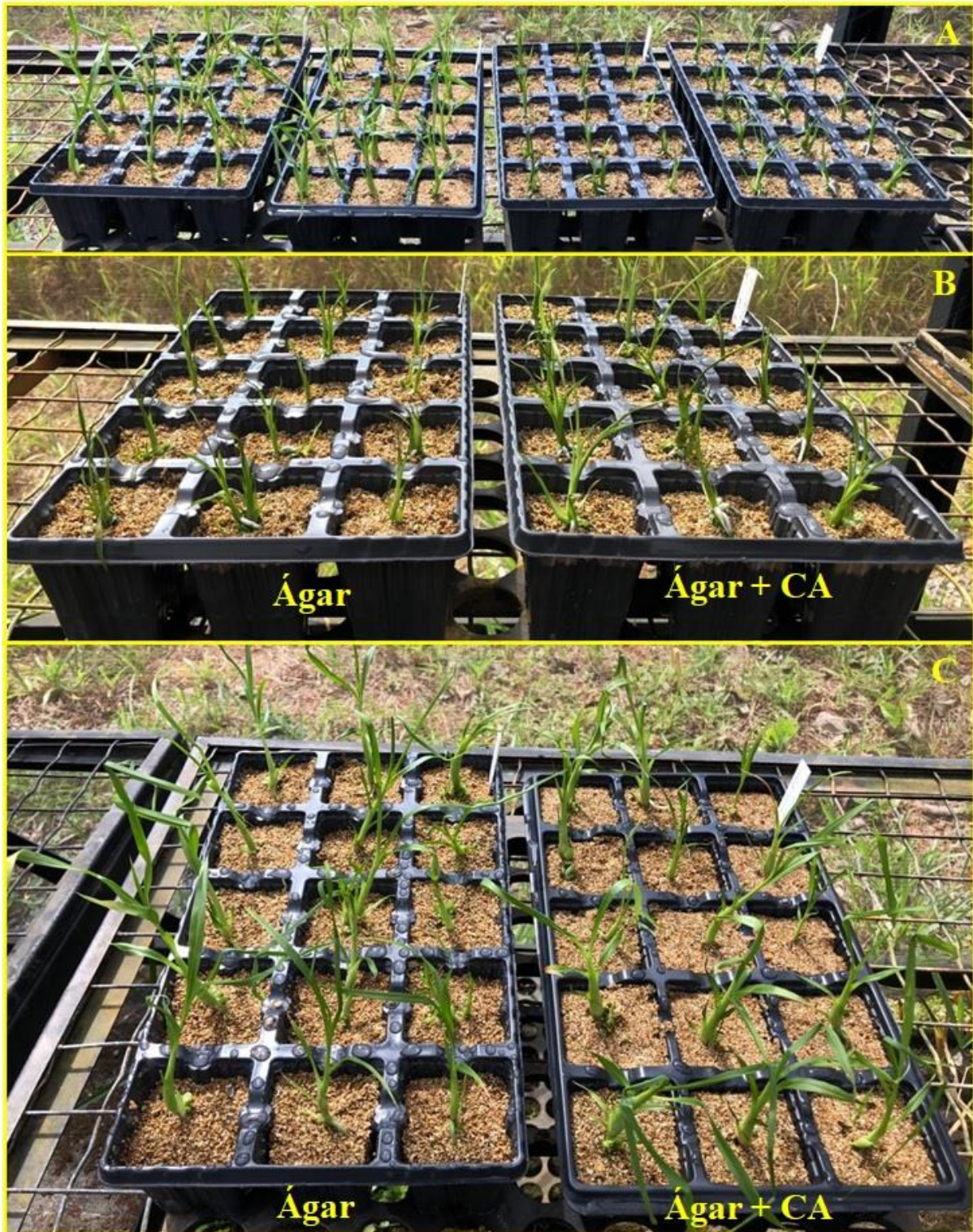


**Figura 23.** Valores médios das massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular de plântulas micropropagadas de *C. parviflorum* e *C. withneri* alongadas em dois sistemas de alongamento, ágar e ágar + carvão ativado (CA). Valores expressos em gramas. Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

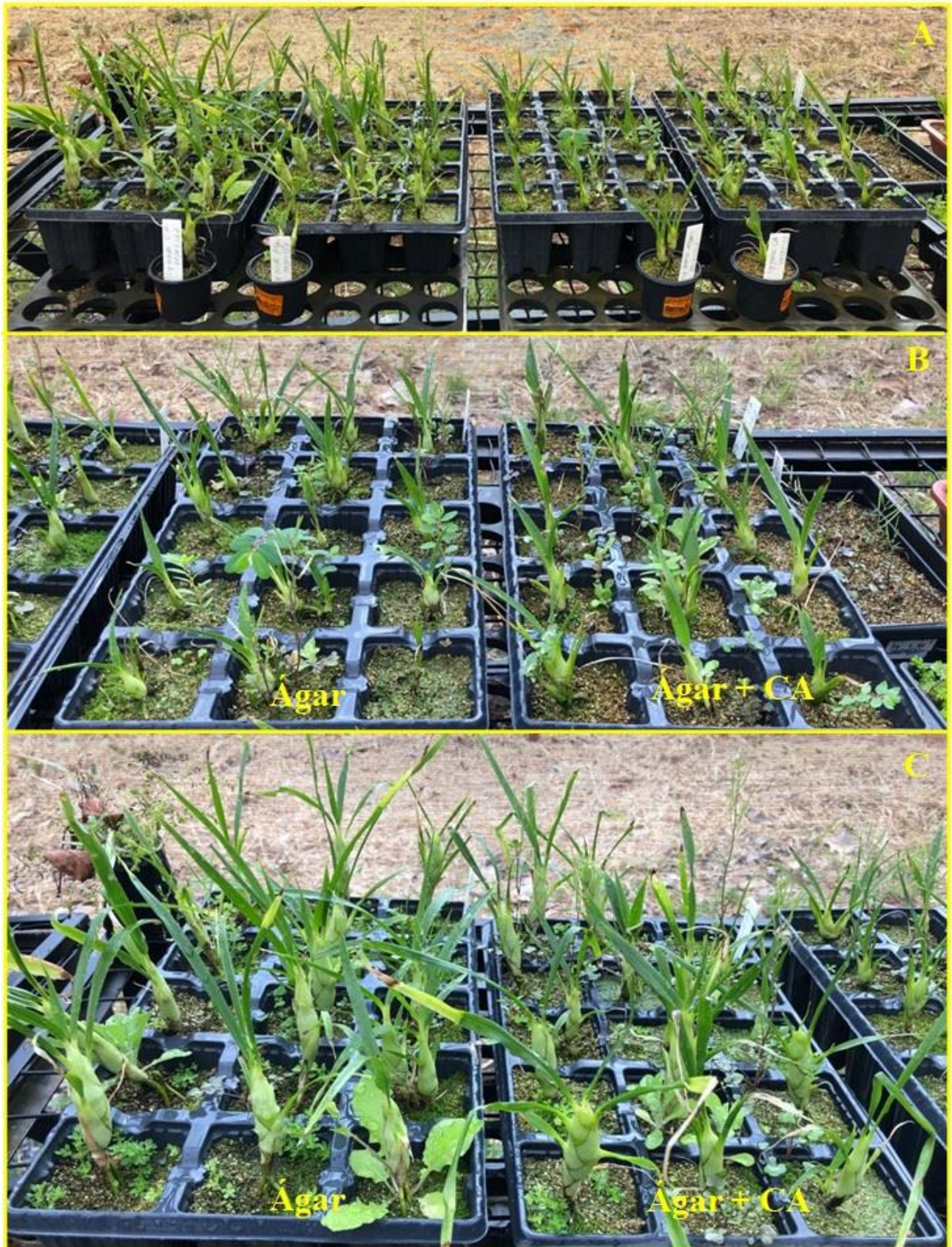
## 7.6. Aclimatização em casa de vegetação de plantas micropropagadas

Após 100 dias de aclimatização as plantas de ambas as espécies se mostraram robustas, com desenvolvimento de raízes e crescimento e expansão dos pseudobulbos (Figuras 24-27). Verificou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos aplicados à mesma espécie ou entre as

espécies quando comparados os mesmos tratamentos. As duas espécies apresentaram sobrevivência acima de 90%, com *C. withneri* apresentando 100% de sobrevivência das plantas oriundas de ambos os tratamentos (Tabela 14).



**Figura 24.** Primeiro dia de aclimatização em casa de vegetação. A. Visão das bandejas contendo as plantas dos quatro tratamentos analisados. B. Plantas de *C. parviflorum* provenientes da etapa de alongamento em ágar e ágar adicionado de carvão ativado (CA). C. Plantas de *C. withneri* provenientes da etapa de alongamento em ágar e ágar adicionado de carvão ativado (CA).



**Figura 25.** Centésimo dia de aclimatização em casa de vegetação. **A.** Visão das bandejas contendo as plantas dos quatro tratamentos analisados. **B.** Plantas de *C. parviflorum* provenientes da etapa de alongamento em ágar e ágar adicionado de carvão ativado (CA). **C.** Plantas de *C. withneri* provenientes da etapa de alongamento em ágar e ágar adicionado de carvão ativado (CA).





**Figura 26.** Plantas com 100 dias de aclimatização. **A** e **C.** *C. parviflorum* e *C. withneri* com alongamento realizado em ágar sem adição de carvão ativado; **B** e **D.** *C. parviflorum* e *C. withneri* com alongamento realizado em ágar com adição de carvão ativado.



**Figura 27.** Destaque dos bulbos de plantas com 100 dias de aclimatização. **A e C.** *C. parviflorum* e *C. withneri* com alongamento realizado em ágar sem adição de carvão ativado; **B e D.** *C. parviflorum* e *C. withneri* com alongamento realizado em ágar com adição de carvão ativado. Barra de escalas em cm: **A.** 1,1; **B.** 1,2; **C.** 1,4 e **D.** 1,8.

**Tabela 14.** Sobrevivência aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Valores em porcentagem.

Método de alongamento	Ágar	Ágar + CA
<i>Cyrtopodium parviflorum</i>	94 Aa	94 Aa
<i>Cyrtopodium withneri</i>	100 Aa	100 Aa

Médias na mesma linha acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias na mesma coluna seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com Hazarika (2003), plantas cultivadas *in vitro* encontram-se em condições de alta umidade, baixa luminosidade, limitações para realização das trocas gasosas, meios geralmente suplementados com alguma fonte de carbono (vários tipos de açúcares podem ser empregados) e influência de RC. Pospíšilová *et al.* (1999) destacam que essas condições levam à formação de plantas com diversas anormalidades, especialmente em folhas e raízes, e que ao passarem para a aclimatização, as condições mencionadas se alteram drasticamente, e a planta experimenta condições de menor umidade e maior irradiância, e em razão disso muitas plantas morrem nessa etapa. Então, para que se tenha sucesso na aclimatização, os fatores que favoreçam o sucesso nessa etapa devem ser implementados: seleção de plântulas de bom aspecto, controle da luminosidade, temperatura e umidade relativa, escolha do recipiente e substrato adequado, promoção de adubação e nutrição apropriadas, além do controle de pragas (Chandra *et al.* 2010; Irsyadi 2021; Kim *et al.* 2021).

Na literatura há vários trabalhos que apresentam dados sobre aclimatização. Contudo, nem sempre há uma descrição pormenorizada da metodologia empregada, em especial o tipo de substrato usado. Por isso, em alguns trabalhos citados há menção apenas da sobrevivência, sem detalhes sobre o substrato.

Na aclimatização de *Cymbidium devonianum* Paxt., Das *et al.* (2007) testaram cinco substratos em diferentes proporções de musgo, serapilheira (liteira), fibra de côco, tijolo picado, carvão e esterco. O substrato composto por tijolo picado, carvão e liteira (1:1:1) com musgo resultou em 90% de sobrevivência. Esse substrato adicionado de fibra de côco apresentou a menor sobrevivência, 45%. Dutra *et al.* (2008) obtiveram sobrevivência de 98.8% de sobrevivência na aclimatização de *Bletia purpurea*, com avaliação de quatro substratos comerciais: i. esfagno chileno; ii. Fafard® Mix 2 (55% esfagno, 20% perlita, 25% vermiculita); iii. Fafard Mix 2:areia (1:1 v:v); iv. Fafard Mix 4 (esfagno canadense, perlita, calcário dolomítico, agente umectante e composto à base de silício). Lesar *et al.* (2012) fizeram a avaliação da aclimatização de *Bletilla striata* Rchb.f. em três substratos orgânicos comerciais de baixa a média fertilidade (Tonsubstrat®, Baltisches substrat® e Royal-Garden®) e obtiveram sobrevivência de 95-97%. Mohanty *et al.* (2012) usou uma mistura de carvão, tijolo picado e vermicomposto (composto obtido da compostagem de matéria orgânica vegetal) que resultou em 88% de sobrevivência.

No trabalho de Parthibhan *et al.* (2015) sobre *Dendrobium aqueum*, as plantas passaram por um processo de pré-aclimatização, que consistiu em cultivar as plantas por cinco semanas em meio ½ MS gelificado sem adição de sacarose e CA. Após esse período as plantas foram retiradas dos frascos, transferidas para vasos com carvão e tijolo picado (1:1) cobertos por musgo, e mantidas em cultivo em ambiente com iluminação artificial e temperatura constante de 25 °C por 4-6 semanas. Finalizada essa etapa as plantas foram transferidas para casa de vegetação. Neste trabalho a

sobrevivência observada foi de 96%. Silva *et al.* (2017) revisaram a literatura acerca da aclimatização de plantas de *Dendrobium*, cobrindo 29 trabalhos publicados com informações sobre 22 espécies e 7 híbridos. Desses trabalhos, 11 apresentaram sobrevivência acima de 90%, apenas quatro com 100% de sobrevivência e um trabalho apresentou 25% de sobrevivência, o menor percentual. Lakshanthi & Seran (2019) investigaram a aclimatização de uma espécie de *Dendrobium* em diferentes proporções fibra de côco, carvão, tijolo, carvão e pedrisco, em um total de oito tratamentos, com sobrevivência observada entre 33,3 e 90,0%. Juras *et al.* (2019) testaram a aclimatização de *Cattleya xanthina* (Lindl.) Van den Berg em dois substratos: *Sphagnum* e *Sphagnum* com casca de *Pinus*, com sobrevivência de 64 e 68%, respectivamente.

Os dados deste trabalho se mostraram similares a trabalhos com sobrevivências maiores ou iguais a 90% após a aclimatização (Das *et al.* 2007; Dutra *et al.* 2008; Lesar *et al.* 2012; Parthibhan *et al.* 2015), e superiores a outros trabalhos, com valores abaixo de 70% (Mohanty *et al.* 2012; Juras *et al.* 2019; Lakshanthi & Seran 2019).

Os estudos analisados sobre a sobrevivência de plantas de *Cyrtopodium* cultivadas *in vitro* após a aclimatização mostraram similaridade com as espécies aqui estudadas, *C. parviflorum* e *C. withneri*. Dutra *et al.* (2009) em seu estudo sobre *C. punctatum* apenas mencionaram 90% de sobrevivência, sem apresentarem dados mais pormenorizados. Guo *et al.* (2010) citam que obtiveram sucesso na aclimatização de *C. paranaense* Schltr. (= *C. flavum* Link & Otto ex Rchb.f.), mas não informaram os percentuais. Rodrigues *et al.* (2015) realizaram a aclimatização com uma mistura de substrato comercial e bainhas de palmeira Acuri (*Attalea phalerata* Mart. ex Spreng.), forófito sobre o qual *C. saintlegerianum* naturalmente vegeta. Foi observado que plantas alongadas sem a presença de GA<sub>3</sub> tiveram sobrevivência de 90%, enquanto que aquelas que foram alongadas com a concentração máxima desse RC tiveram sobrevivência de 50%. Picolotto *et al.* (2017) realizaram a aclimatização em substrato comercial, com 90% de sobrevivência. Stefanello *et al.* (2020) obtiveram 100% de sobrevivência de plântulas de *Cyrtopodium flavum*. Oliveira *et al.* (2023) obtiveram diferentes percentuais de sobrevivência para *C. aliciae* em razão do meio de cultivo usado no alongamento, os quais não receberam RC. O meio VW apresentou a menor sobrevivência (63,33%), em seguida veio KC (70,00%) e 1/2 MS (96,67%). Neste estudo foi usado como substrato uma mistura de musgo e casca de *Pinus* (1:1). Com exceção de *C. aliciae* em dois dos três meios usados no alongamento, tanto o nosso estudo quanto os demais estudos, obtiveram sucesso acima de 90% na aclimatização. Esses percentuais de sobrevivência mostram que as espécies do gênero se adaptam bem ao processo de aclimatização, e mostra que é viável a produção *in vitro* de *C. parviflorum* e *C. withneri*, além de outras espécies do gênero, pois, segundo Irsyadi (2021) a taxa de sobrevivência na

aclimatização alcança 40-60%, e em algumas culturas esse número seria bastante baixo, ca. 10%, valores bem abaixo dos verificados para as espécies de *Cyrtopodium*.

A análise do número de brotos foi realizada para duas categorias: i. brotos maiores que 1 cm; e ii. brotos menores que 1 cm (Tabela 15). Para a primeira categoria, *C. parviflorum* e *C. withneri* apresentaram, respectivamente, 0,67 e 0,27 brotos, para plantas alongada em meio sem adição de carvão, e 0,27 e 0,47 brotos, para plantas alongadas em meio com CA. Para a segunda categoria, foram observados brotos apenas para *C. parviflorum*, 0,07 brotos para ambos os tratamentos empregados no alongamento. Em cada categoria, não houve diferença estatística entre os tratamentos para uma mesma espécie e entre as espécies submetidas ao mesmo tratamento. Também foram avaliados o número de folhas e a altura da parte aérea (Tabela 15). O menor número de folhas foi observado em plantas de *C. parviflorum* oriundas do alongamento sem CA, os demais tratamentos variaram de 5,40-6,07 cm, sem diferença estatística. *Cyrtopodium withneri* apresentou o maior comprimento da parte aérea, 17,20 e 18,37 cm, respectivamente, para plantas alongadas sem e com adição de CA, sem diferença entre esses tratamentos. A altura da parte aérea de *C. parviflorum*, 4,47 e 5,40 cm, para meio de alongamento sem e com CA, respectivamente, não apresentou diferença entre seus dois tratamentos, mas diferiu em relação a *C. withneri*.

**Tabela 15.** Dados sobre a parte aérea aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Número de brotos maiores e menores que 1 cm (Brotos<sup>+1cm</sup> e Brotos<sup>-1cm</sup>, respectivamente), Número de folhas (NF), Altura da parte aérea em cm (APA).

	Tratamento	Brotos <sup>+1</sup>	Brotos <sup>-1</sup>	NF	APA
<i>C. parviflorum</i>	Ágar	0,67 Aa	0,07 Aa	4,47 Ba	7,82 Ba
	Ágar + CA	0,27 Aa	0,07 Aa	5,40 Aa	9,71 Ba
<i>C. withneri</i>	Ágar	0,27 Aa	0,00 Aa	5,80 Aa	17,20 Aa
	Ágar + CA	0,47 Aa	0,00 Aa	6,07 Aa	18,37 Aa

Dentro da mesma coluna, médias relativas à espécie acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias relativas ao mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dutra *et al.* (2008) observaram de 1,16-1,45 brotos acima de 1 cm nos tratamentos usados na aclimatização. O comprimento dos brotos ao fim desta etapa variou de 12,8 a 16,4 cm. No estudo de Pitoyo *et al.* (2015) sobre *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl. com o uso de Chitosan nas

concentrações de 0,00, 0,50, 0,75 e 1,00 g.L<sup>-1</sup>, foi observado que concentrações mais altas não tiveram efeito positivo no comprimento dos brotos, e que o melhor resultado foi obtido na concentração de 0,50 g.L<sup>-1</sup>, com brotos de 1,20 cm de altura. As demais concentrações produziram brotos menores que 1 cm. No trabalho de Lakshanthi & Seran (2019) foram registrados apenas brotos acima de 1 cm, com variação de 2,06-4,46 cm de comprimento. Juras *et al.* (2019) observaram brotos de 3,2 cm para a aclimatização apenas em *Sphagnum*, e de 5,6 cm para aclimatização em casca de *Pinus* e *Sphagnum*. Febriani *et al.* (2019) no estudo sobre aclimatização da orquídea monopodial *Papillionanthe hookeriana* (Rchb. f.) Schltr. observaram que o substrato influencia a aclimatização mais do que a frequência de adubações. Nos quatro substratos analisados, fibra de côco, lã de rocha, aparas de madeira e raízes de samambaias, os comprimentos verificados foram: 2,09, 1,89, 3,60 e 2,94 cm, respectivamente. Dutra *et al.* (2009) não avaliaram dados de parte aérea ou sistema radicular. No estudo sobre *C. saintlegerianum* (Rodrigues *et al.* 2015), foi avaliado apenas o comprimento dos brotos ao final da aclimatização. Esses autores observaram que os RC ANA e BAP, mesmo quando usados isoladamente, tiveram efeito positivo sobre o comprimento dos brotos ao final dessa etapa. Por sua vez, o uso de GA3 teve efeito contrário no comprimento dos brotos. O meio sem qualquer RC produziu brotos de 5,34 cm. Já o melhor tratamento com RC foi o que usou apenas 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, resultando em brotos de 7,76 cm. Oliveira *et al.* (2023) no estudo sobre *C. aliciae* observaram o meio de alongamento influenciou o tamanho dos brotos ao final da aclimatização. O comprimento dos brotos foram os seguintes: 3,93 (VW), 4,26 (KC) e 8,02 cm (1/2MS). Os resultados do presente estudo mostraram que a espécie não foi afetada pelo alongamento na presença de CA. As duas espécies apresentaram diferença no comprimento dos brotos, mas esse resultado pode ser apenas a manifestação das características genéticas de cada espécie, já que elas apresentam portes bem diferentes na fase adulta. Em relação aos trabalhos sobre outras espécies, apenas o estudo sobre *Bletia purpurea* (Dutra *et al.* 2008) apresentou valores relativos ao comprimento dos brotos próximos ao de *C. withneri*.

Os dados relativos ao sistema radicular mostram que *C. withneri* apresentou raízes mais compridas que *C. parviflorum* (Tabela 16). O comprimento da maior raiz e o comprimento médio das raízes apresentou diferença entre as duas espécies. Para *Cyrtopodium withneri* não houve diferença entre as plantas oriundas dos dois tratamentos de alongamento. No caso de *C. parviflorum* houve diferença no comprimento da maior raiz, tendo as plantas alongadas em meio com CA desenvolvido raízes maiores. As outras variáveis, número de raízes e diâmetro da maior raiz não apresentaram diferença estatística.

Febriani *et al.* (2019) avaliaram o sistema radicular em relação a três frequências de adubação, a cada 2, 3 e 4 dias. Os valores relativos ao número/comprimento das raízes foi: 4,86/3,05

cm; 6,61/4,48 cm; e 5,84/4,19 cm, respectivamente. Lakshanthi & Seran (2019) registraram o número de raízes entre 6,36 e 14,86, e o comprimento da maior raiz de 3,83-13,26 cm. Em relação aos trabalhos a respeito de *Cyrtopodium*, Rodrigues *et al.* registraram 2,94-4,22 raízes para os tratamentos sem GA<sub>3</sub>, e 2,38-6,10 para os tratamentos cujo alongamento ocorreu em GA<sub>3</sub>. Para esses tratamentos o comprimento das raízes variou de 5,54-7,94 cm e 5,30-7,81 cm, respectivamente. Estes dados corroboram com aqueles obtidos no presente estudo, exceto, em relação ao número de raízes, que foi bem menor do que os apresentados por Lakshanthi & Seran (2019).

**Tabela 16.** Dados sobre raízes aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Número de raízes (NR); Comprimento da maior raiz (CMaR), Diâmetro da maior raiz (DMaR) e Comprimento das raízes (CR) expressos em cm.

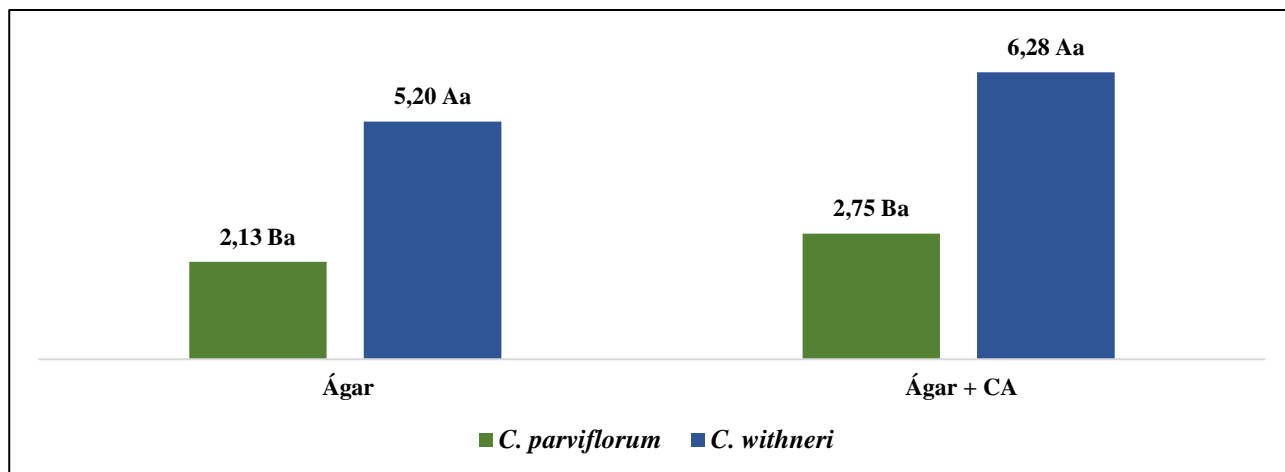
	Tratamento	NR	CMaR	DMaR	CR
<i>C. parviflorum</i>	Ágar	6,47 Aa	5,17 Bb	0,17 Aa	3,35 Ba
	Ágar + CA	5,20 Aa	7,25 Ba	0,20 Aa	4,36 Ba
<i>C. withneri</i>	Ágar	5,93 Aa	10,73 Aa	0,52 Aa	6,81 Aa
	Ágar + CA	5,67 Aa	11,80 Aa	0,23 Aa	7,15 Aa

Dentro da mesma coluna, médias relativas à espécie acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias relativas ao mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A massa total (Figura 28) e massa fresca e seca da parte aérea e sistema radicular (Figura 29) apresentaram diferença entre as duas espécies estudadas. A massa total de *C. withneri* e *C. parviflorum* apresentaram diferença estatística, sendo a da primeira espécie maior do que a da segunda. Dentro da mesma espécie não houve influência do uso de CA na fase de alongamento. A massa fresca e seca do sistema radicular, e massa seca da parte aérea não apresentaram diferença entre os tratamentos. A massa fresca da parte aérea de *C. withneri* apresentou diferença, sendo maior nas plantas alongadas com CA, 5,64 g vs 3,35 g. Em relação às duas espécies, a massa fresca de *C. withneri* diferiu da massa fresca de *C. parviflorum*, 5,64 e 1,47 g, respectivamente.

Dutra *et al.* (2008) anotaram a massa fresca total de *Bletia purpurea* após 150 dias de aclimatização variando de 1,00-1,83 g de plantas alongadas sem a presença de RC. Rodrigues *et al.* (2015) observaram massa fresca total de plantas aclimatizadas de *C. saintlegerianum* de 0,39 e 0,37 g, respectivamente, para plantas alongadas em 5 e 10 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, e entre 0,69 e 1,56 g para plantas

cujo alongamento foi realizado em várias combinações de ANA e BAP, mas sem a presença de GA<sub>3</sub>. Os dados sobre valores de massa fresca total para esta etapa se mostraram escassos na literatura. Os valores de massa fresca do total apresentado pelas espécies do presente estudo se mostraram superiores aos dois estudos comparados. Para *C. withneri* a massa fresca registrada foi de 5,20 e 6,28 g, para o alongamento feito sem e com adição de CA. Mesmo *C. parviflorum*, com massa de 2,13 e 2,75 g para os referidos tratamentos, mostrou valores superiores aos resultados encontrados por Dutra *et al.* (2008) e Rodrigues *et al.* (2015).

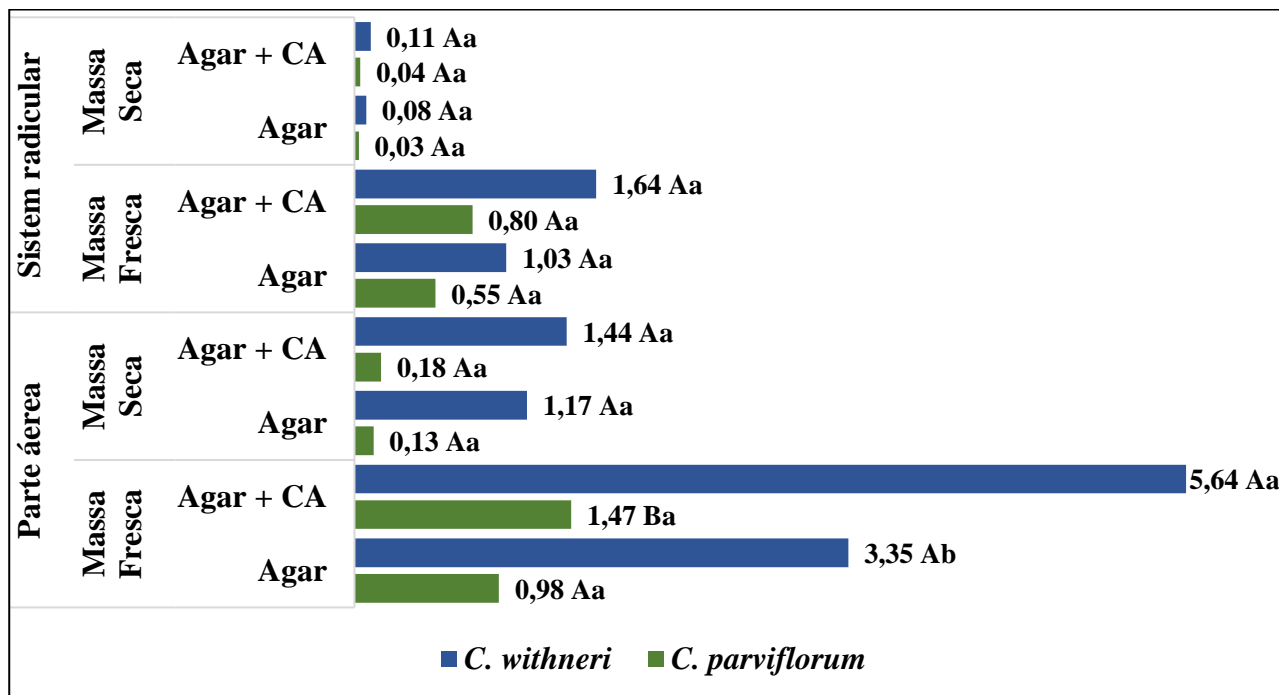


**Figura 28.** Massa total aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Massa expressa em gramas. Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados aqui apresentados mostram a viabilidade na aclimatização de plantas obtidas *in vitro* em casa de vegetação com emprego de vermiculita como substrato. As espécies estudadas apresentaram sobrevivência elevada, 94% para *C. parviflorum* e 100% para *C. withneri*. De forma geral, o uso de carvão ativado não influenciou a aclimatização das plantas. Os valores de massa total, massa seca e massa fresca particionada, estão dentro dos valores divulgados na literatura. Contudo, *C. withneri* apresentou valor de massa total bem superior às demais espécies divulgadas na literatura. Essa comparação deve ser analisada com parcimônia, uma vez que os dados publicados se referem a orquídeas de diferentes tamanhos, como *Grammatophyllum speciosum* que possui pseudobulbos vigorosos que podem alcançar até 3 m de altura (Sopalum *et al.* 2010), plantas monopodiais como *Esmeralda clarkei* (Paudel & Pant 2012), que não ultrapassam 1m de altura, ou plantas de 15 cm de altura sem pseudobulbos, como *Acianthera prolifera* (Herb. ex Lind.) Pridgeon & M. W. Chase (Koene *et al.* 2019). Outro ponto que dificulta a comparação entre os resultados é o processo de aclimatização em si. Há trabalhos que realizam pré-aclimatização *in vitro* (Parthibhan *et al.* 2015), uso



de biofertilizantes (Pitoyo *et al.* 2015), uso de diferentes substratos (Dutra *et al.* 2008; Lesar *et al.* 2012; Febriani *et al.* 2019). Mas ainda assim, a despeito da diversidade de metodologias empregadas na literatura, o procedimento empregado no nosso trabalho se mostrou adequado para as espécies estudadas (Chandra *et al.* 2010), e principalmente, a sobrevivência de *C. withneri* e *C. parviflorum* está acima da média da literatura, que é de 40-60% (Irsyadi 2021).

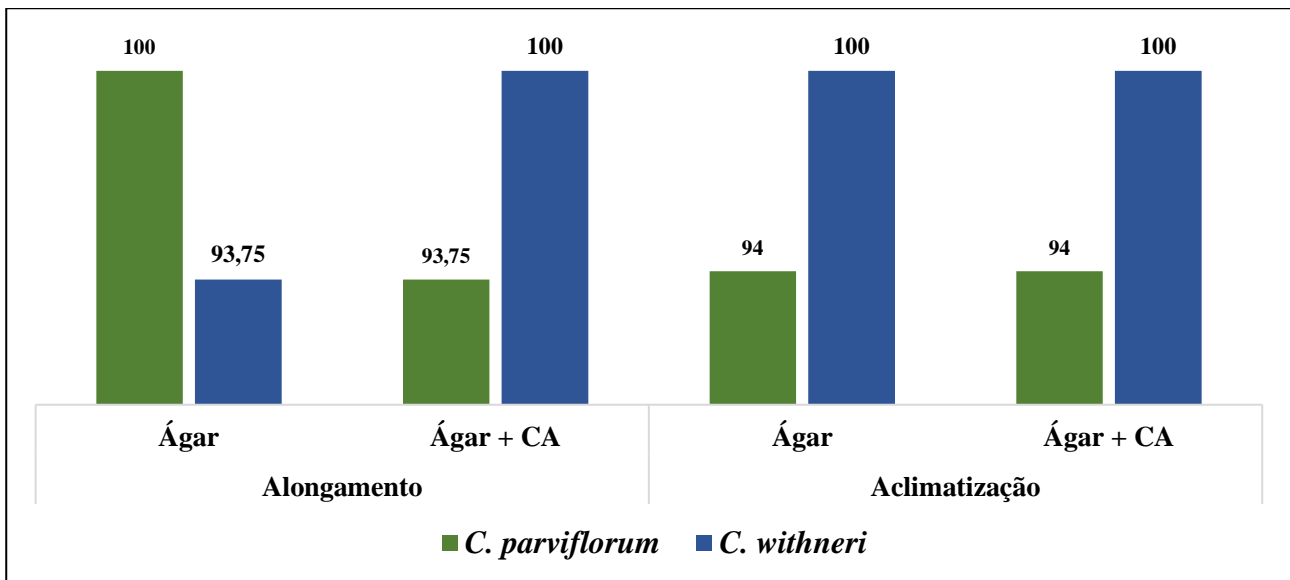


**Figura 29.** Massa fresca e seca aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação da parte área e sistema radicular de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Valores expressos em gramas. Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 7.7 Comparação entre as fases de alongamento e aclimatização

Em ambas as fases, a sobrevivência das duas espécies estudadas ficou acima de 90% (Figura 30). *Cyrtopodium withneri* não apresentou 100% de sobrevivência apenas na fase de alongamento no cultivo em meio sem CA. Em contraste, neste tratamento, foi o único em que se observou 100% de sobrevivência para *C. parviflorum*.

A etapa de alongamento tem primordialmente duas funções: alongar ou distender ao máximo o corpo da planta, e produzir raízes que serão fundamentais para a adaptação ao processo de aclimatização (Costa *et al.* 2013). Assim, na fase alongamento, a produção de brotos não é o objetivo principal, mas sim a produção de raízes e crescimento dos brotos, e assim garantir que ao final dessa etapa as plantas tenham vigor para sobreviver à aclimatização.

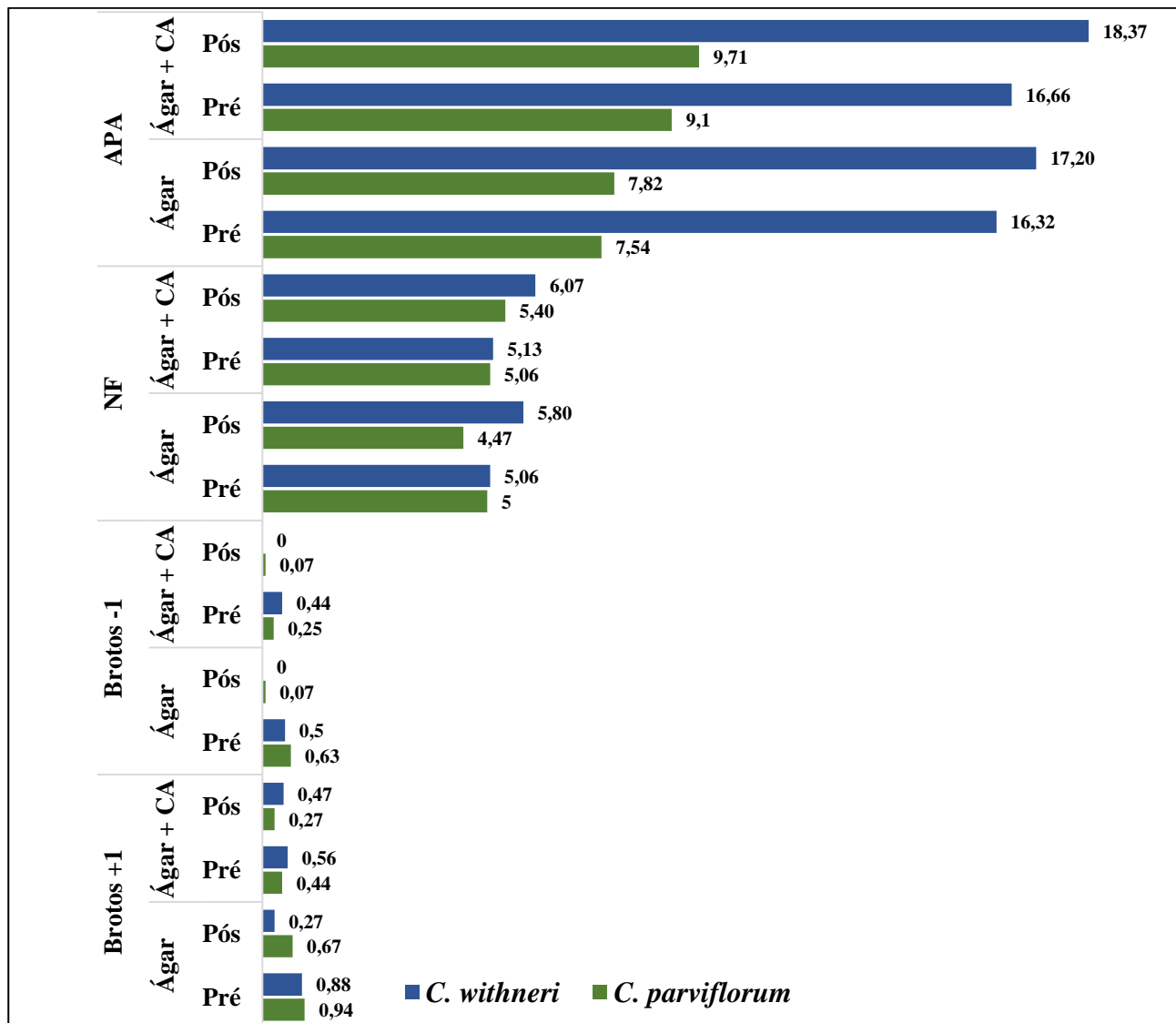


**Figura 30.** Sobrevivência medida ao fim do alongamento e no centésimo dia de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Valores expressos em porcentagem.

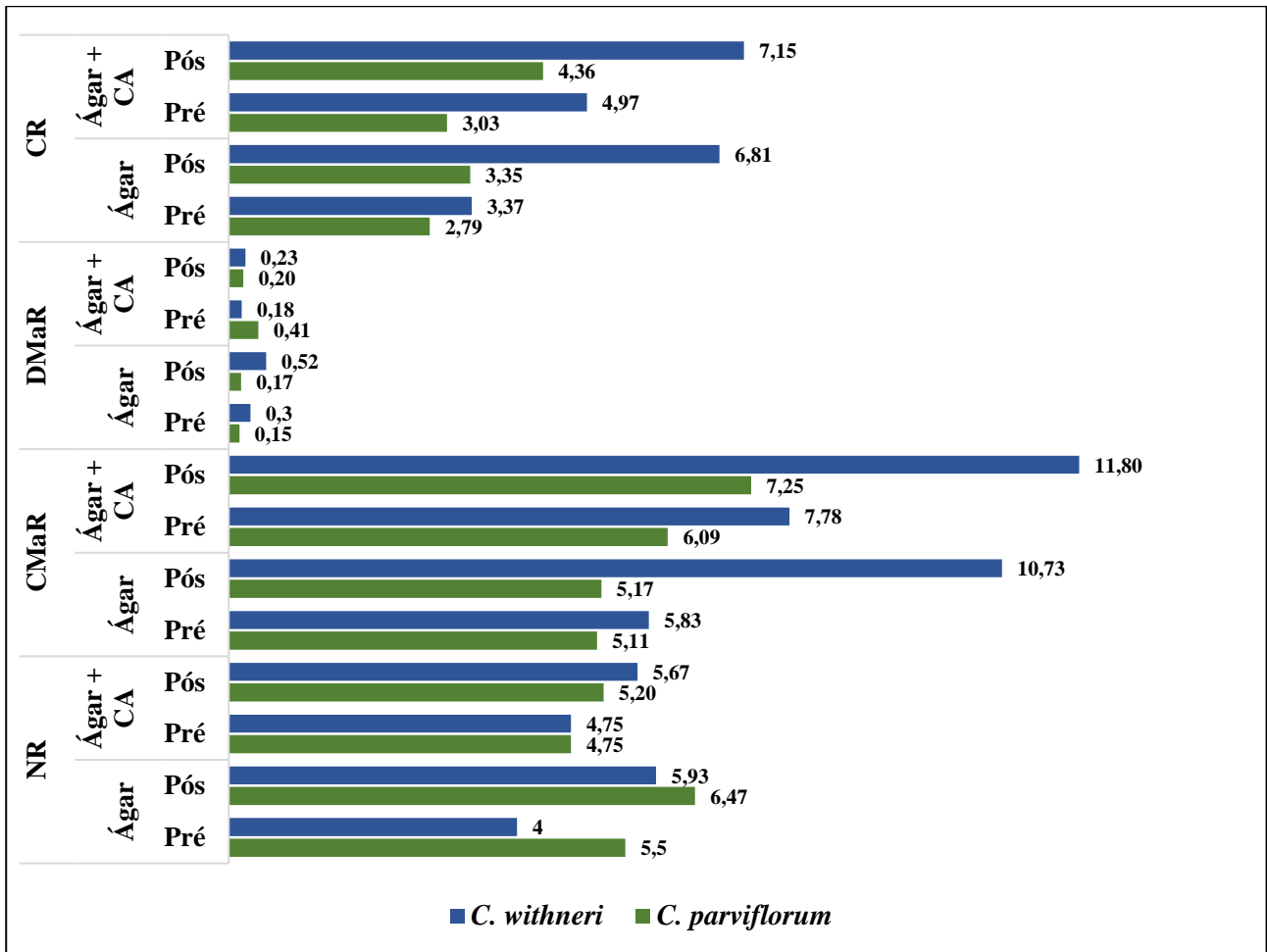
Em razão das plantas cultivadas *in vitro* estarem em condições controladas e sem a presença de patógenos (Irsyadi 2021), na fase de alongamento a sobrevivência, em regra, se mostra elevada (Bhowmik & Rahman 2020a; 2020b; Zanello *et al.* 2022). Contudo, a transição para a condição *ex vitro*, provoca elevada mortalidade de plantas (Chandra *et al.* 2010). Neste estudo a aclimatização foi realizada em vasos contendo vermiculita como substrato. De acordo com Martins *et al.* (2011), a vermiculita possui algumas características que trazem vantagem para sua utilização como substrato: fácil obtenção, uniformidade na composição química e granulometria, capacidade de retenção de água e baixa densidade, é um produto estéril em razão de ser produzida em um processo térmico entre 800 e 900 °C. Esse substrato já foi usado com sucesso no cultivo de algumas orquídeas sozinho ou associado com outros compostos (Faria *et al.* 2018).

Os dados aqui obtidos, mostram que no período compreendido entre o fim da última etapa *in vitro* (alongamento) e o fim da etapa *ex vitro* (aclimatização), ocorreu aumento no valor das variáveis analisadas para *C. withneri* e redução de alguns valores para *C. parviflorum*. O comprimento da parte aérea (Figura 31), o comprimento e o número de raízes (Figura 32), e da massa total e particionada (Figuras 33 e 34) apresentou aumento para o caso de *C. withneri*. Já em relação a *C. parviflorum* foi observada uma pequena redução do número de folhas, massa fresca e seca do sistema radicular e da parte aérea em relação ao fim do alongamento. *C. parviflorum* também apresentou menor incremento percentual de massa fresca total em relação a *C. withneri*. Uma possível explicação para essa diferença pode estar nos habitats de ocorrência dessas espécies. *Cyrtopodium withneri* ocorre em Matas Secas do Cerrado (Menezes 2000), que apesar de não estarem associados a cursos de água, apresentam solos com boa fertilidade (Reatto *et al.* 2002). *Cyrtopodium parviflorum* ocorre

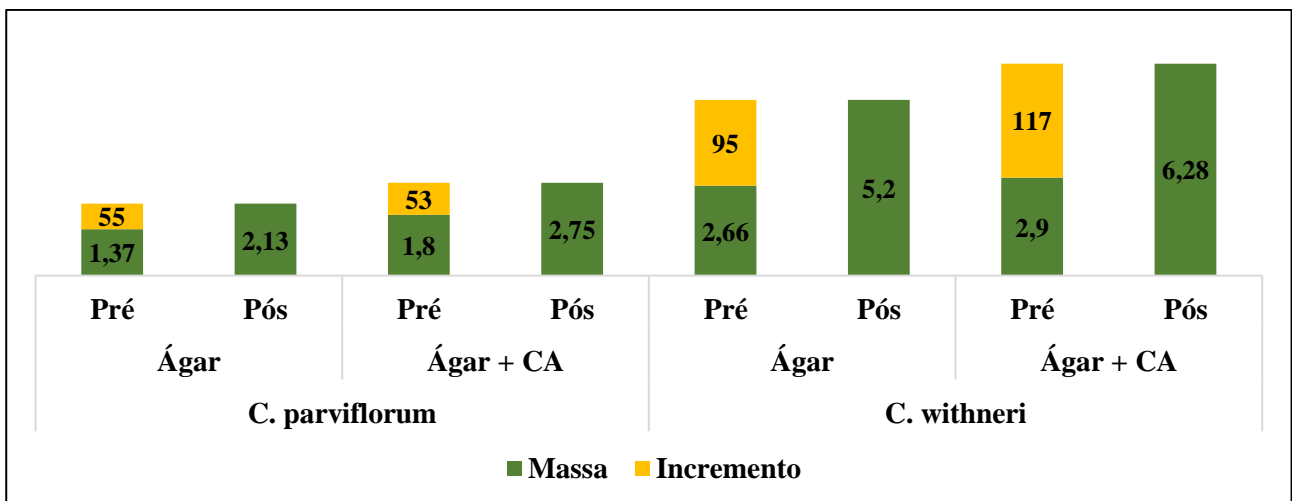
em Campos Limpos Úmidos (Menezes 2000), cujos solos apresentam grande acúmulo de matéria orgânica, e por isso possuem elevada capacidade de complexar íons de  $Al^{+3}$  (Silva *et al.* 2015). É possível que *C. parviflorum* tenha alguma capacidade de acumular alumínio, e a falta desse elemento, nos mesmos níveis dos solos onde habita, pode ter afetado sua capacidade de crescimento, uma vez que para algumas plantas do Cerrado, esse elemento tem grande importância no seu metabolismo (Haridasan 1982; 2008; Ruggiero & Pivello 2005).



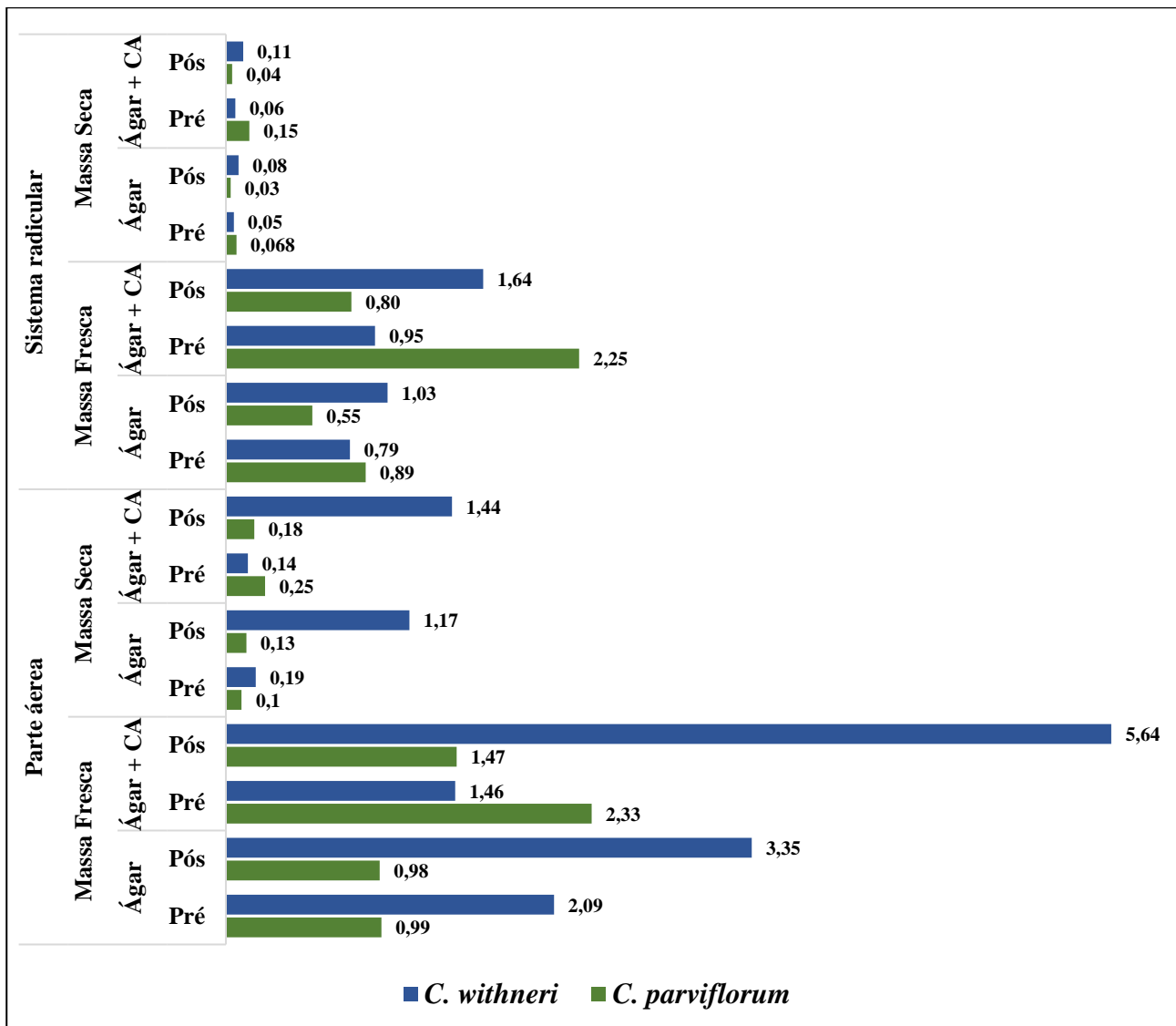
**Figura 31.** Dados relativos a brotações e parte aérea ao fim do alongamento *in vitro* e no centésimo dia de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo gelificado com e sem adição de carvão ativado (CA). Número de brotos maiores e menores que 1 cm (Brotos<sup>+1cm</sup> e Brotos<sup>-1cm</sup>, respectivamente), Número de folhas (NF), Altura da parte aérea em cm (APA).



**Figura 32.** Dados relativos a raízes ao fim do alongamento (Pré) e no centésimo dia de aclimatização (Pós) em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Número de raízes (NR); Comprimento da maior raiz (CMaR), Diâmetro da maior raiz (DMaR) e Comprimento das raízes (DR) expressos em cm.



**Figura 33.** Massa total ao fim do alongamento (Pré) e no centésimo dia de aclimatização (Pós) e o incremento de massa durante essas duas fases de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Massa expressa em gramas e incremento de massa em porcentagem



**Figura 34.** Massa fresca e seca ao fim do alongamento (Pré) e no centésimo dia de aclimatização (Pós) em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Massa expressa em gramas.

Dessa forma, o emprego de vermiculita como substrato se mostrou adequado para a aclimatização de *C. parviflorum* e *C. withneri*, proporcionando condições adequadas que evitem a morte de plantas, que é característica dessa fase (Irsyadi (2021).

### 7.8. Aspectos fisiológicos e anatômicos das fases de alongamento *in vitro* e aclimatização *ex vitro*

As condições de cultivo *in vitro* promovem o rápido crescimento e multiplicação dos explantes/plântulas, e isso leva a formação de plantas com diversas características fisiológicas e morfológicas indesejáveis, tais como alterações na anatomia e morfologia foliar sem a devida estruturação, baixa eficiência fotossintética, mal funcionamento dos estômatos e redução no depósito de cera epicuticular (Hazarika 2006; Hazarika *et al.* 2015). Há portanto a necessidade de se verificar

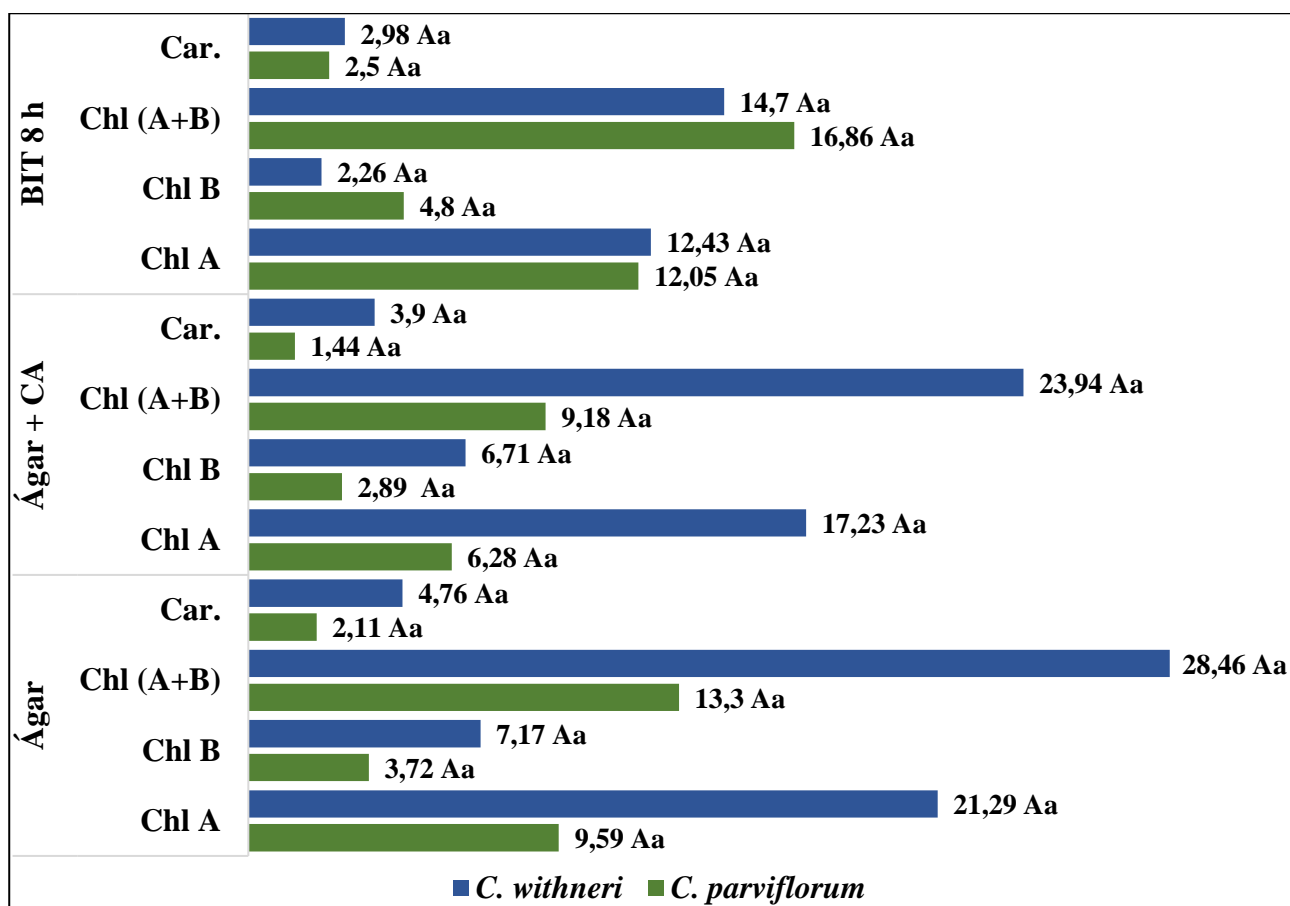
as condições fisiológicas e anatômicas de plantas micropropagadas, a fim de melhorar a eficiência do processo.

A clorofila, desempenha um papel crucial para a produção de alimento e oxigênio, e seu metabolismo possui uma complexa regulação (Wang & Grimm 2020). A quantidade desse pigmento nas folhas pode ser afetado por diversos fatores: idade e posição das folhas, temperatura, umidade relativa do ar, nutrição mineral, qualidade da luz, etc. (Pavlović *et al.* 2014). A análise feita ao final do alongamento, nas duas espécies de *Cyrtopodium* estudadas, não apresentou diferença do conteúdo dos pigmentos fotossintéticos entre as duas espécies ou entre os métodos empregados (Figura 35). O alongamento em meio gelificado sem CA apresentou os maiores valores de carotenoides e de clorofila *a*, *b* e total. Os valores medidos para o alongamento em meio gelificado com CA e em BIT se mostraram bem próximos. Para a avaliação dos teores de pigmentos ao final da aclimatização, foram consideradas apenas de plantas alongadas em meio gelificado com e sem CA (Figura 36). *Cyrtopodium parviflorum* apresentou os maiores valores de clorofilas e carotenoides em comparação com *C. withneri*, exceto para clorofila *b* de plantas alongadas em ágar sem CA. Contudo, não houve diferença estatística entre os tratamentos. Em relação ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos ao final do alongamento e da aclimatização, notou-se aumento desse conteúdo ao final da aclimatização (Figura 37).

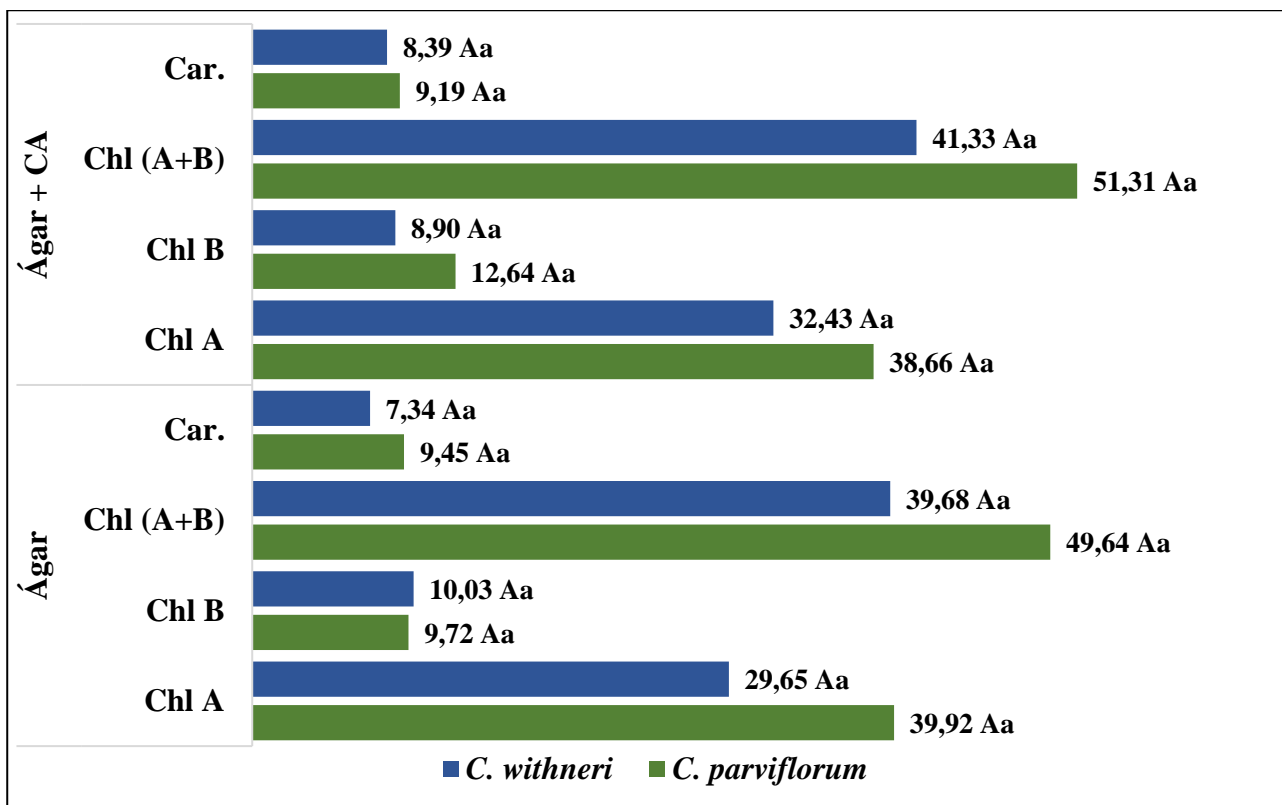
Amelia & Kurniawan (2021) estudaram plantas adultas de *Dendrobium crumenatum* Sw. coletadas em seu habitat natural, sendo submetidas a três regimes de cultivo: i. irrigação e iluminação normais; ii. estresse luminoso e; iii. hídrico. Ao avaliar os teores dos pigmentos após sete dias, observaram conteúdos diferentes frente aos tipos de cultivos. No regime de estresse hídrico, a clorofila *a* teve seu conteúdo aumentado em relação ao controle, passando de 52,65 para 59,27 mg.L<sup>-1</sup>, sendo maior do que na condição de estresse luminoso. A clorofila *b* praticamente não teve seu conteúdo alterado, e os carotenóides tiveram discreto aumento. Na situação de estresse luminoso ocorreu o inverso, os carotenóides tiveram expressivo aumento, variando de 17,14 para 28,30 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que as clorofilas *a* e *b* tiveram redução nos seus conteúdos.

No presente trabalho, os valores de clorofila *a* variaram de 1,51-5,11 mg.L<sup>-1</sup> na fase de alongamento, e passaram para 5,59-7,52 mg.L<sup>-1</sup> no final da aclimatização. Os valores máximos dos carotenoides para o final do alongamento e da aclimatização foram, respectivamente 1,14 e 1,78 mg.L<sup>-1</sup>.

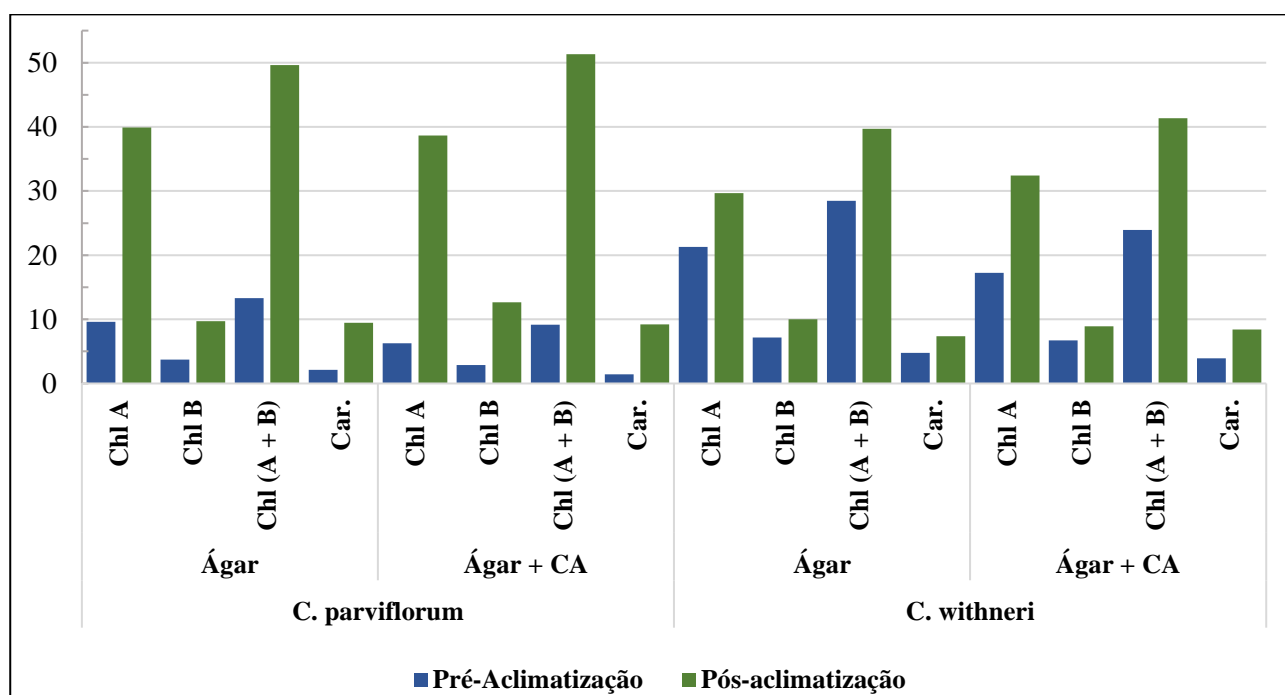
Jakab-Ilyefalvi & Pamfil (2011) realizaram estudo sobre aclimatização de plantas micropropagadas de *Prunus domestica* L. (Rosaceae), onde foram anotados valores de 7,02-12,93 e 2,81-5,07 mg.L<sup>-1</sup> para clorofila *a* e *b*, respectivamente. No presente estudo os valores de clorofila *b*, ao fim do alongamento e da aclimatização, foram de 0,54-1,72 e 1,68-2,38 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 35.** Teores de clorofilas e carotenóides de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* micropropagadas oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Valores expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . carvão ativado (CA); Biorreator de imersão temporária com intervalos de imersão de 8 h (BIT 8 h). Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 36.** Teores de clorofilas e carotenóides aos 100 dias de aclimatização em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Valores expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 37.** Comparativo entre os teores de clorofilas e carotenóides ao fim do alongamento (Pré-aclimatização) e no centésimo dia de aclimatização (Pós-aclimatização) em casa de vegetação de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Valores expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .



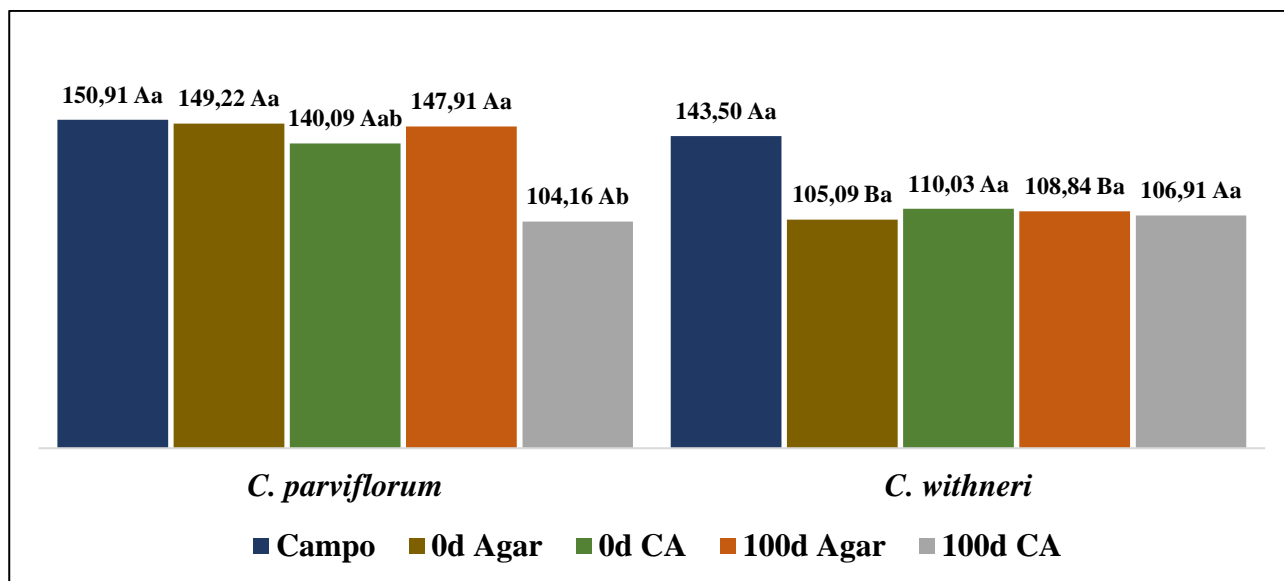
Sugiyarto *et al.* (2019) avaliaram *in situ* o conteúdo de clorofilas de plantas adultas de *Spathoglottis plicata* Blume em habitats com diferentes altitudes: 95, 600 e 980 m acima do nível do mar. Em cada habitat foram avaliados o conteúdo de clorofilas de plantas de flores brancas e púrpuras. Os resultados obtidos mostraram que houve diferença no conteúdo de pigmentos em relação aos habitats e à cor das flores. Plantas de flores púrpuras apresentaram os maiores valores de clorofila *a* (33,07 mg.L<sup>-1</sup>) e *b* (16,60 mg.L<sup>-1</sup>) no habitat de altitude intermediária. Já as plantas de flores brancas tiveram maiores conteúdos de clorofila *a* (21,98 mg.L<sup>-1</sup>) e *b* (12,94 mg.L<sup>-1</sup>) no habitat mais elevado. Variações no conteúdo das clorofilas em função do habitat também foram observados por Moreira *et al.* (2009) em um estudo sobre *Dichaea cogniauxiana* Shltr. e *Epidendrum secundum* Jacq.

Segundo Hazarika *et al.* (2015), plantas cultivadas *in vitro* apresentam baixos teores de clorofilas e de enzimas envolvidas na fotossíntese em razão do suprimento externo de sacarose, que faz com que as plantas não necessitem do desenvolvimento do aparato fotossintético. Os dados obtidos na pesquisa aqui apresentada corroboram os achados daqueles autores, onde as plantas estudadas apresentavam baixo conteúdo de clorofilas ao final da última etapa *in vitro*, quando comparadas com aquelas analisadas ao fim da aclimatização. Percebe-se também que *C. parviflorum* e *C. withneri*, bem como *Prunus domestica* (Jakab-Ilyefalvi & Pamfil 2011) apresentaram conteúdos de clorofilas próximos, porém abaixo dos apresentados nos estudos sobre *Spathoglottis plicata* (Sugiyarto *et al.* 2019) e *Dendrobium crumenatum* (Amelia & Kurniawan 2021), realizados com plantas adultas no habitat e em situação de campo, respectivamente. Segundo Grout & Millam (1985), essa diferença entre os teores de pigmentos pode ser explicada pelo fato de que, em regra, apenas as folhas desenvolvidas após a transferência para condição *ex vitro* teriam competência para realizar adequadamente a fotossíntese.

Além da maquinaria bioquímica da fotossíntese, a estrutura anatômica de plantas micropropagadas também pode apresentar falhas, não estando imediatamente aptas para o adequado controle da transpiração e fixação de CO<sub>2</sub> (Silva *et al.* 2017). De acordo com Lee *et al.* (1988) plantas micropropagadas possuem folhas mais finas, células do mesofilo menores, ausência de componentes vacuolares, maiores estômatos e alta densidade estomática em relação às plantas cultivadas em condições de luminosidade mais elevada, como no campo ou em casa de vegetação. Plantas com essas características exigem mais cuidados na etapa inicial de aclimatização, pois possuem baixa eficiência fotossintética e menor capacidade de regulação hídrica (Dousseau *et al.* 2008).

No presente estudo foi avaliada a densidade estomática de plantas adultas vegetando à sol pleno, e de plantas micropropagadas ao fim da fase de alongamento e da aclimatização. A densidade estomática variou de 104,16-150,91 estômatos.mm<sup>-2</sup> para *C. parviflorum* e de 105,09-143,50 estômatos.mm<sup>-2</sup> para *C. withneri* (Figura 38). Não houve diferença estatística entre os tratamentos ou

entre as espécies. Para as duas espécies, as maiores densidades estomáticas foram registradas para as plantas cultivadas à sol pleno.



**Figura 38.** Densidade estomática (número de estômatos.mm<sup>-2</sup>) de plantas de *C. parviflorum* e *C. withneri* cultivadas em condições de campo (Campo), ao fim do alongamento (0d) e no centésimo dia de aclimatização em casa de vegetação (100d) oriundas do alongamento em meio de cultivo com e sem adição de carvão ativado (CA). Médias da mesma espécie seguidas de mesma letra minúscula, e médias de um mesmo tratamento seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Sasongko *et al.* (2016) estudaram o efeito de quatro concentrações de sacarose (0, 5, 10, e 20 g.L<sup>-1</sup>) *Grammatophyllum scriptum* em dois sistemas de pré-aclimatização: i. tradicional (frascos fechados); e ii. No sistema denominado “Photoautotrophic Micropropagation System” (PMS). Este sistema consiste no cultivo em meio gelificado em frascos cujas as tampas permitem o fluxo de ar atmosférico para o interior deles. Esses pesquisadores verificaram que a maior densidade estomática (68,75 estômatos.mm<sup>-2</sup>) ocorreu no sistema tradicional (frascos fechados), tendo respondido proporcionalmente ao aumento da concentração de sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>). A menor densidade estomática (23,25 estômatos.mm<sup>-2</sup>) foi observada no sistema PMS com sacarose a 10 g.L<sup>-1</sup>. Dousseau *et al.* (2008) em um estudo sobre aclimatização de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) obtiveram dados que mostram relação inversa aos dados de Sasongko *et al.* (2016). No estudo foi avaliada a densidade estomática de plântulas cultivadas *in vitro*, plantas aclimatizadas por diferentes períodos (20, 40, 60 e 80 dias) oriundas do cultivo *in vitro*, e de plântulas germinadas nas mesmas condições da aclimatização, tratamento denominado *in vivo*. Na avaliação dos resultados foi verificado que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Entretanto, a maior densidade estomática (137,68 estômatos.mm<sup>-2</sup>) foi observada no tratamento *in vivo*. A menor densidade ocorreu nas plantas com 40 dias de aclimatização (111,74 estômatos.mm<sup>-2</sup>). Plantas do cultivo *in vitro* e da

aclimatização por 80 dias apresentaram o mesmo valor de densidade estomática (116,18 estômatos.mm<sup>-2</sup>). Eburneo *et al.* (2017) estudaram a densidade estomática ao final dos 90 dias da fase de alongamento de plântulas do híbrido natural *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade. No alongamento foram testadas concentrações de três concentrações de K<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>, 0, 0,5 e 1,0 mL.L<sup>-1</sup>, no meio de cultivo. A densidade estomática decresceu em função da dose de silicato de potássio usado no meio, respectivamente, 46,49, 45,98 e 38,43 estômatos.mm<sup>-2</sup>. Moreira *et al.* (2009) estudaram *in situ* duas orquídeas sem pseudobulbos de habitats e formas de vida diferentes: *Dichaea cogniauxiana* uma epífita de locais sombreados, e *Epidendrum secundum*, planta terrestre heliófila de campos rupestres. Para a primeira espécie a densidade estomática medida foi de 111 estômatos.mm<sup>-2</sup>, e para a segunda 65 estômatos.mm<sup>-2</sup>.

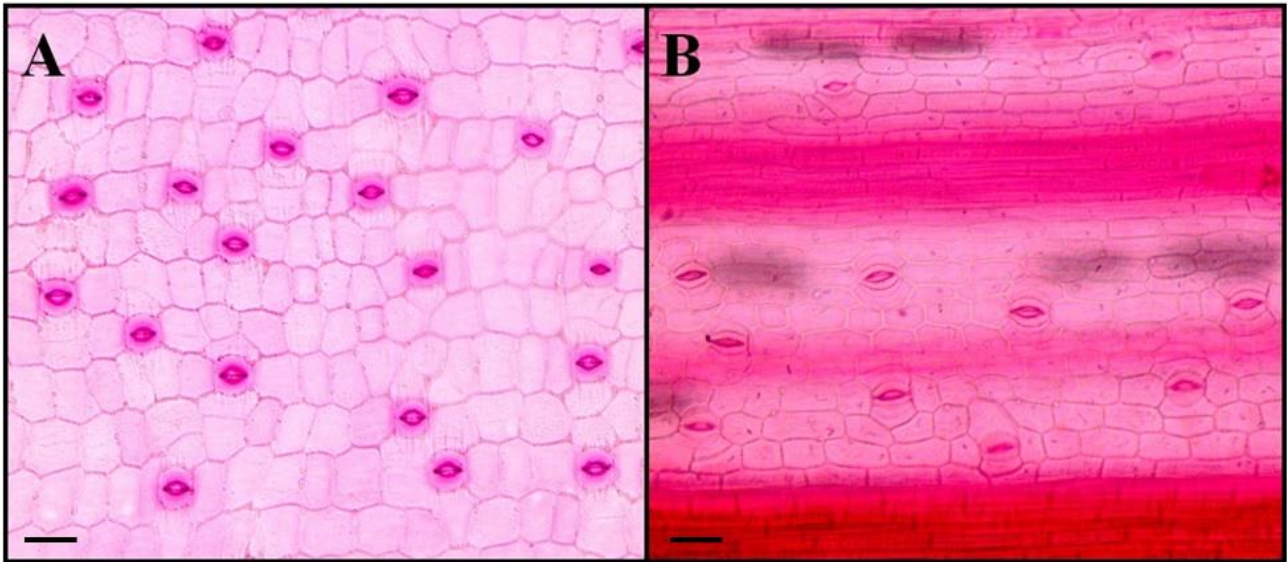
Nos estudos analisados acima, a densidade estomática se comportou de diferentes maneiras. No presente estudo as espécies tiveram comportamentos similares em relação aos tratamentos analisados. Já no estudo de Sasongko *et al.* (2016), a espécie estudada respondeu de forma antagônica aos dois sistemas de alongamento, aumentando a densidade estomática com o aumento na concentração de sacarose no sistema fechado, e diminuindo a densidade estomática com o aumento de sacarose o sistema aberto (PMS). No trabalho de Dousseau *et al.* (2008), de forma similar ao nosso, os tratamentos aplicados não geraram diferença na densidade estomática. Este trabalho também apresentou valores de densidade estomática mais próximos ao do nosso trabalho, i.e., acima de 100 estômatos.mm<sup>-2</sup>. *Dichaea cogniauxiana* (Moreira *et al.* 2009) também apresentou valores acima dessa faixa. Eburneo *et al.* (2017) relataram que as plantas com melhores condições anatômicas apresentavam, entre outras características, menor densidade estomática.

Alguns estudos apontam que baixas densidades estomáticas são características de plantas que necessitam manter a hidratação em condições de seca, como as epífitas (Holbrook & Putz 1996; Martin *et al.* 2004). Nesse sentido, Pires *et al.* (2013) realizaram um estudo com cinco espécies de orquídeas da Mata Atlântica, das quais duas eram terrestres e três epífitas. Entre as terrestres uma possuía pseudobulbos, *Cyrtopodium polyphyllum* (Vell.) Pabst ex F.Barros (= *C. flavum*), e a outra, *Sobralia sp.*, não possuía. As três epífitas tinham pseudobulbos. No estudo foram avaliadas a taxa fotossintética líquida e condutância estomática. Foi observado que *Sobralia sp.* apresentou os maiores valores para as duas variáveis analisadas, seguida por *C. polyphyllum*, com diferença entre as duas espécies. As três epífitas tiveram os menores valores e diferiram das demais espécies, e apenas na taxa fotossintética líquida elas diferiram entre si. Segundo os autores, maiores taxas fotossintéticas líquidas e condutância estomática estariam relacionadas a uma maior densidade estomática, e os valores observados em *C. polyphyllum* colocam a espécie em uma posição intermediária entre a espécie terrestre e as três epífitas. Esse resultado indica que *C. polyphyllum*, de maneira similar a *C.*

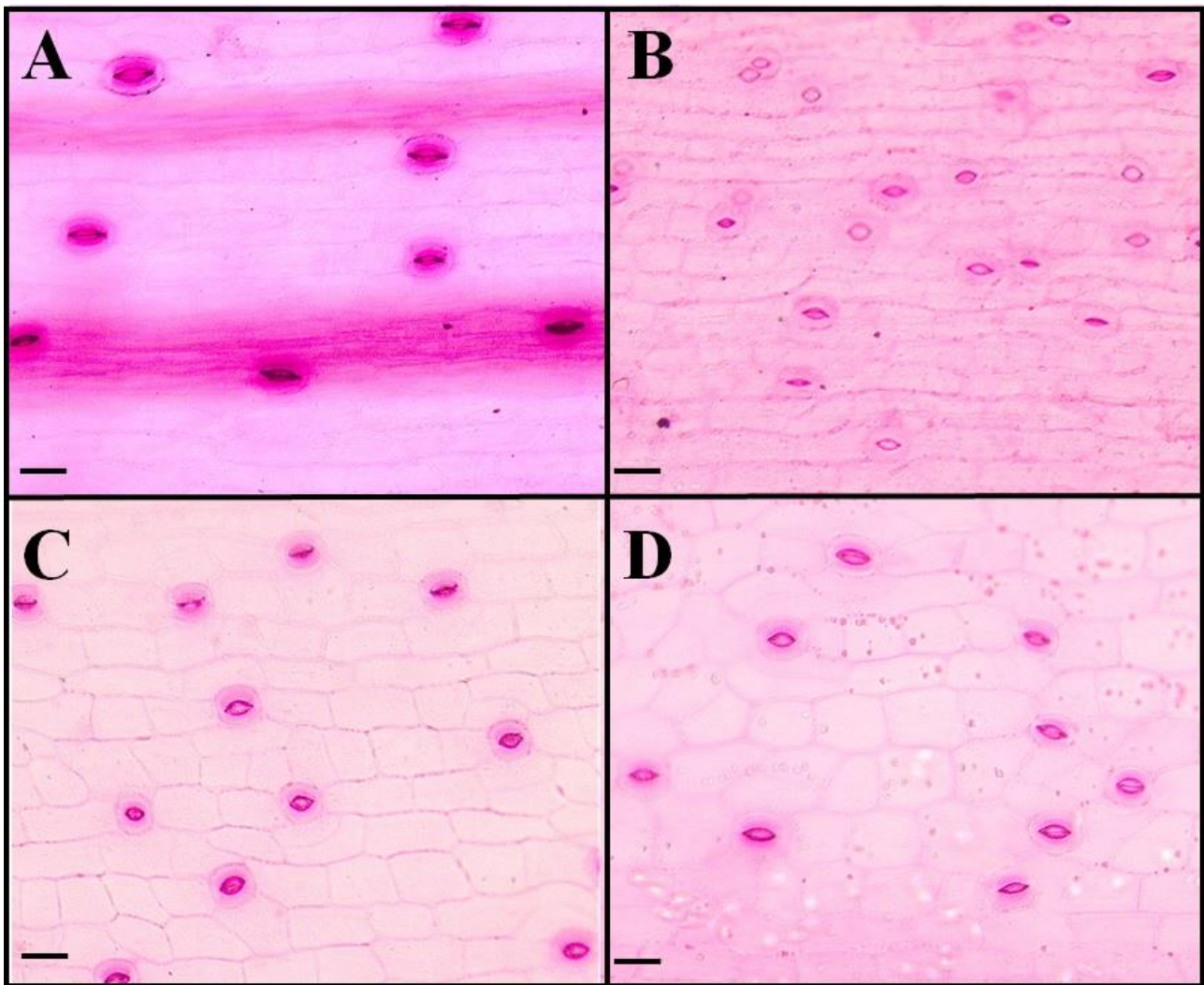
*parviflorum* e *C. withneri*, possui densidade estomática maior, se comparada às espécies estudadas por Moreira *et al.* (2009), Pires *et al.* (2013), Eburneo *et al.* (2017). Essa aparente tendência de maior densidade estomática em *Cyrtopodium* não pode ser explicada apenas pelo hábito terrícola, pois *Dichaea cogniauxiana*, que é uma epífita delgada e sem pseudobulbos, apresentou quase o dobro da densidade estomática que aquela apresentada por *Epidendrum secundum* Moreira *et al.* (2009). Assim, a densidade estomática não seria o único mecanismo envolvido na regulação da fotossíntese, pois em algumas orquídeas, essa regulação orquídeas está intimamente relacionado à espessura da cutícula e ao armazenamento de água nos pseudobulbos (Yang *et al.* 2016).

Por fim, a análise de folhas dissociadas de *C. parviflorum* e *C. withneri* mostrou que ambas as espécies apresentam estômatos apenas na face abaxial, ou seja, hipoestomáticas. Os estômatos observados apresentaram predominante quatro células subsidiárias arranjadas em um padrão bem específico: uma célula ocorrendo em cada lado e em cada polo das células-guarda, sendo definidos como tetracíticos (Cutler *et al.* 2011), (Figuras 39-43). Segundo estes autores, os estômatos tetracíticos, juntamente com paracíticos, são os mais comuns. Nas Orchidaceae, os estudos anatômicos relatam o predomínio dos tipos tetracíticos, anomocíticos e anisocíticos (Stern & Judd 2001; Moreira *et al.* 2009; Eburneo *et al.* 2017; Muthukumar & Shenbagam 2018), mas também há a ocorrência dos tipos ciclocíticos, paracíticos, entre outros (Morris *et al.* 1996; Carlsward *et al.* 1997; Zahara & Win 2019; Saensouk & Saensouk 2020).

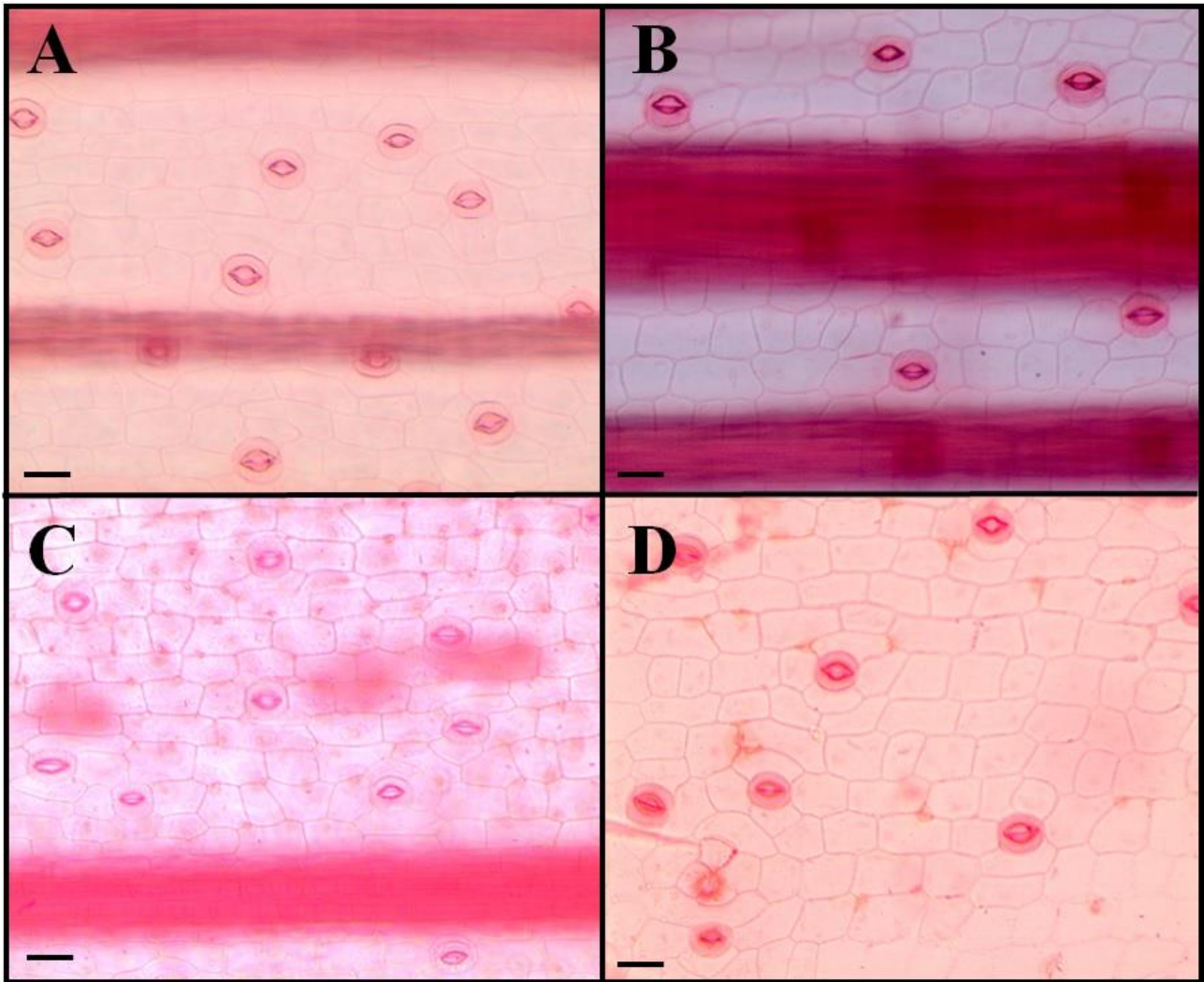
As folhas *C. parviflorum* e *C. withneri* apresentaram, ao final do alongamento e da aclimatização, folhas com duas características diferentes daquelas que se desenvolveram em condições de campo. A primeira foi que nas plantas micropropagadas os estômatos não apresentavam um padrão uniforme de distribuição nas folhas, como foi observado nas plantas cultivadas em condição de campo (Figuras 39-41). A segunda característica diz respeito à forma arredondada dos estômatos em relação à forma elíptica dos estômatos das plantas cultivadas em condição de campo (Figuras 39-41). De acordo com Desjardins (1995), Tichá *et al.* (1999), Eburneo *et al.* (2017) e Leite *et al.* (2017), plantas em condições de cultivo *in vitro* apresentam estômatos arredondados, enquanto que plantas em condições de cultivo em campo possuem estômatos elípticos. Dessa forma, os dados do estudo ora apresentado mostram similaridade com os dados disponíveis na literatura.



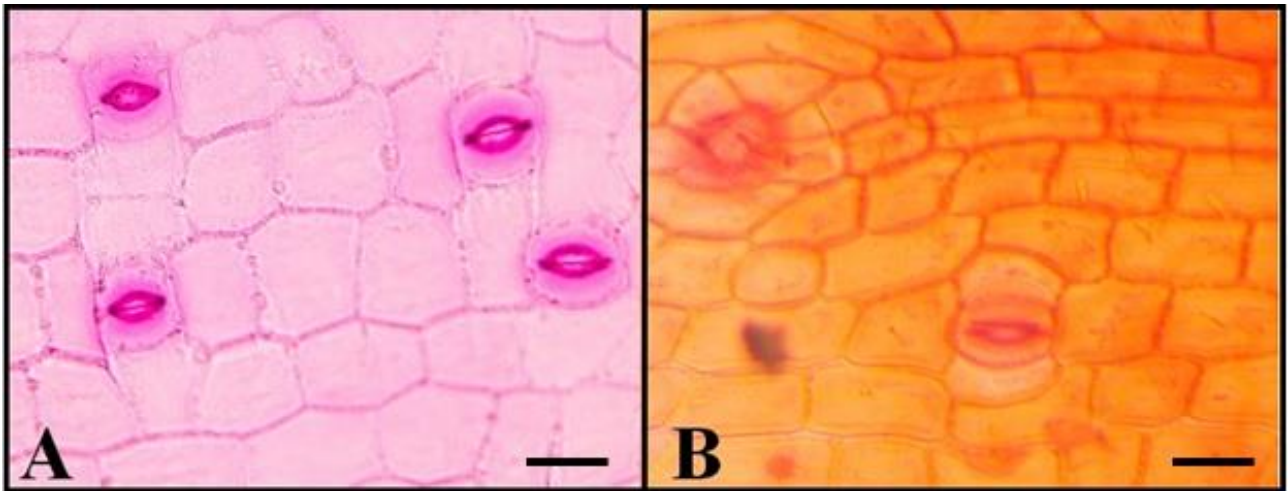
**Figura 39.** Fotomicrografia de epiderme foliar dissociada de plantas cultivadas em condições de campo evidenciando a morfologia dos estômatos. **A.** *C. parviflorum*. **B.** *C. withneri*. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . Aumento 20x.



**Figura 40.** Fotomicrografia de epiderme foliar dissociada de *C. parviflorum*. **A.** Plantas após o alongamento em ágar. **B.** Plantas após o alongamento em ágar com adição de carvão ativado (CA). **C.** Plantas oriundas do alongamento em ágar após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. **D.** Plantas oriundas do alongamento em ágar com adição de CA após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . Aumento de 20x.

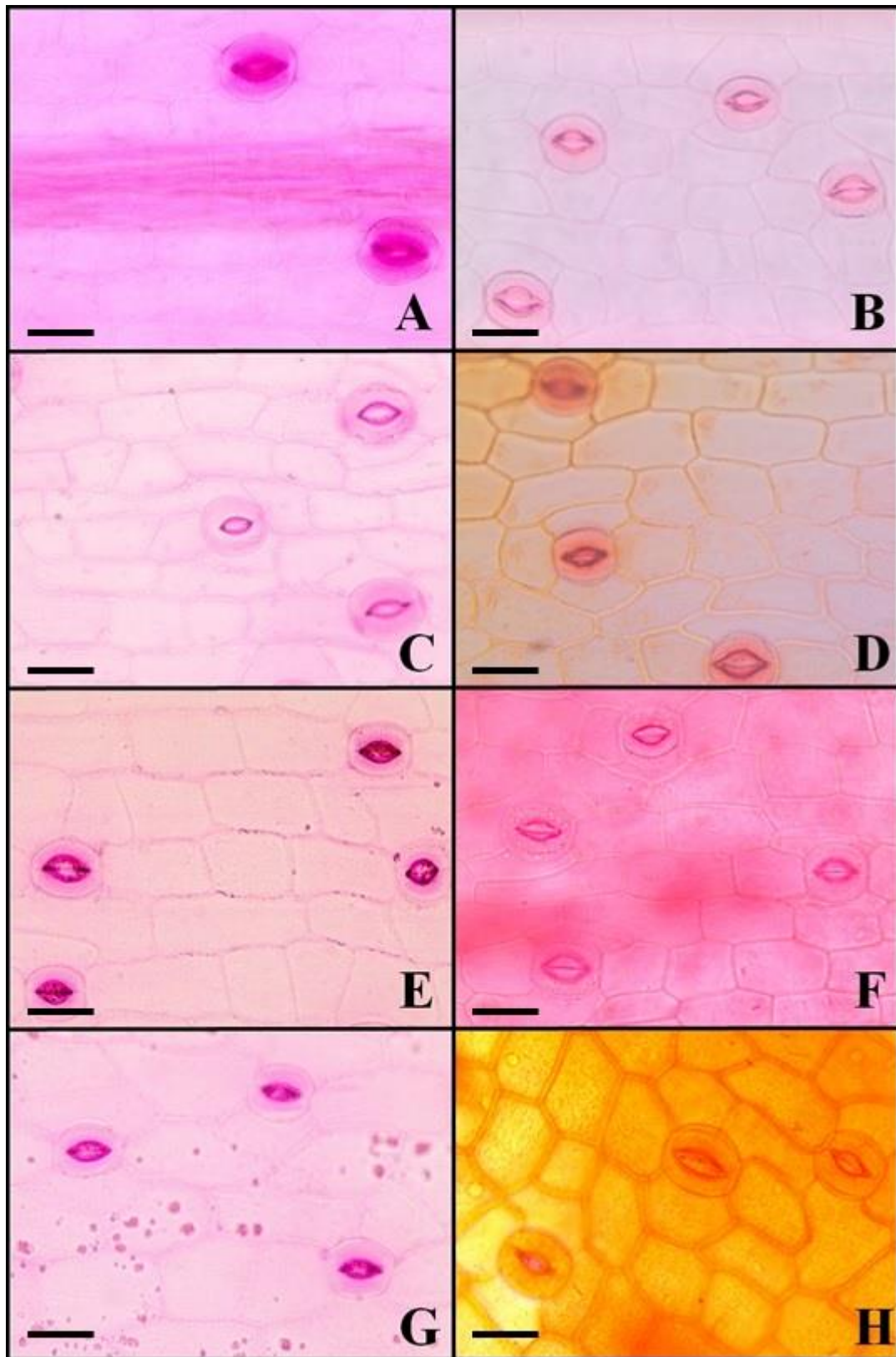


**Figura 41.** Fotomicrografia de epiderme foliar dissociada de *C. withneri*. **A.** Plantas após o alongamento em ágar. **B.** Plantas após o alongamento em ágar com adição de carvão ativado (CA). **C.** Plantas oriundas do alongamento em ágar após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. **D.** Plantas oriundas do alongamento em ágar com adição de CA após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. Escala: 30  $\mu$ m. Aumento de 20x.



**Figura 42.** Fotomicrografia da epiderme foliar dissociada de plantas cultivadas em condições de campo evidenciando a morfologia dos estômatos. **A.** *C. parviflorum*. **B.** *C. withneri*. Escala: 30  $\mu\text{m}$ . Aumento de 40x.





**Figura 43.** Fotomicrografia de epiderme foliar dissociada evidenciando a morfologia dos estômatos. **A, C, E, G.** *C. parviflorum*. **B, D, F, H.** *C. withneri*. **A, B.** Plantas após o alongamento em ágar. **C, D.** Plantas após o alongamento em ágar com adição de carvão ativado (CA). **E, F.** Plantas oriundas do alongamento em ágar após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. **G, H.** Plantas oriundas do alongamento em ágar com adição de CA após 100 dias de aclimatização em casa de vegetação. Escala: 30  $\mu$ m. Aumento 40x.

## 8. CONCLUSÕES

No estudo aqui apresentado foi demonstrado a viabilidade de produção *in vitro* de *Cyrtopodium parviflorum* e *C. virescens* a partir da germinação assimbiótica. Foi observado que o teste de viabilidade por meio do TTC apresentou diferenças entre as espécies e entre os tratamentos utilizados, em especial o de embebição. Recomendamos a embebição em solução de sacarose a 10% e coloração em TTC a 1% diluído em água. A germinação ocorreu com elevado percentual nos três meios analisados, com feito positivo da adição de carvão ativado. Entretanto, a germinação em meio KC não se mostrou viável, uma vez ocorreu a morte de praticamente todos os protocormos desenvolvidos. *Cyrtopodium parviflorum* mostrou preferência para a germinação em MS, enquanto que *C. withneri* a preferência se deu em ½ MS, ambos os meios adicionados de CA.

A fase de multibrotação apresentou elevada sobrevivência das duas espécies em concentrações de até 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, com redução expressiva nas concentrações de 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>. Esse efeito do BAP também foi notado na produção de brotos, onde o aumento na concentração desse regulador de crescimento reduziu ou inibiu a formação de brotos em ambas as espécies. O efeito do BAP no desenvolvimento de raízes foi diferente nas duas espécies. Em *C. withneri* foi observado o desenvolvimento de raízes em todos os tratamentos, exceto T8 e T9. No caso de *C. parviflorum*, a formação de raízes foi inibida em todas as concentrações de BAP empregadas (0,5-4,0 mg.L<sup>-1</sup>). Os demais parâmetros avaliados também indicaram o efeito deletério da citocinina usada. O emprego de ANA também não mostrou ser vantajoso, já que o cultivo sem adição de reguladores de crescimento apresentou, de forma geral, os melhores resultados. Os dados aqui obtidos demonstram que a etapa de multibrotação deve ser conduzida em meio sem adição de reguladores de crescimento. O uso de carvão ativado não foi avaliado e deve ser feito em futuros estudos.

O alongamento realizado em BIT se mostrou inviável em razão da mortalidade quase que integral dos explantes. Os diferentes intervalos entre as imersões não produziram efeitos positivos, bem como o emprego de RC no intervalo de 8h entre as imersões. Por sua vez, o alongamento em meio gelificado, com e sem a adição de CA, apresentou sobrevivência superior a 90%, sem diferença estatística entre os tratamentos e as espécies. Nesses tratamentos os brotos atingiram comprimentos bem expressivos, com valores maiores do que os divulgados na literatura. O alongamento em BIT para as espécies estudadas deve ser aperfeiçoado para ser empregado com essas espécies. Por sua vez, o alongamento em meio gelificado se mostrou eficiente, sendo indicado para ambas as espécies nessa fase do cultivo *in vitro*.

A aclimatização com o uso de vermiculita apresentou elevada sobrevivência para as duas espécies, 100% para *C. withneri* e 94% para *C. parviflorum*. Além da sobrevivência, as mudas

desenvolveram completamente seus pseudobulbos, e algumas novas brotações. Ao final dos 100 dias de aclimatização, houve diferença no tamanho das plantas, tendo *C. withneri* atingido o dobro da altura das plantas de *C. parviflorum*. Contudo, essa diferença de altura pode ser apenas a manifestação das características genéticas das espécies. Com isso, a aclimatização de *C. parviflorum* e *C. withneri* pode ser conduzida em casa de vegetação com 50% de luminosidade e irrigação diária, e emprego de vermiculita como substrato.

Assim, no presente estudo foi verificado que na etapa de multibrotação o uso de reguladores de crescimento, ANA e BAP, não foi eficiente na indução de brotos, e que a sinergia entre esses reguladores de crescimento não é essencial para esta etapa. De maneira contrária ao que se era esperado, o alongamento em Biorreator de Imersão Temporária não foi eficiente, diante da ausência de brotações e, principalmente, pela elevada mortalidade dos explantes nesse sistema. O alongamento em meio gelificado se mostrou o método mais adequado para as espécies estudadas. A aclimatização apenas em vermiculita se mostrou viável.

## 9. REFERÊNCIAS

- Abahmane, L. 2020. A comparative study between temporary immersion system and semisolid cultures on shoot multiplication and plantlets production of two Moroccan date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties *in vitro*. **Notulae Scientia Biologicae** 12(2): 277-288.
- Aggarwal, C., Sharma, C. & Srivastava, D.K. 2012. Thidiazuron: A potent cytokinin for efficient plant regeneration in Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall.) using leaf explants. **Annals of Forest Research** 55(2): 179-188.
- Aguiar, L.A.A., Vasconcelos, N.A.P., Tunes, G.C., Fontenele, A.J., Nogueira, R.A., Reyes, M.B. & Carelli, P.V. 2020. Low-cost open hardware system for behavioural experiments simultaneously with electrophysiological recordings. **HardwareX** 8: e00132.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M. & Sparovek, G. 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift** 22(6): 711–728.
- Alvarez-Pardo, V.M., Ferreira, A.G. & Nunes, V.F. 2006. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira** 24: 217-220.
- Alomía, Y.A., Mosquera-Espinosa, A.T., Flanagan, N.S. & Otero, J.T. 2017. Seed Viability and Symbiotic Seed Germination in *Vanilla* spp. (Orchidaceae). **Research Journal of Seed Science** 10(2): 43-52.
- Amelia, D.E. & Kurniawan, F.Y. 2021. Chlorophyll and Carotenoid Level Comparisons of Pigeon Orchid (*Dendrobium crumenatum*) in Water and Light Stress Treatment. **Indonesian Journal of Science and Education** 5(1): 44-48.
- Amoêdo, S.C. & Ferraz, I.D.K. 2017. Seed quality evaluation by tetrazolium staining during a desiccation study of the recalcitrant seeds of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa surinamensis* Miq. - Meliaceae. **African Journal of Agricultural Research** 12(12): 1005-1013.
- An, J., Kim, P.B., Park, H.B., Kim, S., Park, H.J., Lee, C.W., Lee, B.-D., Kim, N.Y., Hwang, J.E. 2021. Effects of Different Growth Media on *in vitro* Seedling Development of an Endangered Orchid Species *Sedirea japonica*. **Plants** 10: 1193.
- Anastácio, M.R. & Santana, D.G. 2010. Características germinativas de sementes de *Ananas ananassoides* (Baker) L. B. Sm. (Bromeliaceae). **Acta Scientiarum - Biological Sciences** 32(2): 195-200.
- Aragón, C.E., Escalona, M., Rodríguez, R., Cañal, M.J., Capote, I., Pina, D. & González-Olmedo, J. 2009. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 46: 89-94.

- Araújo, L.G., Carneiro, I.F. & Prabhu, A.S. 1999. Produção *in vitro* de mudas de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* a partir de sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 29(2): 67-71.
- Araújo-Lima, C.F., Oliveira, J.P.S., Coscarella, I.L., Aiub, C.A.F., Felzenszwalb, I., Evaristo, G.P.C. & Macedo, A.F. 2020. Metabolomic analysis of *Cyrtopodium glutiniferum* extract by UHPLC-MS/MS and *in vitro* antiproliferative and genotoxicity assessment. **Journal of Ethnopharmacology** 253, 112607.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review** 33(1): 1-97.
- Arditti, J. 1980. Aspects of the Physiology of Orchids. **Advances In Botanical Research** 7: 421-655.
- Arditti, J. 2008. **Micropropagation of orchids**. 2<sup>a</sup> ed. Malden: Blackwell publishing. 2 vol. 1523 pp.
- Arditti, J. 2010. History of orchid propagation. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology** 18(1) supplement: 171-174.
- Arditti, J. & Ghani, K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist** 145: 367-421.
- Arduino. 2022. **Arduino**. Available at <<https://www.arduino.cc>>. Access on: 10 Jan 2022.
- Arellano-García, J., Enciso-Díaz, O., Flores-Palacios, A., Valencia-Díaz, S., Flores-Morales, A. & Perea-Arango, I. 2020. Asymbiotic germination, effect of plant growth regulators, and chitosan on the mass propagation of *Stanhopea hernandezii* (Orchidaceae). **Botanical Sciences** 98(4): 524-533.
- Argueso, C.T. Hansen, M. & Kieber, J.J. 2007. Regulation of Ethylene Biosynthesis. **Journal of Plant Growth and Regulation** 26:92–105.
- Asmar, S.A., Soares, J.D.R., Silva, R.A.L., Pasqual, M.P., Pio, L.A.S. & Castro, E.M. 2015. Anatomical and structural changes in response to application of silicon (Si) *in vitro* during the acclimatization of banana cv. ‘Grand Naine’. **Australian Journal of Crop Science** 9(12):1236-1241.
- Assis, J.G.A., Pérez-García, F. & González-Benito, M.E. 2015. Tetrazolium test for seed viability and germinability of *Melocactus ernestii* Vaupel subsp. *ernestii* and *Melocactus zehntneri* (Britton & Rose) Luetzelb. (Cactaceae). **Gaia Scientia** 9(2): 15-16.
- Auberon, F., Olatunji, O.J., Herbette, G., Raminoson, D., Antheaume, C., Soengas, B., Bonté, F. & Lobstein, A. 2016. Chemical Constituents from the Aerial Parts of *Cyrtopodium paniculatum*. **Molecules** 21: 1418.

- Auberon, F., Olatunji, O.J., Raminoson, D., Muller, C.D., Soengas, B., Bonté, F. & Lobstein, A. 2017. Isolation of novel stilbenoids from the roots of *Cyrtopodium paniculatum* (Orchidaceae). **Fitoterapia** 116: 99–105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.11.015>.
- Ayub, R.A., Santos, J.N., Zanolensi Júnior, L.A. Silva, D.M., Carvalho, T.C. & Grimaldi, F. 2019. Sucrose concentration and volume liquid medium on the *in vitro* growth and development of blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems. **Ciência e Agrotecnologia** 43: e007219.
- Babenko, L.M., Kosakivska, I.V. & Skaterna, T.D. 2015. Jasmonic acid: role in biotechnology and the regulation of plants biochemical processes. **Biotechnologia Acta** 8(2):36-51. doi: 10.15407/biotech8.02.036.
- Badria, F.A. & Aboelmaaty, W.S. 2019. Plant Histochemistry: A Versatile and Indispensable Tool in Localization of Gene Expression, Enzymes, Cytokines, Secondary Metabolites and Detection of Plants Infection and Pollution. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences** 3(7): 88-100.
- Bajguza, A. & Tretynb, A. 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. **Phytochemistry** 62: 1027–1046.
- Bakshi, A., Shemansky, J.M., Chang, C. & Binder, B.M. 2015. History of Research on the Plant Hormone Ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation** 34:809–827. DOI: 10.1007/s00344-015-9522-9
- Barbedo, C.J., Centeno, D.C. & Ribeiro, R.C.L.F. 2013. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea** 40(4): 583-593.
- Barbieri Júnior, E., Rossiello, R.O.P., Morenz, M.J.F. & Ribeiro, R.C. 2010. Comparison of direct methods of extraction and chlorophyll contents quantification in leaves of Tifton 85 bermudagrass. **Ciência Rural** 40:633-636.
- Barthlott, W., Große-Veldmann, B. & Korotkova, N. 2014: **Orchid seed diversity: a scanning electron microscopy survey**. Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin. 245 p.
- Bedi, H.S., Verma.S., Sharma, R. & Singh, B. 2015. The Concept of Programmable Logic Controllers and its role in Automation. **International Journal of Advanced Research in Computer and Communication Engineering** 4(6): 557-561. DOI: 10.17148/IJARCCCE.2015.46120.
- Bellaver, L.A., Kato, K.M.M., Buttini, S., Antonietti, D., Galli, S. & Stefanello, S. 2015. Regeneração *in vitro* de *Cyrtopodium paranaense* Schltr. (Orchidaceae) a partir de regiões meristemáticas. **Revista Brasileira de Energias Renováveis** 4: 100-109.
- Belniaki, A.C., Michelon, T.B., Vieira, E.S.N. & Panobianco, M. 2020. Rapid results of peach palm seed viability: a methodological proposition for the tetrazolium test. **Journal of Seed Science** 42: e202042034. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v42234727>

- Benelli, C. & De Carlo, A. 2018. *In vitro* multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv Canino with temporary immersion system (Plantform™). **3 Biotech** 8: 1–5.
- Benzing, D.H. 1987. Vascular Epiphytism: Taxonomic Participation and Adaptive Diversity. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 74(2): 183-204.
- Berger, J. & Avery, G.S. 1944. Isolation of an auxin precursor and an auxin (Indoleacetic Acid) from maize. **American Journal of Botany** 31:199–203
- Bernard, N. 1899. Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. **Comptes-Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences** 128:1253-1255.
- Bernard, N. 1900. Sur quelques germinations difficiles. **Revue Générale de Botanique** 12: 108–120.
- Bernard, N. 1909. L'évolution dans la symbiose, les orchidées et leurs champignons commensaux. **Annales des Sciences Naturelles Botanique** 9:1–196.
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R. & Bianciotto, V. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: Let's benefit from past successes. **Frontiers in Microbiology** 6:1559. Doi xxx
- Bhowmik, T.K. & Rahman, M.M. 2020a. *In vitro* mass scale propagation and seedlings development of medicinal orchid *Dendrobium transparens* Wall ex Lindl. **Journal of Medicinal Plants Studies** 8(3): 141-146.
- Bhowmik, T.K. & Rahman, M.M. 2020b. *In vitro* study of medicinally important orchid *Aerides multiflora* Roxb. from nodal and Leaf explants. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 9(4): 179-184.
- Bizari, D.R. & Cardoso, J.C. 2016. Reuse water and urban horticulture: alliance towards more sustainable cities. **Horticultura Brasileira** 34: 311-317.
- Bleecker, A.B. & Kende, H. 2000. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 16:1-18.
- Bonner, J. & Bandurski, R. 1952. Studies of the Physiology, Pharmacology, and Biochemistry of the Auxins. **Annual Review of Plant Physiology** 3:59-86.
- Braissant, O., Astasov-Frauenhoffer, M., Waltimo, T. & Bonkat, G. 2020. A Review of Methods to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology. **Frontiers in Microbiology** 11:547458. doi: 10.3389/fmicb.2020.547458.
- Brancalion, P.H.S., Novembre, A.D.L.C. & Rodrigues, R.R. 2011. Seed development, yield and quality of two palm species growing in different tropical forest types in SE Brazil: implications for ecological restoration. **Seed Science & Technology** 39: 412-424.
- BRASIL. 2009. **Regras para análise de sementes**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 399 p.

- BRASIL. 2014. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 443 de 17 de dezembro de 2014. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 18 dez. 2014. Seção 1, p. 110-121.
- Breda, L.C.S. & Ferraz, E.C. 2011. Manual técnico para produção *in vitro* e aclimatização de orquídeas. **Heringeriana** 5(1): 11-57.
- Bryan, L.A. & Bryan, E.A. 1997. **Programmable controllers: theory and implementation**. 2nd ed. Atlanta: Industrial Text Company. 1035 p.
- Bukatsch, F. 1972. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. **Mikrokosmos** 61(8): 255.
- Burg, S.P. 1973. Ethylene in Plant Growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 70(2): 591-597.
- Campos, J.O. & Chaves, H.M.L. 2020. Tendências e Variabilidades nas Séries Históricas de Precipitação Mensal e Anual no Bioma Cerrado no Período 1977-2010. **Revista Brasileira de Meteorologia** 35(1):157-169. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-7786351019>
- Cantelle, T.D., Lima, E.C. & Borges, L.A.C. 2018. Panorama dos recursos hídricos no mundo e no Brasil. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente** 11(4): 1259-1282.
- Caramaschi, G.M.C.L. 2001. **Propagação *in vitro* de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae)**. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Distrito Federal. 110 p.
- Cardoso, J.C. 2013. Melhoramento de espécies ornamentais como estratégia para o desenvolvimento e autossuficiência do setor. **Horticultura Brasileira** 31(1): 171.
- Cardoso, J.C. 2014. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Botucatu: potencial ornamental e cultivo. **Horticultura Brasileira** 32: 7-13.
- Cardoso, J.C., Zanello, C.A. & Chen, J-T. 2022. An Overview of Orchid Protocorm-Like Bodies: Mass Propagation, Biotechnology, Molecular Aspects, and Breeding. **International Journal of Molecular Sciences** 21: 985. doi:10.3390/ijms21030985.
- Carlswald, B.S., Stern, W.L., Judd, W.S. & Lucansky, T.W. 1997. Comparative leaf anatomy and systematics in *Dendrobium*, sections Aporum and Rhizobium (Orchidaceae). **International Journal of Plant Science** 158(3):332-342.
- Carvalho, A.C.P.P., Tombolato, A.F.C., Rodrigues, A.A.J., Santos, E.O. & Silva, F. 2013. Micropropagação de orquídeas. Pp. 13-53. In: T.G. Junghans & A.S. Souza (eds.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA.
- Carvalho, O.C., Neto, V.B.P., Padilha, D.R.C., Veloso, T.G.R., Bocayuva, M.F., Soares, D.C.O. & Kasuya, M.C.M. 2018. *Cyrtopodium paludicolum* germination with two *Tulasnella* isolates. **Acta Botanica Brasilica** 32(1): 107-112.
- Castro, C.N. 2022. **Água, problemas complexos e o Plano Nacional de Segurança Hídrica**. Ipea: Rio de Janeiro. 281 p.



- Cavalli-Sforza, L.L. 2003. **Genes, povos e línguas**. 1ª ed. São Paulo: Companhia das Letras. 289 p.
- Chambers, A. 2017. Potential for commercial vanilla production in southern Florida. **Citrus Industry** 31-33.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V. & Chandra, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: From laboratory to land. **Biotechnology Letters** 32: 1199–1205. DOI 10.1007/s10529-010-0290-0.
- Chaves, A.L.S. & Mello-Farias, P.C. 2006. Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. **Genetics and Molecular Biology** 29(3): 508-515.
- Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Younis, A. & Zheng, B. 2019. Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. **Frontiers in Plant Science** 9:1945. doi: 10.3389/fpls.2018.01945.
- Chung, H.-H. & Ouyang, H.-Y. 2021. Use of Thidiazuron for High-Frequency Callus Induction and Organogenesis of Wild Strawberry (*Fragaria vesca*). **Plants** 10(67). <https://doi.org/10.3390/plants10010067>
- Cid, L.P.B & Teixeira, J.B. 2014. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. Pp.17-51. In: L.P.B Cid (ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA.
- Ciesielski, T. 1872. Untersuchungen uber die Abwärtskrümmung der Wurzel. **Beiträge zur Biologie Pflanzen** 1: 1–31.
- Clouse, S.D. & Sasse, J.M. 1998. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 49:427–51
- Coelho, M.F.B., Vieira, S.N., Chig, L.A., Santos, L.W. & Albuquerque, M.C.F. 2011. Superação da dormência em sementes de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). **Horticultura brasileira** 29(4): 472-476.
- Coll, Y., Coll, F., Amorós, A. & Pujol, M. 2015. Brassinosteroids roles and applications: an up-date. **Biologia – Section Botany** 70(6): 726-732. DOI: 10.1515/biolog-2015-0085
- Collins, B. 1996. The Photovoltaic Relay: a new Solid State Control Device. Application Note AN-104. Pp. E9-14. In: **International Rectifier-Microeletronic Relay Data Book**. 7a. ed. USA.
- Cortez, P.A., Silva, D.C. & Chaves, A.L.F. 2016. **Manual prático de morfologia e anatomia vegetal**. Ilhéus, BA: Editus. 92 pp.
- Costa, M.A.P.C., Bastos, M.J.S.M., Rocha, M.A., Hansen, D.S., Alves, R.M.O, Souza, E.H. & Garcia, F.R. 2013. Micropropagação de orquídeas. Pp. 373-392. In: T.G. Junghans & A.S. Souza (Eds.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA.

- Costa, M.A., Shimizu, E.S.C., Leão, N.V.M. & Pinheiro, H.A. 2018. Seed Quality Evaluation by Tetrazolium Staining of *Parkia multijuga* Benth. **Agricultural Sciences** 9: 577-586.
- CEPEA/IBRAFLORE - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada e Instituto Brasileiro de Floricultura. 2022. **PIB da cadeia de Flores e Plantas Ornamentais brasileira: ano-base 2017**. <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-da-cadeia-de-flores-e-plantas-ornamentais.aspx>. Accessed on: 10 Dec 2022.
- CRIA (Centro de Referência e Informação Ambiental). 2017. **Specieslink - simple search**. Disponível em <http://www.splink.org.br/index> (Acesso em 01/07/2017).
- Crosby, A.W. 2011. **Imperialismo ecológico: a expansão biológica da Europa, 900-1900**. 1ª ed. São Paulo: Companhia das Letras. 375 p.
- Cui, J., Liu, J., Deng, M., Chen, J. & Henny, R.J. 2008. Plant Regeneration through Protocorm-like Bodies Induced from Nodal Explants of *Syngonium podophyllum* ‘White Butterfly’. **HORTSCIENCE** 43(7): 2129–2133.
- Cunha, M.C.L., Lopes, J.A., Monte, A.A.M., Ferreira, T.C. & Oliveira, M.R.G. 2021. Protocolos de germinação e tetrazólio para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. **Research, Society and Development** 10(9): e57910918273. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18273>.
- Custódio, C.C., Marks, T.R., Pritchard, H.W., Hosomi, S.T. & Machado-Neto, N.B. 2016. Improved tetrazolium viability testing in orchid seeds with a thick carapace (*Dactylorhiza fuchsii*) or dark seed coat (*Vanda curvifolia*). **Seed Science & Technology** 44(1): 1-12. <http://doi.org/10.15258/sst.2016.44.1.17>
- Cutler, D.F., Botha, T. & Stevenson, D.W. 2011. **Anatomia vegetal: uma abordagem aplicada**. Artmed: Porto Alegre. 304 p.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. & Abrams, S.R. 2010. Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. **Annual Review of Plant Biology** 61:651-679.
- Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T. & Yeo, P.F. 1985. **The families of the monocotyledons**. Berlin: Springer-Verlag. 520 pp.
- D’Áusilio, A. 2012. Arduino: A low-cost multipurpose lab equipment. **Behavioral Research** 44: 305–313.
- Darwin, C. & Darwin, F. 1880. **The Power of movement in plants**. London: John Murray. 592 p. Available on [www.darwin-online.org.uk](http://www.darwin-online.org.uk). Accessed on 23 Feb 2022.
- Das, M.C., Kumaria, S. & Tandon, P. 2007. Protocorm Regeneration, Multiple Shoot Induction and *ex vitro* Establishment of *Cymbidium devonianum* Paxt. **Asian Journal of Plant Sciences** 6(2): 349-353.

- Davey, M.R. & Anthony, P. 2010. **Plant cell culture: essential methods**. Londre: John Wiley & Sons. 341 p.
- De, L.C. & Medhi, R.P. 2017. Orchid – a diversified flower crop. **Acta Horticulturae**. 1181: 107-111. DOI 10.17660/ActaHortic.2017.1181.14.
- De, L.C. & Pathak, P. 2018. Conservation, management, and utilization of orchid genetic resources. **Journal of the Orchid Society of India** 32: 81-91.
- De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M. & Benelli, C. 2021. Temporary Immersion System for Production of Biomass and Bioactive Compounds from Medicinal Plants. **Agronomy** 11: 2414. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122414>.
- Deb, C.R., Deb, M.S., Jamir, N.S. & Imchen, T. 2009. Orchids in indigenous system of medicine in Nagaland, India. **Pleione** 3(2): 209 -211.
- Debnath, S.C. 2011. Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation - A review. **Canadian Journal of Plant Science** 91: 147-157.
- Dempsey, D.A. & Klessig, D.F. 2017. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? **BMC Biology** 15:23. DOI 10.1186/s12915-017-0364-8.
- Desjardins, Y., 1995. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization; pp. 145-160. In: F. Carre, P. Chagvardieff (Ed.). **Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures**. Saint-Paul-lez-Durance: Centre d'études de Cadarache.
- Devarakonda, K., Nguyen, K.P. & Kravitz, A.V. 2016. ROBucket: A low cost operant chamber based on the Arduino microcontroller. **Behavior Research Methods** 48:503–509. DOI: 10.3758/s13428-015-0603-2
- Devi, N.P., Lisipriya, B. & Bai, N. 2015. Asymbiotic seed germination and mass multiplication of *Taprobanea spathulata* (L.) Christenson (Asparagales: Orchidaceae): a medicinally important epiphytic orchid. **Brazilian Journal of Biological Sciences** 2(4): 271-286.
- Dignart, S.L., Castro, E.M.C., Pasqual, M., Ferronato, A., Braga, F.T. & Paiva, R. 2009. Sunlight and sucrose concentrations on *in vitro* culture of *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia** 33(3):780-787.
- Distrito Federal. 2016. Agência reguladora de águas, energia e saneamento básico do Distrito Federal – ADASA. Resolução nº 20 de 07 de novembro de 2016. **Diário Oficial do Distrito Federal**, Brasília, DF, 07 nov. 2016. Seção 1, p. 9.
- Dousseau, S., Alvarenga, A.A., Castro, E.M., Soares, R.P., Emrich, E.B. & Melo, L.A. 2008. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *ex vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia** 32(6): 1694-1700.

- Dressler, R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge, USA: Harvard University Press. 331 p.
- Ducos, J., Lambot, C. & Pétiard, V. 2007. Bioreactors for Coffee Mass Propagation by Somatic Embryogenesis. **International Journal of Plant Developmental Biology** 1(1): 1-12.
- Dutra, D., Johnson, T.R.M, Kauth, P.J., Stewart, S.L., Kane, M.E. & Richardson, L. 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 94:11–21.
- Dutra, D., Kane, M.E., Adams, C.R. & Richardson, L. 2009. Reproductive biology of *Cyrtopodium punctatum* in situ: implications for conservation of an endangered Florida orchid. **Plant Species Biology** 24: 92–103.
- Dutra, D., Kane, M.E. & Richardson, L. 2009. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 96: 235-243.
- Duval, C.M. 2014. The flower production and family farming. **Horticultura Brasileira** 32(2): 241.
- Eburneo, L., Ribeiro-Júnior, N.G., Karsburg, I.V., Rossi, A.A.B. & Silva, I.V. 2017. Anatomy and micromorphometric analysis of leaf *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade with addition of potassium silicate under different light sources. **Brazilian Journal of Biology** 77(1): 140-149.
- Eibl, R. & Eibl, D. 2008. Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. **Phytochemistry Reviews** 7:593-598.
- Ekmekçigil, M., Bayraktar, M., Akkus, Ö. & Gürel, A. 2019. High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 136: 465–466.
- Elizalde, V., García, J.R., Peña-Valdivia, C.B., Ybarra, M.C., Leyva, O.R. & Carlos-Trejo, C. 2017. Viabilidad y germinación de semillas de *Hechtia perotensis* (Bromeliaceae). **Revista de Biología Tropical** 65(1): 153-165.
- Erland, L.A.E., Giebelhaus, R.T., Victor, J.M.R., Murch, S.J. & Saxena, P.K. 2020. The Morphoregulatory Role of Thidiazuron: Metabolomics-Guided Hypothesis Generation for Mechanisms of Activity. **Biomolecules** 10: 1253. doi:10.3390/biom10091253.
- Escalona, M., Lorenzo, J.C., González, B., Daquinta, M., González, J.J., Desjardins, Y., Borroto, C.G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports** 18: 743–748.

- Espitia-Camacho, M., Araméndiz-Tatis, H. & Cardona-Ayala, C. 2020. Morphological characteristics and seed viability of *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake. **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica** 23(1): e1530. <http://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1530>
- Esyanti, R.R., Adhitama, N. & Manurung, R. 2016. Efficiency Evaluation of *Vanda Tricolor* Growth in Temporary Immerse System Bioreactor and Thin Layer Culture System. **Journal of Advanced Agricultural Technologies** 3(1): 63-66.
- Etienne, H. & Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 69: 215–231.
- Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. 2014. **Raven Biologia vegetal**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1637 p.
- Fahnestock, G.W. 1858. Memoranda of the effects of carburetted hydrogen gas upon a collection of exotic plants. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia** 10:118-134.
- Fang, S-C., Chen, J-C. & Wei, M-J. 2016. Protocorms and Protocorm-Like Bodies Are Molecularly Distinct from Zygotic Embryonic Tissues in *Phalaenopsis aphrodite*. **Plant Physiology** 171: 2682–2700.
- FAO. 2018. **Seeds toolkit - Module 6: Seed storage**. Rome: FAO. 112 p.
- Faria, R.T., Assis, A.M. & Carvalho, J.F.R.P. 2010. **Cultivo de orquídeas**. Londrina: Mecenias. 208 p.
- Faria, R.T., Assis, A.M., Unemoto, L.K. & Carvalho, J.F.R.P. 2012. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenias. 124 p.
- Faria, R.T., Stegani, V., Bertoncelli, D.J., Alves, G.A.C. & Assis, A.M. 2018. Substrates for the cultivation of epiphytic orchids. **Semina: Ciências Agrárias** 39(6): 2851-2866.
- Febriani, S., Ganefianti, D.W., Romeida, A. & Herawati, R. 2019. Acclimatization of Pencil Orchid (*Papillionanthe hookeriana* Rehb.f) as affected by different types of planting media and fertilizing frequency. **Akta Agrosia** 22(1): 36-41.
- Ferreira, M.E., Caldas, L.S. and Pereira, E.A. 1998. Aplicação da Cultura de Tecidos no Melhoramento genético de Plantas. Pp. 21-43. In: A.C. Torres, L.S. Caldas and J.A. Buso (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CNPH.
- Ferreira, D.F. 2011. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35(6):1039-1042.

- Ferreira, W.M., Oliveira, A.M., Viana, J.C., Suzuki, R.M. & Oliveira, J.R.G. 2022. Asymbiotic germination, initial development *in vitro* and acclimatization of *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, a Brazilian Savanna orchid species. **Rodriguésia** 73: e01272020.
- Ferreira, W.M., Oliveira, S.P., Suzuki, R.M., Silva, K.L.F. & Júnior, J.W.P.S. 2018. Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. **Rodriguésia** 69(4): 2137-2151.
- Figura, T., Weiser, M. & Ponert, J. 2020. Orchid seed sensitivity to nitrate reflects habitat preferences and soil nitrate content. **Plant Biology Journal** 22: 21-29.
- Figueiredo, L.D. & Kolb, R.M. 2013. Novo substrato para o cultivo de orquídeas: estudo do seu potencial de uso em plantas de *Laelia pulcherrima*. **Revista Brasileira de Biociências** 11(4): 405-413.
- Fileti, J.F., Hengling, M.M., Gianeti, T.M.R., Pritchard, H.W., Hosomi, S.T., Machado-Neto, N.B. & Custódio, C.C. 2021. Seed longevity and cryobiotechnology in the orchid genus *Cattleya*. **CryoLetters** 42(6): 353-365.
- Fileti, J.F., Hosomi, S.T., Custódio, C.C. & Machado-Neto, N.B. 2015. Controlled deterioration test in seeds of four orchids' species to evaluate the physiological behavior. **Colloquium Agrariae** 11(2): 32-37.
- Flachsland, E., Graciela Terada, G., Fernández, J.M., Medina, R., Schinini, A., Rey, H. & Mroginski, L. 2011. Plant regeneration from root-tip culture of *Cyrtopodium brandonianum* Barb. Rodr. (Orchidaceae). **Propagation of Ornamental Plants** 11(4): 184-188.
- Flora e Funga do Brasil. 2022. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Accessed on: 10 Dec 2022.
- Fonge, B.A., Essomo, S.E., Bechem, T.E., Tabot, P.T., Arrey, B.D., Afanga, Y. & Assoua, E.M. 2019. Market trends and ethnobotany of orchids of Mount Cameroon. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 15:29. <https://doi.org/10.1186/s13002-019-0308-1>.
- França-Neto, J.B. & Krzyzanowski, F.C. 2019. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. **Journal of Seed Science** 41(3):359-366.
- Franceschi, C.R.B., Smidt, E.C., Vieira, L.N. & Ribas, L.L.F. 2019. Storage and *in vitro* germination of orchids (Orchidaceae) seeds from Atlantic Forest – Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 91(3): e20180439.
- Freitas, E.L., Lima-Brito, A., Albuquerque, M.S. & Sanatana, J.R.F. 2013. **Multiplificação *in vitro* de *Cyrtopodium aliciae* (Orchidaceae) por via direta**. In: XIX Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecido de Plantas,

- 2013, Recife-PE. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecido de Plantas.
- Fu, Y. 2017. The Vulnerability of Plant Genetic Resources Conserved *ex Situ*. **Crop Science** 57: 2314-2328.
- Galston, A.W. & Sawhney, R.K. 1990. Polyamines in Plant Physiology. **Plant Physiology** 94: 406-410.
- Gane, R. 1934. Production of Ethylene by some Ripening Fruits. **Nature** 134: 1008.
- García-Ramírez, Y., Barrera, G.P., Freire-Seijo, M., Barbón, R., Concepción-Hernández, M., Mendoza-Rodríguez, M.F. & Torres-García, S. 2019. Effect of sucrose on physiological and biochemical changes of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 137: 239–247.
- George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.D. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. Pp. 205–226. In: E.F. George, M.A. Hall & G.D. Klerk. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3<sup>a</sup> ed. Springer: Dordrecht.
- Georgiev, M.I., Eibl, R. & Zhong, J. 2013. Hosting the plant cells *in vitro*: recent trends in bioreactors. **Applied Microbiology and Biotechnology** 97(9): 3787-3800.
- Georgiev, M.I. & Weber, J. 2014. Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. **Biotechnology Letters** 36: 1359-1367.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A. & Bley, T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering in Life Science** 14(6): 607–621.
- Gianguzzi, V., Inglese, P., Barone, E. & Sottile, F. 2019. *In vitro* regeneration of *Capparis spinosa* L. by using a temporary immersion system. **Plants** 8:177.
- Givnish, T.J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S.P., Hunter, S.J., Zuluaga, A., Doucette, A., Caro, G.G., McDaniel, J., Clements, M.A., Arroyo, M.T.K., Endara, L., Kriebel, R., Williams, N.H., & Cameron, K.M. 2016. Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. **Journal of Biogeography** 43: 1905–1916. doi:10.1111/jbi.12854.
- Givnish, T.J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S.P., Hunter, S.J., Zuluaga, A., Iles, W.J.D., Clements, M.A., Arroyo, M.T.K., Leebens-Mack, J., Endara, L., Kriebel, R., Neubig, K.M., Whitten, W.M., Williams, N.H. & Cameron, K.M. 2015. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. **Proceedings of the Royal Society B** 282: 20151553. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.1553>.
- Gomi, K. 2020. Jasmonic Acid: An Essential Plant Hormone. **International Journal of Molecular Science** 21: 1261; doi:10.3390/ijms21041261.

- Gravendeel, B., Smithson, A., Slik, F.J.W. & Schuiteman, A. 2004. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**. 359: 1523-1535.
- Gray, W.M. 2004. Hormonal regulation of plant growth and development. **PLoS Biology** 2 (9): 1270-1273.
- Grout, B.W.W. & Millam, S. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. **Annals of Botany** 55: 129-131.
- Guedes, R.S., Alves, E.U., Gonçalves, E.P., Viana, J.S., Silva, K.B. & Gomes, M.S.S. 2010. Metodologia para teste de tetrazólio em sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 12(1): 120-126.
- Guimarães, F.A.R., Pereira, M.C., Felício, C.S., Torres, D.P., Oliveira, S.F., Veloso, T.G.R. & Kasuya, M.C.M. 2013. Symbiotic propagation of seedlings of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica** 27(3): 590-596.
- Guiné, R.P.F., Florença, S.G., Moya, K.V. & Anjos, O. 2020. Edible flowers, old tradition or new gastronomic trend: A first look at consumption in Portugal versus Costa Rica. **Foods** 9, 977. doi:10.3390/foods9080977.
- Guo, W.L., Chang, Y.C.A. & Kao, C.Y. 2010. Protocorm-like Bodies Initiation from Root Tips of *Cyrtopodium paranaense* (Orchidaceae). **HortScience** 45(9):1365–1368.
- Guzmán-Fernández, M., Torre, M.Z., Ortega-Sigala, J., Guzmán-Valdivia, G., Galvan-Tejeda, J.I. Cruz-Domínguez, O., Ortiz-Hernández, A., Fraire-Hernández, M., Sifuentes-Gallardo, C. & Durán-Muñoz, H.A. 2021. Arduino: a Novel Solution to the Problem of High-Cost Experimental Equipment in Higher Education. **Experimental Techniques** 45: 613–625.
- Haberlandt, G. 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse** 111: 69–92.
- Halim, R., Akyol, B. & Gurel, A. 2017. *In vitro* regeneration of Vanilla (*Vanilla planifolia* L.). **Journal of Applied Biotechnological Sciences** 11(1): 5-10
- Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F. & Yan, Y. 2018. Phytohormones and Effects on Growth and Metabolites of Microalgae: A Review. **Fermentation** 4(2): 25.
- Handa, A.K., Fatima, T. & Mattoo, A.K. 2018. Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. **Frontiers in Chemistry** 6:10. doi: 10.3389/fchem.2018.00010
- Hangarter, R. & Ries, S.K. 1978. Effect of Triaccontanol on Plant Cell Cultures *in Vitro*. **Plant Physiology** 61: 855-857.



- Harari, Y.N. 2017. **Sapiens – uma breve história da humanidade**. 26<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: L & PM. 464 p.
- Haridasan, M. 1982. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. **Plant and Soil** 65: 265-273.
- Haridasan, M. 2008. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal Of Plant Physiology** 20(3):183-195.
- Harrison, C.R. & Arditti, J. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazzete** 139(2): 180-189.
- Haspolat, G., Özzambak, M.E. & Şik, L. 2013. Seed germination of some *Crocus* species of Western Anatolia. **Anadolu** 23(2): 21-26.
- Hay, F.R., Merritt, D.J., Soanes, J.A. & Dixon, K.W. 2010. Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. **Botanical Journal of the Linnean Society** 164:26–41.
- Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue-cultures plants. **Current Science** 85(12): 1704-1712.
- Hazarika, B.N., Silva, J.A.T. & Talukdar, A. 2006. Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. Pp. 427-438. In: J.A.T. Silva (Ed.). **Floriculture, Ornamental and Plant biotechnology: Advances and Topical Issues**. Isleworth: Global Science Books.
- Hedden, P. & Sponsel, V. 2015. A Century of Gibberellin Research. **Journal of Plant Growth and Regulation** 34:740–760. DOI: 10.1007/s00344-015-9546-1
- Hinsley, A., Lee, T.E., Harrinson, J.R. & Roberts, D.L. 2016. Estimating the extent and structure of trade in horticultural orchids via social media. **Conservation Biology** 30(5): 1038-1047
- Hoelters, J. & Zimmer, K. 1991. Shoot regeneration from tips of orchids *in vitro*. 5: Propagation of other orchids using the “*Mormodes histrio* method”. **Gartenbauwissenschaft** 56(3): 114-117.
- Holbrook, N.M. & Putz, F.E. 1996. From epiphyte to tree: differences in leaf structure and leaf water relations associated with the transition in growth form in eight species of hemiepiphytes. **Plant, Cell & Environment** 19:631–42.
- Hopkins, W.G. & Hüner, N.P.A. 2008. **Introduction to plant physiology**. 4th ed. John Wiley & Sons: New York. p. 307.
- Hosomi, S.T., Custódio, C.C., Seaton, P.T., Marks, T.R. & Machado-Neto, N.B. 2012. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant** 48:127-136.

- Hosomi, S.T., Souza, T.B., Custódio, C.C. & Machado-Neto, N.B. 2017. Refining the tetrazolium test for evaluation of *Cattleya labiata* and *C. tigrina* seeds viability. **Australian Journal of Crop Science** 11(10):1320-1326.
- Holubowicz, R., Wang, X. & Siutaj, W. 2001. Use of tetrazolium (TTC), Germ's and greenhouse plant emergence methods for testing seed vigor of selected ornamental plant species. **Acta Agrobotanica** 54(2): 5-17.
- Hunhoff, V.L., Silva, C.A., Lage, L.A., Krause, W. & Palú, E.G. 2016. Biologia, morfologia floral e potencial ornamental de *Cyrtopodium saintlegerianum* (Orchidaceae). **Agro@mbiente** 10(4): 358-363.
- Irsyadi, M.B. 2021. Factors That Effect of the Optimal Plantlet Growth from Tissue Culture on the Acclimatization Stage. **Proceeding International Conference on Science and Engineering** 4: 100-104
- IUCN - International Union for Conservation of Nature. 2012. **Guidelines for application of IUCN red list criteria at regional and national levels: version 4.0**. Switzerland and Cambridge, Gland. 41p.
- Jakab-Ilyefalvi, Z. & Pamfil, D.C. 2011. Chlorophyll content quantification in acclimated "*in vitro*" plum plants (*Prunus domestica*, L.). **Annals of the Romanian Society for Cell Biology** 16(1): 55-61.
- Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Wlodarska, P., Zabiegala, B., Bucinski, A. & Luczkiewicz, M. 2017. Bioreactor shoot cultures of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) for a large-scale production of bioactive volatile compounds. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 131:51–64.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York. 523 p.
- Juras, M.C.R., Jorge, J., Pescador, R., Ferreira, W.M., Tamaki, V. & Suzuki, R.M. 2019. *In vitro* culture and acclimatization of *Cattleya xanthina* (Orchidaceae), an endangered orchid of the Brazilian Atlantic Rainforest. **Rodriguésia** 70: e01422017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201970014>.
- Kabir, M.F., Rahman, M.S., Jamal, A., Rahman, M. & Khalekuzzaman, M. 2013. multiple shoot regeneration in *Dendrobium fimbriatum* Hook an ornamental orchid. **The Journal of Animal & Plant Sciences** 23(4): 1140-1145.
- Kaviani, B. 2011. **Conservation of plant genetic resources by cryopreservation**. Australian Journal of Crop Science 5(6): 778-800.
- Karyanti, S.P., Sukarnih, T., Rudiyan, Y., Hanifah, N.F., N Sa'adah, N. & Dasumiati, D. 2021. Micropropagation of Red Ginger (*Zingiber officinale* Rosc. Var. *Rubrum*) Using Several Types

- of Cytokinins. **Journal of Physics: Conference Series** 1751: 012051. doi:10.1088/1742-6596/1751/1/012051.
- Kaswan, K.S., Singh, S.P. & Sagar, S. 2020. Role of Arduino in Real World Applications. **International Journal of Scientific & Technology Research** 9(1): 1113-1116.
- Kauth, P.J., Dutra, D, Johnson, T.R., Stewart, S.L., Kane, M.E. & Vendrame, W.A. 2008. Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. Pp. 375-391. In: J.A. Teixeira da Silva (Ed). **Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topic issues**. Isleworth: Global Science Books.
- Kendon, J.P., Rajaovelona, L., Sandford, H., Fang, R., Bell, J. & Sarasan, V. 2017. Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: *in vitro* collecting as a case study. **Botanical Studies** 58 (34): DOI 10.1186/s40529-017-0187-5
- Kengar, A.A. & Paratkar, G.T. 2015. Large scale production of *Ruta graveolens* L. shoots using aerated bioreactor. **European Journal of Biotechnology and Bioscience** 3(7): 35-38.
- Kerbaux, G.B. 2008. **Fisiologia vegetal**. 2<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 431 pp.
- Kim, J.K., Shawon, M.R.A., An, J.H., Yun, Y.J., Park, S.J., Na, J.K. & Choi, K.Y. 2021. Influence of Substrate Composition and Container Size on the Growth of Tissue Culture Propagated Apple Rootstock Plants. **Agronomy** 11: 2450.
- Klein, C. 2015. Utilização de substratos alternativos para produção de mudas. **Revista Brasileira de Energias Renováveis** 4: 43-63.
- Knudson L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette** 73:1–25.
- Knudson L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin** 14: 214–217.
- Kodym, A. & Zapatas-Arias, F.J. 2001. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ culture** 66(1): 67-71.
- Koene, F.M., Amano, É. & Ribas, L.L.F. 2019. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany** 121: 83–91.
- Kokkoris, V. & Hart, M. 2019. *In vitro* propagation of arbuscular mycorrhizal fungi may drive fungal evolution. **Frontiers in Microbiology** 10:2420.
- Koo, Y.M., Heo, A.Y. & Choi, H.W. 2020. Salicylic Acid as a Safe Plant Protector and Growth Regulator. **Plant Pathology Journal** 36(1):1-10.
- Kraus, J.E. & Arduim, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: UFRRJ, 198 p.

- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P. & Kongbangkerd, A. 2019. *In vitro* propagation of rheophytic orchid, *Epipactis flava* Seidenf. - A comparison of semi-solid, continuous immersion and temporary immersion systems. **Biology** 8: 72. doi:10.3390/biology8040072
- Kurosawa, E. 1926. Experimental studies on the nature of the substance excreted by the 'bakanae' fungus. **Transactions, Natural History Society of Formosa** 16:213–227
- Labouriau, L.G., Oliveira, J.G. & Salgado-Labouriau, M.I. 1961. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 33(2):237-252.
- Lakshanthi, J.M.T. & Seran, T.H. 2019. Survival rate and growth performance of *in vitro* raised plantlets of orchid (*Dendrobium sp.*) in different hardening substrates. **International Journal of Advanced Research and Review** 4(3): 01-09.
- Latunra, A.I., Tuwo, M. & Rezky, N. 2021. *In vitro* propagation of *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* protocorm on media containing liquid organic fertilizer as a substitute for MS media. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science** 886: 012006. doi:10.1088/1755-1315/886/1/012006
- Lauzer, D., St-Arnaud, M. & Barbaré, D. 1994. Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cypripedium acaule*. **Lindleyana** 9(3): 197-204.
- Lee, N., Wesztein, Y. & Sommer, H.E. 1988. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed Sweetgum Leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 113(1): 167-171.
- Lee, Y-I., Hsu, S-T. & Yeung, E.C. 2013. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. **American Journal of Botany** 100(11): 2121–2131.
- Lefevre, H., Bauters, L. & Gheysen, G. 2020. Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. **Frontiers in Plant Science** 11:338. doi: 10.3389/fpls.2020.00338.
- Leite, M.S., Silva, F.G., Assis, E.S., Neto, A.R., Mendes, G.C. & Rosa, M. 2017. Morphoanatomy and physiology of *Pouteria gardneriana* Radlk plantlets grown *in vitro* at varied photosynthetic photon flux densities. **Acta Scientiarum. Agronomy** 39(2): 217-224.
- Lemos, E.E.P. 2013. Micropropagação de Plantas por Biorreatores. Pp. 95-131. In: T.G. Junghans & A.S. Souza (Eds.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA.
- Lemos, E.E.P., Ferreira, M.S., Alencar, L.M.C., Oliveira, J.G.J. & Magalhães, V.S. 2001. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura** 23(3): 482-487.

- Lesar, H., Hlebec, B., Čeranič, N., Kastelec, D. & Luthar, Z. 2012. Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under *in vitro* conditions. **Acta Agriculturae Slovenica** 99(1): 69-75.
- Latham, D.S. 1973. Cytokinins from *Zea mays*. **Phytochemistry** 12: 2445-2455.
- Leyva-Ovalle, O.R., Bello-Bello, J.J., Murguía-González, J., Núñez-Pastrana, R. & Ramírez-Mosqueda, M.A. 2020. Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et W. E. Higging in Temporary Immersion Systems. **3 Biotech** 10:26. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2010-3>
- Lima, B.V. 2012. **Subsídios para o manejo cultural e fitopatológico de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.102 p.
- Lloyd, G. & McCown, B.H. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society** 30: 421-427.
- Lopez-Rodriguez, F.M. & Cuesta, F. 2021. An Android and Arduino Based Low-Cost Educational Robot with Applied Intelligent Control and Machine. Learning. **Applied Sciences** 11, 48. <https://dx.doi.org/10.3390/app11010048>
- Lorenzi, H. 2015. **Plantas para jardim no Brasil - herbáceas, arbustivas e trepadeiras**. 2<sup>a</sup>. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum 1120 p.
- Louis, L. .2016. Working principle of arduino and using it as a tool for study and research. **International Journal of Control, Automation, Communication and Systems** 1(2): 21-29. DOI: 10.5121/ijcaacs.2016.1203
- Loyola-González, O., Medina-Pérez, M.A., Hernández-Tamayo, D., Monroy, R., Carrasco-Ochoa, J.A. & García-Borroto, M. 2019. A Pattern-Based Approach for Detecting Pneumatic Failures on Temporary Immersion Bioreactors. **Sensors** 19, 414; doi:10.3390/s19020414.
- Luz, F.J.F. & Oliveira, J.M.F. 2012. **Orquídeas de Roraima**. Brasília: Embrapa. 181 p.
- Machado, M.P., Silva, A.L.L., Biasi, L.A., Deschamps, C., Bespalho-Filho, J.C. & Zanette, F. 2014. Influence of Calcium Content of Tissue on Hyperhydricity and Shoot-Tip Necrosis of *in vitro* Regenerated Shoots of *Lavandula angustifolia* Mill. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 57(5): 636-643.
- Machado-Neto, N.B. & Custódio, C.C. 2005. Orchid conservation through seed banking: ins and outs. **Selbyana** 26(1/2): 229–235.

- Maharjan, S., Pradhan, S., Thapa, B.B. & Pant, B. 2019. *In Vitro* Propagation of Endangered Orchid, *Vanda pumila* Hook.f. through Protocorms Culture. **American Journal of Plant Sciences** 10: 1220-1232.
- Maluta, F.A., Bordignon, S.R., Rossi, M.L., Ambrosano, G.M.B. & Rodrigues, P.H.V. 2013. Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 48(9): 1303-1307.
- Mancilla-Álvarez, E., Pérez-Sato, J.A., Núñez-Pastrana, R., Spinoso-Castillo, J.L. & Bello-Bello, J.J. 2021. Comparison of Different Semi-Automated Bioreactors for *In Vitro* Propagation of Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). **Plants** 10: 1010. <https://doi.org/10.3390/plants10051010>
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015. **Mapeamento e Quantificação da Cadeia de Flores e Plantas Ornamentais do Brasil**. São Paulo: OCESP. 122p.
- Marcos-Filho, J. 2015. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola** 72(4): 363-374.
- Marchant, M.J., Molina, P., Montecinos, M., Guzmán, L., Balada, C., Fassio, C. & Castro, M. 2021. *In vitro* propagation of Easter Island *Curcuma longa* from rhizome explants using temporary immersion system. **Agronomy** 11: 2121.
- Martin, C.E., Lin, T.-C., Lin, K.-C., Hsu, C.-C. & Chiou, W.-L. 2004. Causes and consequences of high osmotic potentials in epiphytic higher plants. **Journal of Plant Physiology** 161: 1119–1124.
- Martin, K.P., Zhang, C-L., Slater, A. & Madassery, J. 2007. Control of shoot necrosis and plant death during micropropagation of banana and plantains (*Musa* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 88:51–59.
- Martins, C.C., Machado, C.G., Caldas, I.G.R. & Vieira, I.G. 2011. Vermiculita como substrato para o teste de germinação de sementes de Barbatimão. **Ciência Florestal** 21(3): 421-427.
- Martre, P., Lacan, D., Just, D. & Teisson, C. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 67: 25–35.
- Mathews, V.H. & Rao, P.S. 1985. *In vitro* culture os *Vanda* hybrid (*Vanda* TMA x *Vanda* Miss. Joaquim) I. Studies on protocorm explants. **Proceedings of Indian National Science Academy** 1: 96-103.
- Mayo-Mosqueda, A., García-Hernández, E., Noguera-Savelli, E., Cetzal-Ix, W. & Alatorre-Cobos, F. 2022. Advances in Breeding, Bioprospecting, and *In Vitro* Culture of *Laelia* Orchid Species. **Horticulturae** 8: 103.
- McRoberts, M. 2011. **Arduino básico**. 1ª ed. Novatec: São Paulo. 453pp.

- Mehrotra, S. Goel, M.K., Kukreja, A.K. & Mishra, B.N. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology** 6(13): 1484-1492.
- Melo, G.M., Barbosa, M.R., Dias, A.L.F., Willadino, L. & Camara, T.R. 2014. Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 18 (Suplemento): S27–S33.
- Mendes, D.J., Sibov, S.T. & Faria, M.T. 2015. Influência dos ácidos naftaleno acético e ácido indol butírico (auxinas) no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. F. (Orchidaceae). **Revista Eletrônica De Educação Da Faculdade Araguaia** 7: 13-40.
- Mendonça, E.G., Stein, V.C., Carvalho, H.H., Santos, B.R., Beijo, L.A. & Paiva, L.V. 2016. The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. **Ciência Florestal** 26(4): 1211-1224.
- Menezes, L. C. 2000. **Orquídeas genus *Cyrtopodium*: Espécies brasileiras**. IBAMA. Brasília. 208 p.
- Mercado, S.A.S, Caleño, J.D.Q. & Roza, L.Y.M. 2020. Improvement of the methodology of the tetrazolium test using different pretreatments in seeds of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae). **Journal of Seed Science** 42: e202042013. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v42231028>
- Mercado, S.A.S, Delgado, E.A.B. & Caleño, J.D.Q. 2019. Pre-treatments on the tetrazolium test on *Epidendrum barbaricum* Hágsater & Dodson seeds. **Acta Agronómica** 68(4): 306-311.
- Milik, A. & Hryniewicz, E. 2012. Synthesis and Implementation of Reconfigurable PLC on FPGA Platform. **International Journal Of Electronics And Telecommunications** 58(1): 85-94. DOI: 10.2478/v10177-012-0012-8.
- Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., Saltza, M.H. & Strong, F.M. 1955b. Structure and synthesis of kinetin. **Journal of the American Chemical Society** 78: 2662-2663.
- Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., Saltza, M.H. & Strong, F.M. 1956. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell Division. **Journal of the American Chemical Society** 78: 1375-1380.
- Miller, C.O., Skoog, F., Saltza, M.H. & Strong, M. 1955a. Kinetin, a cell Division factor from deoxyribonucleic acid. **Journal of the American Chemical Society** 77:1329-1334.
- Milošević, M., Vujakovic, M. & Karagic, D. 2010. Vigour Tests as Indicators of Seed Viability. **Genetika** 42(1): 103-118.
- Mirani, A.A., Abul-Soad, A.A. & Markhand, G.S. 2017. *In vitro* rooting of *Dendrobium nobile* orchid: multiple responses to auxin combinations. **Notulae Scientia Biologicae** 9(1): 84-88.

- Mohanty, P., Paul, S., Das, M.C., Kumaria, S. & Tandon, P. 2012. A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India. **AoB PLANTS**: pls023; doi:10.1093/aobpla/pls023.
- Mok, D.W.S. & Mok, M.C. 2001. Cytokinin Metabolism and Action. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 52:89–118.
- Moore, D. 1849. On growing orchids from seeds. **The Gardeners' Chronicle** 35:549.
- Moraes, L.M., Cavalcante, L.C.D. & Faria, R.T. 2002. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum** 24(5): 1397-1400.
- Morales-Sánchez, V., Rivero-Cruz, I., Laguna-Hernández, G., Salazar-Chávez, G. & Mata, R. 2014. Chemical composition, potential toxicity, and quality control procedures of the crude drug of *Cyrtopodium macrobulbon*. **Journal of Ethnopharmacology** 154:790–797.
- Moreira, A.L., Silva, A.B., Santos, A., Reis, C.O. & Landgraf, P.R.C. 2013. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural** 43(10): 1804-1810.
- Moreira, A.S.F.P., Filho, J.P.L., Zotz, G. & Isaias, R.M.S. 2009. Anatomy and photosynthetic parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Shltr. and *Epidendrum secundum* Jacq. **Flora** 204: 604–611.
- Morris, M.W., Stern, W.L. & Judd, W.S. 1996. Vegetative anatomy and systematics of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 120: 89-144.
- Murai, N. 2014. Review: Plant Growth Hormone Cytokinins Control the Crop Seed Yield. **American Journal of Plant Sciences** 5: 2178-2187. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.514231>.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473–497.
- Murch, S.J., Liu, C., Romero, R.M. & Saxena, P.K. 2004. *In Vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 78: 63–68.
- Muschick, M. 2010. The evolution of seed testing. **Seed Testing International** 139: 3-6.
- Muthukumar, T. & Shenbagam, M. 2018. Vegetative anatomy of the orchid *Bulbophyllum sterile* (Orchidaceae: Epidendroideae). **Lankesteriana** 18(1): 13–22.
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T.R., Seaton, P.T. & Pritchard, H.W. 2011. Nutritional requirements for *in vitro* seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. **Journal of Tropical Forest Science** 23(2): 204-212.
- Naeem, M., Iqbal, M., Parveen, N., Ul-Allh, S. Abbas, Q., Rehman, A. & Sad, M. 2016. An over View of Bakanae Disease of Rice. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science** 16 (2): 270-277. DOI: 10.5829/idosi.aejaes.2016.16.2.12834



- Naeem, M., Masroor, M., Khan, A. & Moinuddin. 2012. Triaccontanol: a potent plant growth regulator in agriculture. **Journal of Plant Interactions** 7(2): 129-142.
- Nakayama, H., Sinha, N.R. & Kimura, S. 2017, How Do Plants and Phytohormones Accomplish Heterophylly, Leaf Phenotypic Plasticity, in Response to Environmental Cues. **Frontiers in Plant Science** 8: 1717. DOI: 10.3389/fpls.2017.01717
- Nascimento, D. & Novais, G.T. 2020. Clima do Cerrado: dinâmica atmosférica e características, variabilidades e tipologias climáticas. **Élisée, Revista de Geografia da UEG** 9(2): e922021
- Nazir, U., Gul, Z., Shah, G.M. & Khan, N.I. 2022. Interaction Effect of Auxin and Cytokinin on *in vitro* Shoot Regeneration and Rooting of Endangered Medicinal Plant *Valeriana jatamansi* Jones through Tissue Culture. **American Journal of Plant Sciences** 13: 223-240
- Novak, S.D., Luna, L.J. & Gamache, R.N. 2014. Role of auxin in orchid development. **Plant Signaling and Behavior** 9(10): e972277.
- Novikova, T.I., Asbaganov, S.V., & Ambros, E.V. & Zaytseva, Y.G. 2020. TDZ-induced axillary shoot proliferation of *Rhododendron mucronulatum* Turcz and assessment of clonal fidelity using DNA-based markers and flow cytometry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 56: 307–317. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10049-9>.
- Nowrot, A. & Solecka, B. 2018. Application of Arduino Module to Research In Surface Physics. **Multidisciplinary Aspects of Production Engineering** 1(1): 295-300. Doi:10.2478/mape-2018-0037
- Nurfadilah, S. 2016. The effect of culture media and activated charcoal on asymbiotic seed germination and seedling development of a threatened orchid *Dendrobium taurulinum* J.J. Smith *in vitro*. **Berita Biologi** 15(1): 49-57.
- Oliveira, J., Moraes, M.C., Custódio, C.C. & Neto, N.B.M. 2023. *In vitro* development and acclimatization of *Cyrtopodium aliciae* L. Linden & Rolfe, an endemic species of the Chapada Diamantina. **Ciência Rural** 53(5): e20210299.
- Oliveira, M.L., Xavier, A., Penchel, R.M. & André Santos, A.F. 2011. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis** 39(91): 309-315.
- Oliveira, P.E.A.M. 2008. Fenologia e biologia reprodutiva das espécies de Cerrado; pp. 273-290, in: S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Tecnologia e Informação. v. 1.
- Pacek-Bieniek, A., Dyduch-Siemińska, D. & Rudaś, M. 2010. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). **Folia Horticulturae** 22(2): 45-50

- Paek, K.Y., Chakrabarty, D. & Hahn, E.J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 81: 287–300.
- Paiva, J.G.A., Fank-de-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P. & Graciano-Ribeiro, D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica** 20(2): 257-264.
- Paiva, P.D.O. 2008. **Paisagismo: conceitos e aplicações**. Lavras: UFLA. 603 p.
- Paque, S. & Weijers, D. 2016. Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. **BMC Biology** 14:67. DOI 10.1186/s12915-016-0291-0.
- Parthibhan, S., Rao, M.V. & Kumar, T.S. 2015. *In vitro* regeneration from protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley – An imperiled orchid. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** 13: 227–233.
- Passos, M.C., Ribeiro, F.P., Teixeira, T.M.A. & Valadão, M.B.X. 2020. Crise hídrica no Distrito Federal, Brasil: uma visão acadêmica. **Research, Society and Development** 9(11): e1139119518.
- Paudel, M.R. & Pant, B. 2012. *In vitro* plant regeneration of *Esmeralda clarkei* Rchb.f. via protocorm explant. **African Journal of Biotechnology** 11(54): 11704-11708.
- Paul, S., Kumaria, S. & Tandon, P. 2012. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. **AoB PLANTS**: plr032: 1-7; doi:10.1093/aobpla/plr032.
- Paulino, M.A.P.P., Martins, V., Silva, A.P.R., Karsburg, I.V., Silva, J.C., Corbellini, M. & Rondon, M.J.P. 2021. Desenvolvimento *in vitro* de *Cyrtopodium cachimboense* L.C. Menezes em diferentes níveis de sacarose. **Brazilian Journal of Development** 7(2): 18844-18860.
- Pavlović, D., Nikolić, B., Đurović, S., Waisi, H., Anđelković, A. & Marisavljević, D. 2014. Chlorophyll as a measure of plant health: Agroecological aspects. **Pesticidi i Fitomedicina** 29(1): 21–34.
- Peng, S., Garcia, F.V., Laza, R.C. and Cassman, K.G. 1993. Adjustment for specific leaf weight improves chlorophyll meter's estimate of rice leaf nitrogen concentration. **Agronomy Journal** 85: 987-990.
- Pereira, M.C., Rocha, D.I., Gomes, T., Pereira, O.L., Francino, D.M.T., Meira, R.M.S.A. & Kasuya, M.C.M. 2015. Characterization of seed germination and protocorm development of *Cyrtopodium glutiniferum* (Orchidaceae) promoted by mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp. **Acta Botanica Brasilica** 29(4): 569-576.

- Peres, L.E.P., Majerowicz, N. & Kerbauy, G.B. 2001. Dry matter partitioning differences between shoots and roots in two contrasting genotypes of orchids and their relationship with endogenous levels of auxins, cytokinins and abscisic acid. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 13(2): 185-195.
- Pérez, M., Bueno, M.A, Escalona, M., Toorop, P., Rodríguez, R. & Cañal, M.J. 2013. Temporary immersion systems (RITA®) for the improvement of cork oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production. **Trees** 27:1277–1284.
- Pfeffer, W. 1900. **The physiology of plants**. 2nd ed. A.J. Ewart (trans.). Oxford, England: Clarendon Press. 296 pp.
- PHYTOTECH. 2022. Phytotech Labs - **PhytoTechnology Orchid Seed Sowing Medium**. Available at <<https://phytotechlab.com>>. Access on 23 Feb 2022.
- Piao, X.C., Chakrabarty, D., Hahn, E.J. & Paek, K.Y. 2003. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. **Current Science** 84(8): 1129-1132.
- Piazza, L.D, Smidt, E.C. & Bona, C. 2014. Comparative anatomy of the vegetative organs of species of *Bulbophyllum* sect. Didactyle (Lindl.) Cogn. and *Bulbophyllum* sect. Xiphizusa Rchb.f. (Orchidaceae). **Hoehnea** 42(1): 171-183.
- Picolotto, D.R.N. 2013. **Cultivo in vitro e aclimatização de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul. 68 p.
- Picolotto, D.R.N., Neto, V.B.P., Barros, F., Padilha, D.R.C., Cruz, A.C.F.C. & Otoni, W.C. 2017. Micropropagation of *Cyrtopodium paludicolum* (Orchidaceae) from root tip explants. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 17: 191-197.
- Pires, M.V., Almeida, A-A.F., Santos, E.A. & Bertolde, F.Z. 2013. Gas exchange of terrestrial and epiphytic orchids from Brazilian Atlantic Rainforest. **Photosynthetica** 51(2): 317-320.
- Pitoyo, A., Hani, M.R. & Anggarwulan, E. 2015. Application of chitosan spraying on acclimatization success of tiger orchid (*Grammatophyllum scriptum*) plantlets. **Nusantara Bioscience** 7(2): 185-191.
- Ponert, J., Figura, T., Vosolsobe, S., Lipavska, H., Vohnik, M. & Jersakova, J. 2013. Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. **Botany** 91: 662-670.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. & Plzáková, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum** 42(4): 481-497.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. 2003. **Genera orchidacearum**. vol. 3, Orchidoideae part 2, Vanilloideae. Oxford University Press, New York, USA, 400 pp.

- Pritchard, H.W. 2004. Classification of Seed Storage Types for *Ex Situ* Conservation in Relation to Temperature and Moisture. Pp. 139-161. In: E.O. Guerrant Jr., K. Havens & M. Maunder (Eds.). **Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild**. Society for Ecological Restoration International Center for Plant Conservation, Washington: Island Press.
- Pujasatria, G.C., Miura, C. & Kaminaka, H. 2020. *In Vitro* Symbiotic Germination: A Revitalized Heuristic Approach for Orchid Species Conservation. **Plants** 9, 1742. doi:10.3390/plants9121742.
- Quijala, E., Barbón, R., Capote, A., Pérez, N. & Jiménez, E. 2016. *In Vitro* Mass Propagation of *Cymbopogon citratus* Stapf., A medicinal Gramineae. In: T. J.M. Walker. **Methods in Molecular Biology**. New York, USA: Humana Press. Volume 1391: 445-57. doi: 10.1007/978-1-4939-3332-7\_30.
- Quijala, E., Barbón, R., Jiménez, E., De Feria, M., Chávez, M., Capote, A. & Pérez, N. 2006. Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant** 42: 298–300.
- Quiñonez-Bastidas, G.N. & Navarrete, A. 2021. Mexican Plants and Derivates Compounds as Alternative for Inflammatory and Neuropathic Pain Treatment - A Review. **Plants** 10, 865. <https://doi.org/10.3390/plants10050865>.
- Quiroz, K., Saavedra, J., Vogel, H., Verdugo, G., Caligari, P.D.S. & García-González, R. 2017. *In vitro* asymbiotic germination for micropropagation of the recalcitrant terrestrial orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). **Applications in Plant Sciences** 5(8): 1600142.
- Rahman, A. 2013. Auxin: a regulator of cold stress response. **Physiologia Plantarum** 147: 28–35.
- Ramdan, M. & Sukmana, I. 2017. Advanced bioreactor system for the implantable biomaterials testing and tissue engineering applications. **ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences** 12(12): 3767-3771.
- Ramírez-Mosqueda, M.A. & Bello-Bello, J.J. 2021. SETIS™ bioreactor increases *in vitro* multiplication and shoot length in vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews). **Acta Physiologiae Plantarum** 43, 52: 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03227-z>
- Ramírez-Mosqueda, M.A. & Iglesias-Andreu, L.G. 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. **In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant** 52: 154–160.
- Ramos-Castellá, A., Iglesias-Andreu, L.G., Bello-Bello, J.J. & Lee-Espinosa, H. 2014. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. **In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant** 50: 576–581.

- Rao, S.R. & Ravishankar, G.A. 2000. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 80:289-304.
- Raspor, M., Motyka, V., Kaleri, A.R., Ninkovic, S., Tubic, L., Cingel, A. & Cosic, T. 2021. Integrating the roles for Cytokinin and Auxin in *de novo* shoot organogenesis: From hormone uptake to signaling outputs. **International Journal of Molecular Sciences** 22: 8554. <https://doi.org/10.3390/ijms22168554>.
- Reatto, A., Martins, E.S., Farias, M.F.R. & Silva, A.V. 2002. **Relação entre Classes de Solos e as Fitofisionomias da Área de Preservação Ambiental - APA de Cafuringa, escala 1:100.000**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 38 p.
- Rego-Oliveira, L.V. & Faria, R.T. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum** 27(1): 1-5.
- Reinert, F., Leal-Costa, M.V., Junqueira, N.E. & Tavares, E.S. 2013. Are sun- and shade-type anatomy required for the acclimation of *Neoregelia cruenta*? **Annals of the Brazilian Academy of Sciences** 85(2): 561-573.
- Reis, C.O., Silva, A.B., Landgraf, P.R.C., Batista, J.A. & Jacome, G.A.J. 2018. Bioreactor in the micropropagation of ornamental pineapple. **Ornamental Horticulture** 24(2): 182-187.
- Ribeiro, A.S., Brondani, G.E., Tormen, G.C.R. & Figueiredo, A.J.R. 2016. Cultivo *in vitro* de bambu em diferentes sistemas de propagação. **Nativa** 4(1): 15-18.
- Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. 2001. As Matas de Galeria no Contexto do Bioma Cerrado; pp. 29-47, in: J.F. Ribeiro, C.E.L. Fonseca and J.C.S. Silva (Eds.). **Cerrado: caracterização e recuperação de Matas de Galeria**. Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. 2008. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado; pp. 151-212, In: S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Tecnologia e Informação. v. 1.
- Ribeiro, L.M., Garcia, Q.S., Oliveira, D.M.O. & Neves, S.C. 2010. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45(4): 361-368.
- Ribeiro, L.M., Sorgato, J.C., Soares, J.S. & Ramos, J.C.M. 2021. Methodology of the tetrazolium test for identifying viable seeds of orchids of the genus *Cattleya* native to the Brazilian Cerrado. **Semina: Ciências Agrárias** 42(3): 1351-1360.
- Rittirat, S., Klaoheed, S., Thammasiri, K. & Prasertsongskun, S. 2018. *In vitro* Propagation and Forest Reestablishment of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl., an Endangered Medicinal Orchid. **Walailak Journal of Science & Technology** 15(10): 711-724.

- Roberts, L.W. 1950. A Survey of Tissues that Reduce 2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium Chloride in Vascular Plants. **Bulletin of Torrey Botanical Club** 77(5): 372-381.
- Rodrigues, D.T., Novais, R.F., Alvarez, V. H, Dias, J.M.M. & Villani, E.M.A. 2010. Orchid growth and nutrition in response to mineral and organic fertilizers. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 34: 1609-1616.
- Rodrigues, L.A., Neto, V.B.P, Boaretto, A.G., Oliveira, J.F., Torrezan, M.A., Lima, S.F. & Otoni, W.C. 2015. *In vitro* propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (Orchidaceae), a native orchid of the Brazilian savannah. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 15: 10-17.
- Rodrigues, P.H.V., Teixeira, F.M., Lima, A.M.L.P. & Ambrosano, G.M.B. 2006. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia** 65(1): 29-35.
- Roeser, K.R. 1972. Die Nadel der Schwarzkiefer Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos** 61(2): 33-36.
- Romero-González, G.A., Batista, J.A.N. & Bianchetti, L.B. 2008. A synopsis of the genus *Cyrtopodium* (Catasetinae: Orchidaceae). **Harvard Papers in Botany** 13(1): 189-206, 2008.
- Ruffoni, B. & Savona, M. 2005. The temporary immersion system (T.I.S.) for the improvement of micropropagation of ornamental plants. **Acta Horticulturae** 683: 445-454.
- Ruggiero, P.G.C. & Pivello, V.R. 2005. O Solo e a Comunidade vegetal; pp. 173-188. In: V.R. Pivello & E.M. Varanda (orgs.). **O Cerrado Pé-de-Gigante (Parque Estadual de Vassununga, SP) - Ecologia e Conservação**. São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente.
- Saensouk, S. & Saensouk, P. 2020. Comparative leaf surfaces of Orchidaceae species from Thailand. **Suranaree Journal of Science and Technology** 27(3): 030032(1-8).
- Samala, S., Te-chatob, S., Yenchonb, S. & Thammasiric, K. (2014). Protocorm-like body proliferation of *Grammatophyllum speciosum* through asymbiotic seed germination. **Science Asia** 40: 379-383.
- Sanchez M.L. 1988. Micropropagation of *Cyrtopodium* (Orchidaceae) through root-tip culture. **Lindleyana** 3: 93-96.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A. & Estelle, M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology** 5(5): 301-307.
- Santos, I.S., Alonso, A.A. & Silva, M.J. 2020. A new occurrence of *Bulbophyllum* (Orchidaceae, Epidendroideae) for the state of Goiás, Brazil. **Rodriguésia** 71: e02262018.
- Sarmah, D., Kolukunde, S., Sutradhar, M., Singh, B.K., Mandal, T. & Mandal, N. 2017. A Review on: *In Vitro* Cloning of Orchids. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 6(9): 1909-1927.

- Sasongko, A.B., Fatumi, A. & Indrianto, A. 2016. The Growth Improvement of *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl. *In Vitro* Plantlet using Photoautotrophic Micropropagation System. **Indonesian Journal of Biotechnology** 21(2): 109–116.
- Sauer, M., Robert, R. & Kleine-Vehn, J. 2013. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany** (64)9: 2565–2577.
- Scheidt, G.N., Arakaki, A.H., Chimilovski, J.S., Portella, A.C.F., Spier, M.R., Woiciechowski, A.L., Biasi, L.A. & Soccol, C.R. 2009a. Utilization of the Biorreactor of Imersion by Bubbles at the Micropropagation of *Ananas comosus* L. Merril. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 52: 37-43.
- Scheidt, G.N., Silva, A.L.L., Dronk, A.G., Biasi, L.A., Arakaki, A.H. & Soccol, C.R. 2009b. Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. **Biociências** 17(1): 82-85.
- Schmitz, J. A. K., Souza, P. V. D. & Kämpf, A. N. 2002. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural** 32(6): 937-944.
- Schneiders, D., Pescador, R., Booz, M.R. & Suzuki, R.M. 2012. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres** 59(2): 185-191.
- Seaton, P.T. 2007. Orchid conservation: where do we go from here? **Lankesteriana** 7(1-2): 13-16.
- Seaton, P.T., Hosomi, S.T., Custódio, C.C., Marks, T.R., Machado-Neto, N.B. & Pritchard, H.W. 2018. Orchid seed and pollen: A toolkit for long-term storage, viability assessment and conservation; pp. 71-98, In: Lee, Y. I. and Yeung, E. C. (Eds.) **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses - Methods and Protocols**. New York, USA: Humana Press.
- Seaton, P.T., Kendon, J.P., Pritchard, H.W., Puspitaningtyas, D.M. & Marks, T.R. 2013. Orchid conservation: the next ten years. **Lankesteriana** 13(1-2): 93-101.
- Seaton, P.T & Pritchard, H.W. 2011. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. **Lankesteriana** 11(3): 349-353.
- Selosse, M.A., Minasiewicz, J. & Bernard Boullard, B. 2017. An annotated translation of Noël Bernard's 1899 article 'On the germination of *Neottia nidus-avis*'. **Mycorrhiza** 27(6): 611-616. DOI: 10.1007/s00572-017-0774-z
- Sen, M.A., Palabiyik, I. & Kurultay, S. 2019. The effect of saleps obtained from various Orchidaceae species on some physical and sensory properties of ice cream. **Food Science and Technology** 39(1): 83-87. DDOI: <https://doi.org/10.1590/fst.26017>.

- Shengji, P. & Zhiwei, Y. 2018. Orchids and its uses in Chinese medicine and health care products. **Medical Research and Innovations** 2(1): 1-3. doi: 10.15761/MRI.1000133.
- Silber, A. & Bar-Tal, A. 2008. Nutrition of substrate-grown plants. P. 291-340. In: M. Raviv & J.H. Lieth (ed.). **Soiless Culture: Theory and Practice**. San Diego: Academic Press.
- Silva, A.B., Pasqual, M., Teixeira, J.B. & Araújo, A.G. 2007. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42(9): 1257-1260.
- Silva, A.B., Reis, C.O., Cazetta, J.O., Carlin, S.D., Landgraf, P.R.C. & Reis, M.C. 2016. Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the *in vitro* growth of orchids. **Bioscience. Journal** 32(3):619-626.
- Silva, A.G., Boldrini, R.F. & Kuster, R.M. 2013a. Os sumares cicatrizantes da medicina tradicional brasileira, ou, as surpresas químicas ativas do desconhecido gênero *Cyrtopodium* (Orchidaceae). **Natureza on line** 11(3): 152-154.
- Silva, C.S., Araújo, L.G., Sousa, K.C.I., Silva, D.M., Sibov, S.T. & Faria, P.R. 2017. Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado. **Ornamental Horticulture** 23(1):96-100.
- Silva, D.M., Carneiro, L.C., Mendes, D.J. & Sibov, S.T. 2013b. Efeito das auxinas ácido naftaleno acético e ácido indol butírico no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (ORCHIDACEAE). **Enciclopédia Biosfera** 9(16): 852-860.
- Silva, F.A.M., Assad, E.D. & Evangelista, B.A. 2008. Caracterização Climática do Bioma Cerrado; pp. 70-88, in: S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro (eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Tecnologia e Informação. v. 1.
- Silva, G.P., Sales, J.F., Zuchi, J., Nascimento, K.J.T., Silva, L.A., Souza, M.A.V. & Rodrigues, A.A. 2021. Physiological Quality of Stored *Dipteryx alata* Vogel Seeds: Tetrazolium Test and Radiographic Imaging Standardization. **Floresta e Ambiente** 28(3): e20200022. <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2020-0022>.
- Silva, I.V., Meira, R.M.S.A., Azevedo, A.A. & Euclides, R.M.A. 2006. Estratégias anatômicas foliares de treze espécies de Orchidaceae ocorrentes em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB) - MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 20(3): 741-750.
- Silva, J.A.T., Hossain, M.M., Sharma, M., Dobránszki, J., Cardoso, J.C. & Songjun, Z. 2017. Acclimatization of *in Vitro*-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal** 3 (3): 110–124.
- Silva, J.A.T., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M.E., Kher, M.M., Wicaksono, A., Gulyás, A., Hidvégi, N., Magyar-Tábori, K., Mandler-Drienyovszki, N., Márton, L., Landín, M., Gallego, P.P.,



- Driver, J.A. & Dobránszki, J. 2020. Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. **Planta** 252:47.
- Silva, R.B.M., Francelino, M.R., Moura, P.A., Moura, T.A., Pereira, M.G. & Oliveira, C.P.. 2015. Relação solo/vegetação em ambiente de Cerrado sobre influência do grupo *Urucuaia*. **Ciência Florestal** 25(2): 363-373.
- Silva-Júnior, J.M., Rodrigues, M., Castro, E.M., Bertolucci, S.K.V. & Pasqual, M. 2013. Changes in anatomy and chlorophyll synthesis in orchids propagated *in vitro* in the presence of urea. **Acta Scientiarum** 35(1): 65-72.
- Skoog, F., Strong, F.M. & Miller, F.M. 1965. Cytokinins. **Science** 148: 532-533.
- Smith, R.H. 2013. **Plant Tissue Culture - Techniques and Experiments**. 3<sup>a</sup> ed. Elsevier: Waltham. 188 p.
- Soares, J.S., Rosa, Y.B.C.J., Tatará, M.B., José Carlos Sorgato, J.C. & Lemes, C.S.R. 2014. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. **Semina: Ciências Agrárias** 35(5): 2275-2284.
- Soares, J.S., Sorgato, J.C., Ribeiro, L.M. & Ramos, J.M.C. 2021. Seed viability test of orchids native to the Brazilian Savanna. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 51: e67069.
- Soccol, C.R., Scheidt, G.N. & Mohan, R. 2008. **Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal**. Universidade Federal do Paraná. Patente (DEPR. 01508000078). 03/03/2008.
- Solberg, S.Ø., Yndgaard, F., Andreasen, C., von Bothmer, R., Loskutov, I.G. & Asdal, Å. 2020. Long-Term Storage and Longevity of Orthodox Seeds: A Systematic Review. **Frontiers in Plant Science** 11:1007. doi: 10.3389/fpls.2020.01007
- Sorgato, J.C., Soares, J.S., Damiani, C.R., Ribeiro, L.M. 2020. Effects of light, agar, activated charcoal, and culture medium on the germination and early development of *Dendrobium* seedlings. **Australian Journal of Crop Science** 14(4): 557-564.
- Sousa, K.C.I., Araújo, L.G., Silva, C.S., Carvalho, J.C.B., Sibov, S.T., Gonçalves, L.A., Pereira, M.C., Gonçalves, F.J. & Filippi, M.C.C. 2019. Seed germination and development of orchid seedlings (*Cyrtopodium saintlegerianum*) with fungi. **Rodriguésia** 70: e02302016.
- Sousa, R.P.S., Costa, W.S., Matos, P.S., Carvalho, A.S., Martins, F.D. & Torres, K.R. 2020. Ornamental potential of species from the ferruginous Campo rupestre of the Carajás National Forest, Brazilian Amazon. **Comunicata Scientiae** 11:e3260. <https://doi.org/10.14295/CS.v12.3260>.

- Souza, D.M.S.C., Fernandes, S.B., Molinari, L.V. Avelar, M.L.M., Gonçalves, D.S., Faria, J.C.T. Teixeira, G.L. & Brondani, G.E. 2021. The influence of light quality in the *in vitro* cultivation of *Cattleya crispata* (Thunb.) Van den Berg. **Nativa** 9(5): 582-588.
- Souza, F.H.D. 1994. Preparation of neutral solutions of tetrazolium. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 51. Available at: <http://old.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/cot/COT51.html> Accessed at January 21st, 2020.
- Souza, J.N.C., Diniz, J.W.M., Silva, F.A.O., Almeida, N. D. R. 2020. Panorama econômico de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Scientific Electronic Archives** 13(5).
- Spinoso-Castillo, J.L, Chavez-Santoscoy, R.A. Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J.A., Morales-Ramos, V. & Bello-Bello, J.J. 2017. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 129(2): 195-207. DOI 10.1007/s11240-017-1169-8
- Srivastava, D., Gayatri, M.C. & Sarangi, S.K. 2015. *In vitro* seed germination and plant regeneration of an epiphytic orchid *Aerides ringens* (Lindl.) Fischer. **Indian Journal fo Biotechnology** 14: 574-580.
- Stancato, G.C., Abreu, M.F. & Furlani, A.M.C. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 17(1): 25-33.
- Stefanello, S., Cruz, F.G.Z., Kozera, C. & Zanella, S. 2020. Germinação *in vitro* e propagação de *Cyrtopodium flavum* (Orchidaceae) utilizando o seccionamento de protocormos. Pp. 11-23. In: A.L.O. Francisco (org.). **Avanços científicos, tecnológicos e de inovação na botânica**. Ponta Grossa, PR: Atena.
- Stern, W.L. & Judd, W.S. 2001. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 136: 153-178.
- Stevens, P.F. (2001 onwards). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]. Disponível em <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em 04 de março de 2022.
- Sugiyarto, L., Djukri, Aloysius, S., Ariyani, N.A. & Hidayati, S. 2019. Photosynthetic response and chlorophyll content of *Spathoglottis plicata* Blume on different altitudes. **The Science and Science Education International Seminar Proceedings** B42-47.
- Surenciski, M.R., Dematteis, M. & Flachslan, E.A. 2007. Chromosome stability in cryopreserved germplasm of *Cyrtopodium hatschbachii* (Orchidaceae). **Annales Botanici Fennici** 44:287-292.

- Surenciski, M.R., Flachslan, E.A., Terada, G., Mroginski, L.A. & Rey, H.Y. 2012. Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. **Biocell** 36(1): 31-36.
- Sussex, I.M. 2008. The Scientific Roots of Modern Plant Biotechnology. **The Plant Cell** 20: 1189-1198.
- Suzuki, A.B.P., Vidal, T.C.M., Alves, G.A.C., Bertocelli Junior, D., Biz, G., Sorace, M. & Faria, R.T. 2018. Cryopreservation of Brazilian orchid *Catasetum atratum* Lindl. seed at risk of extinction. **Australian Journal of Crop Science** 12(7): 1051-1057.
- Suzuki, R.M., Moreira, V.C., Pescador, R. & Ferreira, W.M. 2012. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 48:500–511.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2013. **Fisiologia vegetal**. Artmed: Porto Alegre. 918 p.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M. & Murphy, A. 2021. **Fundamentos de Fisiologia Vegetal**. Artmed: Porto Alegre. 528 p.
- Takane, R.J., Yanagisawa, S.S. & Góis, E.A. 2013. **Técnicas em substratos para a floricultura**. Expressão Gráfica e Editora: Fortaleza. 148 p.
- Takayama, S. & Misawa, M. 1981. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. **Plant & Cell Physiology** 22(3):461-467.
- Teisson, C., Alvard, D., Lartaud, M., Etienne, H., Berthouly, M., Escalona, M. & Lorenzo, J.C. 1999. Temporary immersion for plant tissue culture. In: **Plant Biotechnology and In vitro Biology in the 21st Century**. Proceedings of the IXth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Section H: Novel micropropagation methods. Pp 629–632. Jerusalem.
- Teixeira, J.B. 2001. Biorreator de Imersão Temporária desenvolvido pela EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. **II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**: 278-284.
- Teixeira, J.B. 2002. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 4:36-41.
- Teixeira, J.B. & Cid, L.P.B. 2000. **Sistemas de biorreatores para cultivo de células vegetais, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão temporária ou contínua utilizando fonte de pressão positiva ou negativa**. Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Patente (PI 0004185-8).
- Teixeira, J.B. & Cid, L.P.B. 2014. Biorreatores para produção de mudas em escala. Pp.159-178. In: L.P.B Cid (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA.
- Thammasiri, K. & Soamkul, L. 2007. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by Vitrification. **ScienceAsia** 33: 223-227.

- Thiers, B. [continuously updated]. **Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff**. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available at <<http://sweetgum.nybg.org/ih/>>. Accessed on 01 July 2017.
- Thomas, S.G., Rieu, I & Steber, C.M. 2005. Gibberellin metabolism and signaling. **Vitamins and Hormones** 72: 289-338.
- Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances** 26: 618–631.
- Tichá, I., Radochová, B. & Kadleček, P. 1999. Stomatal Morphology during Acclimatization of Tobacco Plantlets to *ex vitro* Conditions. **Biologia plantarum** 42:469-474.
- Tivendale, N.D. & Cohen, J.D. 2015. Analytical History of Auxin. **Journal of Plant Growth and Regulation** 34:708–722. DOI 10.1007/s00344-015-9519-4.
- Torres, A.C., Caldas, L.S. & Ferreira, T.E. 1998. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. Pp. 11-20. In: A.C. Torres, L.S. Caldas and J.A. Buso (eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 2<sup>a</sup> ed. Brasília: EMBRAPA-CNPq.
- Turner, J.G., Ellis, C. & Devoto, A. 2002. The Jasmonate Signal Pathway. **The Plant Cell** 14: S153-S164. [www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.000679](http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.000679).
- Utami, E.S.W. & Hariyanto, S. 2019. *In Vitro* Seed Germination and Seedling Development of a Rare Indonesian Native Orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm. **Scientifica** 8105138, 6 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/8105138>.
- Vacin, E.F. & Went, F.W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette** 110: 605-617.
- Valvekens, D., Van Montagu, M. & van Lijsebettens, M. 1988. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. **Proceedings of the National Academy of Science** 85: 5536–5540.
- Veldman, S., Kim, S., van Andel, T.R., Font, M.B., Bone, R.E., Bytebier, B., Chuba, D., Gravendeel, B., Martos, F., Mpatwa, G., Ngugi, G., Vinya, R., Wightman, N., Yokoya, K. & de Boer, H.J. 2018. Trade in Zambian edible orchids - DNA Barcoding reveals the use of unexpected orchid taxa for chikanda. **Genes** 9: 595. doi:10.3390/genes9120595.
- Vence, L.B. 2008. Disponibilidade de água-aire em substratos para plantas. **Ciência de Solo** 26(2): 105-114.
- Vendrame, W., Faria, R.T., Sorace, M & Sahyun, S.A. 2014. Orchid Cryopreservation. **Ciência & Agrotecnologia** 38(3): 213-229.
- Vendrame, W.A., Xu, J. & Beleski, D. 2022. Evaluation of the Effects of Culture Media and Light Sources on *In Vitro* Growth of *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. Hybrid. **Horticulturae** 8: 450.

- Vertucci, C.W. & Roos, E.E. 1990. Theoretical Basis of Protocols for Seed Storage. **Plant Physiology** 94: 1019-1023.
- Vidal, N. & Sánchez, C. 2019. Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. **Engineering in Life Sciences** 19: 896–915.
- Villela, F.A. & Peres, W.B. 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. Pp. 265-281. In: F.A.G. Ferreira & F. Borghetti (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed.
- Vogel, I.N. & Macedo, A.F. 2011. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 104:147–155.
- Vudala, S.M. & Ribas, L.L.F. 2017. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany** 108:1–7.
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabé, D. & Thibeault. 2000. Viability Testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. **Annals of Botany** 86: 79-86.
- Walters, C. 2004. Guidelines for Seed Storage. Pp. 442-453. In: E.O. Guerrant Jr., K. Havens & M. Maunder (Eds.). **Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild**. Society for Ecological Restoration International Center for Plant Conservation, Washington: Island Press.
- Walters, C. 2015. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta** 242: 397-406. DOI 10.1007/s00425-015-2312-6.
- Wang, J., Song, L., Gong, X., Xu, J. & Li, M. 2020. Functions of Jasmonic Acid in Plant Regulation and Response to Abiotic Stress. **International Journal of Molecular Science** 21: 1446; doi:10.3390/ijms21041446.
- Wang, P. & Grimm, B. 2020. Connecting Chlorophyll Metabolism with Accumulation of the Photosynthetic Apparatus. **Trends in Plant Science** 2074: 12 pages.
- Wang, Y.H. & Irving, H.R. 2011. Developing a model of plant hormone interactions. **Plant Signaling & Behavior** 6(4): 494-500.
- Warghat, A.R., Bajpai, P.K., Srivastava, R.B., Chaurasia, O.P., Chauhan, R.S. & Sood, H. 2014. *In vitro* protocorm development and mass multiplication of an endangered orchid, *Dactylorhiza hatagirea*. **Turkish Journal of Botany** 38: 737-746.
- Watt, M.P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal of Biotechnology** 11:14025-14035.

- Welander, M., Persson, J., Asp, H & Zhu, L.H. 2014. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. **Scientia Horticulturae** 179: 227-232.
- Welander, M., Sayegh, A., Hagwall, F., Kuznetsova, T. & Holfors, A. 2017. Technical improvement of a new bioreactor for large scale micropropagation of several *Vaccinium* cultivars. **Acta Horticulturae** 1180(53): 387-392.
- Wellburn, A.R. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology** 144: 307-313.
- Went, F.W. 1928. Wuchsstoff und Wachstum. **Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais** 25(1/2): 1-116.
- WFO. 2022. **World Flora Online**. Published on the Internet. <http://www.worldfloraonline.org>. Accessed on: 10 Dec 2022.
- Williams, S.J., Gale, S.W., Amy Hinsley, A., Gao, J. & St. John, F.A.V. 2018. Using consumer preferences to characterize the trade of wild-collected ornamental orchids in China. **Conservation Letters** 11(5): e12569. <https://doi.org/10.1111/conl.12569>.
- Wong, D.C.J. & Peakall, R. 2022. Orchid Phylotranscriptomics: The Prospects of Repurposing Multi-Tissue Transcriptomes for Phylogenetic Analysis and Beyond. **Frontiers in Plant Science** 13:910362.
- Yabuta, T. 1935. Biochemistry of the “bakanae” fungus of rice. **Agriculture and Horticulture** 10: 17–22.
- Yam, T. & Arditto, J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reports** 3:1–56.
- Yamazaki, J. & Miyoshi, K. 2006. *In vitro* Asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). **Annals of Botany** 98: 1197–1206.
- Yancheva, S., Georgieva, L., Badjakov, I. & Dinc, I. 2019. Application of bioreactor technology in plant propagation and secondary metabolite production. **Journal of Central European Agriculture** 20(1): 321-340.
- Yang, S.J., Sun, M., Yang, Q.Y., Ma, R.Y., Zhang, J.L. & Zhang, S.B. 2016. Two strategies by epiphytic orchids for maintaining water balance: thick cuticles in leaves and water storage in pseudobulbs. **AoB Plants** 8: plw046.
- Yeung, E.C. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies** 58:33. DOI 10.1186/s40529-017-0188-4.
- Zahara, M. & Win, C.C. 2019. Morphological and Stomatal Characteristics of Two Indonesian Local Orchids. **Journal of Tropical Horticulture** 2(2): 65-69.

- Zanello, C.A., Duarte, W.N., Gomes, D.M. & Cardoso, J.C. 2022. Micropropagation from Inflorescence Nodal Segments of *Phalaenopsis* and Acclimatization of Plantlets Using Different Substrates. **Horticultura** 8: 340.
- Zanlorensi Júnior, L.A. 2016. **Desenvolvimento de um Biorreator de Imersão Temporária com sistema de software e hardware para manipulação dos dados**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 62p.
- Zeng, S. Chen, Z., Wu, K., Zhang, J., Bai, C., Silva, J.A.T. & Duan, J. 2011. Asymbiotic seed germination, induction of calli and protocorm-like bodies, and *in vitro* seedling development of the rare and endangered *Nothodoritis zhejiangensis* chinese orchid. **Hortscience** 46(3):460–465.
- Zhang, B., Song, L., Bekele, L. D., Shi, J., Jia, Q., Zhang, B., Jin, L., Duns, G. J. & Chen, J. 2018a. Optimizing factors affecting development and propagation of *Bletilla striata* in a temporary immersion bioreactor system. **Scientia Horticulturae** 232, 121-126.
- Zhang, G-Q., Liu, K-W., Li, Z., Lohaus, R., Hsiao, Y-Y., Niu, S-C., Jie-Yu Wang, J-Y., Lin, Y-C., Xu, Q., Chen, L-J., Yoshida, K., Fujiwara, S., Wang, Z-W., Yong-Zhang, Y-Q., Mitsuda, N. , Wang, M., Liu, G-H., Pecoraro, L., Huang, H-X., Xiao, X-J., Lin, M., Wu, X-Y., Wu, W-L., Chen, Y-Y., Chang, S-B., Sakamoto, S., Ohme-Takagi, M., Yagi, M., Zeng, S-J., Shen, C-Y., Yeh, C-M., Luo, Y-B., Tsai, W-C., Van de Peer, Y. & Liu, Z-J. 2017. The *Apostasia* genome and the evolution of orchids. **Nature** 549:379-383. doi:10.1038/nature23897.
- Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W. & Hu, H. 2018b. Physiological diversity of orchids. **Plant Diversity** 40: 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>
- Zhang, W., Zhang, G., Zeng, P., Zhang, Y., Hu, H., Liu, Z. & Cai, J. 2021. Genome sequence of *Apostasia ramifera* provides insights into the adaptive evolution in orchids. **BMC Genomics** 22:536.
- Zhang, Z., Niu, Z., Li, C., Hou, Z., Xue, Q., Liu, W. & Ding, X. 2022. Improving large-scale biomass and total alkaloid production of *Dendrobium nobile* Lindl. using a temporary immersion bioreactor system and MeJA elicitation. **Plant Methods** 18:10. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00843-9>
- Zorzeto, T.Q., Dechen, S.C.F., Abreu, M.F. & Fernandes Júnior, F. 2014. Caracterização física de substratos para plantas. **Bragantia** 73(3): 300-311. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0086>

## Capítulo II

**Manuscrito submetido à publicação no Periódico Acta Scientiarum. Technology (ISSN on-line: 1807-8664).**

José Herlânio de Lima<sup>1,3</sup>, Lucia Helena Soares-Silva<sup>1,2</sup> and Conceição Eneida dos Santos Silveira<sup>1</sup>

1. Department of Botany, University of Brasília (UnB)

2. Reference Center for Nature Conservation and Degraded Area Recovery (CRAD/UnB).

3. Author for correspondence, email: jhlimacoffeholic@gmail.com

**Title:** Automation of a temporary immersion bioreactor using an Arduino microcontroller: an efficient low-cost system for ornamental plant micropropagation

**Running Title:** Automation of bioreactor by Arduino microcontroller

### Abstract

This study aimed to automate a temporary immersion bioreactor (TIB) using an Arduino Uno microcontroller. To that end, we built an automation system, consisting of a logic module (the Arduino), a physical module (solid-state relay) and a pneumatic system (solenoid valves and a compressor). The automation system was tested in a Twin-flask system developed by the Brazilian Agricultural Research Corporation/Genetic Resources and Biotechnology (EMBRAPA/CENARGEN). A code was written to enable the Arduino to control immersion time and the intervals between immersions. An immersion time of 3 minutes was used, with immersion intervals of 2, 4 and 8 hours. The functioning of the TIB was monitored daily for 60 days. The cost of assembling the logic and physical modules was determined and compared with the price of four programmable logic controllers (PLCs) available on the domestic market. No system failure was detected in either of the two modules or the pneumatic system during TIB monitoring. The cost of assembling an automation system containing an Arduino is low in relation to the price of a PLC, which is 2.5 to 4 times more expensive. Additionally, using solid-state relays in the automation system provided greater protection for the Arduino electrical circuit than their electromagnetic counterparts. It was concluded that TIB automation can be achieved using an Arduino microcontroller, with the following advantages over PLCs: low cost and the ability to incorporate solid-state relays and simultaneously control three rows of plant tissue with different immersion times.

**Keywords:** plant tissue culture, Solid-state relays



## Resumo

Este trabalho teve como objetivo realizar a automação de um Biorreator de Imersão Temporária (BIT) com o emprego de um microcontrolador Arduino Uno. Para isso foi construído um sistema de automação constituído de um módulo lógico, um módulo físico e um sistema pneumático. O módulo lógico é constituído pelo Arduino, o módulo físico por Relés de Estado Sólido e o sistema pneumático, por válvulas solenóides e um compressor. O sistema de automação foi testado em um biorreator do tipo Twin-Flask System desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA/CENARGEN). Foi escrito um código para que o Arduino controlasse o tempo de imersão e o intervalo entre as imersões. O tempo de imersão utilizado foi de 3 minutos, e os intervalos de imersão foram de 2, 4 e 8 horas. O funcionamento do BIT foi monitorado diariamente por 60 dias. Também foi avaliado o custo de montagem dos módulos lógico e físico e comparado com o preço de quatro Controladores Lógicos Programáveis (CLP) disponíveis no mercado nacional. Durante o monitoramento do funcionamento do BIT não foi detectada nenhuma falha de funcionamento em nenhum dos módulos ou no sistema pneumático. O custo de montagem de um sistema de automação feito com Arduino pode ser considerado baixo se comparado ao preço de um CLP (2,5 a 4 vezes mais caro). Foi ainda verificado que o emprego de relés de estado sólido no sistema de automação promove maior proteção do circuito elétrico do Arduino do que Relés Eletromagnéticos. Neste estudo pôde-se concluir que a automação de um BIT pode ser realizada por um microcontrolador Arduino, apresentando algumas vantagens em relação aos CLP: baixo custo, possibilidade de incorporar Relés de Estado Sólido e controle simultâneo de três linhas de cultivo com tempo de imersão diferentes.

**Palavras-chave:** cultura de tecidos vegetais, Relés de estado sólido

## Introduction

Ornamental plants are ubiquitous in modern-day society, whether directly applied in urban landscaping projects (Tappert, Klöti, & Drilling, 2018) or as pot plants or flowers inside people's homes (De & Medh, 2017) to promote wellness (Samuelsson et al., 2018). The ornamental plant and flower market has global economic importance (Table 1), producing around EUR 20 billion (US\$ 24.4 billion based on the exchange rate on 12/31/2020) in 2020, with a significant increase in recent years (Gabellini & Scaramuzzi, 2022). The European Union and United States are the largest consumers (Darras, 2020), with sales of ornamental plants and flowers in 2020 reaching approximately US\$ 13.4 billion (Gabellini & Scaramuzzi, 2022) and US\$ 4.8 billion (USDA 2021),

respectively. In Brazil the market is expanding, producing US\$ 2.63 billion (R\$ 10.2 billion based on the exchange rate on 12/31/2015) in 2015 (Lima Júnior et al., 2015).

Unlike traditional agriculture, which requires large areas, flowers and ornamental plants can be grown on small rural properties (Duval, 2014), in periurban (Recasens & Alfranca, 2018) and even urban areas (Manikas, Malindretos, & Abeliotis, 2019), providing economic and social benefits through job creation, since at least 10 employees/ha are needed, thereby contributing to maintaining workers in the field (Rooijen & Gedanken, 2012). Rocha (2013) argues that the success of these agricultural endeavors requires propagation materials to be produced based on the latest technological precepts, in order to ensure high productive potential for vegetable species cultured on a commercial scale. In this respect, micropropagation is one of the main technologies used.

**Table 1.** Ranking of the 10 largest producers and exporters of flowers and potted plants to the European Union (EU) in 2017. **Source:** Darras (2020).

Ranking	Global producers	Exporters to the EU
1	EU	EU
2	China	Kenya
3	USA	Ethiopia
4	Japan	Ecuador
5	Brazil	Colombia
6	Colombia	Israel
7	Canada	USA
8	Ecuador	Costa Rica
9	Kenya	China
10	Tanzania	Uganda

Micropropagation is a plant tissue culture technique whereby whole plants are regenerated from an explant, i.e., a small piece of plant tissue, under aseptic conditions (George, Hall, & Klerk, 2008; Twaij, Jazar, & Hasan, 2020). The technique has a number of advantages over traditional multiplication methods, including the need for only a small amount of material to start the culture; rapid production of disease and pest-free propagation materials; highly efficient clonal propagation for the large-scale production of new cultivars/varieties; and the production of large numbers of plants year-round, under controlled conditions unaffected by climate variation (George et al., 2008; Rocha, 2013; Cardoso & Vendrame, 2022).

According to Stancato, Abreu and Furlani (2001), the micropropagated seedlings of some ornamental species can generate net revenue of up to 52% in relation to the price of each seedling, with figures not being higher because of elevated labor costs. More efficient protocols are essential in enabling producers to achieve greater seedling production efficiency and enter the export market for ornamental plants (Cardoso, 2013). The use of micropropagation in bioreactors can significantly lower production costs by increasing productivity and reducing labor needs (Teixeira & Cid, 2014), especially in family farming, which typically has fewer financial resources to hire manpower.

In a biochemical context, bioreactors are typically described as independent sterile environments designed for intensive plant tissue and cell culture that involve recirculating liquid or gas/liquid nutrients and maximize the opportunity to control and monitor the environmental conditions (agitation, aeration, temperature, dissolved oxygen and carbon, pH, etc.) (Paek, Chakrabarty, & Hahn, 2005). From an industrial perspective, Georgiev, Schumann, Pavlov and Bley (2014) define bioreactors as technological equipment, consisting of a culture chamber and automated control block, designed for intensive culture by regulating different physical and/or nutritional factors (light, illumination, level of the culture medium, pH, etc.), and can be classified into four main categories: liquid-phase bioreactor, gas-phase bioreactor, temporary immersion system and hybrid bioreactors.

Temporary immersion bioreactors (TIB) have several advantages over other existing systems, such as the drastic reduction of malformation and material losses caused by hyperhydricity and asphyxia (Debnath, 2011); the use of a liquid medium gives the cultivated plants better access to its components, resulting in greater biomass gains and shorter micropropagation times (Businge, Trifonova, Schneider, Rödel, & Egertsdotter, 2017); high photosynthetic rates during acclimatization (Aragón et al., 2014; Uma, Karthic, Kalpana, Backiyarani, & Saraswathi, 2021); the ability to use 10 to 20-liter culture chambers, larger than those traditionally used (Georgiev et al., 2014); significant reduction in labor needs, especially during the elongation/rooting phases, substantially lowering production costs (Teixeira & Cid, 2014; Mancilla-Álvarez, Pérez-Sato, Núñez-Pastrana, Spinoso-Castillo, & Bello-Bello, 2021); greater uniformity in the plants produced (Paek et al., 2005; Teixeira & Cid, 2014); the possibility of automating the system, favoring industrialization of the process (Carvalho, Ozudogru, Lambardi, & Paiva, 2019; Egertsdotter, Ahmad, & Clapham, 2019).

According to Georgiev et al. (2014), the control block of TIBs is a partially or fully automated system designed to monitor the culture conditions. The type of controller used depends on the complexity of the system to be automated. If one or more culture rows are to be operated simultaneously, a conventional timer can be used (Solórzano-Acosta & Guerrero-Padilla, 2020);

however, for non-simultaneous operation, more complex controllers such as a programmable logic controller (PLC) (Loyola-González et al., 2019) is indicated.

Programmable logic controllers were first introduced in the 1970s as relay control systems and were subsequently modernized (Milik & Hrynkiewicz, 2012). They are currently used to control simple systems such as timers, but primarily in industrial plants to control assembly line machines or counting processes (Bedi, Verma, Sharma, & Singh, 2015).

Another alternative as an automation block for a TIB is an Arduino microcontroller, or simply Arduino (Pineño, 2014). Developed in 2005, the device is an open-source platform that can be easily erased and reprogrammed for interactivity projects (Louis, 2016; Arduino, 2022). The equipment consists of a printed circuit board with a microprocessor, power supply, data input pins, digital and/or analog input pins to receive information from other devices, and digital and/or analog output pins to control other equipment (Nowrot & Solecka, 2018). According to Louis (2016), an Arduino acts as a minicomputer, like other controllers such as PLCs, receiving and interpreting input signals and controlling output signals for a variety of electronic devices (relays, engines, etc.). The use of Arduino in industrial processes is still limited (Kaswan, Singh, & Sagar, 2020), its main applications being in educational (Guzmán-Fernández et al., 2021, Lopez-Rodriguez & Cuesta, 2021) and academic projects (D'Áusilio, 2012; Devarakonda, Nguyen, & Kravitz, 2016; Aguiar et al., 2020). However, in recent years this microcontroller has been used in agricultural projects, such as irrigation control (Chatzopoulos, Papoutsidakis, Sofianos, & Piromalis, 2019; Alharbi et al., 2020; Subito, Nurrahmi, & Mustari, 2020; Rocha, Magalhães, Carvalho, Diotto, & Barbosa 2022) and solar collectors for water disinfection (Rocha, Mendonça, Watanabe, Silva, & Lima, 2020).

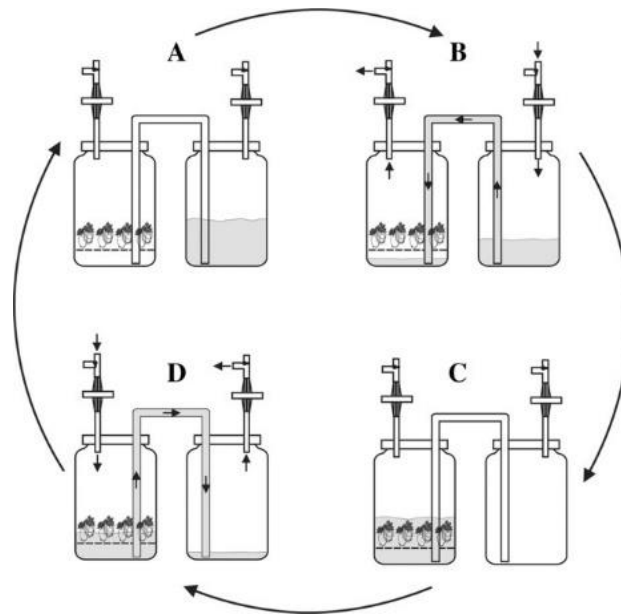
The aim of this study was to construct an efficient low-cost automation system to simultaneously control three culture rows in a temporary immersion bioreactor using an Arduino Uno as microcontroller.

## **Materials and Methods**

The Twin-flask TIB developed by the Brazilian Agricultural Research Corporation/Genetic Resources and Biotechnology (EMBRAPA/CENARGEN) was selected as a bioreactor micropropagation system (Teixeira & Cid, 2000; Teixeira, 2002). The equipment was designed with only one culture row and consists of two 5 L flasks, one containing a liquid culture medium (middle flask) and the other culture material (culture chamber), connected via a silicone hose. An air compressor is used to create pressure in the middle flask, which is then forced into the culture chamber, submerging the material. After an established immersion time, the culture chamber is

pressurized and the medium drains back into the original container (Teixeira 2001; Georgiev et al., (2014) (Figure 1).

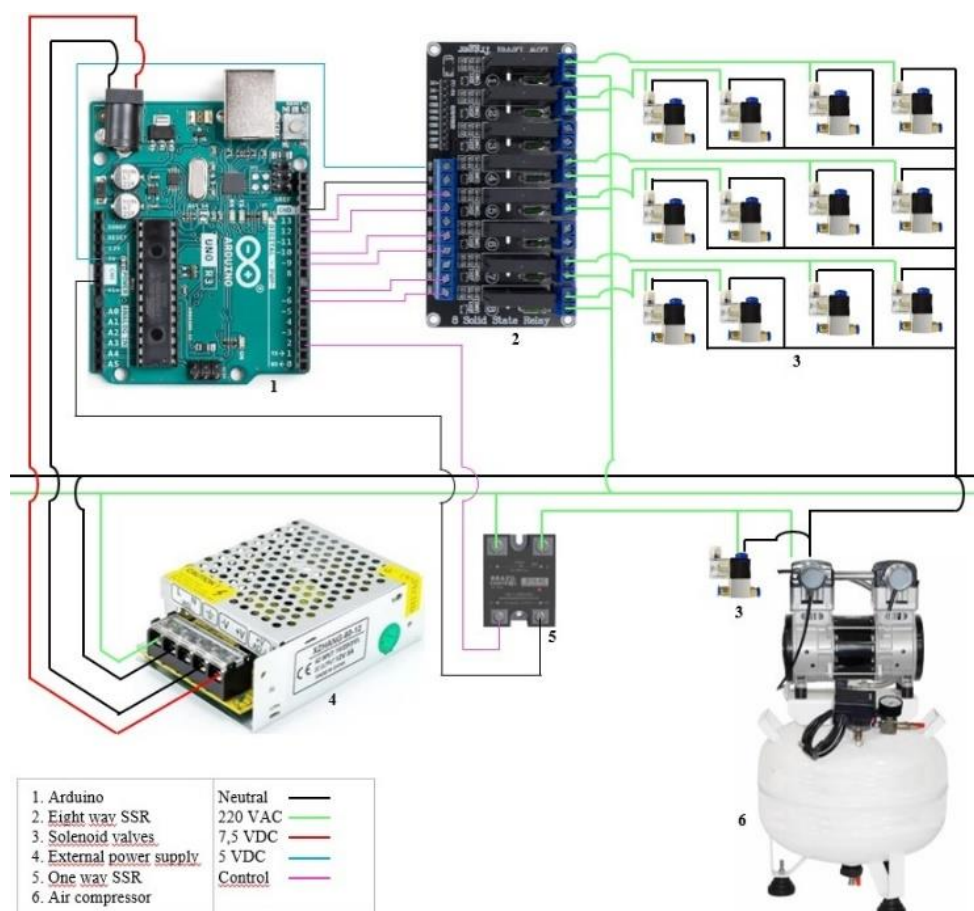
The TIB was automated using a logic module, physical module and a pneumatic system. The logic module consists of a controller that stores instructions and sends them to the physical module, which is composed of relays that, when activated by the Arduino, trigger the pneumatic system containing a compressor and solenoid valves (Figure 2).



**Figure 1.** Operation of the Twin-flask bioreactor. A. The whole volume of the culture medium is located in the medium storage flask culture chamber (flask on the right). B. Pressurization of the flask begins, and the medium moves into the culture chamber (arrows). C. Once transfer of the medium to the culture chamber is complete, immersion begins. D. At the end of the immersion period, the culture chamber is pressurized and the medium drained back into the medium storage flask (on the left), completing the cycle. **Source:** Georgiev et al. (2014).

The logic module was assembled using an Arduino Uno R3 microcontroller with a 7.5 VDC external power supply. A programming code was developed to activate the three culture rows, written in the C and C++, the languages used for Arduino (McRoberts, 2011) and then recorded in its Integrated Development Environment (IDE), version 1.8.19. The physical module was assembled using two solid-state relays (SSRs), one with eight channels, a 5 VDC external power supply and 250 VAC/2A load capacity per channel, and the other with one channel, 3-32 VDC external power supply and 24-480 VAC/25 A load capacity. The pneumatic system and culture rows were assembled in line in accordance with Teixeira (2001), with some changes (Figure 3), as follows: a 60 L oil-free compressor with a maximum pressure of 8 bar (replaces items 22 and 25); two-way industrial solenoid

valves; items 23 and 24, namely an air/oil filter and Erlenmeyer flask with an activated carbon suspension, respectively, were not needed due to the use of the oil-free compressor; air filtering was performed using 40 mm-diameter polytetrafluoroethylene (PTFE) filters with 0.22  $\mu\text{m}$  porosity.

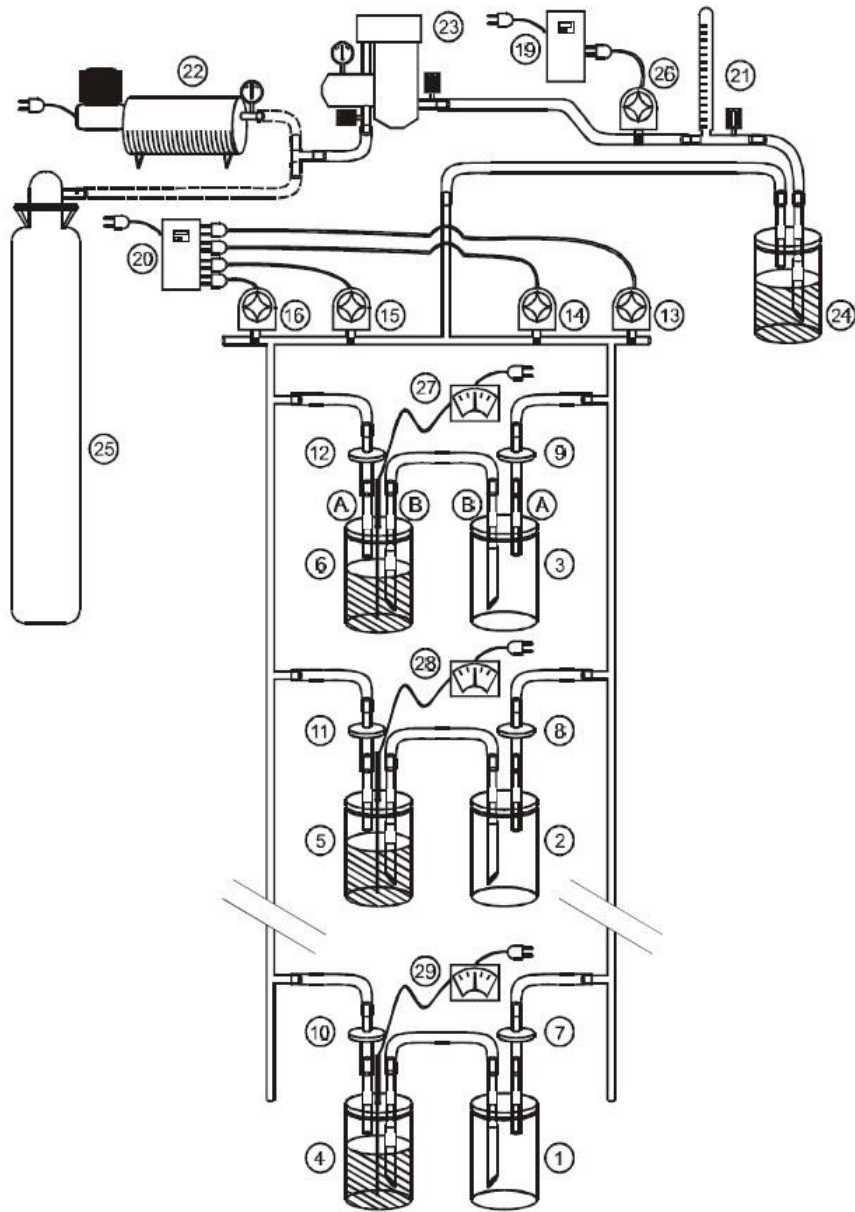


**Figure 2.** Electronic circuit of the automation system controlled by the Arduino, showing the logic (1 and 4) and physical modules (2 and 5) and pneumatic system (3 and 6). The components are not shown to scale.

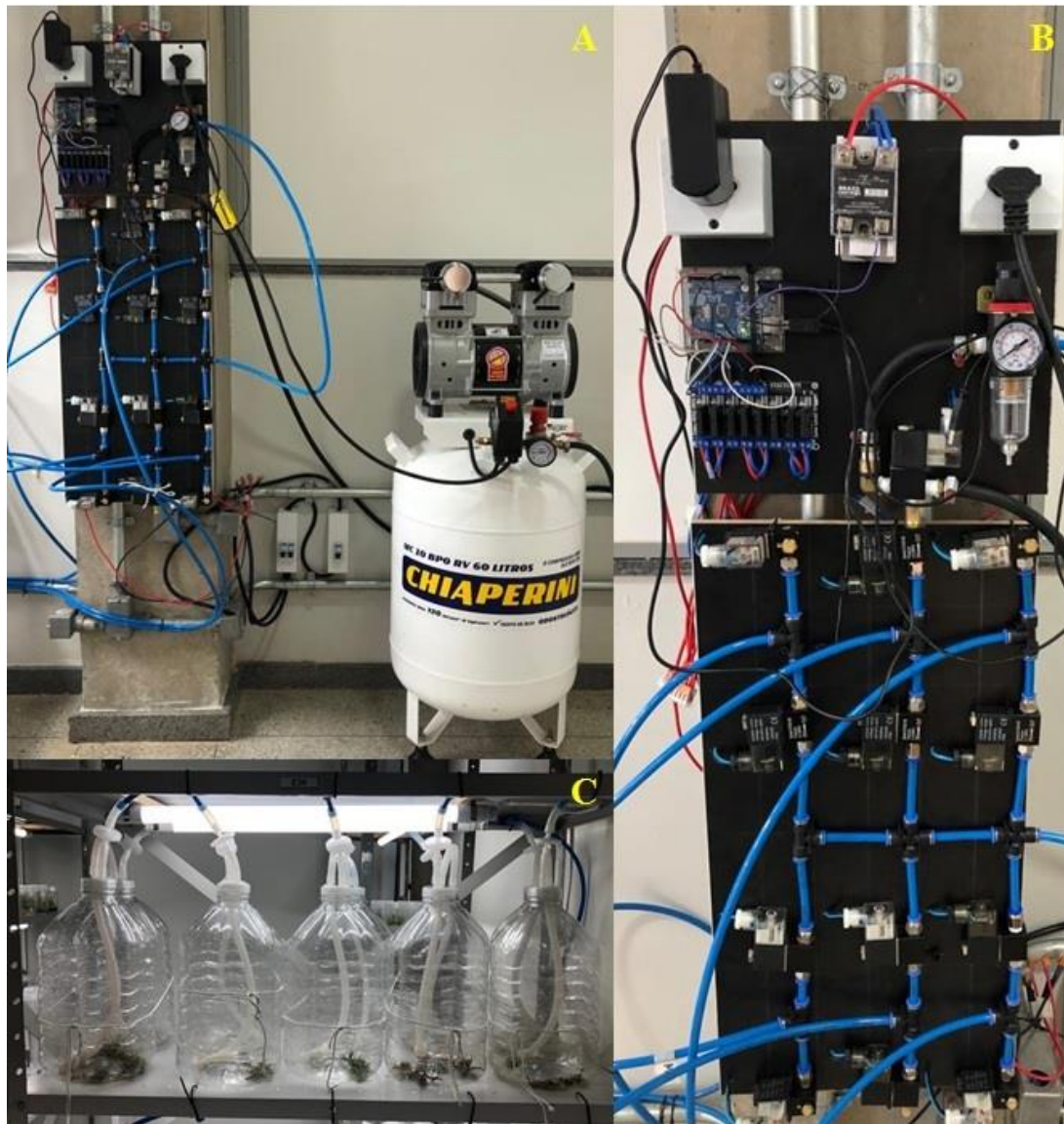
Three culture rows were assembled using 5 L polyethylene terephthalate (PET) flasks connected by silicone hoses (Figure 4). Each row contained four pairs of flasks, with each pair consisting of a culture chamber and medium storage flask. Each medium flask contained 300 mL of MS culture medium (Murashige & Skoog, 1962) added with 20 g L<sup>-1</sup> of sucrose.

The Arduino was programmed to operate the three culture rows of the bioreactor simultaneously, based on the following parameters: Immersion time of three minutes and intervals of 2, 4 and 8 h (Silva, Pasqual, Teixeira, & Araújo, 2007). TIB operation was monitored for 60 days, with daily inspections.

The study was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory of the Reference Center for Nature Conservation and Degraded Area Recovery of the University of Brasília (CRAD/UnB).



**Figure 3.** Twin-flask temporary immersion bioreactor developed by Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. 1-3. Culture chambers. 4-6. Medium storage flasks. 7-12. Air filter with pores of  $\leq 0.44$  micrometers. 13-16 and 26. Solenoid valves. 24. Erlenmeyer flask with an activated carbon aqueous suspension. 19 and 20. Timers. 21. Flow meter. 22 and 25. Positive pressure source (compressed air tank or artificial air cylinder). 23. Air/oil filter. 27-29. Electrodes for medium monitoring. **Source:** Teixeira (2001).



**Figure 4.** Temporary immersion bioreactors assembled at the Reference Center for Nature Conservation and Degraded Area Recovery of the University of Brasília - CRAD/UnB. **A.** View of the logic and physical modules and pneumatic system. **B.** Closeup of the logic module, solenoid valves and pneumatic circuit. **C.** Culture row with 5 L PET flasks connected by silicone hoses with their respective PTFE filters.

## Results and Discussion

After 60 days of monitoring, the three TIB culture rows showed no operational failures in the pneumatic system, logic or physical modules. The air filtering system prevented flask contamination, with no contamination of the culture chambers or medium storage flasks used. The code written in C and C++ was based solely on the "delay" function and enabling or disabling a "digitalWrite" pin and a real-time-clock (RTC) module was not necessary (Figure 5).



```

1 void setup() {
2   // put your setup code here, to run once:
3   pinMode(13, OUTPUT); // CSc
4   pinMode(2, OUTPUT); // LM2
5   pinMode(4, OUTPUT); // LE2
6   pinMode(7, OUTPUT); // LM4
7   pinMode(8, OUTPUT); // LE4
8   pinMode(10, OUTPUT); // LM8
9   pinMode(11, OUTPUT); // LE4
10 }
11
12 void loop() {
13   // put your main code here, to run repeatedly:
14   digitalWrite(4, HIGH); // Close LE2
15   digitalWrite(8, HIGH); // Close LE4
16   digitalWrite(11, HIGH); // Close LE8
17   digitalWrite(2, LOW); // Open LM2
18   digitalWrite(7, LOW); // Open LM4
19   digitalWrite(10, LOW); // Open LM8
20   digitalWrite(13, HIGH); // Turn on CSc
21   delay(60000); // Medium transfer
22   digitalWrite(13, LOW); // Turn off CSc
23   delay(30000); // Line air drain
24   digitalWrite(2, HIGH); // Close LM2
25   digitalWrite(7, HIGH); // Close LM4
26   digitalWrite(10, HIGH); // Close LM8
27   delay(180000); // Immersion
28   digitalWrite(4, LOW); // Open LE2
29   digitalWrite(8, LOW); // Open LE4
30   digitalWrite(11, LOW); // Open LE8
31   digitalWrite(13, HIGH); // Turn on CSc
32   delay(60000); // Medium transfer
33   digitalWrite(13, LOW); // Turn off CSc
34   delay(30000); // Line air drain
35   digitalWrite(4, HIGH); // Close LE2
36   digitalWrite(8, HIGH); // Close LE4
37   digitalWrite(11, HIGH); // Close LE8
38   delay(6840000); // Interval
39   digitalWrite(2, LOW); // Open LM2
40   digitalWrite(13, HIGH); // Turn on CSc
41   delay(60000); // Medium transfer
42   digitalWrite(13, LOW); // Turn off CSc
43   delay(30000); // Line air drain
44   digitalWrite(2, HIGH); // Close LM2
45   delay(180000); // Immersion
46   digitalWrite(4, LOW); // Open LE2
47   digitalWrite(13, HIGH); // Turn on CSc
48   delay(60000); // Medium transfer
49   digitalWrite(13, LOW); // Turn off CSc
50   delay(30000); // Line air drain
51   digitalWrite(4, HIGH); // Close LE2
52   delay(6840000); // Interval
53   digitalWrite(2, LOW); // Open LM2
54   digitalWrite(7, LOW); // Open LM4
55   digitalWrite(13, HIGH); // Turn on CSc
56   delay(60000); // Medium transfer
57   digitalWrite(13, LOW); // Turn off CSc
58   delay(30000); // Line air drain
59   digitalWrite(2, HIGH); // Close LM2
60   digitalWrite(7, HIGH); // Close LM4
61   delay(180000); // Immersion
62   digitalWrite(4, LOW); // Open LE2
63   digitalWrite(8, LOW); // Open LE4
64   digitalWrite(13, HIGH); // Turn on CSc
65   delay(60000); // Medium transfer
66   digitalWrite(13, LOW); // Turn off CSc
67   delay(30000); // Line air drain
68   digitalWrite(4, HIGH); // Close LE2
69   digitalWrite(8, HIGH); // Close LE4
70   delay(6840000); // Interval
71   digitalWrite(2, LOW); // Open LM2
72   digitalWrite(13, HIGH); // Turn on CSc
73   delay(60000); // Medium transfer
74   digitalWrite(13, LOW); // Turn off CSc
75   delay(30000); // Line air drain
76   digitalWrite(2, HIGH); // Close LM2
77   delay(180000); // Immersion
78   digitalWrite(4, LOW); // Open LE2
79   digitalWrite(13, HIGH); // Turn on CSc
80   delay(60000); // Medium transfer
81   digitalWrite(13, LOW); // Turn off CSc
82   delay(30000); // Line air drain
83   digitalWrite(4, HIGH); // Close LE2
84   delay(6840000); // Interval
85 }

```

**Figure 5.** Code written for automation of the Twin-flask temporary immersion bioreactor. CSc (Compressor and compressor solenoid); MR2 (medium storage flask row for the 2-hour immersion interval); ER2 (explant flask row for the 2-hour immersion interval); MR4 (medium storage flask row for the 4-hour immersion interval); ER4 (explant flask row for the 4-hour immersion interval); MR8 (medium storage flask row for the 8-hour immersion interval); ER8 (explant flask row for the 8-hour immersion interval); Interval (Interval until the next immersion).

The use of the Arduino as a controller allows the developed code to be written directly into its IDE, without the need for auxiliary software, such as the JAVA programming package (Java Standard Edition, NetBeans and the JavaFX framework). Moreover, using the C and C++ programming languages is beneficial to the system in that they are simple, easy to learn, flexible, efficient

(McKeeman, 1993; Stroustrup, 1993), available for most computers and hardware independent (Deitel & Deitel, 2006), allowing the replication of this automation system.

In the automation system, the cost of the devices used in the logic and physical modules was substantially lower than that of PLCs available on the domestic market. The cost of a one-channel SSR, an eight-channel SSR, an Arduino Uno R3 microcontroller and a 7.5 VDC external power supply was US\$ 64.00. The PLCs analyzed used a 12 or 24 VDC external supply, depending on the model, with a total cost 2.5 to 4 times lower than that of the least and most expensive PLC, respectively (Table 2).

The maximum number of load switches (Table 2) gives the Arduino a considerable advantage over PLCs available on the market. The data provided by the manufacturers of the models compared indicate that the maximum number of load switches per day varies from 12 to 62 (Schneider Electric, 2022; Siemens, 2022; Tholz, 2022; WEG, 2022), while the Arduino obtained  $4.32 \times 10^7$  (Arduino, 2022). Ninety-one load switches were needed for daily operation of the TIB with three different simultaneous immersion intervals (2, 4 and 8 h), which cannot be achieved with any of the PLCs studied. It is also important to note that all the PLCs analyzed switch loads via electromechanical relays (EMRs) and only two had eight channels. As such, using PLC models with four relays would require expansion modules, which are as costly as the controllers themselves.

Despite their higher cost, SSRs have a number of advantages over EMRs: reliability in applications that require a large number of contact closures, maximum speed and control of contact closures, minimum production of radio frequency interference and little wear because they have no electromechanically activated moving parts (Soderholm & Bern, 1976; Abdelmoumene & Bentarzi, 2014). Furthermore, EMRs operate based on contact between moving components, subjecting them to continuous wear that shortens their service life in relation to SSRs (Ramirez-Laboreo, Sagues, & Llorente, 2015), and the effects of aging alter EMR characteristics during their service life (Sandeep et al., 2017). Another important advantage is that the control signal is isolated from the load to prevent overcurrent that might damage the controller (Mbunwe, Ogbuefi, Anyaka, & Ayogu, 2018). During the testing phase of logical and physical module assembly, the Arduino EMRs were found to be insufficiently insulated, which damaged one of the controllers. Another important point is the power consumption of the relays. The one and eight-channel SSR models used consume around 3-25 mA (Brazilcontrol, 2022) and 10 mA (Omron, 2022), respectively, while EMRs require 71.4 mA (Songlerelay, 2022). The current consumption of EMRs exceeds the maximum current that an Arduino can supply, namely 40 mA per port and 500 mA in total (Arduino, 2022). EMRs therefore require an external power supply to overcome this limitation. Although this was provided during testing, the relays were insufficiently insulated, resulting in overcurrent that damaged the other

Arduino. Since relays play a key role in automation, whenever possible SSRs should be preferred over EMRs (Vinod, Devadasan, Rajanayagam, Sunil, & Thilak, 2018), as occurred in the present study.

**Table 2.** Comparison of the main characteristics of the controllers and relays available on the Brazilian market. Programmable Logic Controllers (PLC); Solid-State Relays (SSR); Electromechanical relay (EMR); External Power Supply (EPS). \* Has a power supply. ‡ Each load drive corresponds to switching one load on and off. \*\* Based on the minimum time to switch a load on and off, which is 2 ms.

Device	Producer	Model	Relays	Load switches/day ‡	Price in US\$
PLC	WEG	Clic-02	4	62	262
PLC	Tholz	CLG535R	8	16	227
PLC	Schneider	SR2A101BD	4	32	174
PLC	Siemens	Logo 230 RC*	4	12	157
Arduino	Arduino	Uno R3	0	4.32 x 10 <sup>7</sup> **	23
1 way SSR	Brazilcontrol	B1425	1	-	12
8 way SSR	-	-	8	-	21
8 way EMR	-	-	8	-	14
7,5 VDC	-	-	-	-	8
12 VDC	-	-	-	-	8
24 VDC	-	-	-	-	8

The literature review demonstrated that few studies with a TIB micropropagation system describe the type of automation used (Escalona et al., 1999; Arellano-García et al., 2020; Solórzano-Acosta & Guerrero-Padilla, 2020). In these studies, and the Twin-flask TIB developed by EMBRAPA (Teixeira & Cid, 2000; Teixeira, 2002), only conventional timers were used for immersion control. Silva et al. (2007) assessed three non-simultaneous immersion intervals controlled by conventional timers. Zhang *et al.* (2022) used an industrial system to control four immersion intervals but did not describe the system characteristics. In the remaining studies identified in the review, only the immersion time and interval between immersions are described, with only one interval assessed (Spinoso-Castillo et al., 2017; Ramírez-Mosqueda, Cruz-Cruz, Cano-Ricárdez, & Bello-Bello, 2019; Aragón et al., 2014; Leyva-Ovalle, Bello-Bello, Murguía-González, Núñez-Pastrana, & Ramírez-

Mosqueda, 2020). This seems to indicate that only timers were used in automation. Other studies with only one immersion time can be found in De Carlo, Tarraf, Lambardi and Benelli (2021).

## **Conclusions**

This study presented an automation system using an Arduino Uno microcontroller. This device has several advantages over PLC controllers: it is an open-source platform whose features are constantly being improved and whose IDE is free of charge; it can be customized for different control formats using low-cost modules for the controllers (wireless, humidity and temperature sensors, real time clock, etc.); different programming codes can be written to meet specific user needs, which is not the case for PLCs whose functions are predefined.

The cost of the automation system designed here was considerably lower than that of PLCs available on the market. Additionally, the solid-state relays used are more durable, ensure better circuit and microcontroller security and do not require an external power supply, making them less costly.

The programming code developed here allows three culture rows with different immersion times to be controlled simultaneously and can be altered to include additional rows, which contributes to the micropropagation of different plant species because the required immersion times may differ between species. Once input into the Arduino IDE, the code executes the programming indefinitely with no need for user intervention or auxiliary software, which require knowledge of other programming languages. Additionally, the Arduino IDE can be installed in computers that use LINUX or Microsoft Windows, even in older versions of these operating systems, eliminating the need for newer more expensive computers.

Thus, using less costly, accessible, modular and customizable technologies is a means of improving productivity in the micropropagation of ornamental plants. This provides an opportunity to improve profits in the flower farming and ornamental plant sectors, which require considerable manpower and generally involve small family farms, enabling farmers to achieve higher revenues per hectare and remain in the industry.

## References

- Abdelmoumene, A., & Bentarzi, H. (2014). A review on protective relays' developments and trends. *Journal of Energy in Southern Africa*, 25(2), 91-95.
- Aguiar, L. A. A., Vasconcelos, N. A. P., Tunes, G. C., Fontenele, A. J., Nogueira, R. A., Reyes, M. B., & Carelli, P. V. (2020). Low-cost open hardware system for behavioural experiments simultaneously with electrophysiological recordings. *HardwareX*, 8, e00132. doi: 10.1016/j.ohx.2020.e00132
- Alharbi, Y. M., Soliman, M. S., Salem, F. A., Alahmadi, A. A., Abeida, H., & Khraisat, Y. S. H. (2020). Design a Wireless Automated Solar Powered Irrigation Control System for Smart Universities Green Areas Water Management. *International Journal of Engineering Research and Technology*, 13(5), 891-899.
- Aragón, C. E., Sánchez, Gonzalez-Olmedo, C. J., Escalona, M., Carvalho, L., & Amâncio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 58(1), 29-38. doi: 10.1007/s10535-013-0381-6
- Arduino. (2022). Available at <https://www.arduino.cc>. Access on: 10 Jan 2022.
- Arellano-García, J., Enciso-Díaz, O., Flores-Palacios, A., Valencia-Díaz, S., Flores-Morales, A. & Perea-Arango, I. (2020). Asymbiotic germination, effect of plant growth regulators, and chitosan on the mass propagation of *Stanhopea hernandezii* (Orchidaceae). *Botanical Sciences*, 98(4): 524-533. doi: 10.17129/botsci.2559.
- Bedi, H. S., Verma, S., Sharma, R., & Singh, B. (2015). The Concept of Programmable Logic Controllers and its role in Automation. *International Journal of Advanced Research in Computer and Communication Engineering*, 4(6), 557-561. doi: 10.17148/IJARCCCE.2015.46120
- Brazilcontrol. (2022). Available at [www.brazilcontrol.com.br](http://www.brazilcontrol.com.br). Access on: 10 May 2022.
- Businge E., Trifonova A., Schneider C., Rödel P., & Egertsdotter, U. (2017). Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of *Eucalyptus*, birch and fir. *Forests*, 8(196), 1-9. doi: 10.3390/f8060196
- Cardoso, J. C. (2013). Melhoramento de espécies ornamentais como estratégia para o desenvolvimento e autossuficiência do setor. *Horticultura Brasileira*, 31(1), 171.
- Cardoso, J. C., & Vendrame, W. A. (2022). Innovation in Propagation and Cultivation of Ornamental Plants. *Horticulturae*, 8: 229. doi: 10.3390/horticulturae8030229
- Carvalho, L. S. O., Ozudogru, E. A., Maurizio Lambardi, M., & Paiva, L. V. (2019). Temporary Immersion System for Micropropagation of Tree Species: a Bibliographic and Systematic Review.

- Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 269-277. doi: 10.15835/nbha47111305
- Chatzopoulos, A., Papoutsidakis, M., Sofianos, G., & Piromalis, D. (2019). An Automated Plant Pot Controlled via the Internet based on Arduino Applications. *International Journal of Computer Applications*, 178(25), 26-30. doi: 10.5120/ijca2019919048
- Darras, A. I. (2020). Implementation of Sustainable Practices to Ornamental Plant Cultivation Worldwide: A Critical Review. *Agronomy*, 10, 1570. doi: 10.3390/agronomy10101570
- D'Áusilio, A. (2012). Arduino: A low-cost multipurpose lab equipment. *Behavioral Research*, 44, 305–313.
- De, L. C., & Medhi, R. P. (2017). Orchid – a diversified flower crop. *Acta Horticulturae*, 1181, 107-111. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1181.14.
- De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M. & Benelli, C. (2021). Temporary Immersion System for Production of Biomass and Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Agronomy*, 11, 2414. doi 10.3390/agronomy11122414.
- Debnath, S. (2011). Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation - A review. *Canadian Journal of Plant Science*, 91, 147– 157. doi: 10.4141/CJPS10131
- Deitel, H. M., & Deitel, P. J. (2006). Introdução aos computadores, à Internet e à World Wide Web. In H. M. Deitel, & P. J. Deitel (Ed.), *C++: como programar* (p. 1-25). São Paulo: Pearson Prentice Hall.
- Devarakonda, K., Nguyen, K. P., & Kravitz, A. V. (2016). ROBucket: A low cost operant chamber based on the Arduino microcontroller. *Behavior Research Methods*, 48, 503–509. doi: 10.3758/s13428-015-0603-2
- Duval, C. M. (2014). The flower production and family farming. *Horticultura Brasileira*, 32(2), 241.
- Egertsdotter, U., Ahmad, I., & Clapham, D. (2019). Automation and Scale Up of Somatic Embryogenesis for Commercial Plant Production, With Emphasis on Conifers. *Frontiers in Plant Science*, 10, 109. doi: 10.3389/fpls.2019.00109
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. J., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18: 743–748.
- Gabellini, S., & Scaramuzzi, S. (2022). Evolving Consumption Trends, Marketing Strategies, and Governance Settings in Ornamental Horticulture: A Grey Literature Review. *Horticulturae*, 8, 234. doi: 10.3390/horticulturae8030234
- George, E. F., Hall, M. A. & Klerk, G. D. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Ed. Springer: Dordrecht, The Netherlands. Vol. 1. 501 pp.

- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A. & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Science*, 14(6), 607–621. doi: 10.1002/elsc.201300166
- Guzmán-Fernández, M., Torre, M.Z., Ortega-Sigala, J., Guzmán-Valdivia, G., Galvan-Tejeda, J. I., Cruz-Domínguez, O., Ortiz-Hernández, A., Fraire-Hernández, M., Sifuentes-Gallardo, C., & Durán-Muñoz, H.A. (2021). Arduino: a Novel Solution to the Problem of High-Cost Experimental Equipment in Higher Education. *Experimental Techniques*, 45, 613–625. doi: 10.1007/s40799-021-00449-1
- Kaswan, K. S., Singh, S. P., & Sagar, S. (2020). Role of Arduino in Real World Applications. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 9(1), 1113-1116.
- Leyva-Ovalle, O. R., Bello-Bello, J. J., Murguía-González, J., Núñez-Pastrana, R., & Ramírez-Mosqueda, M. A. (2020). Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et W. E. Higgings in Temporary Immersion Systems. *3 Biotech*, 10, 26. doi: 10.1007/s13205-019-2010-3
- Lima Júnior, J. C., Nakatani, J. K., Neto, L. C. M., Lima, L. A. C. V., Kalaki, R. B., & Camargo, R. B. (2015). *Mapeamento e Quantificação da Cadeia de Flores e Plantas Ornamentais do Brasil*. São Paulo: OCESP.
- Lopez-Rodriguez, F.M. & Cuesta, F. (2021). An Android and Arduino Based Low-Cost Educational Robot with Applied Intelligent Control and Machine. Learning. *Applied Sciences*, 11, 48. doi: 10.3390/app11010048
- Louis, L. (2016). Working principle of arduino and using it as a tool for study and research. *International Journal of Control, Automation, Communication and Systems*, 1(2), 21-29. doi: 10.5121/ijcacs.2016.1203
- Loyola-González, O., Medina-Pérez, M. A., Hernández-Tamayo, D., Monroy, R., Carrasco-Ochoa, J. A., & García-Borroto, M. (2019). A Pattern-Based Approach for Detecting Pneumatic Failures on Temporary Immersion Bioreactors. *Sensors*, 19, 414. doi: 10.3390/s19020414.
- Mancilla-Álvarez, E., Pérez-Sato, J. A., Núñez-Pastrana, R., Spinoso-Castillo, J. L., & Bello-Bello, J. J. (2021). Comparison of Different Semi-Automated Bioreactors for *In Vitro* Propagation of Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Plants*, 10, 1010. doi: 10.3390/plants10051010
- Manikas, I., Malindretos, G., & Abeliotis, K. (2019). Sustainable Cities through Alternative Urban Farming: The Case of Floriculture. *Journal of International Food & Agribusiness Marketing*, 32(3), 295-311. doi: 10.1080/08974438.2019.1599762
- Mbunwe, M. J., Ogbuefi, U. C., Anyaka, B. O., & Ayogu, C. C. (2018). Protection of a Disturbed Electric Network using Solid State Protection Device. *Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science*, 1, 23-25.

- McKeeman, W. M. (1993). A Brief Introduction to C. *HOPL-II: The second ACM SIGPLAN Conference on History of Programming Languages*, 347–348. doi: 10.1145/154766.155382
- McRoberts, M. (2011). *Arduino básico*. São Paulo, SP: Novatec.
- Milik, A., & Hryniewicz, E. (2012). Synthesis and Implementation of Reconfigurable PLC on FPGA Platform. *International Journal of Electronics and Telecommunications*, 58(1), 85–94. doi: 10.2478/v10177-012-0012-8
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Nowrot, A., & Solecka, B. (2018). Application of Arduino Module to Research In Surface Physics. *Multidisciplinary Aspects of Production Engineering*, 1(1): 295-300. doi: 10.2478/mape-2018-0037
- Omron. (2022). Available at [www.ia.omron.com](http://www.ia.omron.com). Access on: 10 May 2022.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D. & Hahn, E. J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 287–300. doi: 10.1007/s11240-004-6648-z
- Pineño, O. (2014). ArduiPod Box: A low-cost and open-source Skinner box using an iPod Touch and an Arduino microcontroller. *Behavior Research Methods*, 46, 196–205. doi: 10.3758/s13428-013-0367-5
- Ramirez-Laboreo, E., Sagues, C., & Llorente, S. (2015). A new model of electromechanical relays for predicting the motion and electromagnetic dynamics. *IEEE Industry Applications Society Annual Meeting*, 1-8. doi: 10.1109/IAS.2015.7356818
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Cruz-Cruz, C. A., Cano-Ricárdez, A., & Bello-Bello, J. J. (2019). Assessment of different temporary immersion systems in the micropropagation of anthurium (*Anthurium andreaeanum*). *3 Biotech*, 9, 307. doi: 10.1007/s13205-019-1833-2
- Recasens, X., & Alfranca, O. (2018). Production of ornamental plants and cut flowers in peri-urban areas: an economic and environmental analysis of the Barcelona metropolitan region, Spain. *WIT Transactions on The Built Environment*, 179, 245-255. doi: 10.2495/UG180231
- Rocha, H. S. (2013). Biofábricas: Estrutura Física e Organização. In T. G. Junghans, & A. S. Souza (Ed.), *Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas* (p. 133-164). Brasília, DF: EMBRAPA.
- Rocha, P. A. C., Mendonça, S. P. M., Watanabe, T. T. G.; Silva, M. E. V., & Lima, R. J. P. (2020). Analysis of different tracking intervals for Parabolic Trough Collectors for water disinfection in agricultural applications. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(1), 7-32. doi: 10.5433/1679-0359.2020v41n1p7



- Rocha, J. V., Magalhães, R. R., Carvalho, L. G., Diotto, A. V., & Barbosa, B. H. G. (2022). Development of a low-cost weather station and real-time monitoring for automated irrigation management. *Acta Scientiarum. Technology*, 44, e59244. doi: 10.4025/actascitechnol.v44i1.59244
- Rooijen, S. V., & Gedanken, A. (2012). *Capacitação tecnológica em flores e plantas ornamentais*. Brasília, DF: Serviço Nacional de Aprendizagem Rural-SENAR.
- Samuelsson, K., Giusti, M., Peterson, G.P., Legeby, A., Brandta, S.A., & Barthela, S. (2018). Impact of environment on people's everyday experiences in Stockholm. *Landscape and Urban Planning*, 171, 7–17. doi: 10.1016/j.landurbplan.2017.11.009
- Sandeep, S. R., Megha, N., Pavithra, V., Biradar, S. C., & Thanushree, V. (2017). Study and Analysis of Modern Numerical Relay Compared to Electromechanical Relay for Transmission of Power. *International Journal of Engineering Trends and Technology*, 47(9), 509-515
- Schneider Electric. (2022). Available at <https://www.se.com/br/pt/>. Access on: 10 May 2022.
- Siemens. (2022). Available at <https://new.siemens.com/br/pt.html>. Access on: 10 May 2022.
- Silva, A. B., Pasqual, M., Teixeira, J. B., & Araújo, A. G. (2007). Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(9), 1257-1260.
- Soderholm, L. H., & Carl Bern, C. (1976). Solid-State Relays for Control. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 596-600.
- Solórzano-Acosta, R., & Guerrero-Padilla, M. (2020). Design and Construction of a Pneumatic Temporary Immersion Bioreactor System for the Multiplication of *Ananas comosus* var. Trujillana Red. *American Journal of Plant Sciences*, 11, 1429-1442. doi: 10.4236/ajps.2020.119103
- Songlerelay. (2022). Available at [www.songlerelay.com](http://www.songlerelay.com). Access on: 10 May 2022.
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(2), 195-207. doi: 10.1007/s11240-017-1169-8
- Stancato, G. C., Abreu, M. F., & Furlani, A. M. C. (2001). Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 17(1): 25-33.
- Stroustrup, B. (1993). A history of C++: 1979–1991. *The second ACM SIGPLAN Conference on History of Programming Languages*, 271–297. doi: 10.1145/154766.155375
- Subito, M., Nurrahmi, S., & Mustari, A. (2020). Miniature Automatic Watering System of Ornamental Plant at Permanent Seedbed of Central Management of Regional River Flow

- (BPDAS) Palu–Poso Using Microcontroller Arduino-Uno. *MATEC Web of Conferences*, 331, 06003. doi: 10.1051/matecconf/202033106003
- Tappert, S., Klöti, T., & Drilling, M. (2018). Contested urban green spaces in the compact city: The (re) negotiation of urban gardening in Swiss cities. *Landscape and Urban Planning*, 170, 69–78. doi: 10.1016/j.landurbplan.2017.08.016
- Teixeira, J. B. (2001). Biorreator de Imersão Temporária desenvolvido pela EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. *II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 278-284.
- Teixeira, J. B. (2002). Biorreatores. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 4, 36-41.
- Teixeira, J. B., & Cid, L. P. B. (2000). *Sistemas de biorreatores para cultivo de células vegetais, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão temporária ou contínua utilizando fonte de pressão positiva ou negativa*. Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Patente (PI 0004185-8).
- Tholz. (2022). Available at <https://tholz.com.br/>. Access on: 10 May 2022.
- Twaij, B. M., Jazar, Z. H., & Hasan, M. N. (2020). Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. *International Journal of Plant Biology*, 11(1), 8385. doi: 10.4081/pb.2020.8385
- Uma, S., Karthic, R., Kalpana, S., Backiyarani, S., & Saraswathi, M. S. (2021). A novel temporary immersion bioreactor system for large scale multiplication of banana (Rasthali AAB—Silk). *Nature*, 11:20371. doi: 10.1038/s41598-021-99923-4
- Vinod, M., Devadasan, S. R., Rajanayagam, D., Sunil, D. T., & Thilak, V. M. M. (2018). Theoretical and industrial studies on the electromechanical relay. *International Journal of Services and Operations Management*, 29(3), 312-331.
- WEG. (2022). Available at [www.weg.net/institucional/BR/pt/](http://www.weg.net/institucional/BR/pt/). Access on: 10 May 2022.
- Zhang, B., Niu, Z., Li, C., Hou, Z., Xue, Q., Liu, W., & Ding, X. (2022). Improving large-scale biomass and total alkaloid production of *Dendrobium nobile* Lindl. using a temporary immersion bioreactor system and MeJA elicitation. *Plant Methods*, 18, 10. doi: 10.1186/s13007-022-00843-9.

## Anexo I

**Código desenvolvido para automação com Arduino das linhas de cultivo do Biorreator de Imersão Temporária com intervalos entre imersões de 2, 4 e 8 h.**

```
void setup() {
  // put your setup code here, to run once:
  pinMode(13, OUTPUT); // CSc
  pinMode(2, OUTPUT); // LM2
  pinMode(4, OUTPUT); // LE2
  pinMode(7, OUTPUT); // LM4
  pinMode(8, OUTPUT); // LE4
  pinMode(10, OUTPUT); // LM8
  pinMode(11, OUTPUT); // LE4
}

void loop() {
  // put your main code here, to run repeatedly:
  digitalWrite(4, HIGH); // Desativa Linha Explante T2h
  digitalWrite(8, HIGH); // Desativa Linha Explante T4h
  digitalWrite(11, HIGH); // Desativa Linha Explante T8h
  digitalWrite(2, LOW); // Ativa Linha Meio de cultura T2h
  digitalWrite(7, LOW); // Ativa Linha Meio de cultura T4h
  digitalWrite(10, LOW); // Ativa Linha Meio de cultura T8h
  digitalWrite(13, HIGH); // Ativa Compressor e válvula compressor
  delay(60000); // Tempo transferência Frascos Meio-Explante> 1min
  digitalWrite(13, LOW); // Desativa Compressor e válvula compressor
  delay(30000); // Tempo de escape de ar da linha> 30s
  digitalWrite(2, HIGH); // Desativa Linha Meio de cultura T2h
  digitalWrite(7, HIGH); // Desativa Linha Meio de cultura T4h
  digitalWrite(10, HIGH); // Desativa Linha Meio de cultura T8h
  delay(180000); // Tempo de Imersão> 3min
  digitalWrite(4, LOW); // Ativa Linha Explante T2h
  digitalWrite(8, LOW); // Ativa Linha Explante T4h
  digitalWrite(11, LOW); // Ativa Linha Explante T8h
  digitalWrite(13, HIGH); // Ativa Compressor e válvula compressor
  delay(60000); // Tempo transferência Frascos Explante-Meio> 1min
  digitalWrite(13, LOW); // Desativa Compressor e válvula compressor
  delay(30000); // Tempo de escape de ar da linha> 30s
  digitalWrite(4, HIGH); // Desativa Linha Explante T2h
  digitalWrite(8, HIGH); // Desativa Linha Explante T4h
  digitalWrite(11, HIGH); // Desativa Linha Explante T8h
  delay(6840000); // Fim acionamento 1 - Tempo até o próximo ciclo> 1h54min
  digitalWrite(2, LOW); // Ativa Linha Meio de cultura T2h
  digitalWrite(13, HIGH); // Ativa Compressor e válvula compressor
  delay(60000); // Tempo transferência Frascos Meio-Explante> 1min
```

```

digitalWrite(13, LOW); // Desativa Compressor e válvula compressor
delay(30000); // Tempo de escape de ar da linha> 30s
digitalWrite(2, HIGH); // Desativa Linha Meio de cultura T2h
delay(180000); // Tempo de Imersão> 3min
digitalWrite(4, LOW); // Ativa Linha Explante T2h
digitalWrite(13, HIGH); // Ativa Compressor e válvula compressor
delay(60000); // Tempo transferência Frascos Explante-Meio> 1min
digitalWrite(13, LOW); // Desativa Compressor e válvula compressor
delay(30000); // Tempo de escape de ar da linha> 30s
digitalWrite(4, HIGH); // Desativa Linha Explante T2h
delay(6840000); // Fim acionamento 2 - Tempo até o próximo ciclo> 1h54min
digitalWrite(2, LOW); // Ativa Linha Meio de cultura T2h
digitalWrite(7, LOW); // Ativa Linha Meio de cultura T4h
digitalWrite(13, HIGH); // Ativa Compressor e válvula compressor
delay(60000); // Tempo transferência Frascos Meio-Explante> 1min
digitalWrite(13, LOW); // Desativa Compressor e válvula compressor
delay(30000); // Tempo de escape de ar da linha> 30s
digitalWrite(2, HIGH); // Desativa Linha Meio de cultura T2h
digitalWrite(7, HIGH); // Desativa Linha Meio de cultura T4h
delay(180000); // Tempo de Imersão> 3min
digitalWrite(4, LOW); // Ativa Linha Explante T2h
digitalWrite(8, LOW); // Ativa Linha Explante T4h
digitalWrite(13, HIGH); // Ativa Compressor e válvula compressor
delay(60000); // Tempo transferência Frascos Explante-Meio> 1min
digitalWrite(13, LOW); // Desativa Compressor e válvula compressor
delay(30000); // Tempo de escape de ar da linha> 30s
digitalWrite(4, HIGH); // Desativa Linha Explante T2h
digitalWrite(8, HIGH); // Desativa Linha Explante T4h
delay(6840000); // Fim acionamento 3 - Tempo até o próximo ciclo> 1h54min
digitalWrite(2, LOW); // Ativa Linha Meio de cultura T2h
digitalWrite(13, HIGH); // Ativa Compressor e válvula compressor
delay(60000); // Tempo transferência Frascos Meio-Explante> 1min
digitalWrite(13, LOW); // Desativa Compressor e válvula compressor
delay(30000); // Tempo de escape de ar da linha> 30s
digitalWrite(2, HIGH); // Desativa Linha Meio de cultura T2h
delay(180000); // Tempo de Imersão> 3min
digitalWrite(4, LOW); // Ativa Linha Explante T2h
digitalWrite(13, HIGH); // Ativa Compressor e válvula compressor
delay(60000); // Tempo transferência Frascos Explante-Meio> 1min
digitalWrite(13, LOW); // Desativa Compressor e válvula compressor
delay(30000); // Tempo de escape de ar da linha> 30s
digitalWrite(4, HIGH); // Desativa Linha Explante T2h
delay(6840000); // Fim acionamento 4 - Tempo até o próximo ciclo> 1h54min
}

```