



Estado do Paraná

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA**

**EXTRATOS VEGETAIS E REGULADORES DE
CRESCIMENTO NO CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO
DE *Miltonia flavescens* (LINDL.) LINDL. (ORCHIDACEAE).**

Samara Zanella

Toledo – Paraná – Brasil

2021



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA**

**EXTRATOS VEGETAIS E REGULADORES DE CRESCIMENTO NO
CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens*
(LINDL.) LINDL. (ORCHIDACEAE).**

Samara Zanella

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Paulo Vanderlei Sanches
Co-orientadora: Suzana Stefanello

ABRIL/2021

Toledo – PR

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Zanella, Samara

Extratos vegetais e reguladores de crescimento no cultivo in vitro e aclimatização de *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae) / Samara Zanella; orientador(a), Paulo Vanderlei Sanches; coorientador(a), Suzana Stefanello, 2021.

61 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, 2021.

1. Micropropagação. 2. Conservação. 3. Orquídeas. 4. Ecologia. I. Sanches, Paulo Vanderlei. II. Stefanello, Suzana. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Samara Zanella

“Extratos vegetais e reguladores de crescimento no cultivo in vitro e aclimatização de *Mitonia flavescens* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae)”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dra. Luciana Alves Fogaça
Pontifícia Universidade Católica

Prof. Dra. Thaís Souto Bignotto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em: 30 de abril de 2021.
Local de defesa: Via Remota síncrona

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, pelo suporte e incentivo. Seu amor incondicional é meu maior combustível. Obrigada por sempre me mostrarem que mesmo os momentos mais difíceis têm um propósito e que se estivermos juntos na caminhada, tudo é possível.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade de ingressar em um programa multidisciplinar que me proporcionou diferentes visões de mundo e oportunidades profissionais, e à Universidade Federal do Paraná pela parceria e disposição de laboratórios para a realização dos experimentos desenvolvidos na pesquisa.

À CAPES/CNPQ pelo fomento e concessão da bolsa de estudos, permitindo que eu me dedicasse exclusivamente à pesquisa durante um período do curso.

A Deus, fonte de força espiritual, pela saúde e discernimento necessários para cumprir esta jornada.

Aos meus pais, Justina e Valdir, por todo esforço e dedicação para que eu chegasse até aqui, por priorizarem a minha formação e bem-estar mesmo nos momentos de dificuldade, pelas palavras de apoio, pelo incentivo a me tornar uma pessoa melhor a cada dia, pelo amparo, cuidado e amor incondicional.

Ao meu namorado, Lucas, por ser meu melhor amigo e minha companhia diária, fortaleza nos momentos difíceis e minha maior fonte de incentivo. Por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditei. Pelo apoio emocional e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao professor orientador Paulo Vanderlei Sanches e à professora co-orientadora Suzana Stefanello, por aceitarem o desafio da orientação deste trabalho, por todo o conhecimento compartilhado, pelo suporte técnico e científico e por agirem sempre com ética e responsabilidade, me inspirando como profissional.

À professora Shirley Martins da Silva da Unioeste, por toda a prontidão e suporte prestado na realização de análises anatômicas realizadas no trabalho.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para avaliar o trabalho e dispor de todo o seu conhecimento técnico e científico para agregar melhorias ao trabalho.

Aos amigos e colegas pelos bons momentos compartilhados e por tornarem a jornada mais leve e agradável, amenizando o peso das dificuldades ao longo do processo.

A todos que fazem parte da minha vida e acompanham minha trajetória, e que de alguma forma me apoiaram, ajudaram a superar desafios e me inspiraram pessoal ou profissionalmente.

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS.....	18
ARTIGO I - CULTIVO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Miltonia flavescens</i> (LINDL.) LINDL. COM EXTRATO DE ORA-PRO-NÓBIS (<i>Pereskia aculeata</i> MILL.).....	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	20
RESUMEN	21
1 INTRODUÇÃO	21
2 METODOLOGIA	23
2.1 OBTENÇÃO DAS PLÂNTULAS DE <i>Miltonia flavescens</i>	23
2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ORA-PRO-NÓBIS (<i>Pereskia aculeata</i>).....	23
2.3 TRATAMENTOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	24
2.4 ACLIMATIZAÇÃO	24
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1 EFEITO DO EXTRATO NO CRESCIMENTO	25
3.2 ACLIMATIZAÇÃO	29
4 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	33
ARTIGO II - AÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Miltonia flavescens</i> (LINDL.) LINDL. (ORCHIDACEAE)	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	38
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2.1 LOCAL DE CULTIVO E OBTENÇÃO DAS PLÂNTULAS.....	41

2.2 THIDIAZURON E ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i>	41
2.3 ACLIMATIZAÇÃO	42
2.4 ANÁLISE ANATÔMICA	43
2.5 COLETA DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 EFEITO DO TDZ E AIB NO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i>	44
3.2 ACLIMATIZAÇÃO	51
3.3 ANÁLISE ANATÔMICA	54
4 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl. A e B = Aspecto morfológico da planta; C = Detalhe da flor..... 15

ARTIGO I - CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* (LINDL.) LINDL. COM EXTRATO DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* MILL.)

Figura 1. Frascos com meio de cultura contendo plantas de *Miltonia flavescens* nos diferentes tratamentos com extrato aquoso de *Pereskia aculeata*.....24

Figura 2. Número médio de folhas (A) e altura da parte aérea (B) de plantas de *Miltonia flavescens* após 270 dias de cultivo em meio MS ½ com extrato (controle, 25, 50, 75 e 100%) de *Pereskia aculeata*.....27

Figura 3. Número de raízes (A) e comprimento do sistema radicular (B) de plantas de *Miltonia flavescens* após 270 dias de cultivo em meio MS ½ com extrato (0, 25, 50, 75 e 100%) de *Pereskia aculeata*.....27

Figura 4. Massa fresca (A) e número de brotos (B) de plantas de *Miltonia flavescens* após 270 dias de cultivo em meio MS ½ com extrato (0, 25, 50, 75 e 100%) de *Pereskia aculeata*.....29

Figura 5. Aspecto das plantas de *Miltonia flavescens* cultivadas em diferentes concentrações do extrato aquoso de ora-pro-nóbis após 120 dias de aclimatização..32

Figura 6. Plantas de *Miltonia flavescens* sobreviventes presas ao forófito.....33

ARTIGO II - AÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* (LINDL.) LINDL. (ORCHIDACEAE)

Figura 1. Cultivo com reguladores de crescimento. A = Frascos dos diferentes tratamentos; B = Plantas no início do cultivo.....42

Figura 2. Plantas aclimatizadas. A = detalhe das plantas e substrato; B = Bandejas cobertas com plástico no período inicial de aclimatização.....43

Figura 3. Efeito da interação dos reguladores de crescimento TDZ e AIB no número de folhas (A) e na altura da parte aérea (B) das plantas de *M. flavescens* submetidas às diferentes combinações destes reguladores in vitro.....45

Figura 4. Efeito da interação dos reguladores de crescimento TDZ e AIB no número de raízes (A) e no comprimento do sistema radicular (B) das plantas de <i>M. flavescens</i> submetidas às diferentes combinações destes reguladores <i>in vitro</i>	46
Figura 5. Efeito das diferentes concentrações dos reguladores de crescimento TDZ (A) e AIB (B) no número de brotos das plantas de <i>M. flavescens</i> cultivadas <i>in vitro</i>	47
Figura 6. Efeito das diferentes concentrações dos reguladores de crescimento TDZ (A) e AIB (B) na massa fresca das plantas de <i>M. flavescens</i> cultivadas <i>in vitro</i>	48
Figura 7. Aspecto das plantas de <i>Miltonia flavescens</i> cultivadas em diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e Thidiazuron (TDZ).....	50
Figura 8. Plantas tratadas com reguladores de crescimento e sobreviventes à aclimatização presas ao tronco do forófito.....	53
Figura 9. Fotomicrografias de raízes de <i>Miltonia flavescens</i> (Lindl.) Lindl., em secção transversal, sem adição de AIB (A0) (A, B e C) e com adição de AIB (A4) (D, E, F e G) em diferentes períodos (inicial, 30 dias e 60 dias). Co = córtex; Cv = cilindro vascular; Ra = raiz; Ve = velame.....	54
Figura 10. Fotomicrografias da lâmina foliar de <i>Miltonia flavescens</i> (Lindl.) Lindl., em secção transversal, sem adição de AIB (A0) (A e B) e com adição de AIB (A4) (B, C, D e E) em diferentes períodos (inicial, 30 dias e 60 dias). Es = estômato; Ff = feixe de fibra; Fv = feixe vascular; Pc = parênquima clorofiliano.....	55

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I - CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* (LINDL.) LINDL. COM EXTRATO DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* MILL.)

Tabela 1. Valores médios para as variáveis número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotos (NB), altura da parte aérea (APA), comprimento do sistema radicular (CSR) e massa fresca (MF) para plantas de *Miltonia flavescens* cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de extrato aquoso de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*), após 270 dias de cultivo.....26

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência de plantas de *Miltonia flavescens* provenientes de diferentes tratamentos com extratos de *Pereskia aculeata* durante a aclimatização.....30

Tabela 3. Relação dos tamanhos médios (taxa de crescimento) para as variáveis altura da parte aérea (APA) e comprimento do sistema radicular (CSR), a partir das médias das plantas para estas variáveis antes da aclimatização e após 120 dias de aclimatização em substrato do tipo musgo. A relação foi calculada e está expressa na tabela pela fórmula $R=(VF-VI)$31

ARTIGO II - AÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* (LINDL.) LINDL. (ORCHIDACEAE)

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência de plantas de *Miltonia flavescens* provenientes dos tratamentos sem a presença de TDZ e com 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ, em diferentes concentrações de AIB, durante a aclimatização.....5

RESUMO

ZANELLA, S. Extratos vegetais e reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* e aclimatização de *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae). 30 de abril de 2021. 59 folhas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Toledo, 2021.

Miltonia flavescens é uma espécie nativa da Mata Atlântica, bioma que sofre pressão constante do extrativismo, do desmatamento e da coleta predatória, tornando várias espécies de orquídeas ameaçadas de extinção. Ferramentas que possam auxiliar na propagação destas espécies, como a propagação *in vitro*, são de fundamental importância pois permitem o manuseio e a obtenção de uma grande quantidade de plantas em um espaço e período de tempo relativamente curto. Um dos fatores mais relevantes para o sucesso do cultivo é a composição do meio de cultura, ao qual podem ser acrescentados diversos compostos como os reguladores de crescimento ou extratos vegetais, que atuam otimizando o desenvolvimento das plantas cultivadas e fornecendo condições que podem refletir positivamente na sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho elaborar protocolos de multiplicação e desenvolvimento *in vitro* para *Miltonia flavescens* utilizando extrato vegetal de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) e substâncias reguladoras de crescimento (ácido indolbutírico e thidiazuron) a fim de otimizar o crescimento e aclimatização, visando possíveis programas de repovoamento. Com base nos resultados obtidos, os melhores tratamentos para o cultivo da espécie foram aqueles com a utilização do extrato aquoso de ora-pro-nóbis em concentrações de 25% e 50%. No caso dos reguladores de crescimento, o meio com 4 mg.L⁻¹ de AIB proporcionou maiores incrementos nas variáveis altura da parte aérea, comprimento do sistema radicular e número de raízes. A análise da anatomia radicular das amostras demonstrou que as plantas de *M. flavescens* possuem capacidade de aclimatização ao ambiente, apesar de os tratamentos com AIB (ácido indolbutírico) não demonstrarem maiores vantagens para a sobrevivência das plantas em detrimento ao tratamento controle.

Palavras-chave: Micropropagação, Orquídeas, Ecologia.

ABSTRACT

Miltonia flavescens is a native species of the Atlantic Forest, a biome that suffers constant pressure from extractivism, deforestation and predatory collection, making several species of orchids threatened with extinction. Tools that can help in the propagation of these species, such as *in vitro* propagation, are of fundamental importance because they allow the handling and obtaining of a large quantity of plants in a relatively short space and period of time. One of the most relevant factors for the success of the culture is the composition of the culture medium, to which several compounds can be added, such as growth regulators or plant extracts, which act optimizing the development of cultivated plants and providing conditions that can reflect positively on the survival of plants during acclimatization. Thus, the objective of this work was to elaborate *in vitro* multiplication and development protocols for *Miltonia flavescens* using plant extract of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) and growth regulators (Indolbutyric Acid and Thidiazuron) in order to optimize growth and acclimatization, aiming at possible repopulation programs. Based on the results obtained, the best treatments for the cultivation of the species were with the use of the

aqueous extract of ora-pro-nóbis in concentrations of 25% and 50%, and, in the case of growth regulators, with 4 mg.L⁻¹ of AIB that provided greater increments in the variables height of the aerial part, length of the root system and number of roots. The analysis of the root anatomy of the samples demonstrated that the plants of *M. flavescens* possess capacity of acclimatization to the environment, although the treatments with IBA did not demonstrate greater advantages for the survival of the plants in detriment of the control treatment.

Key-words: Micropropagation, Orchids, Ecology.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae é a mais diversa entre as Angiospermas, abrangendo aproximadamente 905 gêneros no mundo (WFO, 2020). O Brasil está entre os países com maior número de espécies de orquídeas, com cerca de 247 gêneros e 2.681 espécies, das quais 1.538 são endêmicas do país (BARROS et al., 2015).

As orquídeas são plantas herbáceas, perenes e de formas de vida diversificadas, sendo as epífitas as mais abundantes, representando mais de 70% das espécies (BARROS et al., 2015). Apresentam distribuição cosmopolita, ocupando praticamente todos os nichos dos mais variados ambientes em todo o mundo, embora sejam mais comuns e diversificadas em regiões tropicais e subtropicais (RODRIGUES, 2011). Grande parte das espécies de orquídea possui relevante importância econômica, seja devido ao valor ornamental, destacando-se como um dos principais produtos no mercado da floricultura, ou pelo valor aromatizante e culinário, como o exemplo da baunilha, retirada dos frutos da *Vanilla planifolia* (GANTAIT; KUNDU, 2017).

A maioria das orquídeas é epífita e esta forma de vida compreende as plantas que crescem germinando e se fixando sobre outras plantas, principalmente árvores, utilizando-as de suporte de forma não parasitária (KRÖMER; GARCÍA-FRANCO; TOLEDO-ACEVES, 2014). Desta forma, na natureza, as orquídeas epífitas são especialmente importantes, pois fazem parte de interações ecológicas complexas, atuando na manutenção da diversidade biológica dos ecossistemas fornecendo atrativos, recursos alimentares e ambiente adequado para reprodução e nidificação de pequenos animais, beneficiando outros seres vivos do ecossistema enquanto garantem sua polinização e dispersão de sementes (DUARTE, 2013; CESTARI, 2009).

As orquídeas, sobretudo epífitas, também são excelentes bioindicadores de qualidade ambiental, uma vez que, devido à sua dependência de outras plantas e das condições do microambiente em que se encontram, são sensíveis às alterações ambientais causadas principalmente por ações antrópicas e pelo desmatamento (KRÖMER; GARCÍA-FRANCO; TOLEDO-ACEVES, 2014). Além disso, considerando o ciclo de vida altamente especializado das orquídeas, sua sobrevivência depende de um ambiente equilibrado e diversificado em recursos e polinizadores.

No Brasil, as espécies de orquídeas possuem distribuição ampla, sendo o

bioma Mata Atlântica o domínio fitogeográfico responsável por abrigar a maior quantidade de espécies da família Orchidaceae (BARROS et al., 2015). No entanto, esse bioma é um dos mais ameaçados, sofrendo pressão constante do extrativismo, do desmatamento e da coleta predatória, de forma que hoje restam apenas cerca de 12,4% dos remanescentes da floresta original (BRASIL, 2019).

Todo esse processo levou à uma perda de biodiversidade por meio da extinção ou ameaça às espécies, dentre estas, muitas nativas da família Orchidaceae, particularmente sensíveis às alterações ambientais antrópicas. Aliado a esses fatores, a própria biologia das orquídeas é um agravante para sua dificuldade de propagação em ambientes naturais. Suas sementes têm tamanho reduzido e não possuem reserva energética (endosperma) (YEUNG, 2017). A sua germinação é lenta, seu ciclo de vida é altamente especializado, com longo período vegetativo e, na natureza, sua germinação e crescimento dependem da associação com fungos micorrízicos (SUZUKI et al., 2009).

O gênero *Miltonia* é nativo da Mata Atlântica e conta hoje com 20 espécies no Brasil, as quais em sua maioria habita regiões elevadas, de temperaturas amenas ou mais quentes (BARROS et al., 2015). Dentre estas espécies, encontra-se *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl., uma orquídea epífita, distribuída em maior abundância pelos estados das regiões Sul e Sudeste. As plantas desta espécie possuem crescimento simpodial, seus pseudobulbos são ovalados e achatados, suas folhas são longas, lanceoladas, com inflorescência basal apresentando de 6 a 12 flores (BARROS et al., 2015; LEMES, 2015). O florescimento ocorre entre os meses de setembro a novembro e suas pétalas e sépalas são de cor amarelo palha/bege e o labelo é branco, com manchas vermelho-púrpuras (BARROS et al., 2015; LEMES, 2015) (Figura 1).

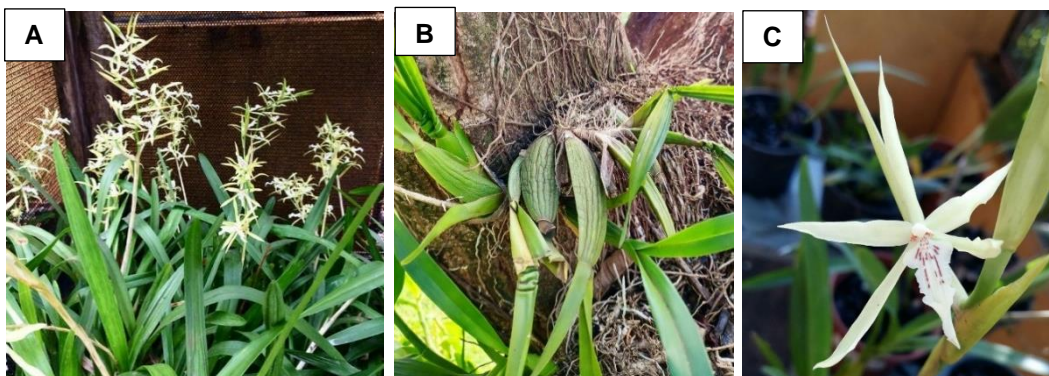


Figura 1. *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl. A e B = Aspecto morfológico da planta; C = Detalhe da flor.

De acordo com informações do Centro Nacional de Conservação da Flora

(2012), atualmente, a espécie encontra-se em um grau de ameaça de extinção menos preocupante. No entanto, espécies que habitam ambientes intensamente impactados e fragmentados encontram-se em constante ameaça, se fazendo cada vez mais necessários esforços para propagação e conservação destas espécies.

Sendo assim, ferramentas que possam auxiliar na propagação destas espécies são de fundamental importância. As técnicas de propagação *in vitro* apresentam vantagens relevantes, uma vez que permitem o manuseio e a obtenção de uma grande quantidade de plantas em um espaço e período de tempo relativamente curto. Com isso, apresentam um ótimo custo-benefício, permitindo a obtenção de material uniforme com alta taxa de germinação e crescimento, sem que as plantas necessitem manter relações simbióticas para garantir seu desenvolvimento (SOARES, 2018).

Um dos fatores mais relevantes para o sucesso do cultivo é a composição do meio de cultura ou meio nutritivo, que fornece os nutrientes necessários para o desenvolvimento vegetal. Os elementos tradicionalmente utilizados em um meio nutritivo são os macro e micronutrientes, que provêm os minerais essenciais para o desenvolvimento das plantas, a água, a sacarose, as vitaminas relacionadas à nutrição e ação enzimática, e o ágar, utilizado para a solidificação do meio de cultura e responsável para dar suporte às plantas (CID; TEIXEIRA, 2015).

Além da composição padrão, ao meio de cultura podem ser acrescentados diversos compostos como os reguladores de crescimento, que atuam como fitohormônios exógenos, a fim de otimizar o desenvolvimento ou ainda, priorizar o crescimento de algum órgão de interesse na espécie (DEEPA; ANJU; THOMAS, 2018). Dentre os reguladores mais utilizados encontram-se as auxinas e citocininas, a exemplo do ácido indol-3-butírico (AIB) e do Thidiazuron (TDZ). Ao AIB atribui-se o efeito de auxina, a qual é responsável por induzir crescimento da parte aérea e, principalmente, o enraizamento na planta. Já ao TDZ, atribui-se o efeito de citocinina, responsável sobretudo pela multiplicação celular na planta, resultando em um aumento de brotações nas plantas (CID; TEIXEIRA, 2015).

Além dos reguladores de crescimento, outros compostos podem ser incorporados ao meio de cultura como forma de potencializar o cultivo, a exemplo dos extratos vegetais, que podem constituir uma forma alternativa e menos onerosa à utilização dos reguladores de crescimento sintéticos (AMATUZZI et al., 2020).

Após o período de cultivo *in vitro*, outra fase crucial para o sucesso dos

protocolos de propagação é a aclimatização, que corresponde ao ajuste climático das plantas, por meio da transferência destas, de forma gradual, das condições *in vitro* para um novo ambiente *ex vitro* (SORACE, 2007; SILVA et al., 2017). Porém, uma das maiores adversidades nesta etapa é a dificuldade da transferência e frequente mortalidade das plantas, devido à grande diferença entre as condições ambientais dos meios *in vitro* e *ex vitro* (CHANDRA et al., 2010).

Nesse contexto, sabe-se que o fornecimento de condições adequadas durante o período de *in vitro* reflete positivamente na sobrevivência das plantas durante o período *ex vitro*, como por exemplo, plantas com uma maior quantidade de raízes podem ter maior sucesso na aclimatização. Outro aspecto importante é a passagem gradual das plantas para as condições *ex vitro*, o que pode contribuir para maiores chances de sobrevivência neste período e reintrodução em ambientes naturais (CHANDRA et al., 2010). Quando plantas cultivadas *in vitro* são transferidas para o ambiente *ex vitro*, ocorrem modificações fisiológicas, morfológicas e também anatômicas que permitem o crescimento e a sobrevivência no novo ambiente, sendo provavelmente a capacidade de reversão das características anatômicas, um dos fatores responsáveis pela obtenção de uma alta taxa de sobrevivência das mudas durante a aclimatização (MAYER et al., 2008).

Considerando a importância ecológica de *Miltonia flavescens*, associada à sua vulnerabilidade em ambiente natural, enfatiza-se a necessidade de estudos que visem à propagação e conservação dessa espécie. A utilização do cultivo *in vitro* de *Miltonia flavescens*, otimizado pela utilização de reguladores de crescimento e extratos vegetais e a posterior aclimatização adequada das mudas, constitui-se como um método potencial de multiplicação e desenvolvimento da espécie, em vista da necessidade da obtenção de uma grande quantidade de plantas para possíveis protocolos de repovoamento desta espécie nativa e ameaçada. Portanto, sob o ponto de vista preservacionista, a utilização de diferentes técnicas de micropropagação é importante para o cultivo da espécie, representando assim, uma alternativa eficaz para a diminuição do risco de extinção (SUZUKI et al., 2009).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho elaborar protocolos de multiplicação e desenvolvimento *in vitro* para *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl., buscando a otimização do crescimento, por meio de extratos vegetais, de substâncias reguladoras de crescimento e da aclimatização, visando possíveis programas de repovoamento.

REFERÊNCIAS

- AMATUZZI, J. C. de. A.; VIEIRA, L. do. N.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; NOSEDA, M. D.; FRAGA, H. P. de. F. Improved *in vitro* development of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) by using aqueous extract of the seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracóvia, v. 42, n. 136, p. 1-9, 2020.
- BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAFA, C. N.; PESSOA, E. N.; FORSTER, W.; MENINI, N. F.; FURTADO, S. G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C. O.; GUIMARÃES, L. R. S. 2015. **Orchidaceae in:** Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 04 jun. 2020.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE. **SOS Mata Atlântica e INPE lançam novos dados do Atlas do bioma**. 2019. Disponível em: <http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=5115>. Acesso em: 06 jun. 2020.
- CESTARI, C. Epiphyte plants use by birds in Brazil. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.13, n. 4, p. 689-712, 2009.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 4. ed. Brasília: Embrapa, p. 7-23, 2015.
- CNCFlora. **Miltonia flavescens** in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Miltonia flavescens](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Miltonia_flavescens)>. Acesso em 23 junho 2020.
- DEEPA, A. V.; ANJU, M.; THOMAS D. T. The Applications of TDZ in medicinal plant tissue culture. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. (Eds.). **Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator**. Singapore: Springer Nature, 297-316, 2018.
- DUARTE, M. M. **Transplante de epífitas entre Florestas Estacionais Semidecíduais para enriquecimento de florestas em processo de restauração**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais – Conservação de Ecossistemas Florestais - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- GANTAIT, S.; KUNDU, S. In vitro biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 9, p. 1-19, 2017.
- KRÖMER, T.; GARCÍA-FRANCO, J. G. Y; TOLEDO-ACEVES, T. Epífitas vasculares como bioindicadores de la calidad forestal: impacto antrópico sobre su diversidad y

composición. In: GONZÁLEZ-ZUARTH, C. A.; VALLARINO, A.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J. C.; LOW-PFENG, A. M. (Eds.). **Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental**. Campeche: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático/ El Colegio de la Frontera Sur, p. 606–623. 2014.

LEMES, C. S. R. **Germinação, desenvolvimento e aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl. (Orchidaceae)**. 2015. 66 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015.

MAYER, J. L. S.; RIBAS, L. L. F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium Hort.* (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 323-332, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000200003>.

RODRIGUES, V. T. **Ochidaceae Juss.** Aspectos morfológicos e taxômicos. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 2011. 19p.

SILVA, J. A. T. da.; HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; SONGJUN, Z. Acclimatization of *in vitro* - derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 110-124, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>

SOARES, J. S. **Técnicas de cultivo *in vitro* como alternativa para a conservação de *Schomburgkia crispa* Lindl. (Orchidaceae) e sua reintrodução em ambiente natural**. 2018. 101 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, 2018.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; YAMAMOTO, L. Y.; SCHNITZER, J. A.; TAKAHASHI, L. S. A. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 195-200, 2007.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. M. de. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 657-666, 2009.

WFO (2020): **Orchidaceae Juss.** Published on the Internet. Disponível em: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-7000000429>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

YEUNG, E.C. A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies**, Taiwan, v. 58, n. 33, p. 1-14, 2017.

ARTIGO I

Preparado de acordo com as normas da revista "Research, Society and Development"

CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* (LINDL.) LINDL. (Orchidaceae) COM EXTRATO VEGETAL DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* MILL.)

***IN VITRO* CULTIVATION AND ACLIMATIZATION OF *Miltonia flavescens* (LINDL.) LINDL. WITH ORA-PRO-NÓBIS EXTRACT (*Pereskia aculeata* MILL.)**

CULTIVO *IN VITRO* Y ACLIMATIZACIÓN DE *Miltonia flavescens* (LINDL.) LINDL. CON EXTRACTO DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* MILL.)

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de concentrações de extrato aquoso de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) no crescimento *in vitro*, sobrevivência e aclimatização da orquídea *Miltonia flavescens*. O extrato bruto foi obtido através da infusão de 10g de folhas secas fracionadas em 100mL de água destilada. Os tratamentos consistiram do extrato bruto (100%) e diluído a 75%, 50%, 25% e 0% e acrescido ao meio de cultura MS ½ onde plântulas de *M. flavescens* germinadas *in vitro* foram cultivadas. Após 270 dias de cultivo, dados de crescimento foram coletados e as plantas aclimatizadas em substrato do tipo musgo. A cada 30 dias avaliou-se a taxa de sobrevivência e aos 120 dias o crescimento da parte aérea e sistema radicular. Para o número de folhas, o tratamento com 100% de extrato apresentou o maior valor médio, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Para o comprimento do sistema radicular e massa fresca, as maiores médias ocorreram no controle e com 100% de extrato. Para o número de raízes e número de brotos, não houve diferença entre os tratamentos. Após 120 dias de aclimatização, as plantas provenientes do tratamento com a maior concentração de extrato apresentaram a menor taxa de sobrevivência e as plantas oriundas dos tratamentos com 25% e 50%, apresentaram maior incremento na parte aérea e raízes, demonstrando que estes tratamentos podem ser benéficos a longo prazo para o cultivo da espécie.

Palavras-chave: Orchidaceae, micropropagação, meios de cultivo, atividade bioestimulante.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of preference of aqueous extract of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) On *in vitro* growth, areas and acclimatization of *Miltonia flavescens*. The crude extract was added by infusing 10g of dry leaves fractionated in 100mL of distilled water. The treatments consisted of the crude extract (100%) and diluted at 75, 50 and 25% added to the culture medium MS ½ (the absence of extract was the control) where seedlings germinated *in vitro* were cultivated. After 270 days of cultivation, growth data were collected and the plants acclimated to a moss-like substrate. The survival rate was evaluated every 30 days and the growth of the aerial part and root system at 120 days. For the number of leaves, the treatment with 100% of extract presented the highest average value, differing statistically from the other treatments. For the length of the root system and fresh weight, the highest averages occurred without control and with 100% of extract. For the number of roots and number of shoots, there was no difference between treatments. After 120 days of acclimatization, as plants from treatment with the highest concentration of mineral extract at

the lowest rate of areas and as plants from treatments with 25 and 50%, greater increase in the aerial part and roots, demonstrating that these treatments can be beneficial term for the cultivation of the species.

Keywords: Orchidaceae, micropropagation, culture media, biostimulant activity

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de preferencia del extracto acuoso de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) Sobre el crecimiento in vitro, áreas y aclimatación de *Miltonia flavescens*. El extracto crudo se añadió infundiendo 10 g de hojas secas fraccionadas en 100 ml de agua destilada. Los tratamientos consistieron en el extracto crudo (100%) y diluido al 75, 50 y 25% agregado al medio de cultivo MS ½ (la ausencia de extracto fue el control) donde se cultivaron plántulas germinadas in vitro. Después de 270 días de cultivo, se recopilaron datos de crecimiento y las plantas se aclimataron a un sustrato similar al musgo. Se evaluó la tasa de supervivencia cada 30 días y el crecimiento de la parte aérea y sistema radicular a los 120 días. Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de separación de medias. Para el número de hojas, el tratamiento con 100% de extracto presentó el valor promedio más alto, difiriendo estadísticamente de los demás tratamientos. Para la longitud del sistema radicular y el peso fresco, los promedios más altos se presentaron sin control y con 100% de extracto. Para el número de raíces y número de brotes, no hubo diferencia entre tratamientos. Después de 120 días de aclimatación, como plantas de tratamiento con mayor concentración de extracto mineral en la menor tasa de áreas y como plantas de tratamientos con 25 y 50%, mayor incremento en la parte aérea y raíces, demostrando que estos tratamientos pueden ser beneficiosos. término para el cultivo de la especie.

Palabras clave: Orchidaceae, micropropagación, medios de cultivo, actividad bioestimulante.

1. Introdução

A família Orchidaceae é uma das famílias mais diversas em número de espécies e de grande importância econômica e ecológica. A dinâmica e manutenção do equilíbrio de um ecossistema é altamente dependente de várias formas de vida e as orquídeas desempenham funções ecológicas fundamentais, relacionadas sobretudo à polinização e, com ela, manutenção de cadeias ecológicas complexas (Duarte & Gandolfi, 2013).

Contudo, muitas espécies de orquídeas hoje encontram-se ameaçadas devido ao desmatamento e coleta predatória em seus habitats naturais, tornando indispensável a utilização de ferramentas capazes de mitigar este problema. Uma dessas ferramentas é o cultivo *in vitro*, que representa uma alternativa eficaz, uma vez que permite um elevado percentual de germinação em curto período de tempo, contribuindo assim para a conservação de espécies nativas ou ameaçadas (Juras et al., 2019).

Miltonia flavescens (Lindl.) Lindl. é uma espécie de orquídea nativa da Mata Atlântica, encontrada sobretudo nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, e encontra-se ameaçada devido à fragmentação do seu habitat e coleta predatória. Sendo assim, faz-se necessária a utilização de formas de produção alternativas como as técnicas de propagação *in vitro*, que permitam a produção de plantas em larga escala, garantindo sua conservação e reintrodução em ambiente

natural (Lemes et al., 2020).

No processo de cultivo *in vitro*, utiliza-se um meio de cultura no qual a planta encontra os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, além de um suporte para fixação (Faria et al., 2012). O meio de cultura pode ser acrescido de substâncias que visam otimizar o crescimento vegetal, a exemplo dos extratos vegetais.

Os extratos vegetais agem como bioestimulantes e são obtidos a partir de materiais naturais e vários estudos têm relatado o efeito dessas substâncias no desenvolvimento vegetal (Yakhin et al., 2017; Amatuzzi et al., 2020). Além de enriquecer o meio de cultura com vitaminas, minerais e outras moléculas, o uso de extratos vegetais pode ser uma ferramenta de grande valor no âmbito da micropropagação, pois representa uma alternativa natural ao uso de reguladores de crescimento, enriquecendo os meios de cultivo e, ao mesmo tempo, tornando-os mais baratos (Amatuzzi et al., 2020) o que pode levar a diminuição nos custos de produção.

Há relatos do efeito bioestimulante da suplementação do meio de cultivo com extratos vegetais, com resultados benéficos na germinação e crescimento *in vitro* (Setiari et al., 2016) na sobrevivência de plantas (Amatuzzi et al., 2020) e na formação de brotos e folhas durante a aclimatização de orquídeas (Charoenwattana & Petprapai, 2013).

A ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) é uma planta da família Cactaceae encontrada em grande parte do território brasileiro. É uma espécie perene, de porte arbustivo e o único gênero na família que produz folhas verdadeiras. Possui ramos longos, e os caules mais velhos são dotados de eminentes espinhos enquanto os ramos mais novos possuem acúleos (Madeira et al., 2016).

A planta tem se tornado popular nos últimos anos principalmente devido ao valor nutricional bastante relevante, com elevado teor de proteínas. Além disso, apresenta quantidades consideráveis de minerais como potássio, magnésio, zinco e, especialmente, cálcio e ferro (Madeira et al., 2016), além de compostos antioxidantes (Sousa et al., 2014) que, no entanto, podem diminuir com a cocção das folhas (Souza et al., 2021).

Tendo em vista a sua composição, os extratos aquosos obtidos de folhas de ora-pro-nóbis podem influenciar positivamente o crescimento de outras plantas. Contudo, não há relatos da sua utilização no cultivo *in vitro* de orquídeas. Trabalhos com extrato de folhas de ora-pro-nóbis foram desenvolvidos por Silva et al. (2017) e Ceretta (2018) e testados com plantas de alface. O extrato etanólico não afetou a germinação das sementes nem o índice mitótico (Silva et al., 2017) e o extrato aquoso (5%) obtido por decocção e borrifado sobre as mudas apresentou efeito benéfico na formação da parte aérea e sistema radicular em ensaios realizados em casa de vegetação (Ceretta, 2018).

O período posterior ao cultivo *in vitro*, no qual as plantas passam para o ambiente *ex vitro*, ou seja, a aclimatização, é uma das etapas mais importantes e críticas no sucesso do protocolo de propagação. Dessa forma, resultados positivos na aclimatização dependem do ajuste ambiental das plantas que, antes de serem introduzidas definitivamente no ambiente *ex vitro*, devem ser aclimatizadas de forma gradual para que suportem as alterações e sejam capazes de sobreviver em condições naturais (Alves, 2018).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) no crescimento *in vitro*, na taxa de sobrevivência e aclimatização de *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl., visando possíveis programas futuros de reintrodução em ambiente natural.

2. Metodologia

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Anatomia e Morfologia Vegetal e de Micologia Aplicada e Plantas Mediciniais, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Palotina, PR, durante o período de agosto de 2019 a junho de 2020.

2.1 Obtenção das plântulas de *Miltonia flavescens*

As plântulas de *Miltonia flavescens* utilizadas no experimento foram obtidas de sementes provenientes de polinização cruzada e oriundas de germinação *in vitro*, com aproximadamente seis meses, 0,5 cm de comprimento e média de três folhas e uma raiz. A germinação e o cultivo inicial dessas plântulas ocorreram em meio de cultura basal MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da concentração de macronutrientes e micronutrientes (MS ½) acrescido de sacarose (30 g.L⁻¹) (Murashige & Skoog, 1962) e solidificado com ágar bacteriológico Dinamica® (7 g.L⁻¹). As plantas foram cultivadas em sala de crescimento a 24°C e 16 horas de fotoperíodo com intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹.

2.2 Obtenção do extrato aquoso de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*)

O extrato aquoso de ora-pro-nóbis foi obtido a partir de folhas de plantas cultivadas no Horto de Plantas Mediciniais e Aromáticas da UFPR - Setor Palotina, coletadas no mês de julho de 2019. Após a coleta, as folhas foram lavadas com água corrente e posteriormente com água destilada e submetidas a secagem em estufa com circulação de ar forçado a 45°C durante seis dias.

O extrato aquoso bruto foi obtido através da infusão das folhas (água fervente sobre as folhas fragmentadas em pequenas porções com abafamento por 15 minutos) na concentração

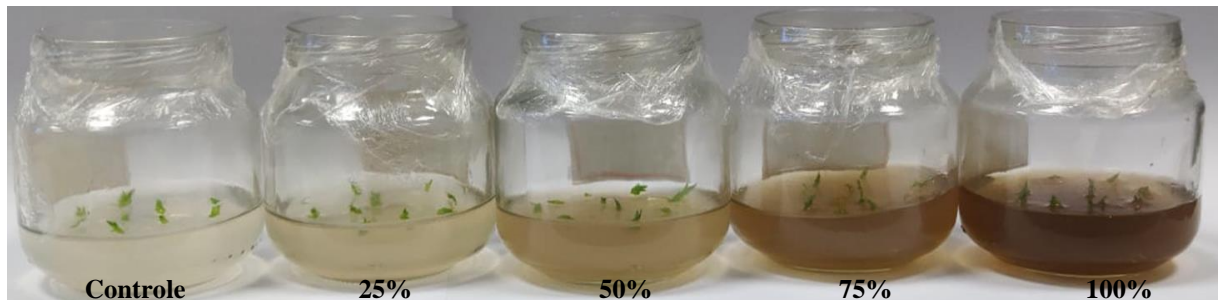
de 10 g de massa seca em 100 mL de água destilada. O extrato foi filtrado com papel filtro, desprezando os detritos e reservando a parte líquida. A partir do extrato bruto obtido (100%) foram feitas diluições com água destilada nas proporções de 75%, 50% e 25% (adaptado de Ceretta, 2018 e Amatuzzi, 2018).

2.3 Tratamentos e condições de cultivo

Os tratamentos consistiram do extrato bruto (100%) e diluído a 75%, 50% e 25% acrescido ao meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, sendo a ausência do extrato considerada o controle. O meio de cultura foi acrescido de sacarose (30 g L⁻¹), com pH ajustado para 5,8 após a adição do extrato aquoso e solidificado com ágar bacteriológico Dinamica® (7 g.L⁻¹), sendo distribuídos 30 mL para cada frasco de vidro. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

As plantas de *M. flavescens* foram distribuídas nos frascos (Figura 1) em câmara de fluxo laminar. O delineamento foi inteiramente casualizado e a unidade experimental consistiu em um vidro com dez plantas e sete repetições. O cultivo ocorreu em sala de crescimento com temperatura média de 24 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 40 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

Figura 1. Frascos com meio de cultura contendo plantas de *Miltonia flavescens* nos diferentes tratamentos com extrato aquoso de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*).



Fonte: Autores.

A cada 90 dias foi realizado um subcultivo e após 270 dias, os dados das variáveis de crescimento de todas as plantas presentes nas unidades experimentais foram coletados e analisados. Foram avaliadas as variáveis: número de folhas, raízes e brotos, altura da parte aérea e comprimento do sistema radicular (cm) (utilizando régua) e massa fresca (g) (com auxílio de balança analítica).

2.4 Aclimatização

O acompanhamento da aclimatização de *M. flavescens* ocorreu no município de Toledo, PR nas coordenadas 28° 05' 56" S e 48° 40' 30" O, em área interna, iluminada com luz natural

e ao abrigo do sol, em temperatura ambiente, durante o período de junho a outubro de 2020. As plantas com aproximadamente 3 cm de altura cultivadas *in vitro* foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para retirada do meio de cultura aderido às raízes e avaliadas quanto à altura da parte aérea e comprimento do sistema radicular para posterior comparação dos valores iniciais e finais para cada variável.

Vinte e quatro plantas de cada tratamento *in vitro* com extrato de ora-pro-nóbis (controle, 25%, 50%, 75% e 100%) foram dispostas em bandejas de poliestireno providas de furos para drenagem na base, sendo uma planta por unidade da bandeja (12,25 cm² e altura de 5,5 cm), preenchidas com substrato do tipo musgo e cobertas com plástico transparente para manutenção da umidade recebendo irrigação com pulverizador manual uma vez ao dia, até as plantas e o substrato se apresentarem completamente úmidos.

Após 15 dias da instalação do experimento, as plantas passaram a receber, com auxílio de pulverizador manual, adubação foliar de 1,0 mL.L⁻¹ de NPK 10-10-10, acrescido dos seguintes micronutrientes: 0,1% de ferro, 0,1% de zinco, 0,1% de cobre, 0,3% de enxofre e 0,5% de manganês. Ao completar 30 dias, retirou-se o plástico de cobertura.

A cada 30 dias avaliou-se o percentual de sobrevivência das plantas e após um período de 120 dias as plantas foram retiradas do substrato e avaliadas quanto à altura da parte aérea e o comprimento do sistema radicular. Para tanto, calculou-se a diferença entre os valores finais e iniciais de cada variável utilizando a expressão $R=(VF-VI)$, sendo VF o valor da variável após a aclimatização e VI o valor da variável antes da aclimatização. As plantas sobreviventes que estavam em boas condições foram transferidas para um forófito presas ao tronco.

2.5 Análises estatísticas

Os dados do cultivo *in vitro* com as diferentes concentrações de extrato e da aclimatização foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de separação de médias (Skott-Knott) a 5% de significância, com posterior análise de regressão, utilizando ambiente R, na interface RStudio, versão 4.0.2.

3. Resultados e discussão

3.1 Efeito do extrato no crescimento

Após 270 dias de cultivo das plantas de *M. flavescens*, observou-se que o maior incremento no número de folhas ocorreu no tratamento com a maior concentração do extrato (100%), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Para a altura da parte aérea, a maior

média foi obtida no tratamento controle (ausência de extrato), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 1).

Por outro lado, para as variáveis comprimento do sistema radicular e massa fresca, as maiores médias ocorreram na ausência e com 100% de extrato, diferindo das demais concentrações (Tabela 1). Para as variáveis número de raízes e número de brotos, não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos com diferentes concentrações do extrato.

Tabela 1. Valores médios para as variáveis número de folhas (NF), altura da parte aérea (APA), comprimento do sistema radicular (CSR) e massa fresca (MF) para plantas de *Miltonia flavescens* cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de extrato aquoso de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*), após 270 dias de cultivo.

Extrato (%)	Variáveis			
	NF	APA (cm)	CSR (cm)	MF (g)
Controle	7,6 b	3,2 a	2,4 a	95,4 a
25	6,4 c	2,2 b	1,8 b	57,0 b
50	6,9 c	1,9 b	1,6 b	57,6 b
75	7,4 b	2,2 b	1,8 b	60,0 b
100	8,2 a	2,5 b	2,2 a	86,7 a
CV (%)	5,31	16,78	12,13	22,45

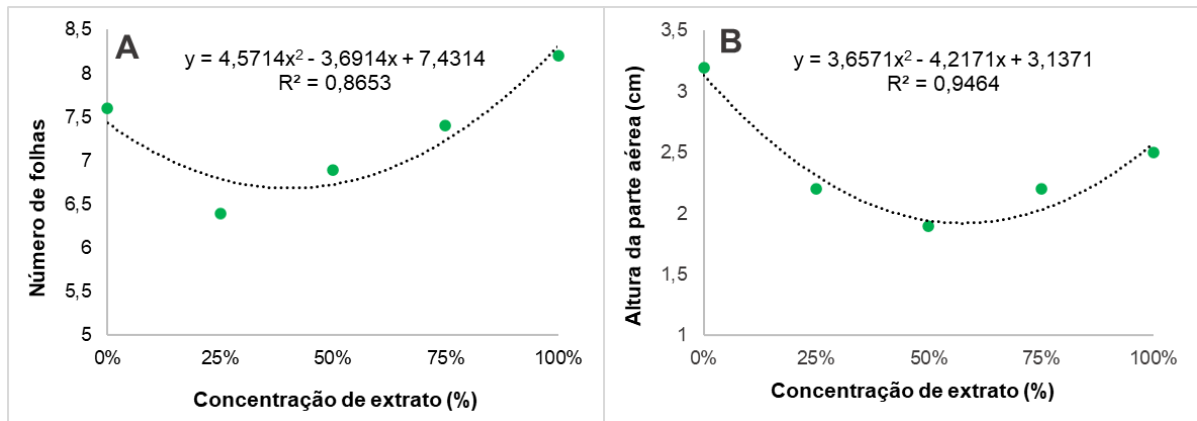
* Médias seguidas de letras distintas nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Fonte: Autores.

Para o número de folhas, maiores incrementos (8,2) foram obtidos no tratamento com a maior concentração do extrato (100%), sendo que, a partir da concentração de 25%, à medida em que foi aumentada a concentração do extrato no meio de cultura, houve também um gradual aumento no número de folhas (Figura 2A). Em relação à altura da parte aérea (Figura 2B), as plantas apresentaram a maior média (3,2 cm) no tratamento controle. A adição de 25% e 50% de extrato no meio de cultura ocasionou a diminuição da altura das plantas e do comprimento das raízes. No entanto, a partir da concentração 75% pode-se notar novamente um aumento nas médias das variáveis.

As folhas estão diretamente relacionadas à atividade fotossintética nas plantas (Furlani, 2004) e, dessa forma, um incremento no número de folhas pode contribuir para o seu desenvolvimento *in vitro* (Amatuzzi et al., 2020) e sua sobrevivência no período *ex vitro*. No trabalho de Oliveira et al. (2013), no qual avaliou-se a composição mineral de folhas de ora-pro-nóbis, foram observados altos níveis de fósforo, zinco e magnésio. O magnésio exerce função estrutural, localizado no centro da molécula de clorofila, sendo encontrado em abundância nas folhas (Furlani, 2004) e podendo assim estar relacionado ao incremento de folhas com o aumento das concentrações do extrato no meio de cultura.

Figura 2. Número médio de folhas (A) e altura da parte aérea (B) de plantas de *Miltonia flavescens* após 270 dias de cultivo em meio MS ½ com extrato (controle, 25, 50, 75 e 100%) de *Pereskia aculeata*.

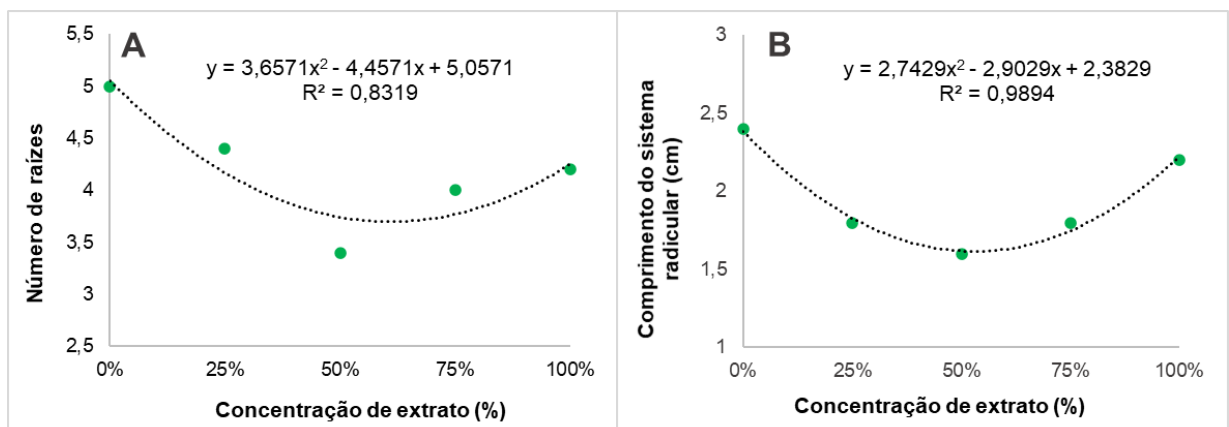


Fonte: Autores.

Charoenwattana e Petprapai (2013) avaliando os efeitos da utilização do extrato etanólico das folhas de *Lotus* combinado com quitosana, no cultivo *in vitro* de híbridos de *Dendrobium* (Orchidaceae), obtiveram resultados positivos com incremento no número de folhas das plantas cultivadas após quatro semanas na presença do extrato vegetal, diferindo significativamente do tratamento controle, de forma semelhante aos resultados encontrados no presente estudo.

Com relação ao número de raízes (Figura 3A), a presença do extrato em diferentes concentrações não levou a um aumento significativo na sua formação em nenhum dos tratamentos. Porém, a maior média para o número de raízes (5,0) foi obtido no tratamento controle sem a presença do extrato. Quanto ao comprimento do sistema radicular (Figura 3B), a maior média (2,4 cm) nas plantas foi obtida no tratamento controle. Novamente, a adição de 25 e 50% de extrato no meio de cultura ocasionou a diminuição da altura das plantas e do comprimento das raízes. No entanto, a partir da concentração 75% pode-se notar um aumento nas médias das variáveis.

Figura 3. Número de raízes (A) e comprimento do sistema radicular (B) de plantas de *Miltonia flavescens* após 270 dias de cultivo em meio MS ½ com extrato (0, 25, 50, 75 e 100%) de *Pereskia aculeata*.



Fonte: Autores.

Resultado semelhante aos encontrado neste estudo foi obtido no trabalho de Ribeiro (2005), com cultivo de orquídeas do gênero *Cattleya* em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de boro e zinco. O autor justifica este resultado à um provável desbalanço nutricional causado pelos nutrientes no meio de cultura à medida em que se aumentava a concentração dos minerais, principalmente do zinco. Sabe-se que plantas de ora-pro-nóbis possuem em suas folhas elevadas quantidades de minerais como ferro, zinco, magnésio, boro, entre outros (Takeiti et al., 2009; Madeira et al., 2016), o que pode ter causado tal desbalanço, gerando o resultado observado.

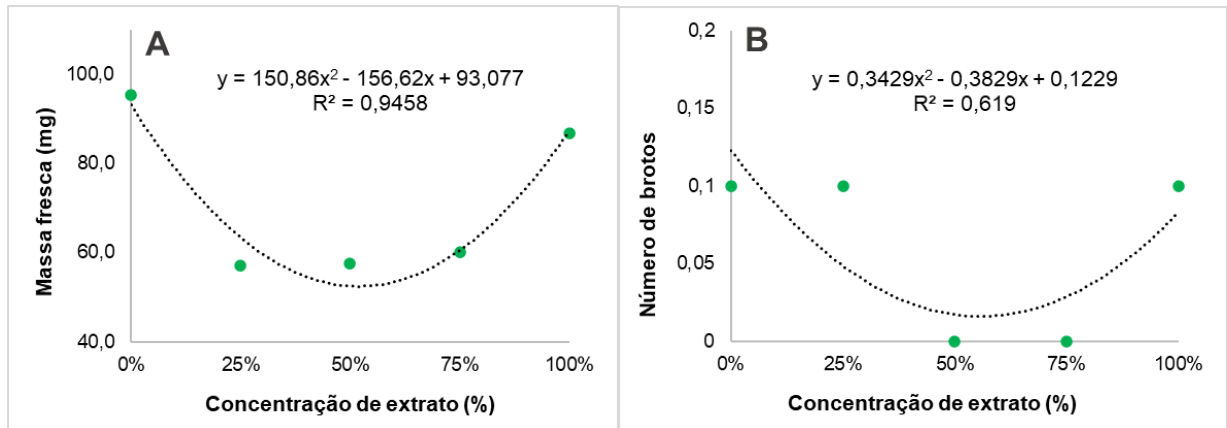
Amatuzzi (2018), com cultivo *in vitro* de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae), demonstrou que a adição do extrato da alga *Ulva fasciata* ao meio de cultura exerceu um efeito deletério, inibindo o desenvolvimento das plantas, de modo que nas maiores concentrações de extrato as plantas apresentaram tamanhos menores, de forma inversamente proporcional. Da mesma maneira, o aumento da concentração do extrato no meio de cultura provocou diminuição no desenvolvimento da raiz. Tais dados corroboram com os encontrados no presente estudo, onde o controle foi o mais eficaz no crescimento de parte aérea e raízes, apesar de um acréscimo voltar a ser observado na maior concentração do extrato.

De modo semelhante, o resultado obtido em relação à massa fresca das plantas (Figura 4A) demonstra uma perda drástica da massa nos tratamentos com 25%, 50% e 75%, em relação ao controle, onde foi obtida a maior média para a massa (95,4 g), seguido do incremento na massa no tratamento com a maior concentração de extrato (100%). Resultados similares foram descritos no trabalho de Amatuzzi et al. (2020), onde as plântulas de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae), submetidas a tratamentos com maiores concentrações de extrato de algas (100 mg.L⁻¹), apresentaram uma massa fresca inferior à média da massa obtida para a mesma variável no controle, ou seja, na ausência do extrato.

Quanto ao aumento da massa no tratamento com a maior concentração do extrato, novamente, esta tendência pode indicar que na concentração de 100%, possivelmente os elementos minerais presentes no extrato vegetal de *P. aculeata* interagem com os macro e micronutrientes já presentes no meio de cultura, influenciando no incremento de massa das plantas cultivadas em altas concentrações de extrato.

No caso da variável número de brotos (Figura 4B), observou-se um pequeno incremento próximo a maior concentração de extrato (0,1), porém não houve diferença significativa em relação aos demais tratamentos. Além disso, esta variável apresentou valores de média muito reduzidos, uma vez que praticamente não houve formação de brotações nas plantas.

Figura 4. Massa fresca (A) e número de brotos (B) de plantas de *Miltonia flavescens* após 270 dias de cultivo em meio MS ½ com extrato (0, 25, 50, 75 e 100%) de *Pereskia aculeata*.



Fonte: Autores.

Estudos com cultivo *in vitro* de orquídeas utilizando outros extratos de origem vegetal, como por exemplo a água de coco, revelaram um efeito eficiente desse extrato na promoção do crescimento *in vitro*, por conter quantidades consideráveis de mio-inositol, citocininas, nucleotídeos e outros compostos orgânicos (Silva et al., 2016), os quais agem diretamente no desenvolvimento de plantas *in vitro*. No entanto, as folhas de ora-pro-nóbis são compostas sobretudo de elementos minerais, principalmente cálcio, ferro, potássio, magnésio, zinco, fósforo, boro e manganês, além de um alto teor de proteínas (Oliveira et al., 2013; Takeiti et al., 2009). Estas substâncias podem ser benéficas para a suplementação do meio, mas, diferentemente do que acontece com a água de coco, são incapazes de produzir morfogênese por si só sem a presença de fitorreguladores, semelhante ao descrito no trabalho de Franco e Echart-Almeida (1998), utilizando extrato de batata.

3.2 Aclimatização

Após 30 dias de aclimatização, as plantas provenientes de todos os tratamentos apresentaram 100% de sobrevivência (Tabela 2), demonstrando que a manutenção das plantas em um ambiente provido de cobertura para preservar a umidade durante o primeiro mês de aclimatização, um dos mais críticos, foi vantajosa para o período inicial. Além disso, altas taxas de sobrevivência indicam que o cultivo com extrato de *P. aculeata* não possui efeito deletério nas plantas durante o período de aclimatização inicial (30 dias).

Elevados percentuais de sobrevivência também foram obtidos aos 60 e 90 dias de aclimatização, com exceção daquelas cultivadas com 100% de extrato após 90 dias de aclimatização, as quais apresentaram uma queda no percentual de sobrevivência, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 2). Estas plantas (cultivadas com 100% de

extrato) foram as que apresentaram na fase de cultivo *in vitro* um maior número de folhas. As folhas, no vegetal, são os órgãos por meio dos quais ocorre o processo de transpiração da planta (Taiz et al., 2017), por isso, uma hipótese a ser considerada é o fato de que um maior número de folhas nas plantas submetidas a este tratamento, ocasionou um consequente aumento na taxa de transpiração, contribuindo para um maior estresse hídrico nestas plantas.

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência de plantas de *Miltonia flavescens* provenientes de diferentes tratamentos com extratos de *Pereskia aculeata* durante a aclimatização.

Extrato (%)	Sobrevivência (%)			
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Controle	100 a	96 a	92 a	54 a
25	100 a	100 a	100 a	25 a
50	100 a	100 a	87 a	29 a
75	100 a	96 a	96 a	54 a
100	100 a	96 a	58 b	20 a
CV (%)	0	6,63	11,66	66,34

* Médias seguidas de letras distintas nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.
Fonte: Autores.

No estudo de Dorneles e Trevelin (2011), plantas de orquídea da espécie *Cattleya intermedia* Lindl. aclimatizadas pelo período de 90 dias tendo como substrato o esfagno, apresentaram 53% de sobrevivência. Para as espécies *Sophranitis cernua* Lindl. e *Brassavola flagellaris* Barb. Rodr. aclimatizadas e cultivadas em substrato composto por mistura de fibra de coco e esfagno, as porcentagens de sobrevivência foram entre 60 e 80% aos 30 dias e, aos 120 dias, entre 30 e 50% (Ichinose, 2012), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Posteriormente, após 120 dias de aclimatização, as plantas, de maneira geral, apresentaram uma diminuição da sobrevivência, o que pode ser atribuído a elevação da temperatura do ambiente e diminuição da umidade do ar neste período, uma vez que as plantas não foram cultivadas em ambiente com temperatura controlada. Para plântulas da mesma espécie do presente estudo Stefanello, et al. (2009), encontraram resultados semelhantes após 60 dias da aclimatização quando se observou uma queda acentuada na taxa de sobrevivência, registrando sobrevivência entre 5 e 30% após 90 dias de aclimatização das plantas cultivadas em diferentes substratos.

A queda acentuada na taxa de sobrevivência das plantas após 30 e 60 dias pode ser atribuída à retirada do plástico de cobertura das bandejas (Stefanello et al., 2009), aliado a um estresse hídrico nas plantas pela baixa umidade relativa do ar. Colombo et al. (2005), evidenciaram que a forma de irrigação neste período também influencia na sobrevivência,

descrevendo uma baixa taxa de sobrevivência de plântulas do híbrido *Cattleya guttata* Lindl, x *Laelia tenebrosa* Lindl. (Orchidaceae) submetidas a irrigação manual, sendo o ideal, segundo os autores, um sistema automático que forneça irrigação intermitente, homogênea e constante.

Lemes (2015) ao estudar a aclimatização de *M. flavescens* em substrato composto por esfagno e fibra de coco, avaliou os efeitos da aclimatização intermediária das plantas, obtendo resultados positivos e com elevada taxa de sobrevivência em plantas submetidas a pré-aclimatização por 30 dias, em sala de crescimento, com temperatura, fotoperíodo e radiação controladas e homogêneas, validando o fato de que a manutenção das plantas em local sem grandes variações nas condições ambientais é um fator determinante para o sucesso da aclimatização.

Altas taxas de mortalidade no período *ex vitro* podem ser explicadas pelas inúmeras alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas que as plantas sofrem quando são retiradas no ambiente *in vitro*, onde apresentam, tamanho e área foliar reduzidos, estômatos não funcionais, entre outros fatores (Bandeira et al., 2007), que podem influenciar diretamente na capacidade das plantas de sobreviver a condições adversas ou de estresse ambiental e hídrico.

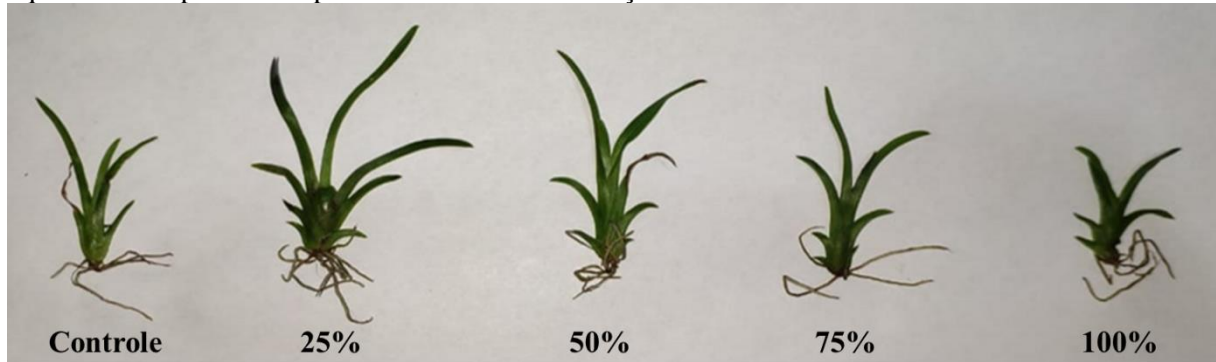
A taxa de crescimento, obtida da relação entre o tamanho final e inicial das plantas durante o período de aclimatização registrado está expressa na Tabela 3. Apesar de uma taxa considerável de mortalidade das plantas, principalmente após os 90 dias, as plantas que sobreviveram apresentaram incremento na formação de parte aérea e sistema radicular (Figura 5). As plantas que foram cultivadas *in vitro* com 50% e 25% do extrato suplementado ao meio de cultivo, foram as que apresentaram maior crescimento, com 1,3 e 1,1 cm de acréscimo na parte aérea e 0,7 cm no comprimento do sistema radicular, respectivamente.

Tabela 3. Relação dos tamanhos médios (taxa de crescimento) para as variáveis altura da parte aérea (APA) e comprimento do sistema radicular (CSR), a partir das médias das plantas para estas variáveis antes da aclimatização e após 120 dias de aclimatização em substrato do tipo musgo. A relação foi calculada e está expressa na tabela pela fórmula $R=(VF-VI)$.

Extrato (%)	R=(VF-VI)	
	APA (cm)	CSR (cm)
Controle	0,2	0,2
25	1,1	0,7
50	1,3	0,7
75	0,3	0,1
100	0,2	0,2

Fonte: Autores.

Figura 5. Aspecto das plantas de *Miltonia flavescens* cultivadas em diferentes concentrações do extrato aquoso de ora-pro-nóbis após 120 dias de aclimatização.



Fonte: Autores.

Tais resultados evidenciam que, apesar do menor crescimento de parte aérea e sistema radicular durante o período *in vitro* em meio de cultura acrescido de 25% e 50% de extrato de ora-pro-nóbis, as plantas provenientes destes tratamentos foram as que obtiveram maiores incrementos nestas variáveis de crescimento quando cultivadas *ex vitro* por 120 dias, demonstrando que, nestas concentrações, o efeito benéfico do extrato pode ser maior a longo prazo. Portanto, o acréscimo do extrato parece ser vantajoso visto que permitiu maior crescimento das plantas em virtude da suplementação mineral que as plantas receberam neste período. Por se tratarem de plantas de metabolismo e desenvolvimento lento, o processo de aclimatização também demanda um longo período (Faria et al., 2012) para que apresente resultados positivos em termos de crescimento de plantas desta espécie.

Sousa et al. (2015), descreveram para *Brassavola tuberculata*, cultivada com a utilização de auxina e aclimatizada em substratos esfagno, fibra de coco e ambos combinados, que a média geral dos incrementos das variáveis de crescimento foi positiva, após 210 dias de aclimatização, semelhante ao presente trabalho que, apesar de uma taxa de mortalidade considerável em alguns tratamentos, em todos eles houve incremento na altura da parte aérea e comprimento do sistema radicular durante a etapa de aclimatização.

A transferência das plantas sobreviventes à aclimatização para forófitos não foi avaliada em termos quantitativos, porém evidenciou que as plantas de *M. flavescens* germinadas e propagadas *in vitro* cresceram bem e são passíveis de serem reintroduzidas em ambientes naturais (Figura 6). Contudo, sugere-se maiores estudos e monitoramento, uma vez que a bibliografia ainda é escassa acerca dos processos de reintrodução de espécies ameaçadas cultivadas *in vitro*, sendo a adaptação das plantas aos forófitos um dos principais obstáculos do processo (Dorneles & Trevelin, 2011).

Figura 6. Plantas de *Miltonia flavescens* sobreviventes à aclimatização presas ao forófito.



Fonte: Autores.

4. Conclusão

O extrato aquoso de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) não apresentou efeito significativo na maioria das variáveis no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl. Para o incremento no número de folhas, durante o período do cultivo *in vitro*, o tratamento com uma alta concentração do extrato (100%) no meio de cultura pode ser considerado vantajoso. No entanto, esta elevada concentração demonstrou não ser tão eficiente a longo prazo, na sobrevivência e crescimento das plantas pós período *in vitro*.

O cultivo *in vitro* com extrato também não exerceu efeitos significativos no crescimento das plantas durante a aclimatização. Porém, as concentrações de 25% e 50% foram as que apresentaram melhores resultados no incremento de parte aérea e sistema radicular após 120 dias de aclimatização, mostrando-se benéficas a longo prazo e podendo assim ser indicadas para o cultivo da espécie.

Referências

Alves, L. R. (2018). *Análise da propagação e desenvolvimento inicial in vitro e aclimatização de Brassavola martiana Lindl (Orchidaceae)*. 46 p. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, TO, Brasil.

- Amatuzzi, J. C. A. de. (2018). *Efeito de extratos de algas marinhas na morfogênese in vitro de Epidendrum secundum Jacq.* 52 p. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.
- Amatuzzi, J. C. de. A., Vieira, L. do. N., Sant'anna-Santos, B. F., Nosedá, M. D., & Fraga, H. P. de. F. (2020). Improved *in vitro* development of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) by using aqueous extract of the seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(136), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03129-6>
- Bandeira, F. S., Xavier, A., Otoni, W. C., & Lani, E. R. G. (2007). Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus utophylla* X *E. grandis*. *Revista Árvore*, 31(5), 773-781. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622007000500001>
- Ceretta, J. M. (2018). Efeito do extrato aquoso de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) na germinação e desenvolvimento de alface. (Trabalho de Conclusão de Curso). 34f. Graduação em Agronomia - Universidade Federal do Paraná, Palotina, PR, Brasil.
- Charoenwattana, P., & Petprapai, U. (2013). Effect of chitosan and lotus extracts as growth promoter in *Dendrobium* orchid. *International Journal of Environmental and Rural Development*, Pathum Thani, 4(2), 133-137. <http://iserd.net/ijerd42/42022.pdf>
- Colombo, L. A., Faria, R. T. De., Assis, A. M. De., & Fonseca, I. C. De. B. (2005). Aclimação de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. *Acta Scientiarum Agronomy*, 27(1), 145-150. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v27i1.2134>
- Dorneles, L. T., & Trevelin, V. (2011). Aclimação e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. *Iheringia, Série Botânica*, 66, 167-174. Recuperado de <https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/47>
- Duarte, M. M., & Gandolfi, S. (2013). Enriquecimento de florestas em processo de restauração: aspectos de epífitas e forófitos que podem ser considerados. *Hoehnea*, 40(3), 507-514. <https://doi.org/10.1590/S2236-89062013000300010>
- Faria, R. T. De., Assis, A. M. De., Unemoto, L. K., & Carvalho, J. F. R. P. De. (2012). Meios de cultura. In: R. T. De. Faria, A. M. De. Assis, L. K. Unemoto, & J. F. R. P. De. Carvalho. *Produção de orquídeas em laboratório*. (Cap. 3, p. 27-42). Londrina: Mecenas.

- Faria, R. T. De., Stegani, V., Bertoncelli, D. J., Alves, G. A. C., & Assis, A. M. De. (2018). Substrates for the cultivation of epiphytic orchids. *Semina: Ciências Agrárias*, 39(6), 2851-2866. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n6p2851>
- Franco, E. T. H., & Echart-Almeida, C. (1998). Ação de extratos vegetais e fitorreguladores na organogênese de *Begonia rex*. *Ciência e Natura*, 20(20), 131-142. Recuperado de <https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/26964/pdf>
- Furlani, A. M. C. (2004). Nutrição mineral. In: G. B. Kerbauy, *Fisiologia vegetal*. (Cap. 2, p. 40-75) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Ichinose, J. G. S. (2012). *Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento in vitro e na aclimatização de Sophronitis cernua Lindl. e Brassavola flagellaris Barb. Rodr. (Orchidaceae)*. 79 p. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, Brasil.
- Juras, M. C R., Jorge, J., Pescador, R., Ferreira, W. M De., 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, 1-11. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970014>.
- Lemes, C. S. R. (2015). *Germinação, desenvolvimento e aclimatização de Miltonia flavescens Lindl. (Orchidaceae)*. 66 p. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.
- Lemes, C. S. R., Sorgato, J. C., Soares, J. S., Nunes, D. P., & Ribeiro, L. M. (2020). Initial *in vitro* establishment of the Native Cerrado Orchid *Miltonia Flavescens*. *Floresta e Ambiente*, Dourados, 27(4), 1-7. <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.022118>
- Madeira, N. R, Amaro, G. B, Melo, R. A. De C. e., Botrel, N, & Rochinski, E. (2016). *Cultivo de ora-pro-nobis (Pereskia) em plantio adensado sob manejo de colheitas sucessivas*. Brasília, DF: Embrapa, 20 p. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1066888/cultivo-de-ora-pro-nobis-pereskia-em-plantio-adensado-sob-manejo-de-colheitas-sucessivas>.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 495-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Oliveira, D. De C. Da S., Wobeto, C., Zanuzo, M. R., & Severgnini, C. (2013). Composição mineral e teor de ácido ascórbico nas folhas de quatro espécies olerícolas não-convencionais. *Horticultura Brasileira*, 31(3), 472–475. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000300021>

Ribeiro, L. de S. (2005). *Adequação de meio de cultura para crescimento in vitro de orquídeas do gênero Cattleya*. 69 p. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Setiari, N., Purwantoro, A., Moeljopawiro, S., & Semiarti, E. (2016). Peptone and tomato extract induced early stage of embryo development of *Dendrobium phalaenopsis* Orchid. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 1(2), 77-86.

Silva, D. O., Seifert, M., Nora, F. R., Bobrowski, V. L., Freitag, R. A., Kucera, H. R., Nora, L., & Gaikwad, N. W. (2017). Acute toxicity and cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a highly nutritious Cactaceae plant. *Journal of Medicinal Food*, 20(4), 403-409. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0133>

Silva, H. F. J., Asmar, S. A., Oliveira, R. C., Luz, J. M. Q., & Melo, B. (2016). Alternative supplements and MS medium concentrations in the *in vitro* establishment of *Dipteryx alata*. *Bioscience Journal*, 32(5), 1138–1146. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n5a2016-33682>

Soares, J. S. (2018). *Técnicas de cultivo in vitro como alternativa para a conservação de Schomburgkia crisper Lindl. (Orchidaceae) e sua reintrodução em ambiente natural*. 101 p. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais - Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, MS, Dourados.

Sousa, R. M. F., Lira, C. S., Rodrigues, A. O., Morais, S. A. L., Queiroz, C. R. A. A., Chang, R., Aquino, F. J., Muñoz, R. A. A., & Oliveira, A. (2014). Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos *in vitro*. *Bioscience Journal*, 1(1), 318-323. Recuperado de <http://200.19.146.79/index.php/biosciencejournal/article/view/19618>

Sousa, G. G., Rosa, Y. B. C. J., Macedo, M. C., & Soares, J. S. (2015). Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. *Horticultura Brasileira*, 33(2), 208-215. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000200012>

Souza, A. H. de., Silva, B. M., Silva, E. C. da., Augusti, R., Melo, J. O. F., & Carlos, L. de A. (2021) Influence of thermal processing on the characteristics and chemical profile of ora-pro-nobis by PS/MS *paper spray*. *Research, Society and Development*, 10(2), 1-17. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12119>

Stefanello, S., Silveira, E. V., Oliveira, L. K., Besson, J. C. F., & Dutra, G. M. V. (2009). Eficiência de substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* Lindl. propagadas *in vitro*. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 2(3), 467-476. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2009v2n3p467-476>

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I., & Murphy, A. (2017). Balanço hídrico das plantas. In: L. Taiz, E. Zeiger, I. Moller, A. Murphy. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. (Cap. 4, 110-116. 6.ed.). Porto Alegre: Artmed.

Takeiti, C. Y., Antonio, G. C., Motta, E. M. P., Collares-Queiroz, F. P., & Park, K. J. (2009). Nutritive evaluation of non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(1), 148 -160. <https://doi.org/10.1080/09637480802534509>

Yakhin, O. I., Lubyaynov, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7(2049), 1-32. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>

ARTIGO II - AÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* (LINDL.) LINDL. (ORCHIDACEAE)

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a ação de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* e aclimatização de *Miltonia flavescens*, a fim de otimizar a multiplicação visando possíveis programas de reintrodução. Os tratamentos utilizados consistiram de meio de cultura acrescido de Thidiazuron (0; 0,5; 1, 2 e 4 mg.L⁻¹) e Ácido Indolbutírico (0; 0,5; 1, 2 e 4 mg.L⁻¹), combinados entre si, totalizando 25 tratamentos. Após 270 dias de cultivo, dados de crescimento foram coletados e as plantas aclimatizadas em substrato do tipo musgo. A cada 30 dias, avaliou-se a taxa de sobrevivência e coletou-se exemplares das plantas para fixação e produção de lâminas para posterior análise anatômica. Os dados coletados das variáveis de crescimento *in vitro* e aclimatização foram submetidos à análise de variância e teste de separação de médias. O cultivo em meio de cultura MS ½ suplementado com 4 mg.L⁻¹ de AIB (Ácido Indolbutírico), na ausência de TDZ (Thidiazuron) levou a maiores incrementos nas variáveis altura da parte aérea, comprimento do sistema radicular e número de raízes. O número de folhas foi significativamente superior em meio de cultura com 2 e 4 mg.L⁻¹ de AIB, também na ausência de TDZ. Por outro lado, a adição de TDZ ao meio de cultura, em diferentes concentrações, inibiu o crescimento da parte aérea e das raízes, mas otimizou sobretudo a presença de brotos nas plantas. Após 30 dias de aclimatização, os melhores resultados ocorreram nas plantas tratadas apenas com AIB. Nas plantas tratadas com AIB, nota-se que a estrutura anatômica é semelhante àquelas do tratamento controle, exceto pela visualização da formação de raízes laterais.

Palavras-chave: Micropropagação, meios de cultivo, Ácido Indolbutírico, Thidiazuron.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the influence of growth regulators in *in vitro* cultivation and acclimatization of *Miltonia flavescens*, in order to optimize the multiplication aiming at possible reintroduction programs. The instruments used consisted of culture medium incremented with the concentrations of Thidiazuron (0; 0.5; 1, 2 and 4 mg.L⁻¹) and Indolbutyric Acid (0; 0.5; 1, 2 and 4 mg.L⁻¹), combined with each other, totaling 25 treatments. After 270 days of cultivation, growth data were collected and the plants acclimated to a moss-like substrate. Every 30 days, the survival rate was evaluated and specimens of the plants were collected for slide production for later anatomical analysis. The data collected from the variables of *in vitro* growth and acclimatization were reported to the analysis of variance and means separation test. Cultivation in MS ½ culture medium supplemented with 4 mg.L⁻¹ of IBA, in the absence of TDZ, led to greater increases in the variables of height of the aerial part, length of the root system and number of roots. The number of leaves was significantly higher in culture medium with 2 and 4 mg.L⁻¹ of IBA, also in the absence of TDZ. On the other hand, the addition of TDZ to the culture medium, at different levels, inhibited the growth of the aerial part and the roots, mainly optimizing the presence of shoots in the plants. After 30 days of acclimatization, the best results occurred in plants treated with IBA only. In plants treated with IBA, it is noted that the anatomical structure is similar to those of the control treatment, except for the visualization of the formation of lateral roots in those treated with IBA.

Keywords: Micropropagation, culture medium, Indolbutyric Acid, Thidiazuron.

1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é apontada como uma das famílias botânicas mais representativas em número de espécies e possui grande importância econômica, ornamental e, sobretudo, ecológica. As orquídeas participam de interações ecológicas fundamentais relacionadas à polinização e são excelentes bioindicadoras de qualidade ambiental, por serem sensíveis às alterações antrópicas causadas nos ecossistemas (KRÖMER; GARCÍA-FRANCO; TOLEDO-ACEVES, 2014). Orchidaceae é também uma das famílias que apresenta maior abundância de espécies epífitas na Mata Atlântica (RAMOS et al., 2019). *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl., é uma orquídea nativa epífita encontrada sobretudo nas regiões sul e sudeste do Brasil (van den BERG, 2021), estando hoje ameaçada devido à coleta indiscriminada e ao desmatamento e fragmentação de seu ambiente natural (LEMES et al., 2015).

Como forma de mitigar esses problemas, buscam-se ferramentas de propagação e cultivo destas espécies, sendo uma delas a sementeira e o cultivo *in vitro* (FEHÉR, 2019). A técnica está baseada no princípio de que células ou partes da planta são capazes de se diferenciar em qualquer tipo de célula do organismo (CONDIC, 2014; FEHÉR, 2019) e são induzidas a se desenvolver assepticamente, em um meio nutritivo e sob condições controladas de luz e temperatura (CARVALHO et al., 2011; CARDOSO; GERALD; TEIXEIRA DA SILVA, 2018).

O meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) tem se mostrado eficiente na germinação e crescimento inicial de *Miltonia flavescens* (LEMES et al., 2020) bem como na regeneração de plantas a partir ápices radiculares e segmentos foliares (STEFANELLO et al., 2009). Além disso, substâncias reguladoras de crescimento com função similar aos hormônios podem ser adicionadas ao meio de cultura a fim de potencializar o desenvolvimento das plantas e induzir respostas fisiológicas, como por exemplo alongamento de parte aérea, crescimento de raízes e indução de brotos (CID; TEIXEIRA, 2015).

Dentre os reguladores de crescimento mais empregados no cultivo *in vitro* estão as citocininas e as auxinas, sendo que a combinação entre eles desempenha papel importante no sucesso da regeneração de plantas (HILL; SCHALLER, 2013). As citocininas fazem parte de um grupo de substâncias responsáveis principalmente pela divisão celular, ao passo que as auxinas estão relacionadas aos processos

fisiológicos que desencadeiam sobretudo, o crescimento dos órgãos vegetativos (CID, 2015).

Nesse contexto, destaca-se a utilização do Thidiazuron ou TDZ [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) ureia], que tem demonstrado efeito similar ao das citocininas, atuando sobretudo na formação de brotações adventícias (CID, 2015) e no caso das orquídeas, promove a formação de “protocorm-like-bodies” (PBLs), tipo de germinação característica das orquídeas, que produz protocormos, que são convertidos em plantas (KUNDU; GANTAIT, 2018). O ácido indolbutírico ou AIB (ácido indol-3-butírico) é uma auxina promotora do alongamento da parte aérea e do sistema radicular, bem como da formação de raízes adventícias (CID; TEIXEIRA, 2015) tendo apresentado resultados positivos no incremento do sistema radicular de diferentes espécies de orquídeas (CAMARGO et al. 2015; FERREIRA et al, 2017).

Resultados positivos em protocolos de cultivo de orquídeas vão além do período *in vitro* e muitas delas necessitam ser aclimatizadas de forma gradual para que suportem as alterações e sejam capazes de sobreviver em condições naturais (SORGATO et al., 2015; ALVES, 2018), sofrendo influência de outros fatores como o tipo de substrato empregado (MACEDO et al., 2014; KANG et al., 2020). De acordo com Breda e Ferraz (2011), no processo da aclimatização muitas plantas são perdidas, pois o ambiente externo possui condições de maior luminosidade e menor umidade e, por isso, as orquídeas precisam desenvolver mecanismos de ajuste para que consigam absorver nutrientes de forma eficiente garantindo sua sobrevivência. Para isso, busca-se estudar a aclimatização levando em conta as particularidades de cada espécie.

O declínio populacional e a conseqüente ameaça aliados a carência de estudos que detalhem procedimentos de conservação e reintrodução de *Miltonia flavescens*, confirmam a importância da otimização de protocolos para a sua propagação *in vitro* e aclimatização, além do conhecimento das alterações anatômicas durante a transferência para o ambiente *ex vitro*. Diante do exposto, este estudo teve o objetivo de avaliar a ação de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* e aclimatização de *Miltonia flavescens*, a fim de otimizar a multiplicação visando possíveis programas de reintrodução.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE CULTIVO E OBTENÇÃO DAS PLÂNTULAS

Os experimentos de cultivo *in vitro* foram realizados nos Laboratórios de Anatomia e Morfologia Vegetal e de Micologia Aplicada e Plantas Medicinais, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Palotina, PR, durante o período de agosto de 2019 a junho de 2020. As análises anatômicas de folhas e raízes foram realizadas no Laboratório de Botânica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel, PR.

As plântulas de *Miltonia flavescens* utilizadas possuíam seis meses de idade, 0,5 cm de comprimento (três folhas e uma raiz) e foram obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes provenientes de polinização cruzada. A germinação e o cultivo inicial ocorreram em meio de cultura basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de macronutrientes e micronutrientes (MS ½) acrescido de sacarose (30 g.L⁻¹) e solidificado com ágar bacteriológico Dinamica® (7 g.L⁻¹).

2.2 THIDIAZURON E ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NO CRESCIMENTO *IN VITRO*

O meio de cultura de multiplicação foi composto por sais do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de macronutrientes e micronutrientes (MS ½) acrescido de sacarose (30.g L⁻¹), ágar (7.g L⁻¹) e das concentrações de Thidiazuron (0; 0,5; 1, 2 e 4 mg.L⁻¹) e Ácido Indolbutírico (0; 0,5; 1, 2 e 4 mg.L⁻¹), combinados entre si, totalizando 25 tratamentos. Distribuiu-se 30 mL de meio de cultura em frascos de vidro com capacidade para 100 mL. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

O delineamento experimental foi fatorial 5x5, sendo cinco concentrações de TDZ e cinco concentrações de AIB, e a unidade experimental consistiu em um vidro contendo dez plantas e cinco repetições (Figura 1). O cultivo ocorreu em sala de crescimento com temperatura média de 24 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

A cada 90 dias foi realizado o subcultivo no mesmo meio de cultura e após 270 dias, foram coletados os dados das variáveis de crescimento: altura da parte

aérea (cm) e comprimento do sistema radicular (cm), número de folhas, raízes e brotos e massa fresca (g).

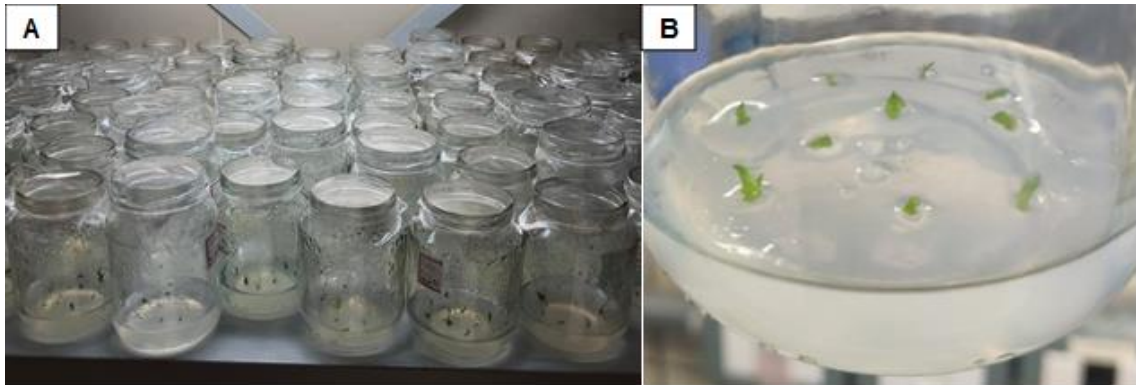


Figura 1. Cultivo com reguladores de crescimento. A = Frascos dos diferentes tratamentos; B = Plantas no início do cultivo.

2.3 ACLIMATIZAÇÃO

Para o experimento de aclimatização, foram utilizadas plantas de *Miltonia flavescens* do experimento anterior submetidas aos tratamentos com todas as concentrações de AIB e com 0 e 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ, uma vez que estas plantas possuíam raízes desenvolvidas ou iniciando seu desenvolvimento, sendo assim mais adequadas para ao processo de aclimatização. As plantas tratadas apenas com TDZ não foram aclimatizadas por serem apresentarem tamanho muito reduzido.

O acompanhamento da aclimatização ocorreu no município de Toledo, PR nas coordenadas 28° 05' 56" S e 48° 40' 30" O, em área interna, iluminada com luz natural e ao abrigo do sol, em temperatura ambiente durante o período de junho a setembro de 2020.

Trinta plantas de cada tratamento, com aproximadamente 4 cm de altura, foram retiradas dos frascos de cultivo, passando por lavagem em água corrente para retirada do meio de cultura e avaliadas quanto à altura da parte aérea (cm) e comprimento do sistema radicular (cm) para posterior comparação dos valores iniciais e finais para cada variável.

As plantas foram dispostas em bandejas de poliestireno com furos na base, sendo uma planta por unidade da bandeja (12,25 cm² e altura de 5,5 cm), preenchidas com substrato do tipo musgo e cobertas com plástico transparente (Figura 2), recebendo irrigação com pulverizador manual uma vez ao dia, até o completo molhamento das plantas e do substrato.

Após 15 dias de cultivo *ex vitro* as plantas passaram a receber, com o auxílio de um pulverizador manual (até o completo molhamento), adubação foliar com 1,0 mL.L⁻¹ de NPK 10-10-10 acrescido dos seguintes micronutrientes: ferro (0,1%), zinco (0,1%), cobre (0,1%), enxofre (0,3%) e manganês (0,5%). Ao completar 30 dias, o plástico de cobertura foi retirado.

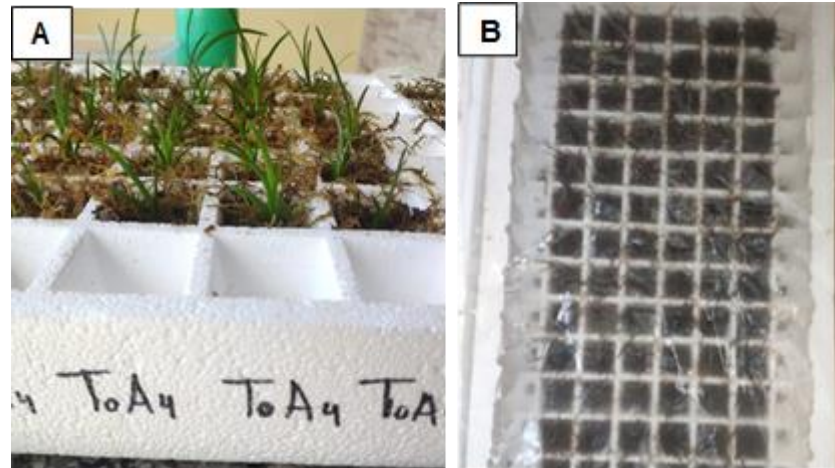


Figura 2. Plantas aclimatizadas. A = detalhe das plantas e substrato; B = Bandejas cobertas com plástico no período inicial de aclimatização.

O percentual de sobrevivência foi avaliado a cada 30 dias e, após 90 dias, as plantas sobreviventes foram transferidas para um forófito do gênero *Pyrus* sp. onde foram presas ao tronco, protegidas da incidência solar direta e recebendo irrigação uma vez ao dia, a fim de avaliar a sobrevivência e a possibilidade de repovoamento.

2.4 ANÁLISE ANATÔMICA

Para as análises anatômicas, uma amostra de raízes e folhas do tratamento controle (ausência de reguladores de crescimento) e do tratamento com 4 mg.L⁻¹ de AIB de diferentes períodos (inicial após retirada do cultivo *in vitro*, 30 dias e 60 dias de aclimatização) foram retiradas a fim de se avaliar o efeito da ausência e da maior concentração de auxina (AIB) nas plantas. As amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%) (Johansen, 1940) e conservadas em etanol 70%. Porções da região mediana desses órgãos foram desidratadas em séries crescentes de álcool etílico, sendo infiltradas e incluídas em historesina (Leica Historesin Embedding Kit, Nussloch, Germany), conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, foram realizadas secções transversais seriadas do material incluído com micrótopo rotativo (Modelo RM 2245, Leica Microsystems

Nusslocj GmbH, Nussloch, Germany) utilizando navalha de tungstênio, espessura 5 μm .

As secções anatômicas foram coradas com azul de toluidina 0,05% (Feder & O'Brien 1968) e montadas em resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany). As lâminas foram analisadas em microscopia de luz, sendo realizada a captura das imagens com auxílio de câmera digital DP041 acoplada ao fotomicroscópio Olympus Bx70, utilizando o programa DP Controller.

2.5 COLETA DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados das variáveis de crescimento *in vitro* foram submetidas à análise de regressão utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011) e os dados de aclimatização foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de separação de médias Skott-Knott a 5% de significância, utilizando ambiente R, na interface RStudio, versão 4.0.2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DO TDZ E AIB NO CRESCIMENTO *IN VITRO*

Transcorridos 270 dias de cultivo *in vitro*, as variáveis de crescimento das plantas de *M. flavescens* foram significativamente influenciadas pelos tratamentos com os reguladores de crescimento. Para as variáveis número de folhas (Figura 3A) e altura da parte aérea (Figura 3B), houve interação significativa entre os reguladores de crescimento no meio de cultura e os dados apresentaram um comportamento quadrático decrescente, em que, conforme o aumento da concentração do TDZ no meio de cultura, o número de média das variáveis caiu.

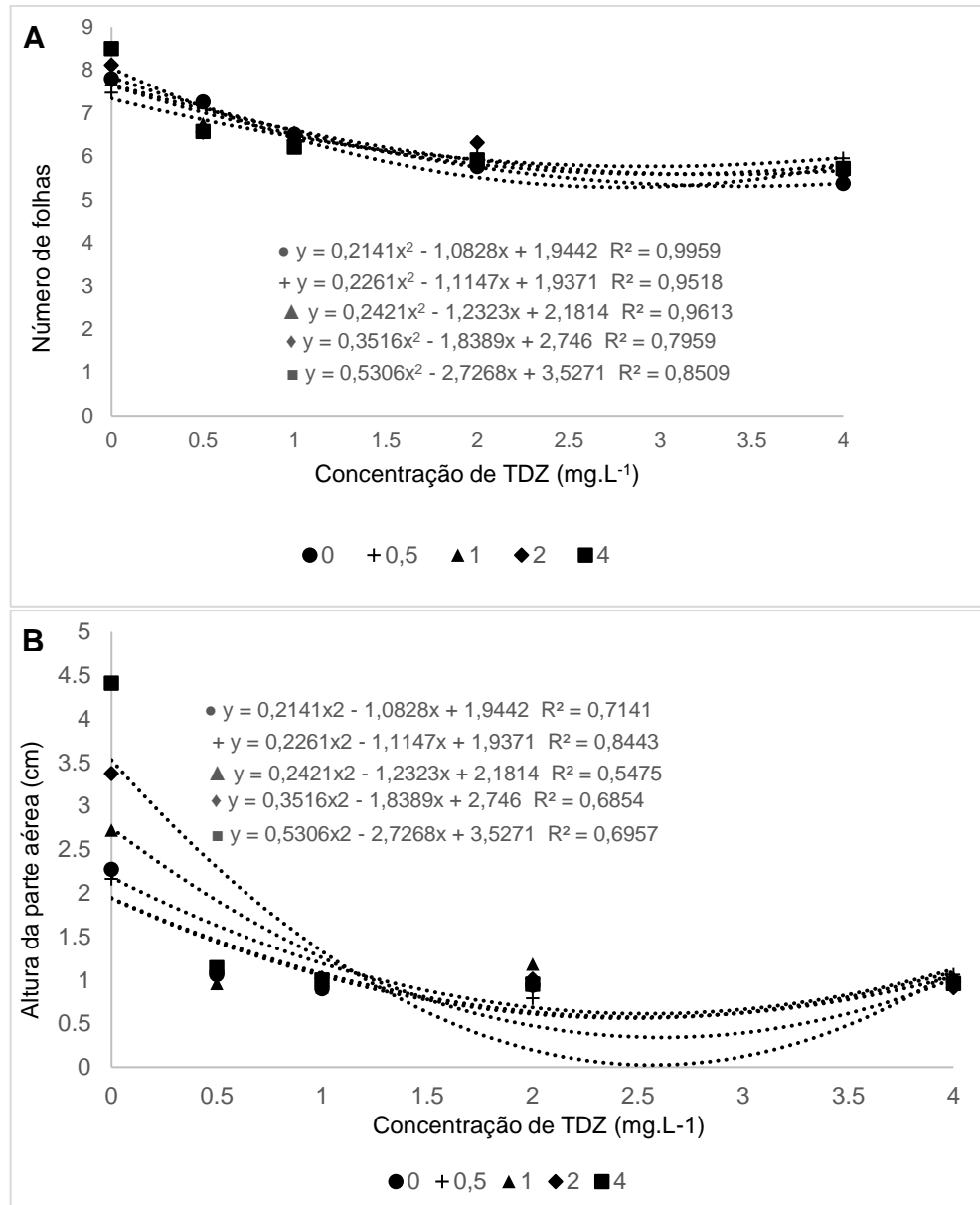


Figura 3. Efeito da interação dos reguladores de crescimento TDZ e AIB no número de folhas (A) e na altura da parte aérea (B) das plantas de *M. flavescens* submetidas às diferentes combinações destes reguladores *in vitro*.

Em relação ao número de raízes (Figura 4A) e o comprimento do sistema radicular (Figura 4B) os dados novamente evidenciaram uma interação significativa entre os reguladores, com um decréscimo das médias das variáveis com o aumento do TDZ no meio de cultura, sendo as maiores médias obtidas com a maior concentração de AIB.

Os efeitos observados podem ser atribuídos a ação do AIB como auxina, responsável principalmente pelo alongamento celular, gerando crescimento de parte aérea e, principalmente, o enraizamento de plantas (CID; TEIXEIRA, 2015). Entre os reguladores de crescimento do grupo das auxinas, o AIB é descrito como um dos mais

responsivos em relação à indução de enraizamento em explantes de culturas de tecidos (LEMOS, 2015) tendo resultado positivo também para orquídeas (SANTOS; FERREIRA; MARQUES, 2010; CAMARGO et al. 2015).

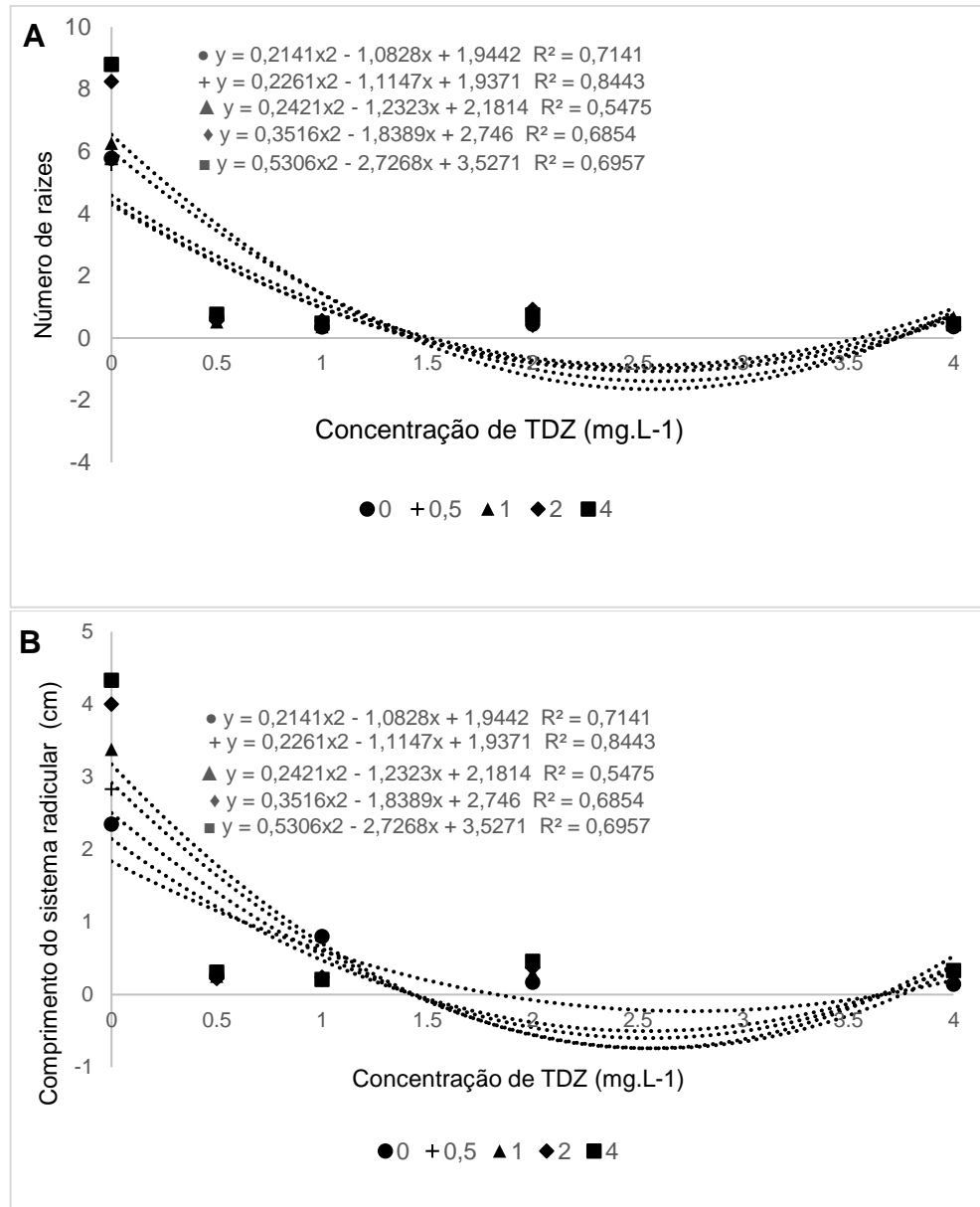


Figura 4. Efeito da interação dos reguladores de crescimento TDZ e AIB no número de raízes (A) e no comprimento do sistema radicular (B) das plantas de *M. flavescens* submetidas às diferentes combinações destes reguladores *in vitro*.

Já para o número de brotos, as análises demonstraram que não houve interação significativa dos reguladores de crescimento no meio de cultura e, portanto, os fatores foram analisados separadamente. Em relação ao TDZ, os dados apresentaram um comportamento linear significativo, sendo que, à medida em que aumentou-se a concentração de TDZ no meio de cultura, o número de brotos também aumentou (Figura 5A). Já em relação ao AIB, não houve efeito significativo do

regulador no número de brotos das plantas, de acordo com a análise de regressão (Figura 5B), sendo que o valor médio verificado para a variável foi de 0,2 brotos no tratamento com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB. Diante disso, observa-se que uma concentração mais elevada de TDZ confirma sua ação como citocinina, gerando um aumento no número de brotos.

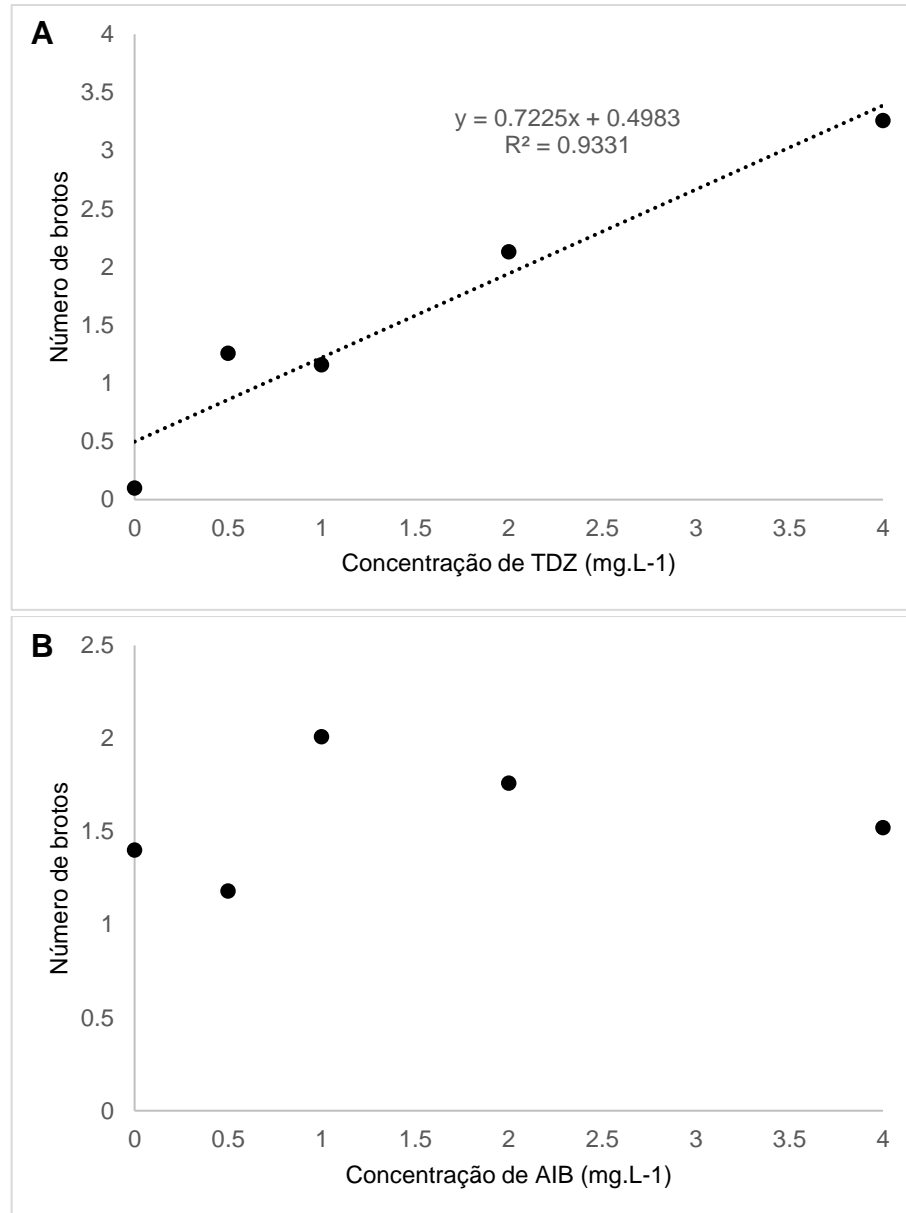


Figura 5. Efeito das diferentes concentrações dos reguladores de crescimento TDZ (A) e AIB (B) no número de brotos das plantas de *M. flavescens* cultivadas *in vitro*.

Da mesma forma, a variável massa fresca não apresentou interação entre os fatores de acordo com a análise de regressão e também não houve efeito significativo para nenhum dos reguladores analisados. Em relação ao TDZ (Figura 6A), o maior número de média encontrado para massa fresca foi de 0,121 g no tratamento com a maior concentração de TDZ e, em relação ao AIB (Figura 6B), a maior média foi de

0,212 g, também no tratamento com a maior concentração do regulador.

Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que mesmo as plantas com a parte aérea e sistema radicular pouco desenvolvidos, apresentaram uma maior quantidade de brotações, fator que também influencia no incremento de massa. No entanto, a maior média para a massa fresca foi encontrada no tratamento com 4 mg.L^{-1} TDZ + 0.5 mg.L^{-1} AIB, o qual apresentou valores médios elevados no desenvolvimento de parte aérea e, ao mesmo tempo, no número de brotos, o que contribuiu para o aumento da massa.

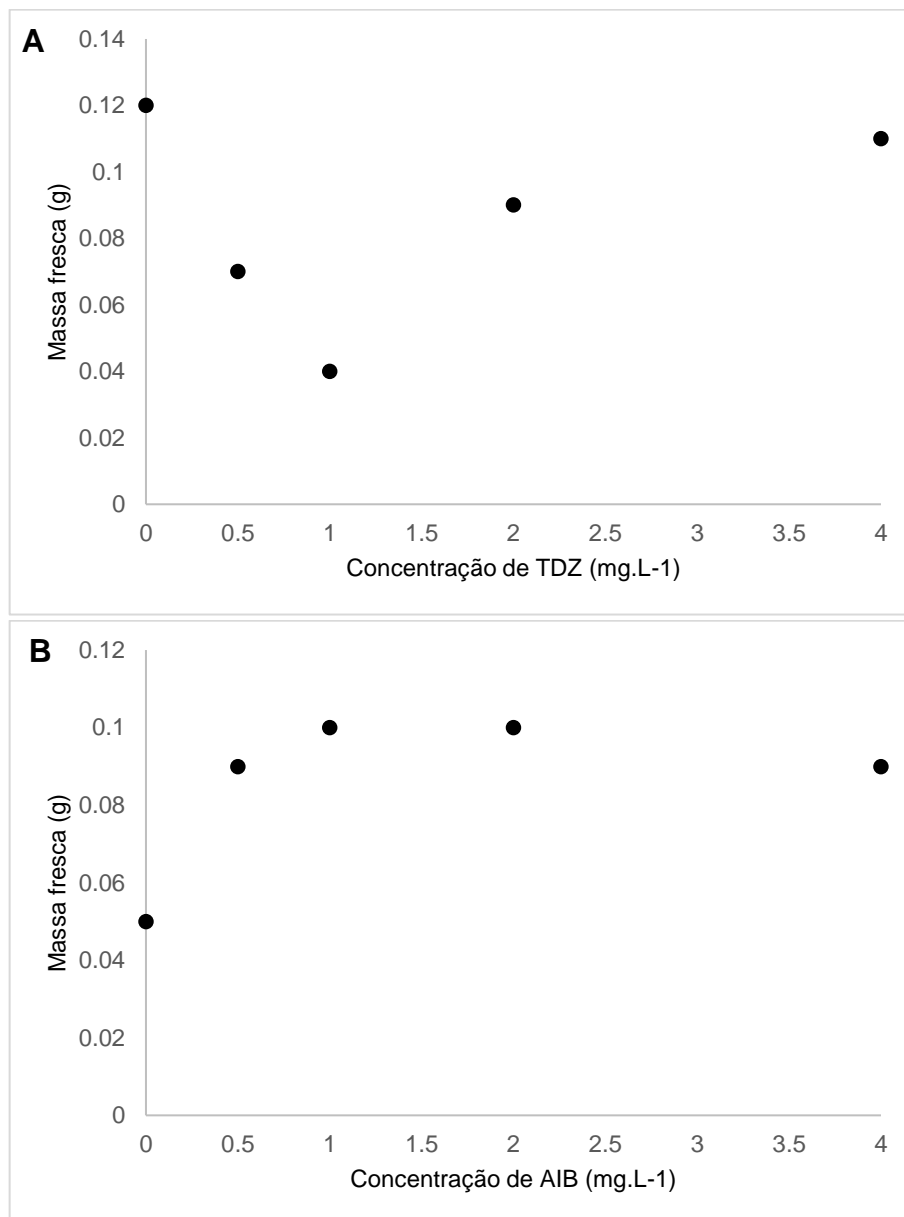


Figura 6. Efeito das diferentes concentrações dos reguladores de crescimento TDZ (A) e AIB (B) na massa fresca das plantas de *M. flavescens* cultivadas *in vitro*.

A partir das análises, verificou-se que concentrações mais elevadas de AIB levaram a diminuição na formação de brotos, da mesma forma que a formação de raízes e desenvolvimento da parte aérea não foram favorecidas pelo aumento na concentração do TDZ. Não houve crescimento de raízes quando o TDZ estava presente no meio de cultura, seja ele isolado ou em combinação com as concentrações de TDZ testadas. A interação auxina-citocinina no meio de cultura influencia no tipo de órgão a ser formado nas plantas cultivadas, sendo que plantas cultivadas em meio com alta razão citocinina/auxina tendem a produzir muita brotação e poucas raízes, enquanto que as plantas cultivadas em meio com alta razão auxina/citocinina tendem a produzir muitas raízes e poucos brotos (PINO-NUNES, 2009).

Resultados semelhantes foram encontrados por Asa e Kaviani (2020), utilizando plantas de *Phalaenopsis amabilis* (Orchidaceae), onde o meio de cultura suplementado com $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB foi mais adequado para a indução de crescimento de raízes, sendo que não houve uma correlação positiva entre o AIB e a citocinina Kinetina para o número e tamanho de raízes das plantas cultivadas em meio com a combinação destes reguladores.

Da mesma forma, Ferreira et al. (2017), relataram que *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) respondeu positivamente à presença da auxina, no meio de cultura, sendo que para o enraizamento o melhor tratamento foi obtido com a adição de 2 mg.L^{-1} de AIB, evidenciando o papel clássico das auxinas na indução da formação de raízes por meio da expansão celular. Ao mesmo tempo, os autores relataram que os tratamentos com a presença de citocinina foram inibitórios para tal variável.

San, Karakuri e Dönmez (2013), utilizando a espécie *Myrtus communis*, relataram que meios de cultura MS $\frac{1}{2}$ contendo TDZ e AIB foram mais eficazes para a proliferação e enraizamento de brotos respectivamente, em comparação à outras auxinas e citocininas testadas. No mesmo contexto, utilizando mirtilo e morango, Cappelletti, Sabbadini e Mezzetti (2016) obtiveram respostas benéficas na utilização do TDZ para indução de brotos na organogênese destas espécies.

Foi possível observar ainda que, sem a presença do TDZ, à medida em que se aumentou a concentração de AIB, houve também incremento no número de folhas e raízes, bem como aumento em seu tamanho. Esses dados evidenciam as vantagens da utilização do AIB como auxina promotora do crescimento e enraizamento das

plantas. A adição de TDZ ao meio de cultura, em diferentes concentrações, evidencia a inibição do crescimento da parte aérea e das raízes, otimizando sobretudo a presença de brotos nas plantas. Porém, no presente estudo, as brotações tenderam a aparecer somente nas concentrações mais baixas de AIB (de 0 a 1 mg.L⁻¹), sendo que, de maneira geral, as concentrações maiores de AIB ocasionaram uma queda no número de brotos nos tratamentos com a presença do TDZ (Figura 7).

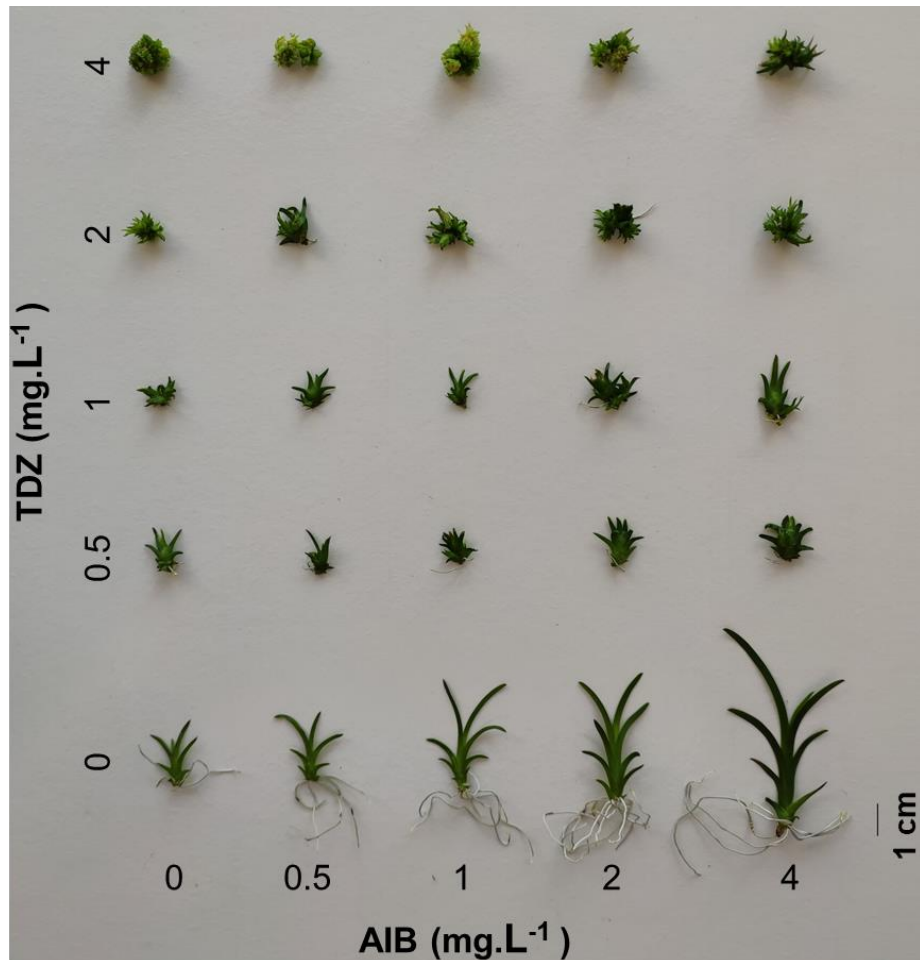


Figura 7. Aspecto das plantas de *Miltonia flavescens* cultivadas em diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e Thidiazuron (TDZ).

Da mesma forma, Ferreira et al. (2017), para *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae), verificaram que o aumento na concentração da citocinina BA (benziladenina) na presença da auxina AIB provocou uma redução no número de raízes formadas. Para a orquídea *Catasetum macrocarpum*, os mesmos efeitos foram observados, onde a presença de BA inibiu a formação de raízes mesmo havendo auxina no meio de cultura (FERREIRA et al., 2018). Esses resultados demonstram que para essas espécies, determinadas concentrações de citocinina no meio de cultura revertem o efeito indutor de enraizamento das auxinas (ALVES, 2018).

Os dados descritos neste e em outros trabalhos, demonstram que as espécies de orquídeas podem apresentar uma certa sensibilidade quando expostas a diferentes concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura (FERREIRA et al., 2017). Em geral, a presença de auxinas e citocininas no meio de forma simultânea pode favorecer ou inibir certos processos de morfogênese (FERREIRA et al., 2017). Auxina e citocinina interagem de forma complexa no meio de cultura podendo determinar vários aspectos do desenvolvimento das plantas e diferenciação de tecidos, sendo que, muitas vezes, essa interação é dependente da resposta de cada espécie à ação dos reguladores e do tecido vegetal (PINO-NUNES, 2009).

3.2 ACLIMATIZAÇÃO

Na avaliação realizada aos 30 dias após a retirada das plantas do cultivo *in vitro* (período em que as bandejas com as plantas estavam cobertas com plástico), o percentual de sobrevivência foi elevado, chegando a 100% no grupo controle e nos tratamentos com 0,5, 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ de AIB e ausência de TDZ. Para os tratamentos com a combinação de AIB e TDZ, nenhum deles atingiu 100% de sobrevivência, sendo o maior percentual atingido pelo tratamento com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB + 4,0 mg.L⁻¹ de TDZ, com 76,6%. (Tabela 2).

Após esse período, com a retirada da cobertura plástica, verificou-se a fase crítica na aclimatização, com mortalidade de plantas em todos os tratamentos, exceto no tratamento proveniente com a concentração mais elevada de AIB e sem a presença do TDZ. No segundo mês de aclimatização, ocorreu decréscimo da sobrevivência das plantas provenientes de todos os tratamentos (Tabela 2) o que coincidiu com o período de maior temperatura ambiente e menor umidade relativa do ar. Durante os primeiros sessenta dias de aclimatização, correspondentes aos meses de julho e agosto, a temperatura máxima foi próxima aos 30°C, enquanto a temperatura mínima foi próxima a 0°C (ACCUWEATHER, 2020).

Os melhores resultados na aclimatização inicial ocorreram nas plantas tratadas apenas com AIB fato que condiz com os resultados de análise das variáveis de crescimento *in vitro*, uma vez que estas foram as plantas que apresentaram também maior média em número e comprimento de raízes. Sabe-se que o condicionamento do sistema radicular é fator determinante para a sobrevivência das plantas durante o período de adaptação *ex vitro*.

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência de plantas de *Miltonia flavescens* provenientes dos tratamentos sem a presença de TDZ e com 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ, em diferentes concentrações de AIB, durante a aclimatização.

Concentrações de reguladores (mg.L ⁻¹)		Sobrevivência (%)	
		30 dias	60 dias
Controle	0	100,0	41,96 c
	0,5	100,0	53,32 c
AIB	1,0	96,6	69,98 b
	2,0	100,0	79,98 b
	4,0	100,0	100,0 a
	0,5 + 0,5	70,0 a	0,0
TDZ + AIB	0,5 + 1,0	56,6 b	0,0
	0,5 + 2,0	56,6 b	0,0
	0,5 + 4,0	76,6 a	0,0

* Médias seguidas de letras distintas nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Resultados semelhantes quanto à taxa de sobrevivência foram descritos para *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae), cultivada *in vitro* na presença de auxina. Após 210 dias de aclimatização, a espécie apresentou sobrevivência de 74% no substrato do tipo musgo (esfagno), demonstrando que a auxina promoveu a formação de sistema radicular eficiente para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas durante a aclimatização (SOUSA et al., 2015).

No segundo mês de aclimatização, após a retirada da cobertura plástica das bandejas houve aumento da mortalidade das plantas que pode ser atribuído a diminuição da umidade do ar bem como a elevação da temperatura ambiente ocorrida no período. Soares (2018) relata que uma grande variação térmica na transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* pode ser considerada um fator crucial para uma possível desestabilização funcional das plantas no início da aclimatização. A condição térmica influencia diretamente a fisiologia das plantas, principalmente seu complexo fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2017).

No período de transição da condição heterotrófica para a autotrófica, as plantas estão se adaptando a um substrato com menos disponibilidade de nutrientes e à instabilidade ambiental (SOARES, 2018) e grandes oscilações de temperatura neste período podem simbolizar condições fatais para estas plantas. Stefanello et al. (2009) também relatam que plantas da mesma espécie deste estudo, apresentaram elevada mortalidade após 60 dias da aclimatização, com queda acentuada na taxa de sobrevivência, registrando sobrevivência entre 5 e 30% após 90 dias de aclimatização em diferentes substratos.

Apesar da alta taxa de mortalidade, atribuída possivelmente às condições ambientais no período *ex vitro*, relata-se efeitos benéficos dos reguladores de crescimento, sobretudo do AIB, e sua importância no desenvolvimento de plantas bem preparadas para a aclimatização, com um sistema radicular bem desenvolvido.

O tratamento com TDZ também foi benéfico, sobretudo no incremento de brotos, porém esta característica não é relevante em termos de aclimatização e adaptação *ex vitro*. A produção de plantas visando transferência para o ambiente natural deve ser realizada em meios contendo AIB, priorizando assim proliferação de raízes e crescimento antes da aclimatização (Ferreira et al., 2017). Além disso, sabe-se que, as citocininas de maneira geral, possuem grande efeito residual, fazendo com que mesmo após a retirada do meio de cultura, as plantas ainda possam ter um comprometimento no seu desenvolvimento de parte aérea. Pereira, Dal-Vesco e Junior (2020) relatam ainda que, além do efeito residual, uma grande produção de calos e brotações nas plantas, principalmente com o TDZ, podem indicar toxidez causada pela citocinina, podendo assim refletir em uma baixa sobrevivência das plantas no ambiente *ex vitro*.

A transferência das plantas sobreviventes à aclimatização para o forófito não foi avaliada em termos quantitativos, porém, observou-se visualmente que as plantas de *M. flavescens* germinadas e propagadas *in vitro* na presença de AIB cresceram bem e são passíveis de serem reintroduzidas em ambientes naturais (Figura 8). Contudo, sugere-se maiores estudos e monitoramento, uma vez que vários fatores podem interferir neste processo, sendo a adaptação das plantas aos forófitos um dos principais obstáculos do processo (DORNELES; TREVELIN, 2011).



Figura 8. Plantas tratadas com reguladores de crescimento e sobreviventes à aclimatização presas ao tronco do forófito.

3.3 ANÁLISE ANATÔMICA

Nas raízes analisadas notou-se que a estrutura anatômica é semelhante entre aquelas do tratamento controle e as com adição de AIB (Fig. 9A-G), exceto pela visualização da formação de raízes laterais nas tratadas com AIB (Fig. 9F).

As raízes iniciais retiradas após 270 dias de cultivo *in vitro* (Fig. 9A, D) apresentam epiderme multiestratificada (3-4 camadas), que constitui o velame, com células de paredes delgadas. Na região cortical, internamente ao velame, nota-se a exoderme uniestratificada com células de paredes levemente espessadas, seguida de 3-4 camadas de células volumosas, de paredes delgadas e com amiloplastos no interior e, posteriormente a endoderme com células de espessadas em “U” e células de paredes delgadas (células de passagem). O cilindro vascular é constituído por 5 pólos de protoxilema.

Aos 30 dias, tanto no controle (A0) quanto com adição de AIB (A4), observam-se características semelhantes às daquelas da raiz inicial, exceto pela ausência de amiloplastos nas células corticais que também apresentam paredes mais finas (Fig. 9B, E-F) e aos 60 dias nota-se que essas células se rompem, formando aerênquima nessa região (Fig. 9C, G).

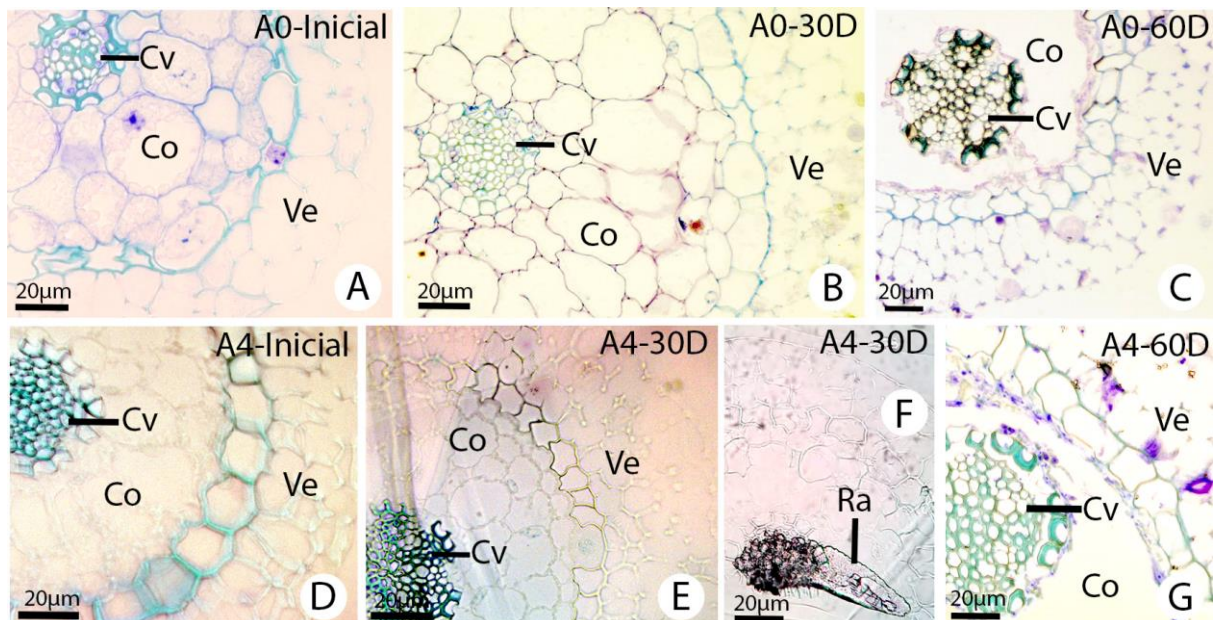


Figura 9. Fotomicrografias de raízes de *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl., em secção transversal, sem adição de AIB (A0) (A, B e C) e com adição de AIB (A4) (D, E, F e G) em diferentes períodos (inicial, 30 dias e 60 dias). Co = córtex; Cv = cilindro vascular; Ra = raiz; Ve = velame.

A estrutura anatômica da lâmina foliar das plantas do controle difere daquelas submetidas à concentração de AIB principalmente quanto a integridade das células e

tecidos (Fig. 10A-F). A lâmina foliar das plantas do controle apresentam epiderme uniestratificada com células de paredes delgadas e cutícula delgada, estômatos com cristas cuticulares localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas e em ambas as superfícies foliares (Fig. 10A-B). O parênquima clorofiliano é homogêneo com células isodiamétricas de contorno circular (Fig. 10A-B). Feixes de fibras dispersos ocorrem no mesofilo e feixes vasculares do tipo colateral (Fig. 10A). Na região da nervura central (Fig. 10B) nota-se células de parênquima clorofiliano e um único feixe vascular colateral.

Nas plantas submetidas ao tratamento com AIB (A4) observa-se aos 30 dias o afrouxamento das paredes celulares que apresentam contornos sinuosos, além de aparente plasmólise (Fig. 10C). Aos 60 dias, as diferenças estruturais são mais marcantes, com ruptura de células do parênquima clorofiliano (Fig. 10D) e também das células-guarda dos estômatos (Fig. 10D-E).

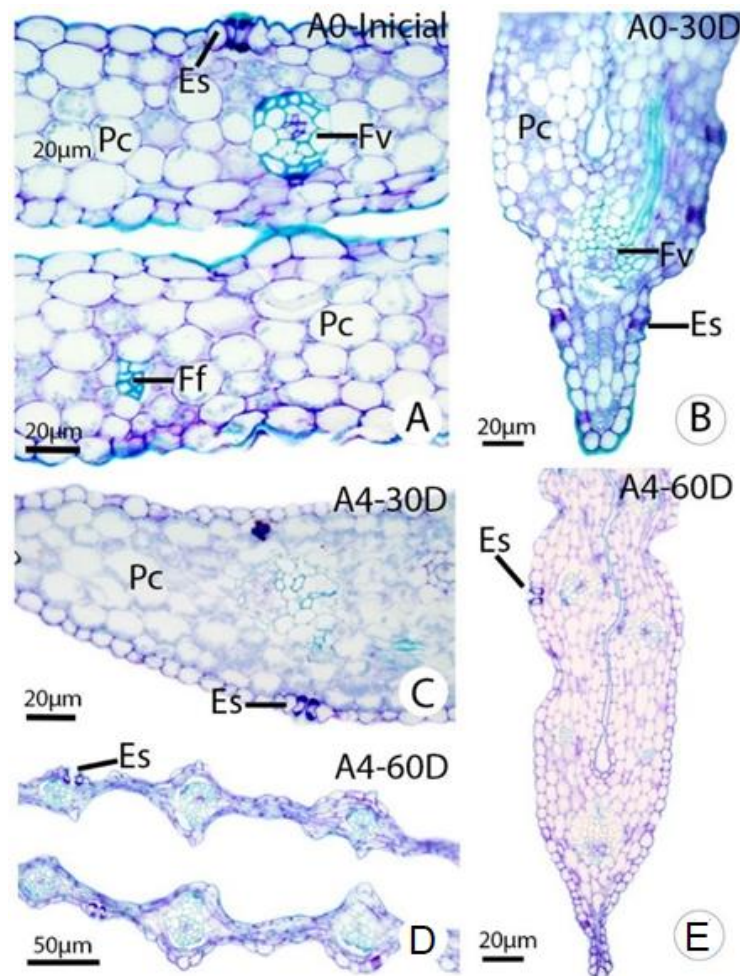


Figura 10. Fotomicrografias da lâmina foliar de *Miltonia flavescens* (Lindl.) Lindl., em secção transversal, sem adição de AIB (A0) (A e B) e com adição de AIB (A4) (B, C, D e E) em diferentes períodos (inicial, 30 dias e 60 dias). Es = estômato; Ff = feixe de fibra; Fv = feixe vascular; Pc = parênquima clorofiliano.

As análises anatômicas da raiz indicam estrutura similar entre plantas tratadas e não tratadas com 4 mg.L⁻¹ de AIB e que ao longo do tempo de aclimatização até 60 dias ocorreram variações mas manteve-se a integridade das células. As raízes das plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas por 60 dias deste estudo possuíam ainda menor quantidade de camadas do que as descritas por Oliveira e Sajo (1999 a) para a mesma espécie, bem como paredes celulares mais delgadas. Segundo os estudos dos referidos autores as raízes de *Miltonia flavescens* apresentam de 5 a 7 camadas de endoderme, 5 a 6 camadas de córtex e 9 camadas de protoxilema. Com a diminuição da umidade e o cultivo *ex vitro* a tendência é que ocorram alterações anatômicas graduais com formação de mais camadas de células e maior reforço das paredes celulares conforme observado por Mayer et al. (2008) em plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis'.

Dettke et al. (2008), em estudos de morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Miltonia regnellii* indicam que a presença de cutícula relativamente fina que recobre as folhas, o mesofilo pouco suculento e a ausência de células espessadas na epiderme, capazes de impermeabilizar os tecidos internos, indica que a espécie pode se adaptar melhor às condições ambientais com menor incidência de luz solar.

No trabalho de Oliveira e Sajo (1999b), com a espécie *Encyclia calamaria*, a análise das folhas estudadas mostra a ocorrência de caracteres que podem ser interpretados como adaptações à economia de água, elemento escasso para plantas de hábito epifítico. A ruptura das células do parênquima clorofiliano observado neste estudo, coincide com o período de variações bruscas de temperatura e umidade do ar e alta mortalidade das plantas, provavelmente devido ao estresse hídrico das plantas.

Além disso, os autores destacam que a presença de cristais no mesofilo da espécie, assim como encontrado nos estômatos de *M. flavescens*, também pode estar relacionada à existência de um estresse hídrico, no ambiente ocupado pela planta. Este fato é condizente com a alta mortalidade das plantas durante o período de aclimatização, no presente trabalho.

A análise da anatomia radicular das amostras demonstrou que as plantas de *M. flavescens* possuem capacidade de aclimatização ao ambiente, sendo provavelmente a capacidade de reversão das características anatômicas (MAYER et al., 2008), como a presença de amiloplastos, raízes laterais e aparecimento de células do aerênquima, alguns dos fatores responsáveis. No entanto, os tratamentos com AIB não demonstraram grandes vantagens para a sobrevivência das plantas durante a

aclimatização, sendo encontrados inclusive sinais de degradação nas folhas das plantas tratadas com esse regulador.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que o cultivo em meio de cultura suplementado com 4 mg.L⁻¹ de AIB, na ausência de TDZ levou a maiores incrementos nas variáveis altura da parte aérea, comprimento do sistema radicular e número de raízes, demonstrando ser o melhor e mais recomendável tratamento para o cultivo *in vitro* de *Miltonia flavescens*.

O tratamento com TDZ foi benéfico para as plantas cultivadas *in vitro*, sobretudo no incremento de brotos, porém esta característica não é relevante em termos de aclimatização e adaptação *ex vitro*, uma vez que as plantas cultivadas na presença de TDZ não apresentaram crescimento de raízes.

Durante o período de aclimatização, apesar da mortalidade de algumas plantas, as que foram submetidas ao tratamento com ausência de TDZ e maior concentração de AIB apresentaram maior taxa de sobrevivência, evidenciando a importância do AIB como auxina para o desenvolvimento de plantas bem preparadas para a aclimatização, com um sistema radicular bem desenvolvido. Entretanto, anatomicamente, as plantas de *M. flavescens* tratadas com maiores concentrações de AIB não demonstraram maiores vantagens em detrimento às plantas do o tratamento controle, na ausência do regulador.

5 REFERÊNCIAS

ACCUWEATHER. **Condições Meteorológicas Mensais em Toledo, Paraná, Brasil**. 2020. Disponível em: <https://www.accuweather.com/pt/br/toledo/40206/september-weather/40206?year=2020>. Acesso em: 06 mar. 2021.

ALVES, L. R. **Análise da propagação e desenvolvimento inicial *in vitro* e aclimatização de *Brassavola martiana* Lindl (Orchidaceae)**. 2018. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, 2018.

ASA, M.; KAVIANI, B. *In vitro* propagation of orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume var. Jawa. **Iranian Journal of Plant Physiology**, Rasht, v. 10, n. 2, p. 3113-3122, 2020.

BREDA, L. de C. S.; FERRAZ, E. C. Manual técnico para produção *in vitro* e aclimatização de orquídeas. **Heringeriana**, Brasília, v. 5, n. 1, p.11-57, 2011.

CAMARGO, S. S.; RODRIGUES, D. B.; RODRIGUES, C. M.; ASSIS, A. M.; FARIA, R. T.; SCHUCH, M. W. Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.11, p.2007-2012, 2015. DOI: 10.1590/0103-8478cr20141780.

CAPPELLETTI, R.; SABBADINI, S.; MEZZETTI, B. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 207, p. 117-124, 2016.

CARDOSO, J. C.; GERALD, L. T. S.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Micropropagation in the twenty-first century. In: LOYOLA-VARGAS, V.; OCHOA-ALEJO, N. (Org.). **Methods in molecular biology**. 4. ed. New York: Springer New York, v. 1815, p. 17-46. 2018.

CARVALHO, A. C. P. P. de.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. E. P. de; SOUZA, F. V. D.; PETERS, J. A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 7, n. 1, p.30-60, out. 2011.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4. ed. Brasília: Embrapa, p. 7-23, 2015.

CONDIC, M. L. Totipotency: what it is and what it is not. **Stem Cells and Development**. v. 23, p. 796–812. 2014. DOI: 10.1089/scd.2013.0364.

DETTKE, G. A.; SANCHES-MARQUES, A. M. M.; FERNANDES, M.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Miltonia regnellii* (Lindl.) Rchb. f. (Oncidiineae, Orchidaceae). **Acta Scientiarum**. v. 30, n. 1, p. 9-16, 2008.

DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimação e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia, Série Botânica**, v. 66, p. 167-174, 2011.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p.123-142, 1968.

FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? **Frontiers in Plant Science**. v. 10, n. 536. p. 1-11. 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00536.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotencologia** (UFLA), v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, W. de. M.; VASCONCELOS, M. C. de.; SILVA, C. C. N.; OLIVEIRA, H. R. de.; SUZUKI, R. M. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 72, n. 1, p. 57-65, 2017.

FERREIRA, W. de M.; OLIVEIRA, S.; SUZUKI, R. M.; SILVA, K. SOARES JUNIOR, J. Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. **Rodriguésia**, v. 69, n. 4, p. 2137-2151, 2018.

HILL, K.; SCHALLER, G. E. (2013) Enhancing plant regeneration in tissue culture: a molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n.10, 2014. p. e25709, DOI: 10.4161/psb.25709.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-Hill Book, 1940. 523p.

KANG, H.; KANG, K.W.; KIM, D.H.; SIVANESAN, I. *In vitro* propagation of *Gastrochilus matsuran* (Makino) Schltr., an endangered epiphytic orchid. **Plants**, v. 9, n. 524. 2020. DOI: 10.3390/plants9040524

KRÖMER, T.; GARCÍA-FRANCO, J. G. Y; TOLEDO-ACEVES, T. Epífitas vasculares como bioindicadores de la calidad forestal: impacto antrópico sobre su diversidad y composición. In: GONZÁLEZ-ZUARTH, C. A.; VALLARINO, A.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J. C.; LOW-PFENG, A. M. (Eds.). **Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental**. Campeche: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático/ El Colegio de la Frontera Sur, 2014. p. 606–623.

KUNDU, S.; GANTAIT, S. Thidiazuron-induced protocorm-like bodies in orchid: progress and prospects. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. (Eds) **Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator**. Springer, Cingapura. p. 273-287, 2018. DOI: 10.1007/978-981-10-8004-3_13.

LEMES, C. S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; NUNES, D. P.; RIBEIRO, L. M. Initial *in vitro* establishment of the native Cerrado orchid *Miltonia flavescens*. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 1-7, 2020.

LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4. ed. Brasília: Embrapa, p. 7-23, 2015.

MACEDO, M. C. de.; ROSA, D. B. C. J.; SOARES, J. S.; TATARA, M. B.; HOFMMANN, N. T. K.; ROSA, Y. B. C. J. Armazenamento de sementes e aclimatização de *Brassavola tuberculata* Hook. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 2883-2894, 2014.

MAYER, J. L. S.; RIBAS, L. L. F.; CLEUSA, B. QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botânica Brasilica**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 323-332. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. Wisconsin, v. 15, p. 495-497.1962.

OLIVEIRA, V. C.; SAJO, M. G. Root anatomy of nine Orchidaceae species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 42, n. 4, p. 405-413, 1999a.

OLIVEIRA, V. D. C.; SAJO, M. D. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, v. 22, n. 3, p. 365-374, 1999b.

PEREIRA, F.; DAL-VECO, L. L.; JUNIOR, P. C. P. F. Efeito do Thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret). **Scientia Naturalis**. Rio Branco, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2020.

PICOLOTTO, D. R. N.; NETO, V. B. de. P.; BARROS, F. de.; PADILHA, D. R. C.; CRUZ, A. C. F. da.; OTONI, W. C. Micropropagation of *Cyrtopodium paludicolum* (Orchidaceae) from root tip explants. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. Viçosa, v. 17, n. 3, p. 191-197, 2017.

PINO-NUNES, L. E. **Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina**: uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom). 2009. 141 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia na Agricultura e no Ambiente, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

RAMOS, F. N. et al. Atlantic epiphytes: a data set of vascular and non vascular epiphyte plants and lichens from the Atlantic Forest. **Ecology**, v. 100, p. e02541, 2019. DOI: 10.1002/ecy.2541.

SAN, B.; KARAKURT, Y.; DÖNMEZ, F. Effects of thidiazuron and activated charcoal on *in vitro* shoot proliferation and rooting of myrtle (*Myrtus communis* L.). **Journal of Agricultural Sciences**, v. 21, p. 177-183, 2015.

SANTOS, M. R. A. dos.; FERREIRA, M. das. G. R.; MARQUES, M. G. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* KUNTH. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 90-98, 2010.

SOARES, J. S. **Técnicas de cultivo *in vitro* como alternativa para a conservação de *Schomburgkia crispa* Lindl. (Orchidaceae) e sua reintrodução em ambiente natural**. 2018. 101 f. Tese (Doutorado) – Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais – Recursos Naturais, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, 2018.

SORGATO, J.C.; ROSA, Y.B.C.J.; SOARES, J.S.; LEMES, C.S.R.; SOUZA, G.G. Light in intermediate acclimatization of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phalenopsis* Deang Suree. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.2, p. 231-237, 2015.

SOUZA, G. G.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SOARES, J. S. Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 208-2015, 2015.

STEFANELLO, S.; SILVEIRA, E. V.; OLIVEIRA, L. K.; BESSON, J. C. F.; DUTRA, G. M. V. Eficiência de substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* Lindl. propagadas *in vitro*. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 2, n. 3, p. 467-476, 2009.

STEFANELLO, S.; KARSTEN, J.; MÜLLER, T. S.; TOMCZAK, A. P.; BONETT, L.P.; SCHUELTER, A. R. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 53-59, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

VAN DEN BERG, C. *Miltonia in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11855>>. Acesso em: 19 fev. 2021.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos para o cultivo de *Miltonia flavescens*, recomenda-se a utilização do extrato aquoso de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.), em concentrações de 25% e 50%, para melhores resultados no incremento de parte aérea e sistema radicular após 120 dias de aclimatização, mostrando-se benéficas a longo prazo no cultivo da espécie.

Em relação às plantas de *M. flavescens* oriundas de cultivo *in vitro* com a utilização dos reguladores de crescimento, recomenda-se, para fins de aclimatização, a utilização de AIB na ausência de TDZ, a fim de otimizar um maior desenvolvimento do sistema radicular e parte aérea, resultando em maiores chances de sobrevivência no período *ex vitro*.

Finalizando, considerando a alta mortalidade das plantas aclimatizadas em condições naturais, com grande variação de temperatura e umidade, recomenda-se a aclimatização inicial em local com condições controladas e homogêneas de luz, temperatura e umidade.