

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE, ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO

ANÁLISE DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL *IN*
***VITRO*, E ACLIMATIZAÇÃO DE *ENCYCLIA FLAVA* (LINDL.) PORTO &**
BRADE (ORCHIDACEAE)

JADERSON RONEY GOMES DE OLIVEIRA

PORTO NACIONAL – TOCANTINS

2018

JADERSON RONEY GOMES DE OLIVEIRA

ANÁLISE DA MULTIPLICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL *IN VITRO*, E ACLIMATIZAÇÃO DE *ENCYCLIA FLAVA* (LINDL.) PORTO & BRADE (ORCHIDACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ecologia e Conservação.

Orientador: Dr. Wagner de Melo Ferreira

Co-orientadora: Dr^a. Kellen Lagares Ferreira Silva

PORTO NACIONAL – TOCANTINS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

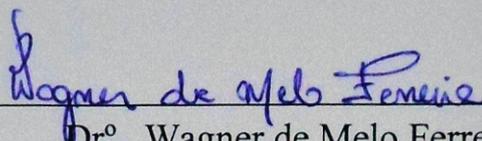
- O48a Oliveira, Jaderson Roney Gomes de.
Análise da multiplicação e desenvolvimento inicial in vitro, e
aclimatização de *Encyclia flava* (Lindl.) Porto & Brade (Orchidaceae). /
Jaderson Roney Gomes de Oliveira. – Porto Nacional, TO, 2018.
35 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Porto Nacional - Curso de Pós-Graduação
(Mestrado) em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, 2018.
Orientador: Wagner De Melo Ferreira
Coorientadora : Kellen Lagares Ferreira Silva
1. Pigmentos fotossintéticos. 2. Análise morfoanatômica. 3. Estiolamento.
4. Aclimatização. I. Título

CDD 577

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

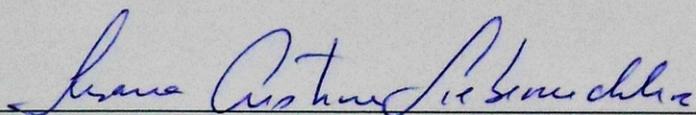
**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

BANCA EXAMINADORA



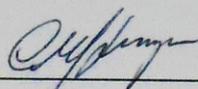
Drº. Wagner de Melo Ferreira

Universidade Federal do Tocantins - UFT (Presidente)



Drª. Susana Cristine Siebeneichler

Universidade Federal do Tocantins - UFT



Drº. Clovis Maurílio de Souza

Universidade Federal do Tocantins - UFT

Aprovada em: 16 de março de 2018

Local de defesa: Auditório do Neamb

Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Porto
Nacional - To

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo de bom que me aconteceu e por ter chegado onde estou hoje.

Aos meus pais, Maria das Graças e Getúlio Rodrigues, principalmente à minha mãe que independente de todos os problemas por qual passei sempre conseguia um jeito de me ajudar a superá-los. Aos meus irmãos, Gracivânia, Leiliane, Jader e Geisa, e à minha sobrinha Amanda, que sempre me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Agradeço também todos os meus familiares (avó, tios, primos, etc.) por acreditarem em mim e sempre me incentivarem a seguir em frente.

Ao meu amigo e orientador Wagner de Melo pela orientação, confiança, oportunidade e ensinamentos. À minha co-orientadora Kellen Lagares pelo incentivo a todo momento do trabalho. Mesmo nas horas em que nada dava certo ela sempre se manteve confiante e otimista independente de qualquer coisa.

A todos do laboratório de Cultivo de Plantas *in vitro* (Neamb-UFT) pela ajuda e apoio nos meus experimentos.

Aos todos os meus amigos, seja da faculdade ou não, que além do apoio ainda me faziam dar uma pausa na dissertação de vez em quando para algum momento de descontração. Principalmente àqueles que faziam questão de me tirar de casa nos fins de semana, me fazendo perceber a cada dia que uma dissertação não pode, e nem deve ser um motivo para se deixar a vida pessoal em segundo plano. A todos estes, meu muito obrigado por me fazer lembrar, principalmente nesses últimos dois anos, que independente da responsabilidade que eu tenha, minha vida pessoal sempre será prioridade.

Um agradecimento mais que especial para as pessoas que mais conviveram comigo até aqui, tenho muito a agradecer pela amizade de vocês. Muito obrigado Laís, Marinna, Ozana, Esmeralda, Orimar e Aline.

Ao PPGBEC por me proporcionar algumas das melhores experiências profissionais que eu poderia ter. Aos docentes deste programa pelos ensinamentos

nesses dois anos que se passaram. À CAPES pela bolsa de estudo, que foi de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Não deixe as pessoas te colocarem na
tempestade delas, coloque-as na sua paz.”*

(Buda)

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1 Descrição da espécie.....	10
2.2 Efeitos dos meios MS, KC e VW na multiplicação e desenvolvimento <i>in vitro</i>	11
2.3 Análise morfoanatômica.....	12
2.4 Micropropagação a partir de segmentos caulinares estiolados.....	12
2.5 Aclimatização	13
2.6 Análises estatísticas	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1 Efeitos dos meios MS, KC e VW na multiplicação e desenvolvimento <i>in vitro</i>	14
3.2 Análise morfoanatômica.....	18
3.3 Micropropagação a partir de segmentos caulinares estiolados.....	23
3.4 Aclimatização	24
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERÊNCIAS	28

RESUMO

Devido ao extrativismo e degradação de habitats, especialmente no Cerrado, muitas espécies estão desaparecendo dos seus ambientes naturais. Uma das formas de subsidiar a conservação de espécies orquídeas é a utilização das técnicas de cultivo *in vitro*. Essa metodologia tem sido bastante utilizada tanto para fins científicos quanto para fins comerciais. Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar aspectos envolvidos com a multiplicação, o desenvolvimento inicial *in vitro* e a aclimatização de *Encyclia flava* (Orchidaceae). Foi testada a influência de três meios de cultura no desenvolvimento *in vitro* dessa espécie: o meio de Knudson (1946) [KC], o meio de Vacin e Went (1949) [VW], e o meio de Murashige e Skoog (1962) nas concentrações de 50% [$\frac{1}{2}$ MS] e 100% [MS] de seus macronutrientes. Com a finalidade de descrever aspectos estruturais relacionados com a germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* de *E. flava*, foram realizados estudos morfoanatômicos. Verificou-se também a possibilidade de se multiplicar a espécie por meio de segmentos caulinares crescidos na ausência de luminosidade. Finalmente, foi desenvolvido um protocolo para aclimatização de *E. flava* utilizando-se substratos comerciais. O meio MS foi o mais favorável para a multiplicação e desenvolvimento *in vitro* de *E. flava*. É bastante provável que a maior produção de pigmentos fotossintéticos detectada nas plantas crescendo nesse meio tenha contribuído para esse resultado. As análises morfoanatômicas revelaram que, morfológicamente, a germinação e o crescimento inicial *in vitro* de *E. flava* é muito semelhante ao de outras Orchidaceae, além de apresentar algumas características estruturais comuns a outras espécies dessa família que possuem hábito epifítico mesmo quando cultivada sob condições *in vitro*. Embora em baixas proporções, foi possível realizar a propagação de *E. flava* por meio de segmentos caulinares estiolados. Para a aclimatização da espécie em estudo, os resultados obtidos sugerem que as plantas cultivadas *in vitro* devam ser inicialmente transferidas para recipientes comunitários contendo substrato formado por contendo Bioplant e Esfagno na proporção de 2:1 (v:v). Após 60 dias os indivíduos devem ser transplantados para vasos individuais contendo novo substrato composto por Ouro Negro e Bioplant na proporção de 3:1 (v:v). Com essa metodologia, a taxa de sobrevivência final das plantas é de 65%.

Palavras-Chave: Pigmentos fotossintéticos; Análise morfoanatômica; Estiolamento; Aclimatização

ABSTRACT

Due to extractivism and habitats degradation, especially in the Cerrado, lots of species are disappearing from their natural environments. One of the ways to subsidizing orchids species conservation is the use of *in vitro* culture techniques. This methodology has been used for both scientific and commercial purposes. In this context the objective of this work was to study aspects involved with multiplication, initial *in vitro* development and acclimatization of *Encyclia flava* (Orchidaceae). Was tested the influence of three culture medium in the development of that species: Knudson (1946) medium [KC], Vacin & Went (1949) medium [VW], and Murashige & Skoog (1962) on 50% [$\frac{1}{2}$ MS] e 100% [MS] of their macronutrients. With the finality of describe structural aspects related to the germination and *in vitro* initial development of *E. flava* was realized anatomical studies. Was verified the possibility of to multiply that species through the segments grown in the dark. Finally, was developed a protocol to acclimatization of *E. flava* using commercial substrate. The MS medium was the most favorable for the *in vitro* multiplication and development of *E. flava*. It is probable that the higher production of photosynthetic pigments detected in this medium contributed to this result. The morphological analysis revealed that morphologically the germination and initial *in vitro* growth of *E. flava* is very similar to that of other Orchidaceae, besides presenting some structural characteristics common to other species of this family that have an epiphytic habit even when cultivated under *in vitro* conditions. Even in low proportions, it was possible to propagate *E. flava* through etiolated stem segments. For the acclimatization of the species under study, the results obtained suggest that *in vitro* cultured plants should be initially transferred to community vessels containing the substrate formed by containing Bioplant and Esfagno in a ratio of 2: 1 (v: v). After 60 days, individuals should be transplanted into individual vessels containing a new substrate composed of Ouro Negro and Bioplant in the proportion of 3: 1 (v: v). With this methodology, the final survival rate of the plants is 65%.

Keywords: Photosynthetic pigments; Morphoanatomical analysis; Etiolation; Acclimatization

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores e mais diversas famílias dentro do grupo das angiospermas. Compreende cerca de 25.000 espécies e mais de 800 gêneros de distribuição cosmopolita. No Brasil foram descritos 235 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (GALDIANO JUNIOR et al., 2013; SHIBU et al., 2012). As regiões tropicais e subtropicais abrigam um número muito maior de espécies desta família (FORSTER; SOUZA, 2013). Estima-se que 800 espécies são identificadas e adicionadas à lista de espécies orquídeas mundialmente por ano (BEKTAŞ; CÜCE; SÖKMEN, 2012). Porém, devido ao extrativismo e degradação de habitats, muitas espécies estão desaparecendo dos seus ambientes naturais (SCHNEIDERS et al., 2012).

Essa família é considerada a terceira com maior representatividade no Cerrado, com 697 espécies distribuídas em 125 gêneros (BARROS et al., 2015). As espécies que ocorrem nesse complexo vegetacional possuem nichos bastante especializados, o que as tornam extremamente sensíveis a interferências em seus habitats (SOUZA-LEAL; PEDROSO-DE-MORAES, 2014). De acordo com Ishara (2010) somente a região central do Cerrado perde cerca de 2,2 milhões de hectares de vegetação nativa por ano. Como cerca de 80% das espécies de orquídeas no Cerrado são epifíticas e terrícolas (os outros 20% apresentam-se como rupícolas, saprofíticas e escandentes), essa destruição afeta fortemente essas espécies.

Uma das formas de subsidiar a conservação de espécies orquídeas é a utilização das técnicas de cultivo *in vitro* (PONERT et al., 2013; WOTAVOCÁ-NOVOTNÁ et al., 2007). Essa metodologia tem sido bastante utilizada tanto para fins científicos quanto para fins comerciais. Considerando o elevado número de espécies de orquídeas, estudos anatômicos relacionados com a germinação e desenvolvimento de membros dessa família ainda bastante escassos (MAJEROWICZ et al., 2000; KRAUS; KERBAUY; MONTEIRO, 2006). Esses estudos são de grande importância para a compreensão das adaptações das plantas a determinados ambientes (FERREIRA et al., 2015). Esses estudos são particularmente importantes nas fases iniciais de desenvolvimento, pois auxiliam no entendimento das diversas respostas fisiológicas das plantas durante essa etapa, que é uma das mais críticas no ciclo de vida de muitas espécies.

Antes de serem levadas para o ambiente natural, as planas produzidas *in vitro* necessitam de um período gradual de aclimatização para que possam sobreviver às condições *ex vitro*. Nesse novo ambiente as plantas estarão sujeitas, dentre outros fatores, a consideráveis variações abióticas. Essa é uma etapa considerada crucial para as plantas produzidas *in vitro*, pois seu sucesso depende de diversos fatores como temperatura, umidade, nutrientes, luminosidade, dentre outros (DÍAZ et al., 2010; DORNELES; TREVELIN, 2011). Dentre esses outros fatores, Kämpf (2000) destaca que a sobrevivência das plantas nessa fase depende também do tipo de substrato a ser utilizado para o transplântio, que deve ter boa capacidade para retenção adequada de água e, ao mesmo tempo, favorecer as trocas gasosas das raízes.

Dentre os vários fatores que afetam o desenvolvimento das plantas *in vitro* a luminosidade é um fator determinante. De maneira geral, na ausência de luz a planta se alonga e apresenta-se com uma coloração amarela ou esbranquiçada; tal processo é denominado de estiolamento (SUZUKI; KERBAUY; ZAFFARI, 2004). Durante o estiolamento as plantas apresentam uma redução na lignificação e suberização das células, o que tornam as paredes celulares mais finas, além do fato de que apresentam coloração amarela ou esbranquiçada devido à ausência de clorofila. A segmentação dos caules estiolados, isolando as gemas, promove o desenvolvimento destas pelo fato de alterar o balanço hormonal entre auxinas e citocininas no explante (CHAER, 2012). No cultivo *in vitro* de orquídeas essa técnica pode ser utilizada para propagar diversas espécies, pois a maioria das orquídeas possui filotaxias onde os nós são muito próximos uns dos outros. Com isso, o alongamento do caule permite a separação desses nós individualmente (SUZUKI; KERBAUY; ZAFFARI, 2004) de modo que os segmentos caulinares contendo as gemas possam ser facilmente separados.

Dos diversos gêneros que compõem a família Orchidaceae, o gênero *Encyclia* Hook., ao qual pertence a espécie objeto deste estudo (*Encyclia flava*), apresenta cerca de 120 espécies distribuídas desde os Estados Unidos até a região sul do Brasil e Norte da Argentina (MENEGUZZO; BIANCHETTI; PROENÇA, 2010). No Brasil são descritas 54 espécies das quais 42 são endêmicas. Nesse gênero existem diversas espécies adaptadas a diferentes condições ambientais, desde ambientes secos a regiões paludosas. Podem apresentar hábitos epifíticos, rupícola e terrícola (BASTOS; VAN DEN BERG; MENEGUZZO, 2012).

Devido a problemas ambientais, geralmente causados por fatores antrópicos ou até mesmo o intenso extrativismo que ocorrem nas áreas de abrangência do Cerrado, são recomendados estudos detalhados que visam a conservação da biodiversidade. Para a família Orchidaceae estudos que propõem alternativas de cultivo são essenciais para espécies potencialmente ameaçadas ou que estejam sujeitas a possíveis ameaças (SHERLOCK, 2009). Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar aspectos envolvidos com a multiplicação, o desenvolvimento inicial *in vitro* e a aclimatização de *Encyclia flava* (Orchidaceae).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo de Plantas *in vitro* da Seção de Propagação e Desenvolvimento de Plantas do Cerrado (SPDPC), no Núcleo de Estudos Ambientais (Neamb) da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus de Porto Nacional.

2.1. Descrição da espécie

A espécie escolhida para o presente trabalho, *Encyclia flava* (Lindl.) Porto & Brade, ocorre naturalmente no Cerrado tocantinense, sendo, portanto, considerada nativa dessa região (MENDONÇA et al., 1998). Trata-se de uma epífita que ocorre nos estados do Paraná, São Paulo, oeste de Minas, Goiás, Tocantins e Amazonas. No Tocantins é encontrada principalmente nas matas de galerias e nos Cerradões. Sua altura pode atingir até 25 cm de comprimento. Seus pseudobulbos são cônicos, bifoliados de 2 cm de comprimento por 1,5-1,7 cm de largura (Fig. 1). O período de floração dessa espécie é de setembro a dezembro (CASTRO NETO, 2004). Devido as ações antrópicas, *E. flava* e outras espécies do mesmo gênero são consideradas bioindicadoras ambientais da conservação de diversos locais (SHERLOCK, 2009).

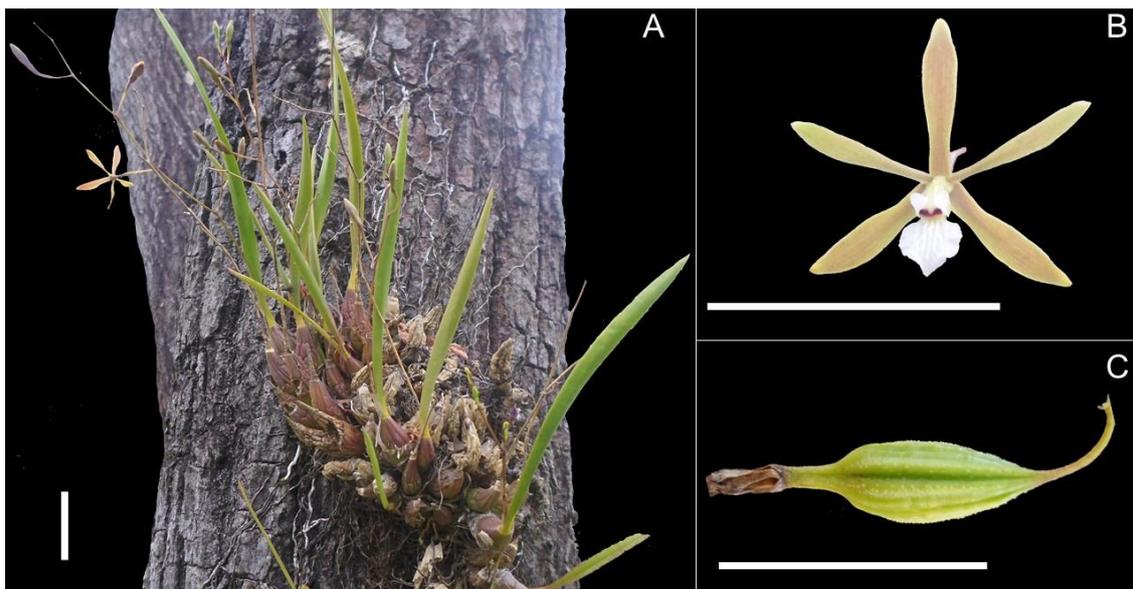


Figura 1: Planta crescendo em ambiente natural (A), flor isolada (B) e fruto (C) de *Encyclia flava*. Barra= 3 cm.

2.2. Efeitos dos meios MS, KC e VW na multiplicação e desenvolvimento *in vitro*

Plantas de *E. flava* com 90 dias de idade, obtidas por meio da germinação *in vitro* em meio Knudson (1946), foram transferidas para frascos com capacidade para 200 mL, fechados com tampas plásticas, contendo 40 mL de meio de cultura. Foi testada a influência de três meios de cultura no desenvolvimento *in vitro*: o meio de Knudson (1946) [KC], o meio de Vacin e Went (1949) [VW], e o meio de Murashige e Skoog (1962) nas concentrações de 50% [$\frac{1}{2}$ MS] e 100% [MS] de seus macronutrientes, todos suplementados com $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiamina, 100 mg.L^{-1} de mioinositol e 2% de sacarose. O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição de 0,2% de Phytigel. Todos os meios foram autoclavados a 120° C por 20 minutos.

Para cada meio de cultura foram realizadas vinte repetições, que consistiram em plantas de $0,5 \pm 0,2$ cm de comprimento. Todas as plantas tiveram suas raízes eliminadas com o objetivo de padronizar as repetições. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $26^\circ \text{ C} \pm 1^\circ \text{ C}$ e um fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de $35\text{-}40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, obtidas por meio do uso de lâmpadas fluorescentes. Após 90 dias de cultivo os resultados foram avaliados a partir da análise dos seguintes parâmetros: altura da planta (cm), número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), número de folhas e número de brotos formados.

Para cada meio de cultura utilizado acima foram determinados teores de pigmentos fotossintéticos das plantas por meio do método da colorimetria proposto por

Arnon (1949) modificado para o presente trabalho. Para isto, 1g do material fresco de cada tratamento (brotos oriundos dos meios de cultura) foi imerso em 5 mL de solução de Dimetilsulfóxido (DMSO), contida em tubos de ensaio totalmente cobertos com papel alumínio para impedir a entrada de luz. Foram realizadas oito repetições, cada repetição consistiu de um tubo de ensaio com 1g de material vegetal. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 30 horas. Após este período foram realizadas as leituras da densidade ótica da solução a 470, 645 e 663 nm utilizando-se um espectrofotômetro Digimed, modelo DM-ESPEC. Para a obtenção da massa seca, os brotos (1g) foram secados por 48 horas em estufa a 50°C, após a extração dos pigmentos. Os teores de clorofila e carotenoides foram determinados através das seguintes equações propostas por Arnon (1949), e Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila a} = (12,7.A_{663} - 2,69.A_{645}/1000*MS).volume$$

$$\text{Clorofila b} = (22,9.A_{645} - 4,68.A_{663}/1000*MS).volume$$

$$\text{Clorofila total} = (20,2.A_{663} - 2,69.A_{645}/1000*MS).volume$$

$$\text{Carotenoides} = (1000.A_{470}).(1,82.Clor. a)+(85,02.Clor. b).(198).volume$$

em que A_{663} = absorvância a 663 nm; A_{645} = absorvância a 645 nm; A_{470} = absorvância a 470 nm; V = volume da amostra (mL); e MS = massa seca da amostra. Os valores das equações foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de massa seca do material.

2.3. Análise morfoanatômica

Sementes de *E. flava* oriundas de frutos obtidos de plantas matrizes crescendo em ambiente natural e/ou viveiro foram postas para germinar em 5 frascos de vidros, com capacidade para 100 mL fechados com tampas plásticas e contendo 40 mL do meio de cultura Knudson (1946) [KC], como proposto por Oliveira (2015), suplementado com 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 2% de sacarose antes da adição de 0,2% de Phytigel. O pH foi ajustado a 5,8 ± 0,1. Noventa dias após o início da germinação foi coletado o material para análise. Foram considerados 4 estágios de desenvolvimento: estágio 1 – embriões entumecidos de coloração verde (protocormos); estágio 2 – protocormo com uma folha diferenciada; estágio 3 – protocormo com duas ou mais folhas; estágio 4 – planta com folhas e raízes. As amostras coletadas foram divididas de acordo com os estágios de desenvolvimento anteriormente citados e fixadas

em FAA₅₀ e incluídas em parafina + cera de abelha 8% (Johansen, 1940). Os cortes foram obtidos em micrótomo rotativo Leica RM2245 e corados em Azul de Astra 1% e Safranina 1%, como proposto por Gerlach (1984). Os cortes foram feitos a 10µm de espessura e aderidos às lâminas com adesivo de Haupt. As lâminas foram montadas utilizando Bálsamo do Canadá. As imagens foram obtidas em câmera Leica ICC50 HD acoplada ao microscópio óptico Leica DM 500.

2.4. Micropropagação a partir de segmentos caulinares estiolados

Plantas de 3±0,2 cm de comprimento, obtidas por meio de germinação *in vitro*, como descrito no item anterior, foram transferidas para frascos com capacidade para 350 mL, contendo 50 mL de meio de cultura Murashige e Skoog (1962) [MS] suplementado com 4% de sacarose (de acordo com Ferreira et al. 2011), 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição de 0,2% de Phytigel. Os frascos permaneceram 150 dias no escuro em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1°C. Após esse período os caules estiolados foram divididos em segmentos de aproximadamente 1 cm contendo uma gema axilar. Esses segmentos foram transferidos para 25 frascos de vidro cada um contendo 6 segmentos caulinares. O meio de cultura utilizado foi o MS e foram testadas diferentes combinações de benziladenina (BA) e ácido naftalenoacético (ANA) (em combinações de 0-0; 2,28-0,57; 4,56-1,14; 2,28-0 e 4,56-0 µM) no desenvolvimento das gemas. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 35-40 µmol. m⁻².s⁻¹. Os resultados foram avaliados 60 dias após a transferência para a presença de luz. Foi considerada para a análise a porcentagem de segmentos caulinares estiolados que originaram brotos e raízes.

2.5. Aclimatização

Para o processo de aclimatização foram utilizadas 120 plantas (com raízes, folhas e pseudobulbos já formados ou em formação) oriundas de cultivo *in vitro*, as quais foram lavadas em água corrente, para a remoção do meio de cultura das raízes, e transferidas para 12 recipientes plásticos, com 16 cm de altura x 12 cm de diâmetro basal com tampas transparentes, cada um contendo 10 plantas. Foi testado o substrato composto por Bioplant [Nova Ponte, MG] e Esfagno triturado nas proporções de 1:0;

1:1 e 2:1 (cada tratamento com 4 recipientes plásticos [parcelas], totalizando 40 repetições por tratamento). Os recipientes permaneceram fechados e foram mantidos em sala de crescimento por 60 dias com uma irrigação de 250 mL de água a cada 15 dias, realizada com o auxílio de um borrifador (Fase 1). Após esse período, os resultados foram avaliados a partir da análise das seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência, número de brotos, altura das plantas (da base até a altura da folha mais jovem), número de folhas e número de raízes por planta formada, bem como o comprimento da maior raiz. Passados os 60 dias, 100 plantas foram transferidas para vasos plásticos individuais (7 cm altura x 6 cm de diâmetro basal) contendo o substrato Ouro Negro e Bioplant nas proporções de 1:0; 0:1; 1:1; 2:1 e 3:1 [v:v] (20 plantas para cada tratamento). As plantas foram irrigadas diariamente até o ponto de capacidade de campo do substrato e suas folhas pulverizadas com água deionizada durante 3 meses (Fase 2). Nesta segunda fase foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência, altura das plantas, número de folhas, raízes e brotos laterais formados, comprimento da maior raiz e massa da matéria seca da parte aérea e da raiz.

2.6. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente ao acaso. A análise de variância (ANOVA) foi usada na maioria dos experimentos para avaliar as variáveis estudadas e as médias comparadas pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade. Para o experimento de micropropagação a partir de segmentos caulinares estiolados, por não apresentar normalidade dos dados, mesmo após transformações, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis também no nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram feitas utilizando o software estatístico R (versão 3.4.2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeitos dos meios MS, KC e VW na multiplicação e desenvolvimento *in vitro*

Após 90 dias de cultivo *in vitro* não foram detectadas diferenças significativas entre os meios testados para a maioria das variáveis analisadas (Tab. 1). Todavia, verificou-se que as plantas de *E. flava* apresentaram melhor desenvolvimento no meio MS.

Em relação ao número de brotos e folhas formados verificou-se que o meio MS foi significativamente superior ao KC (0,45 e 6,20, respectivamente). Tais resultados podem estar associados à quantidade de sais presentes nos meios testados, uma vez que o meio MS apresenta altas concentrações de macronutrientes em relação aos outros meios. Os meios KC e VW possuem comparativamente quantidades relativamente baixas de nutrientes. Suzuki et al. (2009) também observaram que o meio MS favoreceu uma maior produção de folhas de *Hadrolaelia tenebrosa*, sendo significativamente melhor que o meio KC que apresentou o menor número de folhas, fato esse também observado em *E. flava*. Ferreira et al. (2017), trabalhando com *Alatiglossum fuscopetalum*, perceberam que o meio ½MS mostrou ser o meio mais eficiente para produção de brotos, porém não diferiu significativamente do meio MS; os meios VW e KC foram significativamente inferiores para essa variável. Comparando tais informações com os resultados do presente trabalho nota-se que meios com baixas concentrações de nutrientes não são indicados para produção de brotos e folhas tanto dessas espécies quanto para *E. flava*.

Tabela 1: Efeito dos meios de cultura Knudson (KC), Murashige e Skoog (MS e ½ MS) e Vacin e Went (VW) na multiplicação e desenvolvimento inicial *in vitro* de *Encyclia flava*. ALT= Altura (cm) NR= Número de raízes; CMR= Comprimento da maior raiz (cm); NF= número de folha; NB= Número de brotos. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Meios de cultura	NB	NF	NR	CMR	ALT
KC	0,00b	4,15b	3,25a	1,56a	1,37a
MS	0,45a	6,20a	3,45a	1,57a	1,51a
½ MS	0,20ab	4,95ab	2,95a	2,05a	1,36a
VW	0,10ab	4,90ab	3,55a	1,78a	1,49a

Os resultados relacionados ao número de raízes de *E. flava* não demonstraram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os meios testados. No entanto, o meio VW apresentou o maior valor para esta variável (3,55 raízes por planta). Segundo Lemes et al. (2016), meios com concentrações elevadas de nutrientes interferem no enraizamento *in vitro* de algumas espécies. Estes autores recomendam ainda a utilização de meios com baixas concentrações de sais quando o objetivo do cultivo for a formação de raízes. Suzuki et al. (2009) também verificaram que o meio VW foi o mais eficaz para a formação de raízes em *H. tenebrosa*. Entretanto, esses autores observaram que o meio

MS apresentou um número significativamente menor de raízes, o que não foi observado em *E. flava* uma vez que o meio MS apresentou a segunda maior média para número de raízes, não diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) do meio VW. É provável que a formação de raízes em *E. flava* seja menos sensível a concentrações mais elevadas de nutrientes. Ferreira et al. (2017) observaram que para *A. fuscopetalum* o enraizamento foi favorecido quando se utilizou o meio $\frac{1}{2}$ MS. Rego-Oliveira e Faria (2005), relataram que o meio MS foi mais eficaz para o enraizamento de *Catasetum fimbriatum*, enquanto que o meio KC demonstrou ser mais eficiente para *Cyrtopodium paranaenses* considerando a mesma variável. Assim torna-se necessário fazer o estudo dos meios de cultura já que as plantas respondem de forma diferente a cada meio.

Para o comprimento da maior raiz, observou-se que o meio $\frac{1}{2}$ MS apresentou a maior média (2,05 cm), não diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) dos demais. Resultados bastante semelhantes foram encontrados por Ferreira et al. (2017) para *A. fuscopetalum*, ou seja, o meio $\frac{1}{2}$ MS foi o que apresentou plantas com maiores comprimentos de raízes quando comparado aos outros meios de cultura (os mesmos testados no presente estudo). Em *H. tenebrosa*, Suzuki et al. (2009) também verificaram que as plantas cultivadas em meio VW (que possui baixa concentração de nutrientes) foram as que apresentaram maior comprimento de raízes. Silva (2003) argumenta que plantas cultivadas em meios com baixas concentrações de macronutrientes tendem a aumentar o comprimento da raiz em busca de mais nutrientes, mesmo que isso signifique um maior gasto de reservas. Assim, é possível que para algumas espécies de orquídeas meios com concentrações mais baixas de nutrientes sejam mais eficientes para o crescimento longitudinal das raízes. Essa característica é bastante relevante principalmente porque raízes mais longas apresentam maior possibilidade de explorar o substrato e assim absorver quantidades mais elevadas de nutrientes, o que auxilia a fase de aclimatização.

Em relação à altura das plantas, não houve diferença significativa entre os meios testados, porém verificou-se que o meio MS foi o que apresentou o maior valor (1,51 cm), seguido do meio VW (1,49 cm). Em *A. fuscopetalum* a maior média de altura foi verificada no meio $\frac{1}{2}$ MS (FERREIRA et al., 2017). O meio VW foi o mais favorável para o crescimento em altura de *H. tenebrosa* (SUZUKI et al., 2009) e *Cattleya bicolor* (SUZUKI et al., 2010). Tais resultados diferem do observado neste trabalho, onde foi verificado que o meio com maior concentração de nutrientes promoveu o melhor resultado. No entanto, o fato de não ter sido observada uma diferença significativa entre

os meios testados indica que *E. flava* consegue apresentar crescimento satisfatório *in vitro* independente da concentração de nutrientes disponíveis no meio.

Os pigmentos fotossintéticos são componentes essenciais e de grande importância para o processo da fotossíntese e, por isso, estão diretamente relacionados com a multiplicação celular e desenvolvimento das plantas (FAVETTA et al., 2017). A tabela 2 mostra os teores de pigmentos fotossintético sem plantas de *E. flava* quantificados após 90 dias de cultivo nos meios testados. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os meios analisados, entretanto o meio MS apresentou valores numericamente maiores que os demais. É possível que os maiores teores de clorofila encontrados em plantas se desenvolvendo no meio MS tenha favorecido a maioria das variáveis relacionadas ao desenvolvimento inicial *in vitro*, como observado acima. Em relação aos teores de clorofila *a* o meio MS apresentou $9,14 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca. O mesmo meio também apresentou $3,06 \mu\text{g.g}^{-1}$ para clorofila *b* e $14,54 \mu\text{g g}^{-1}$ para clorofila total. Esses valores podem estar relacionados com a alta concentração de nutrientes no meio MS, se comparado aos demais meios. Os valores relativos aos teores de carotenoides e proporção entre clorofila *a*/clorofila *b* também foram maiores nas plantas cultivadas no meio MS: $199,60 \mu\text{g g}^{-1}$ e $3,36 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 2: Teores de pigmentos fotossintetizantes (em $\mu\text{g/g}$ de matéria seca) em plantas de *Encyclia flava* nos meios de cultura Knudson (KC), Murashige e Skoog (MS e $\frac{1}{2}\text{MS}$), e VacineWent (VW). *Ca/Cb*= proporção entre clorofila *a* e clorofila *b*. ns= não significativo, segundo análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade.

Tratamentos/Meios	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total	Carotenoides	<i>Ca/Cb</i>
KC	6,05 ns	2,63 ns	9,62 ns	176,14 ns	2,28 ns
MS	9,14 ns	3,06 ns	14,54 ns	199,60 ns	3,36 ns
$\frac{1}{2}\text{MS}$	6,16 ns	2,07 ns	9,80 ns	160,61 ns	3,19 ns
VW	7,31 ns	2,66 ns	11,63 ns	192,09 ns	2,84 ns

Ferreira (2014) cita que o teor de clorofila nas plantas apresenta correlação positiva com o teor de nitrogênio. Isto se deve principalmente ao fato da maior parte do nitrogênio total presente nas folhas ser integrante tanto da molécula de clorofila quanto

de enzimas associadas aos cloroplastos. Tal informação corrobora com os resultados do presente trabalho, já que o meio MS possui maiores concentrações desse nutriente quando comparado aos demais meios. Assim como nos resultados deste trabalho, Paiva Neto et al. (2013) afirmam ainda que valores menores de clorofila (*a*, *b* e total) em plantas crescidas no meio KC, quando comparados às do MS, estão relacionados ao fato do meio KC possuir menores concentrações de nitrogênio em sua composição. Porém, altos valores de clorofila não significam necessariamente uma melhor taxa fotossintética (FAVETTA et al., 2017).

A clorofila é fundamental para o processo fotossintético das plantas (STÖCKEL; MEYER; GEBAUER, 2011). A clorofila *a* tem como função ampliar a quantidade de fótons para o centro de reação da fotossíntese. Por outro lado, a clorofila *b* amplia a faixa de luz, em comprimentos de ondas, que podem ser usados no processo fotossintético; sendo considerada um pigmento acessório (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Segundo Galdiano Júnior et al. (2012), maiores valores de clorofila *b* em plantas cultivadas *in vitro* podem estar relacionados a condições luminosas limitantes. Pacheco et al. (2013) cita ainda que altos teores de clorofila *b* pode ser considerada uma característica importante para adaptação de plantas a ambientes com baixa intensidade luminosa. Essas características não foram verificadas no presente estudo, podendo esse ser um indicativo que as condições de luminosidade foram satisfatórias para o desenvolvimento das plantas sob condições *in vitro*. Na maioria das plantas de folhas verdes a clorofila *b* equivale cerca de um quarto do conteúdo total de clorofila (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), mantendo assim os valores da proporção de clorofila *a*/clorofila *b* geralmente próximos de 3. As proporções encontradas no presente estudo nas plantas cultivadas nos meios MS e ½ MS estão bem equivalentes aos relatados por esses últimos autores. Os carotenoides, por sua vez, possuem duas funções essenciais para as plantas: atuam como pigmentos acessórios capturando energia luminosa e transferindo-as para a clorofila *a*, e apresentam capacidade fotoprotetora, protegendo o aparelho fotossintético de danos fotoinibitórios (VENTURA, 2007). Logo, tanto os carotenoides quanto as clorofilas são indispensáveis para o processo fotossintético nas plantas.

3.2. Análise morfoanatômica

O processo de germinação das espécies da família Orchidaceae se inicia com a ruptura do tegumento do embrião seguida pela formação de uma estrutura esférica clorofilada denominada protocormo [Estágio 1]. Na superfície desse protocormo surgem, inicialmente, os primórdios foliares [Estágio 2] e em seguida alguns rizoides. Os protocormos aumentam de tamanho e então são formadas as primeiras folhas [Estágio 3] e depois raízes [Estágio 4] (KRAUS; KERBAUY; MONTEIRO, 2006).

As análises morfoanatômicas realizadas no presente trabalho mostraram que em *E. flava*, os quatro estágios de desenvolvimento são bem definidos e nitidamente diferenciáveis (Fig. 2). No primeiro estágio de desenvolvimento é possível visualizar nos protocormos a presença de células predominantemente parenquimáticas com núcleos bem evidentes e epiderme unisseriada (Fig. 2A). Em alguns casos também é possível perceber o início da formação de células meristemáticas, evidenciando uma polarização no protocormo. O polo superior do protocormo caracteriza-se pela presença de células em tamanho menor que o polo inferior e uma alta taxa mitótica nessa região (Fig. 2A). Vale ressaltar que nem todos os protocormos analisados apresentavam o mesmo tipo de desenvolvimento. O mesmo comportamento foi observado por Ferreira et al. (2018, no prelo) em estudos morfoanatômicos em protocormos de *Catasetum macrocarpum*, que assim como *E. flava* também é uma espécie nativa do Cerrado.

O segundo estágio de desenvolvimento é caracterizado pela diferenciação do primeiro primórdio foliar, além do surgimento de alguns rizoides unicelulares e pluricelulares (Fig. 2B). Os rizoides são tricomas presentes na parte inferior do protocormo e são responsáveis tanto pela absorção de nutrientes quanto pela fixação inicial deste protocormo nos forófitos (KRAUS; KERBAUY; MONTEIRO, 2006). Quando cultivados *in vitro*, os protocormos obtêm os nutrientes necessários a partir do meio de cultura. Logo, os rizoides são estruturas importantes para o desenvolvimento inicial devido a sua função de absorção de nutrientes, porém não são essenciais já que é possível obter um bom desenvolvimento mesmo que a planta não apresente tal estrutura (FERREIRA et. al., 2018, no prelo). Segundo Kraus, Kerbauy e Monteiro (2006), os rizoides são estruturas comuns em espécies de orquídeas, tanto em protocormos cultivados *in vitro*, quanto *in natura*.

A partir do estágio 3 (Fig. 2C) já é possível perceber a diferenciação de mais de uma folha. Verificou-se que as folhas de *E. flava* são anfiestomáticas (Figs. 2E e 2F), o

que não é comumente visto em outras espécies da mesma família. Isto pode estar relacionado ao fato das folhas analisadas estarem ainda em desenvolvimento, pois a grande maioria dos estômatos visualizados localizavam-se na superfície abaxial das folhas. Zanega-Godoy e Costa (2003) citam que durante a fase de desenvolvimento das orquídeas ocorrem várias alterações nas características estomática, o que pode induzir a erros de interpretação se comparadas com análises da mesma espécie na maturidade. Os mesmos autores, estudando anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya*, verificaram que *C. walkeriana*, *C. nobilior*, *C. araguaiensis* e *C. bicolor* apresentaram folhas hipoestomáticas. O mesmo foi observado nas espécies *Oeceoclades maculata* (RIVERÓN-GIRÓ et al., 2017) e *Cattleya violacea* (SAONCELLA; MARTELINE; PEDROSO-DE-MORAES, 2017). A presença de folhas hipoestomáticas é uma característica comum em espécies da família *Orchidaceae* e já foi observada para várias espécies da tribo *Epidendroideae* (tribo a qual pertence a *E. flava*) e das subtribos *Oncidiinae*, *Pleurothallidinae*, *Orchidinae*, *Catasetinae* e *Laeliinae* (SAONCELLA; MARTELINE; PEDROSO-DE-MORAES, 2017). O mesofilo das folhas de *E. flava* é composto por parênquima clorofiliano do tipo homogêneo. Em geral o mesofilo das folhas das orquídeas apresenta parênquima clorofiliano homogêneo (SILVA e MILANEZE-GUTIERRE, 2004). Foi observado, no interior das células do mesofilo da espécie em estudo, a presença de cristais de oxalato de cálcio do tipo ráfide (Fig. 2F). Nas orquídeas, estes cristais são responsáveis principalmente por tornar as folhas menos palatáveis aos animais, dificultando assim a herbivoria. Esta característica é considerada comum entre as espécies da família *Orchidaceae* (SAONCELLA; MARTELINE; PEDROSO-DE-MORAES, 2017). Foram observados 3 feixes vasculares do tipo colateral nas folhas de *E. flava* (Fig. 2E). O mesmo foi observado por Andreota, Barros e Sajo (2015) para as espécies *Pteroglossa roseoalba*, *Cranichis candida*, e *Sauroglossum nitidum*. Porém, esta é uma característica que pode variar dependendo da espécie estudada (SAONCELLA; MARTELINE; PEDROSO-DE-MORAES, 2017).

Apenas no estágio 4 (Fig. 2D) é possível visualizar raízes. Segundo Ferreira et al. (2018, no prelo), nesta fase de desenvolvimento a presença de raízes é o que caracteriza o fim da fase de protocormo e inicia a fase de planta. Kraus, Kerbauy e Monteiro (2006) citam que a primeira raiz das orquídeas surge adjacente à gema apical. O mesmo pôde ser observado nas plantas estudadas de *E. flava* (Fig. 2D). Nas raízes das plantas

estudadas foi possível visualizar, por meio de cortes longitudinais, a coifa bem evidente (Fig. 2G). Além disso, foi verificada, tanto em cortes longitudinais quanto transversais, a presença de velame nas raízes (Figs. 2G e 2H) contendo 3-4 camadas de células. As poucas camadas observadas podem estar associadas ao fato das raízes analisadas serem oriundas de cultivo *in vitro*. Muthukumar e Kowsalya (2017) também notaram velame com 3-5 camadas de células para *Acampe praemorsa*. Uma, Rajedran e Mutukumar (2015) verificaram 4-6 camadas para *Eulophia epidendreae* e uma única camada para a espécie *Malaxis acuminata*, enquanto que Moreira et al. (2009) já observaram duas camadas para *Dichaea cogniauxiana* e 4-5 camadas para *Epidendrum secundum*. Segundo Riverón-Giró et al. (2017), o número de camadas do velame varia de acordo a espécie e a condição à qual a mesma se encontra. O tamanho do velame está associado a algumas condições ambientais como temperatura e disponibilidade de água; além de ser responsável pela proteção mecânica, redução da taxa de transpiração e absorção de água e nutrientes (ANDREOTA; BARROS; SAJO, 2015; JOCA et al., 2017). Apesar de ter ocorrência registrada para outras famílias, como Araceae, Liliaceae, Dioscoreaceae, Taccaceae, Amaryllidaceae e Commelinaceae, o velame é associado, em orquídeas, ao hábito epifítico (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2012; RIVERÓN-GIRÓ et al., 2017). Logo, a presença de velame em *E. flava* corrobora com tal afirmação.

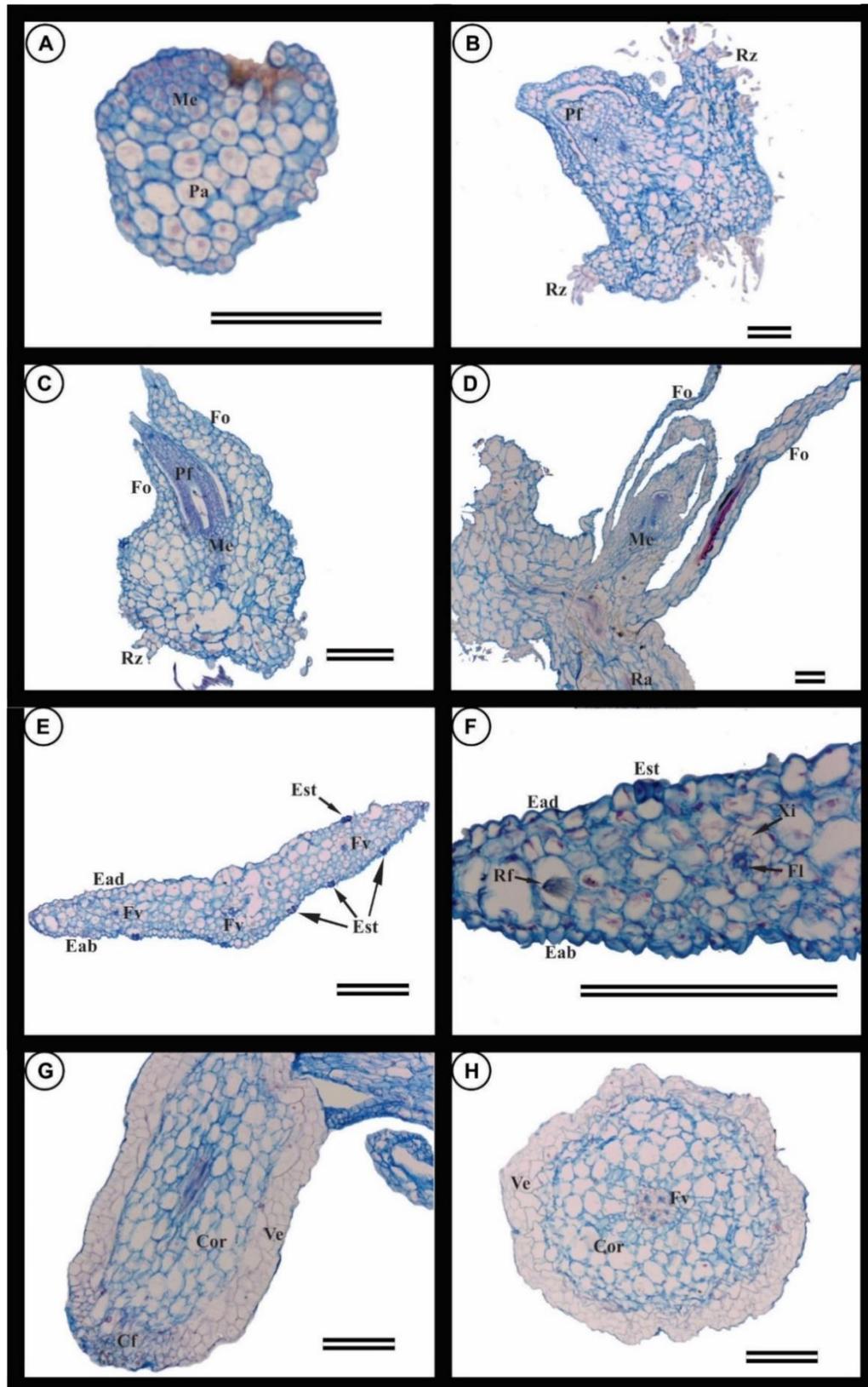


Figura 2: Desenvolvimento morfoanatômico de *Encyclia flava* sob condições *in vitro*. A. Primeiro estágio denominado fase de protocormo; B. Protocormo com uma folha (estágio 2); C. Protocormo com mais de uma folha (estágio 3); D. Planta com raiz (estágio 4); E e F. Cortes transversais da folha; G. Corte longitudinal da raiz; H. Corte transversal da raiz. Me= meristema apical caulinar; Pa= parênquima; Pf= primórdio foliar; Rz= rizóides; Fo= folha; Ra= raiz; Ead= epiderme adaxial; Eab= epiderme abaxial; Est= estômato; Fv= feixe vascular; Xi= xilema; Fl= floema; Rf= ráfide; Cf= coifa; Co= córtex; Ve= velame. Barra= 200 µm.

3.3. Micropropagação a partir de segmentos caulinares estiolados

Após 150 dias submetidas à condição de escuro, as plantas de *Encyclia flava* desenvolveram caules alongados, esbranquiçados, folhas curtas e entrenós afastados (Fig. 3). As plantas submetidas a tais condições apresentam redução na lignificação e suberização de suas células, o que torna a parede celular mais delgada. Além disso, as plantas não conseguem acumular clorofila (RODRIGUES, 2014). Estas características se devem à inibição do desenvolvimento dos pró-plastídeos que, na ausência de luz não se convertem em cloroplastos e se desenvolvem em estioloplastos. Estes, por sua vez, não sintetizam as enzimas e pigmentos fotossintéticos necessários para a fotossíntese. Porém, quando submetidas novamente à luz as plantas e/ou seus segmentos retomam sua expansão e desenvolvimento normal (RAMOS; CARNEIRO, 2007; SOARES et al., 2010; RODRIGUES, 2014).

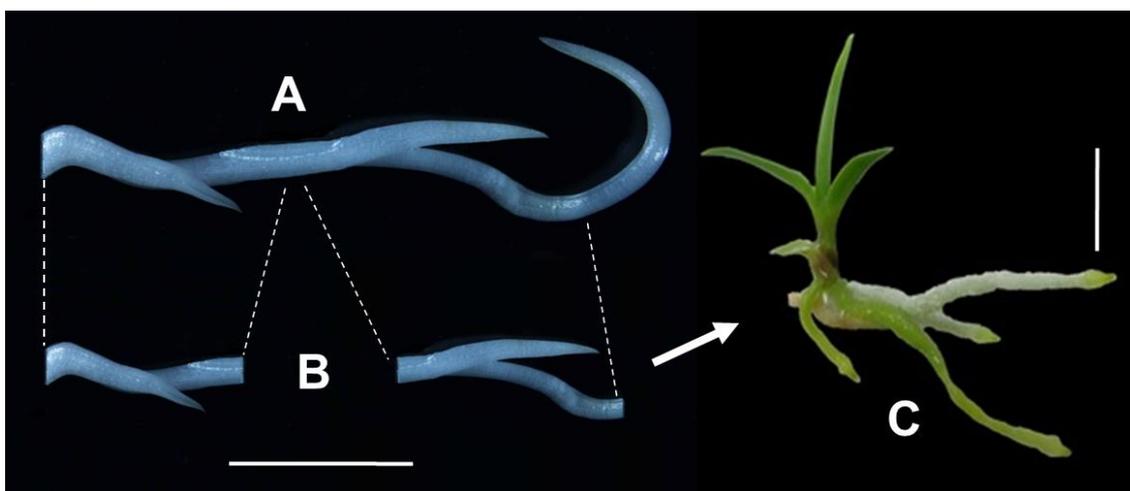


Figura 3: Caule (A) e segmentos caulinares estiolados (B) de *Encyclia flava* após 150 dias no escuro e broto formado após 60 dias de cultivo destes segmentos na presença de luz (C). Barra= 1 cm.

Sessenta dias após a transferência para a presença de luz, os segmentos caulinares estiolados foram analisados quanto à porcentagem de brotos formados por segmento. Tais resultados são apresentados na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos testados no presente estudo. No entanto, verificou-se que o tratamento com as maiores concentrações dos dois reguladores ($4,56 \mu\text{M}$ de BA + $1,14 \mu\text{M}$ de ANA) apresentou resultado numericamente superior aos demais tratamentos (29,17% de brotos). É possível que o conteúdo endógeno de citocinina e auxina em *E. flava* seja relativamente baixo, pois a presença de reguladores de crescimento, independente da combinação ou concentração, favoreceu a produção de brotos da espécie em estudo, uma vez que o tratamento controle (ausência de

reguladores) apresentou apenas 8,34% de brotos formados, enquanto que todos os outros tratamentos obtiveram porcentagens de brotos acima de 20%. Resultados contrastantes foram observados por Suzuki, Kerbauy e Zaffari (2004) e Ramos e Carneiro (2007), estudando, respectivamente, *Catasetum fimbriatum* e *Cattleya mesquिताe*; nesses dois casos a ausência de reguladores favoreceu à maior formação de brotos em ambas as espécies. Mok, Martin e Mok (2000) também cita que o acréscimo de BA no meio favorece a formação de novos brotos; o que também pode ser visto no presente estudo. Porém, devido às baixas porcentagens de brotações, novos estudos são necessários para elucidar com mais clareza o papel dos reguladores no processo de formação de brotos em *E. flava*. Acredita-se que a utilização de plantas com maior biomassa inicial como também a manutenção dessas plantas no escuro por um período de tempo mais longo propicie a formação de segmentos estiolados mais vigorosos e, conseqüentemente, a formação de uma maior porcentagem de brotos quando da transferência dos segmentos caulinares estiolados para a presença de luz.

Tabela 3: Formação de brotos em segmentos caulinares estiolados de *Encyclia flava* em diferentes combinações de reguladores de crescimento. ns= não significativo, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($\alpha= 5\%$).

Tratamento BA – ANA (μM)	Porcentagem de brotos (%)
0 – 0	8,34 ns
2,28 – 0,57	25,00 ns
4,56 – 1,14	29,17 ns
2,28 – 0	25,00 ns
4,56 – 0	20,84 ns

3.4. Aclimatização

A Tabela 4 mostra os resultados referentes aos efeitos das diferentes proporções de Bioplant e Esfagno na fase inicial de aclimatização de *E. flava*, 60 dias após o início do experimento. A maior taxa de sobrevivência (92,5%) foi observada no tratamento utilizando Bioplant e Esfagno (2:1, v:v). No entanto, os demais tratamentos também demonstraram ser eficientes nesta fase da aclimatização, pois as proporções 1:0 e 1:1 apresentaram 80% e 82,5%, respectivamente. A presença de Esfagno, mesmo em menor quantidade, pode ter favorecido a sobrevivência das plantas devido à sua capacidade de

reter mais água no substrato, impedindo que este se desidrate. Os resultados do presente trabalho mostram que todos os tratamentos podem ser recomendados para a aclimatização da espécie em estudo, pois a menor taxa de sobrevivência observada ainda foi maior que a observada por alguns autores em outras espécies. Dorneles e Trevelin (2011) obtiveram sobrevivência de 53% para *Cattleya intermedia* enquanto que Sousa et al. (2015), trabalhando com *Brassavola tuberculata* verificaram que 74% das plantas sobreviveram, utilizando-se apenas o Esfagno como substrato. Macedo et al. (2014), também trabalhando com *B. tuberculata*, obtiveram melhores resultados utilizando fibra de coco (87,50%). Ferreira et al. (2018, no prelo), estudando a aclimatização de *Catasetum macrocarpum*, relataram que 93,30% das plantas sobreviveram quando se utilizou a combinação de Bioplant e esfagno na proporção de 1:1 (v:v), resultado bastante semelhante ao encontrado no presente estudo.

Tabela 4: Efeitos de diferentes proporções dos substratos Bioplant e Esfagno na fase inicial de aclimatização de *Encyclia flava*. PS= porcentagem de sobrevivência; NB= número de brotos; NR= número de raízes; CMR= comprimento da maior raiz (cm); NF= número de folhas; ALT= Altura da planta (cm). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Tratamento (Bioplant:Esfagno)	PS*	NB	NR	CMR	NF	ALT
1:0	80,00	0,41a	6,27ab	4,31a	6,70a	3,54b
1:1	82,50	0,56a	5,19b	3,20b	3,16b	3,51b
2:1	92,50	0,52a	7,42a	4,49a	3,27b	4,78a

*Não foi possível realizar teste estatístico para esta variável.

Tais resultados indicam que as plantas não estiveram sob um estresse acentuado após a transferência do meio de cultura para os substratos testados. Como os recipientes permaneceram fechados durante todo o experimento a alta umidade relativa dentro dos mesmos pode ter beneficiado o estabelecimento das plantas, favorecendo assim seu desenvolvimento. A maior produção de brotos e folhas nesta fase foi observada quando se utilizou a proporção de 1:1; apresentando, em média, 0,56 brotos e 6,70 folhas por planta, embora diferenças significativas ($P < 0,05$) tenham sido observadas apenas em relação ao número de folhas (Tabela 4). Por outro lado, o tratamento com a proporção de 2:1 apresentou resultados significativamente superiores para número de raízes e comprimento da maior raiz (7,42 raízes e 4,49 cm, respectivamente) bem como para

altura da planta (4,78 cm). Esses resultados mostram que, provavelmente, o maior número de raízes bem como seu maior comprimento contribuíram para uma maior sobrevivência das plantas nesse substrato.

A Tabela 5 mostra os dados obtidos 90 dias após a transferência das plantas para potes individuais, caracterizado com a segunda fase do processo de aclimatização, quando foram utilizadas diferentes proporções dos substratos Ouro Negro e Bioplant. Em relação à sobrevivência, verificou-se que a maior taxa (65%) foi obtida quando esses substratos foram utilizados na proporção de 1:1 (v/v). Comparando-se com os resultados da primeira fase da aclimatização, observou-se um considerável decréscimo na taxa de sobrevivência. Segundo Dorneles e Trevelin (2011), mais de 50% das orquídeas podem não resistir ao processo de aclimatização nos primeiros seis meses. Os autores ressaltam ainda que o período de aclimatização é um período bastante susceptível a perdas devido a drásticas mudanças nas condições de cultivo. É possível que a diminuição do teor de umidade atmosférica nessa segunda fase tenha contribuído para a redução da porcentagem de sobrevivência das plantas.

Tabela 5: Efeitos de diferentes proporções dos substratos Ouro Negro e Bioplant na segunda fase de aclimatização de *Encyclia flava*. NB= número de brotos; NR= número de raízes; CMR= comprimento da maior raiz (cm); NF= número de folhas; ALT= Altura da planta (cm); MSPA= massa da matéria seca da parte aérea (mg); MSR= massa da matéria seca das raízes (mg). ns= não significativo, segundo análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade.

Tratamento (Ouro Negro:Bioplant)	PS*	NB	NR	NF	MSPA	MSR
0:1	25,00	0,60 ns	5,80 ns	4,00 ns	14,40 ns	24,20 ns
1:0	40,00	0,50 ns	6,13 ns	3,88 ns	11,38 ns	18,88 ns
1:1	65,00	0,77 ns	6,00 ns	2,92 ns	13,77 ns	23,31 ns
2:1	45,00	0,67 ns	5,78 ns	3,67 ns	18,11 ns	25,00 ns
3:1	40,00	0,63 ns	6,63 ns	4,75 ns	18,50 ns	25,88 ns

*Não foi possível realizar teste estatístico para esta variável.

Em relação às variáveis analisadas pouquíssimas diferenças foram observadas neste estudo, o que resultou na ausência de diferenças significativas entre os tratamentos. No que se refere ao número de brotos, o tratamento 1:1 (v:v) foi superior aos demais (0,77 brotos por planta). Em seu trabalho, Lone et al. (2008) perceberam que

o melhor tratamento para produção de brotos de *Cattleya intermedia* foi o substrato composto apenas por fibra de coco, que pode ser uma alternativa para substituir o Esfagno, substrato de difícil acesso.

Um bom desenvolvimento do sistema radicial é essencial para o estabelecimento e bom desenvolvimento das plantas na fase *ex vitro* (SOARES, 2015). Foi observado que o tratamento 3:1 (v:v) foi o que obteve melhores resultados para número de raízes (6,63 raízes). Observou-se que em todos os tratamentos parte das raízes morreram e novas raízes foram formadas. Segundo Dorneles e Trevelin (2011), raízes oriundas de plantas cultivadas *in vitro* tendem a cessar seu crescimento após um tempo depois de aclimatizadas, tornando-se pouco eficientes. Raízes de espécies epífitas geralmente se desenvolvem melhor em substratos com textura relativamente grossa e de boa drenagem (LONE et al., 2008). Assim, como o substrato Ouro Negro apresenta partículas mais espessas, sua utilização em proporções maiores provavelmente contribuiu para o melhor desenvolvimento das raízes.

Durante o período de aclimatização as folhas formadas *in vitro* podem permanecer ou sofrer senescência; característica esta que varia entre as espécies (DORNELES; TREVELIN, 2011). Em *E. flava* foi verificado que a maioria das folhas produzidas *in vitro* permaneceram por todo o período de aclimatização (Fases 1 e 2). O tratamento 3:1 (v:v), com uma média de 4,75 folhas por planta, foi o que apresentou melhor resultado para a formação de folhas.

Não foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos em relação às massas da matéria seca da parte aérea e da raiz. O substrato contendo Ouro Negro e Bioplant na proporção de 3:1 (v:v) foi o mais eficaz tanto para massa seca da parte aérea (18,50 mg) quanto para massa seca da raiz (25,88 mg). O resultado para a massa seca da parte aérea provavelmente está relacionado ao fato de o mesmo tratamento (3:1) ter sido o mais eficiente tanto para o número de folhas quanto para a altura da parte aérea. O mesmo pode ser dito em relação à massa seca da raiz uma vez que o maior número de raízes foi observado neste mesmo tratamento. Assim como as demais variáveis analisadas, a matéria seca tanto da parte aérea quanto da raiz são parâmetros de grande importância para a planta durante o período de aclimatização pois estas variáveis são comumente associadas ao vigor das plantas (FERREIRA et al., 2018, no prelo).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio MS foi o mais favorável para a multiplicação e desenvolvimento *in vitro* de *E. flava*. É bastante provável que a maior produção de pigmentos fotossintéticos detectada nesse meio tenha contribuído para esse resultado.

As análises morfoanatômicas revelaram que, morfológicamente, a germinação e o crescimento inicial *in vitro* de *E. flava* é muito semelhante ao de outras Orchidaceae, além de apresentar algumas características estruturais comuns a outras espécies dessa família que possuem hábito epifítico mesmo quando cultivada sob condições *in vitro*.

Embora em baixas proporções, foi possível realizar a propagação de *E. flava* por meio de segmentos caulinares estiolados. Os melhores resultados foram obtidos quando uma alta concentração de BA em combinação com uma concentração relativamente alta de ANA (4,56 μM e 1,14 μM , respectivamente) foram adicionados ao meio de cultura.

Para a aclimatização da espécie em estudo, os resultados obtidos sugerem que as plantas cultivadas *in vitro* devam ser inicialmente transferidas para recipientes comunitários contendo substrato formado por contendo Bioplant e Esfagno na proporção de 2:1 (v:v). Após 60 dias os indivíduos devem ser transplantados para vasos individuais contendo novo substrato composto por Ouro Negro e Bioplant na proporção de 3:1 (v:v). Com essa metodologia, a taxa de sobrevivência final das plantas é de 65%.

REFERÊNCIAS

ANDRETO, R. C.; BARROS, F.; SAJO, M. G. Root and leaf anatomy of some terrestrial representatives of the Cranichideae tribe (Orchidaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 367-378, 2015.

ARNON D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

BARROS, F., VINHOS, F., RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C.N., PESSOA, E.M., FORSTER, W., MENINI NETO, L., FURTADO, S.G., NARDY, C., AZEVEDO, C.O. & GUIMARÃES, L.R.S. 2015. *Orchidaceae*. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 18 fev. 2018.

BASTOS, C. A.; VAN DEN BERG, C.; MENEGUZZO, T. E. C. *Encyclia fimbriata* (Orchidaceae: Laeliinae), a new large-flowered species from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, v. 40, p. 26-40, 2012.

CASTRO NETO, V. P. **Encyclias brasileiras**, 2004. CD-ROM.

CHAER, L. **Estudo para o estabelecimento de uma estratégia de clonagem *in vitro* de *Cattleya* e *Cymbidium* (Orchidaceae) por meio da utilização de gemas laterais de caules estiolados**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência, na área de Botânica) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

DÍAZ, L. P.; NAMUR, J. J.; BOLLATI, S. A.; ARCE, O. E. A. Acclimatization of *Phalaenopsis* and *Cattleya* obtained by micropropagation. **Rev. colomb. Biotecnol.**, v. 12, n. 2, p. 27-40, 2010.

DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham *ex* Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia**, v. 66, n. 2, p. 167-174, 2011.

FAVETTA, V.; COLOMBO, R. C.; JÚNIOR, J. F. M.; FARIA, R. T. Light sources and culture media in the *in vitro* growth of the Brazilian orchid *Microlaelia lundii*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1775-1784, 2017.

FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M.; PESCADOR, R.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; KERBAUY, G. B. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium Second Love* (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 420-427, 2011.

FERREIRA, L. S. **Cultivo *in vitro* de orquídeas em dois ambientes (sala de crescimento e casa de vegetação): crescimento e capacidade fotossintética**. 2014. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

FERREIRA, C. S.; CARMO, W. S.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; OLIVEIRA, J. M. F.; MELO, R. B.; FRANCO, A. C. Anatomia da lâmina foliar de onze espécies lenhosas dominantes nas savanas de Roraima. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 4, p. 337-346, 2015.

- FERREIRA, W. M.; VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. C. N.; OLIVEIRA, H. R.; SUZUKI, R. M. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. **Iheringia Série Botânica**, v. 72, n. 1, p. 57-65, 2017.
- FERREIRA, W. M.; OLIVEIRA, S. P.; SUZUKI, R. M.; SILVA, K. L. F.; JUNIOR, J. W. S. Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. **Rodriguésia**, 2018. No prelo.
- FORSTER, W.; SOUZA, V. C. Laeliinae (Orchidaceae) do Parque Nacional do Caparaó, Estados do Espírito Santo e Minas Gerais, Brasil. **Hoehnea**, v. 40, n. 4, p. 701-726, 2013.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI C.; CASSANO, A. O.; LEMOS, E. G. M. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 127-134, 2013.
- GERLACH, D. **Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1984.
- ISHARA, K. L. **Aspectos florísticos e estruturais de três fisionomias de Cerrado no município de Pratânia, São Paulo**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.
- JOCA, T. A. C., OLIVEIRA, D. C., ZOTZ, G., WINKLER, U., MOREIRA, A. S. F. P., The velamen of epiphytic orchids: variation in structure and correlations with nutrient absorption. **Flora**, v. 230, p.66-74, 2017.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 523p.
- KÄMPF, A.N. Seleção de materiais para uso como substrato. In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Ed.). **Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Gênese, 2000. p.139-145.
- KNUDSON, L. A new nutrient Solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.
- KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, W. R. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, v. 33, n. 2, p. 177-184, 2006.

- LEMES, C. S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 499-505, 2016.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 4, p. 465-469, 2008.
- MACEDO, M. C.; 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**, v. 35, n. 6, p. 2883-2894, 2014.
- MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G. B.; NIEVOLA, C. C.; SUZUKI, R. M. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (orchidaceae) grown with different nitrogen sources. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 195-206, 2000.
- MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. 1998. Flora vascular do Cerrado. In: S.M. Sano & S.P. Almeida. **Cerrado, Ambiente e Flora**, p. 289-556.
- MENEGUZZO, T. E. C.; BIANCHETTI, L. B.; PROENÇA, C. E. B. Typifications in brazilian names of the genus *Encyclia* (Orchidaceae). **Neodiversity**, v. 5, p. 18-22, 2010.
- MOK, M. C.; MARTIN, R.C.; MOK, D. S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 36, p. 102-107, 2000.
- MOREIRA, A. S. F. P.; FILHO, J. P. L.; ZOTZ, G.; ISAIAS, R. M. S. Anatomy and photosynthetic parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Shltr. and *Epidendrum secundum* Jacq. **Flora**, v. 204, p.604-611, 2009.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUTHUKUMAR, T.; KOWSALYA, A. Comparative anatomy of aerial and substrate roots of *Acampe praemorsa* (Rox.) Blatt. & McCann. **Flora**, v. 226, p. 17-28, 2017.

OLIVEIRA, J. R. G. **Germinação e crescimento inicial in vitro de *Encyclia flava* (Lindl.) Porto & Brade (Orchidaceae)**. 2015. Monografia de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional.

PACHECO, F. V.; SILVEIRA, H. R. O.; ALVARENGA, A. A.; ALVARENGA, I. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; LIRA, J. M. S. Gas Exchange and Production of Photosynthetic Pigments of *Piper aduncum* L. Grown at Different Irradiances. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 114-121, 2013.

PAIVA NETO, V. B.; CAMPOS, G. O.; BOARETTO, A. G.; ZUFFO, M. C. R.; TORREZAN, M. A.; BENETÃO, J. *In vitro* behaviour of *Aspasia variegata*, an epiphytic orchid from the Brazilian Cerrado. **Ciência Rural**, v.43, n. 12, p. 2178-2184, 2013.

PEDROSO-DE-MORAES, C.; SOUZA-LEAL, T.; BRESCANSIN, R. L.; PETTINI-BENELLI, A.; SAJO, M. G. Radicular anatomy of twelve representatives of the Catasetinae subtribe (Orchidaceae: Cymbidieae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.84, n. 2, p. 455-467, 2012.

PONERT, J.; FIGURA, T.; VOVOLSOBE, S.; LIPAVSKA, H.; VOHNIK, M. JERSAKOVA, J. Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. **Botany**, v. 91, n. 10, p. 662-670, 2013.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação “in vitro” de *Cattleya x mesquitae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 1, p. 10-15, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6^a. ed. Rio de Janeiro: 2001.

REGO-OLIVEIRA, L. V.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27 n. 1, p. 1-5, 2005.

- RIVERÓN-GIRÓ, F. B.; DAMON, A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, A.; SOLÍS-MONTERO, L.; AGUILAR-ROMERO, O.; RAMÍREZ-MARCIAL, N.; NIETO, G. Anatomy of the invasive orchid *Oeceoclades maculata*: ecological implications. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 184, p. 94-112, 2017.
- RODRIGUES, A. A. J. **Estiolamento *in vitro* de *Cattleya labiata* e *Phalaenopsis sp.*** 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.
- SAONCELLA, A. L.; MARTELINE, M. A.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe (*Orchidaceae*). **Iheringia, Série Botânica**, v. 72, n. 1, p. 114-126, 2017.
- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya spp.* *Orchidaceae*). **Rev. Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.
- SHERLOCK, E. M. **Propagação *in vitro* de *Encyclia alboxanthina fowlie* (*Orchidaceae*): espécie endêmica da Chapada Diamantina-Bahia.** 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Feira de Santana. Feira de Santana.
- SHIBU, B.S.; DEVI, B. C.; WESLEY, P. S.; MOIN, S. *Ex situ* conservation of endemic orchids of Western Ghats, Tamilnadu, India via asymbiotic seed germination. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 5, p. 3339-3343, 2012.
- SILVA, C. I.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (*Orchidaceae*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 91-100, 2004.
- SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.** 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras.
- SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G. Estiolamento e luz artificial no cultivo *in vitro* de orquídeas nativa e híbrida. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1941-1947, 2010.

SOARES, K. H. **Germinação *in vitro* e aclimação de orquídeas**. 2010. Monografia de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.

SOUSA, G. G.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SOARES, J. S. Aclimação de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos.

Horticultura Brasileira, v. 33, n. 2, p. 208-215, 2015.

SOUZA-LEAL, T.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Fenologia reprodutiva e distribuição espacial de *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae) em Cerrado do município de Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil. **Iheringia Serie Botanica**. v. 69, n. 2, p. 405-416, 2014.

STÖCKEL, M.; MEYER, C.; GEBAUER, G. The degree of mycoheterotrophic carbon gain in green, variegated and vegetative albino individuals of *Cephalanthera damasonium* is related to leaf chlorophyll concentrations. **New Phytologist**, v. 189, p. 790–796, 2011.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 929-935, 2004.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. M. 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**, v. 36, n. 4, p. 657-666, 2009.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 4, p. 731-742, 2010.

UMA, E.; RAJEDRAN, R.; MUTUKUMAR, T. Morphology, anatomy and mycotrophy of pseudobulb and subterranean organs in *Eulophia epidendreae* and *Malaxis acuminata* (Epidendroideae, Orchidaceae). **Flora**, v. 217, p. 14-23, 2015.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH Changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, 1949.

VENTURA, G. M. **Cultivo in vitro de orquídeas do grupo Cattleya, em diferentes meios de cultura e irradiâncias.** 2007. 122f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.

WOTAVOVÁ-NOVOTNÁ, K.; VEJSADOVÁ, H.; KINDLMANN, P. Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species. **Biologia Plantarum** v. 51, p. 198-200; 2007.

ZANEGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do planalto central brasileiro. **Acta Botânica Brasílica**, v. 17, n. 1, p. 101-118, 2003.