



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS DE PORTO NACIONAL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**BARBARA SCHIRATO GONÇALVES**

**CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA DAS SEMENTES,  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*, E  
ACLIAMATIZAÇÃO DE *Brassavola martiana* LINDL.  
(ORCHIDACEAE)**

Porto Nacional/ TO  
2021

**BARBARA SCHIRATO GONÇALVES**

**CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA DAS SEMENTES,  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*, E  
ACLIAMATIZAÇÃO DE *Brassavola martiana* LINDL.  
(ORCHIDACEAE)**

Monografia apresentada a Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Universitário de Porto Nacional, Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado), como pré-requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Dr. Wagner de Melo Ferreira

**Coorientadora:** MSc. Laís Ramos Alves

Porto Nacional/ TO  
2021

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

---

G635c    Gonçalves , Barbara Schirato.

    Caracterização biométrica das sementes, germinação e desenvolvimento in vitro, e aclimatização de *Brassavola martiana* LINDL. (Orchidaceae). / Barbara Schirato Gonçalves . – Porto Nacional, TO, 2021.

    41 f.

    Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Porto Nacional - Curso de Ciências Biológicas, 2021.

    Orientador: Wagner de Melo Ferreira

    Coorientadora : Laís Ramos Alves

    1. Botânica. 2. Orchidaceae. 3. Epífita. 4. Substratos . I. Título

**CDD 570**

---

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).**

**BARBARA SCHIRATO GONÇALVES**

**CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA DAS SEMENTES,  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*, E  
ACLIMATIZAÇÃO DE *Brassavola martiana* LINDL.  
(ORCHIDACEAE)**

Monografia foi avaliada e apresentada à  
UFT – Universidade Federal do Tocantins –  
Campus Universitário de Porto Nacional,  
Curso de Ciências Biológicas para a  
obtenção do título de Bacharela e aprovada  
em sua forma final pelo Orientador e pela  
Banca Examinadora.

Data de aprovação: 19/11/2021

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr.<Wagner de Melo Ferreira> Orientador, UFT

---

Prof. Dr. <Rodney Haulien Ferreira Viana> Examinador, UFT

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.<Solange de Fátima Lolis> Examinadora, UFT

---

MSc. <Silene Lívia Aires de Oliveira> Suplente, SEDUC

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão para todos aqueles que foram essenciais e sem os quais este trabalho e essa jornada jamais existiriam. À minha família, em especial meus pais e minha vó, que sempre me prestaram todo o apoio do mundo. Ao meu orientador Wagner e minha co-orientadora Laís que nunca mediram esforços para me ajudar. Ao Rony, Paulo, Maíra, Silene e Dona Fran que sempre estiveram presentes tanto no dia a dia do laboratório quanto me prestando ajuda e apoio como podiam. Nada disso teria sido possível sem todos vocês.

Também gostaria de estender meus agradecimentos a todos os professores que foram importantíssimos na minha formação, bem como aos meus amigos e colegas de curso que sempre estiveram ao meu lado. Principalmente sou grata pela minha família da UFT, todos os meus Ohanos, que sempre estiveram ali, para comemorar as vitórias e me amparar quando tudo parecia tão difícil e distante. Rachel, Mariana, Karol, Carol, Ítalo, Loise, Lia e Bruno, muito obrigada amigos por estarem comigo nessa caminhada. À Fernanda, minha amiga da Botânica, meu muito obrigada também por todas as experiências compartilhadas.

Um abraço especial ao meu amigo Adriano com quem tive conversas muito filosóficas nas mesas da lanchonete, enquanto tomávamos vários cafés. Biologia é muito mais interessante e divertida quando penso nas conversas que tivemos.

Á Geruza, Marco, Natália, Nathan, Yuri, Vinícius e todos meus amigos de outros cursos, vocês me deram perspectivas e perspectivas sobre várias coisas, vocês fizeram dessa caminhada um trajeto muito mais bonito e feliz com todo o acolhimento que eu poderia pedir ou querer, obrigada pelas horas de conversas que muito me agregaram. Fazer ciência embora seja um trabalho um tanto quanto objetivo, às vezes também me parece como algo que vem do fundo do coração e vocês me fizeram enxergar isso.

Por último, meus agradecimentos à Universidade Federal do Tocantins, ao Laboratório de Cultivo *in vitro* de Plantas, do Núcleo de Pesquisas Ambientais (Neamb), e ao CNPq que ofereceram a estrutura e o fomento necessários à pesquisa aqui apresentada.

**“O homem é a mais insana das espécies. Adora um Deus invisível e mata a Natureza visível... Sem perceber que a Natureza que ele mata é esse Deus invisível que ele adora.”**

**(Hubert Reever)**

## RESUMO

*Brassavola martiana* é uma espécie de orquídea epifítica apreciada por colecionadores devido à beleza de suas flores. Devido à diminuição do seu habitat natural causada por diversas ações antrópicas e por apresentar potencial ornamental, estudos relacionados à sua germinação e desenvolvimento utilizando-se as técnicas de cultivo *in vitro* são altamente relevantes. Assim, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar a biometria das sementes, estudar a influência da idade dessas no processo germinativo, avaliar a influência de diferentes temperaturas no desenvolvimento das plantas *in vitro*, e estabelecer um protocolo eficaz para a aclimatização inicial das plantas obtidas *in vitro*. Para a caracterização biométrica, sementes foram fotografadas com o auxílio de microscópio óptico e tiveram suas medidas de comprimento e largura tomadas através do programa Anati Quanti. Para os testes referentes à idade das sementes foram utilizados frutos oriundos de autofecundação e de fecundação cruzada. Sementes com 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 dias após a polinização foram inoculadas em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) na concentração de 50% dos macronutrientes e mantidas em sala de crescimento para avaliação de suas taxas de germinação. Para verificar a influência da temperatura no desenvolvimento *in vitro* da espécie, recipientes contendo plântulas de *B. martiana* foram mantidos em câmaras de crescimento ajustadas para temperaturas de 25, 30 e 35°C. Os resultados foram avaliados após 120 dias de cultivo através das variáveis: número de brotos e raízes formados/explante, comprimento do maior broto e da maior raiz. O processo de aclimatização foi dividido em duas fases. A fase 1 consistiu na retirada das plantas do meio de cultura e plantio em recipientes plásticos contendo diferentes proporções de quatro substratos sólidos (Bioplant, Esfagno, Ouro Negro e Casca de *Pinus*) em duas etapas. Na fase 2 as plantas sobreviventes oriundas da fase 1 foram transferidas para orquidário com 75% de retenção da radiação solar. A avaliação foi realizada por meio das variáveis: porcentagem de sobrevivência, altura das plantas, número de folhas e raízes e comprimento da maior raiz. A biometria revelou que as sementes de *B. martiana* apresentaram uma grande variação em suas dimensões com médias de 212,67 µm de comprimento e 52,33 µm de largura. Os resultados referentes ao efeito da idade das sementes no processo germinativo mostraram que sementes com até 300 dias de idade, oriundas tanto da autofecundação quanto da fecundação cruzada, não germinaram. Quanto à temperatura observou-se que 25°C é a mais adequada para o desenvolvimento *in vitro* da espécie. Em relação à fase 1 da aclimatização, os melhores resultados foram obtidos com as combinações de Bioplant + Esfagno e Ouro Negro + Casca de *Pinus* ambas na proporção de 1:1. Para a fase 2 os melhores resultados foram obtidos com os substratos Ouro Negro e Casca de *Pinus* também na proporção de 1:1. Em síntese, foi possível realizar a descrição biométrica das sementes de *B. martiana*, determinar uma temperatura adequada para seu desenvolvimento *in vitro* bem como desenvolver um protocolo inicial para sua aclimatização.

**Palavras-chave:** Botânica. Orchidaceae. Epífita. Substratos.

## ABSTRACT

*Brassavola martiana* is an epiphytic orchid species appreciated by collectors due to the beauty of its flowers. Because of the decrease of its population in natural habitats caused by several anthropic actions, studies related to the germination and development of this species using *in vitro* techniques become highly relevant. This investigation aimed to characterize the biometry of seeds, to evaluate the influence of their age on the germination process, to assess the effects of different temperatures on the *in vitro* development of plants, and to establish an effective protocol for the initial acclimatization of plants originated from *in vitro* cultures. For the biometric characterization, seeds were photographed with an optical microscope and had their length and width measured by the Anati Quanti program. In order to evaluate the influence of the age of seeds on the germination process, fruits from self- and cross-fertilization were used. Seeds aged 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 and 300 days after pollination were inoculated in half-strength Murashige and Skoog (1962) culture medium and kept in a growth room for subsequent evaluation of their germination rates. To verify the influence of temperature on the *in vitro* development of the species, glass jars containing seedlings of *B. martiana* were kept in growth chambers adjusted to temperatures of 25, 30 and 35°C. The results were evaluated after 120 days of cultivation based on the variables: number of shoots and roots formed per explant, length of the largest shoot and root. The acclimatization process was divided into two phases. Phase 1 consisted of removing the plants from the culture medium and planting them in plastic containers containing different proportions of two combinations of solid substrates (Bioplant + Sphagnum and Ouro Negro + Bark of *Pinus*) in two stages. In phase 2, the surviving plants from phase 1 were transferred to the nursery with 75% retention of solar radiation. The evaluation was carried out based on the variables: survival percentage, plant height, number of leaves and roots and length of the largest root. The biometric study revealed that the seeds of *B. martiana* showed a great variation in their dimensions with averages of 212.67 µm in length and 52.33 µm in width. The results regarding the effect of seed age on the germination process showed that seeds up to 300 days old, from both self- and cross-fertilization, did not germinate. In terms of temperature, 25 °C was the most suitable for the *in vitro* development of the species. Concerning the first phase of acclimatization, the best results were obtained with Bioplant + Sphagnum and Ouro Negro + Bark of *Pinus* both in the proportion of 1:1. For phase 2, the best results were obtained with the substrates Ouro Negro and Bark of *Pinus* also in the proportion of 1:1. In summary, it was possible to carry out the biometric description of *B. martiana* seeds, to determine an adequate temperature for plant development *in vitro*, as well as to develop an initial acclimatization protocol for *B. martiana*.

**Key-words:** Botany. Orchidaceae. Epiphyte. Substrates.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Brassavola martiana</i> no Orquidário do Neamb/UFT (Campus de Porto Nacional) .....	16
Figura 2. Fruto de <i>Brassavola martiana</i> antes de ser coletado .....	18
Gráfico 1. Frequências de comprimento (A) e largura (B) de sementes de <i>Brassavola martiana</i> . .....	23
Figura 3. Sementes inviáveis de <i>Brassavola martiana</i> (A) e sementes viáveis de <i>Catasetum macrocarpum</i> (B) submetidas ao teste de Tetrazólio (Barras = 500µM).....	24
Gráfico 2. Médias de precipitação (A), umidade relativa do ar (B) e temperatura (C) para o município de Porto Nacional, Tocantins, nos anos de 2017, 2018 e 2019 durante o período de frutificação de <i>Brassavola martiana</i> (fevereiro-abril). .....	26
Figura 4. Plantas de <i>Brassavola martiana</i> cultivadas <i>in vitro</i> em Erlenmeyers de 125 mL nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, em A, B e C, respectivamente. Em B e C observam-se folhas com manchas ou completamente necrosadas. ....	28
Figura 5. Plantas de <i>Brassavola martiana</i> após 90 dias em viveiro com substratos Ouro negro e Casca de <i>Pinus</i> nas proporções 1:0 (A), 0:1 (B) e 1:1 (C). Barras = 10 cm.....	34

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Estatística descritiva para as variáveis comprimento e largura de sementes de *Brassavola martiana*. ..... 23
- Tabela 2. Efeitos da temperatura no desenvolvimento *in vitro* plantas de *Brassavola martiana* 120 dias após a transferência para câmaras de crescimento com temperaturas ajustadas para 25, 30 e 35°C. PS = porcentagem de sobrevivência; NR = número de raízes; CMR = comprimento da maior raíz, NB = número de brotos, CMB = comprimento do maior broto. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Dunn no nível de 5% de probabilidade..... 28
- Tabela 3. Efeitos dos substratos Bioplant e Esfagno na aclimatização de plantas de *Brassavola martiana* 60 dias após a transferência para condições *ex vitro*. PS = porcentagem de sobrevivência; AL = altura; NF = número de folhas; NR = número de raízes. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%. ..... 30
- Tabela 4. Efeito dos substratos Ouro Negro e Casca de Pinus na aclimatização de plantas de *Brassavola martiana* 60 dias após o plantio. PS = porcentagem de sobrevivência; AL = altura; NF = número de folhas; NR = número de raízes. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%. ..... 32
- Tabela 5. Efeitos dos substratos Ouro Negro e Casca de *Pinus* na segunda fase de aclimatização de *Brassavola martiana* 90 dias após a transferência para o Viveiro do Neamb/UFT. PS = porcentagem de sobrevivência; ALT= altura, NF = número de folhas, NR = número de raízes; CMR = comprimento da maior raíz. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste Tukey no nível de probabilidade de 5%. ..... 33
- Tabela 6. Influência dos substratos Ouro Negro e Casca de *Pinus* na quantificação de pigmentos de *Brassavola martiana*. Ca = clorofila a; Cb= clorofila b, Ct = clorofila total, Cr = carotenóides. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste Tukey no nível de probabilidade de 5%. ..... 35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Altura
ANA	Ácido naftalenoacético
BA	Benziladenina
Ca	Clorofila a
Cb	Clorofila b
CMR	Comprimento da maior raiz
CMB	Comprimento do maior broto
Cr	Carotenoides
Ct	Clorofila total
CV	Coefficiente de Variação
DAP	Dias após a polinização
DMSO	Dimetilsulfóxido
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
NEAMB	Núcleo de Estudos Ambientais
NF	Número de folhas
NR	Número de raízes
PS	Porcentagem de Sobrevivência
T1	Tratamento 1
T 2	Tratamento 2
T 3	Tratamento 3
T 4	Tratamento 4
UFT	Universidade Federal do Tocantins

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	17
2.1	<b>Estudos biométricos</b> .....	17
2.2	<b>Influência da idade das sementes na germinação</b> .....	17
2.3	<b>Influência da temperatura no desenvolvimento <i>in vitro</i></b> .....	19
2.4	<b>Aclimatização</b> .....	19
2.5	<b>Análises estatísticas</b> .....	21
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
3.1	<b>Estudos biométricos</b> .....	22
3.2	<b>Influência da idade das sementes na germinação</b> .....	23
3.3	<b>Influência da temperatura no desenvolvimento <i>in vitro</i></b> .....	27
3.4	<b>Aclimatização</b> .....	29
4	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	36
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das mais importantes em termos botânicos e econômicos uma vez que é considerada a maior e mais diversificada dentre as angiospermas (VENTURA, 2007; YEW; HEW, 2000) e apresenta características ornamentais altamente relevantes. Em relação ao seu hábito de vida, as orquídeas podem ser terrícolas, epifíticas, rupícolas, escandentes e, em alguns casos saprófitas; tal diversidade possibilita uma distribuição ampla ao redor do mundo, embora mais diversa e abundante em ambientes de florestas tropicais (SUZUKI *et al.*, 2009). Na natureza, as orquídeas necessitam de associações com fungos micorrízicos para que ocorra a germinação, pois suas sementes são extremamente pequenas e possuem pouca reserva, não sendo suficiente para dar início ao processo germinativo, de modo que o fungo fornece ao embrião os nutrientes necessários para a retomada do seu desenvolvimento e consequente formação da nova planta. Mesmo com essa associação e com a grande quantidade de sementes por fruto (podendo haver milhares de sementes em um único fruto) a germinação destas plantas na natureza não passa de 5% (MOREIRA; TOMBA; ZONETTI, 2007).

Devido à dificuldade de germinação apresentada pelas orquidáceas, várias estratégias de propagação *in vitro* vêm sendo propostas, já que cada gênero, ou mesmo cada espécie, apresenta especificidades quanto às condições favoráveis e nutrientes requeridos (RUÍZ *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2012). O cultivo de sementes e o desenvolvimento de orquídeas *in vitro* tiveram início a partir de 1922 com os trabalhos de Lewis Knudson, propondo um meio de cultura composto por sais minerais. Com isso foi possível o cultivo *in vitro* dessas plantas sem a associação com fungos, ou seja, assimbioticamente (HOSSAIN *et al.*, 2008; SCHNEIDERS *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2007). A propagação *in vitro* a partir de sementes é um dos métodos mais conhecidos e utilizados na multiplicação de espécies da família Orchidaceae (VENTURA, 2007). Schneiders *et al.* (2012) apontam que as plantas obtidas através de sementes podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies nativas, devido à variabilidade genética dos indivíduos, sendo portanto altamente relevante no que diz respeito à estudos com fins de preservação da flora.

No estado do Tocantins, grandes empreendimentos hidroelétricos, dentre outras atividades antrópicas, como a agropecuária e práticas extrativistas, estão alterando fortemente os habitats naturais desse grupo de plantas, o que põe em risco várias espécies nativas. Seu alto potencial ornamental faz com que as orquidáceas sejam expressivamente apreciadas por colecionadores, o que muitas vezes os levam a retirá-las de seus habitats naturais, já bastante

reduzidos, de modo ilegal, Lei n.º 9.605 de 12 de fevereiro de 1998 (Lei de Crimes Ambientais). Por essas razões, a capacidade de produzir plantas de orquídeas em grandes quantidades, o que é viabilizado pela propagação *in vitro* dessas espécies, poderia garantir que essas espécies ocupem um lugar no futuro, evitando assim sua extinção (FERREIRA *et al.*, 2018). O cultivo *in vitro* de orquídeas é bastante positivo, uma vez que, resulta em maiores percentuais de germinação quando comparada àquela que ocorre em condições naturais; além disso, a quantidade de indivíduos produzidos por essa técnica é muito maior do que aquela que poderia ser obtida pelo método de multiplicação tradicional.

Devido ao fato de sementes imaturas de certas espécies de orquídeas serem utilizadas na germinação assimbiótica, é importante estabelecer o tempo adequado para a coleta de seus frutos. Esse tempo deve coincidir com o estágio ideal de maturação da semente, que está relacionado com a fase em que seu embrião tiver alcançado um nível de desenvolvimento adequado para que a germinação possa ocorrer com sucesso sob condições *in vitro* (SUZUKI *et al.*, 2012). Por outro lado, no caso de algumas espécies de orquídeas, as sementes podem ser coletadas em grandes quantidades e armazenadas por longos períodos de tempo (LAUZER *et al.*, 1994). Ruíz *et al.* (2008) ressaltam que o estado de maturidade da semente é um fator importante para a germinação, porém ainda pouco estudado na família Orchidaceae, e que a maturidade do fruto tem um efeito altamente significativo sobre a porcentagem de germinação das espécies por eles estudadas.

As sementes de orquídeas também podem auxiliar estudos relacionados com a taxonomia desse grupo de plantas. Segundo Swamy *et al.* (2004) foram propostos vários esquemas de classificação para orquídeas baseados em características micro-morfológicas convencionais, sendo que a morfologia da semente não serve apenas de marcador taxonômico, mas também é importante para a investigação de relações filogenéticas. Diversos estudos científicos realizados com orquídeas sugerem que a variação em características como o tamanho da semente, seu formato e sua cor tem servido de marcadores taxonômico e/ou filogenéticos (ALOMÍA *et al.*, 2016). Esses autores ainda afirmam que características biométricas de sementes também podem afetar importantes aspectos biológicos e ecológicos como, por exemplo, os mecanismos de dispersão das espécies. Verma *et al.* (2014) afirmam que as sementes estão diretamente ligadas a regeneração e distribuição das espécies, de modo que informações sobre suas características biométricas contribuem também com estudos fitogeográficos. Esses mesmos autores ressaltam ainda que as características das sementes são consideradas bastante conservativas quando em comparação com outros caracteres vegetativos e florais.

Após a germinação alguns fatores ambientais afetam o desenvolvimento de plantas *in vitro*, dentre eles a temperatura. Este é um fator crítico para o desenvolvimento dos vegetais, pois controla reações metabólicas celulares e, assim, exerce influência significativa nas atividades fisiológicas das plantas tanto em ambientes naturais quanto sob condições *in vitro*. Nesse sentido, trabalhos científicos têm abordado os efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento de espécies cultivadas por meio das técnicas *in vitro* (NIEVOLA *et al.*, 2005; JOHNSON; KANE, 2012).

Outro importante fator a ser considerado e que se configura como um dos desafios encontrados quando se propaga plantas *in vitro* é a necessidade de um período de aclimatização para que as novas plantas possam ser transferidas para o ambiente natural e nele se desenvolvam adequadamente. Esta fase é bastante delicada, não apenas porque representa um estresse para a plântula, mas também pelo perigo de infecções por bactérias e fungos que podem se instalar nos indivíduos durante esse período (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

É também pertinente verificar a atividade fotossintética da planta uma vez que esta é retirada de um ambiente mais controlado, em sala de crescimento, e colocada em um outro mais semelhante ao seu hábitat natural, em viveiro, por exemplo. Favetta *et al* (2017) relatam que os pigmentos fotossintéticos apresentam grande importância na fotossíntese e estão relacionados com o crescimento das plantas. Os organismos fotossintetizantes são os únicos capazes de realizar um processo único de importância biológica capaz de aproveitar a energia do sol. As clorofilas são os pigmentos verdes especializados na absorção de luz e ficam contidas nos cloroplastos, onde por sua vez a energia luminosa é utilizada para a produção de energia química através dos fotossistemas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

*Brassavola martiana* Lindl, espécie objeto do presente estudo (Figura 1), possui hábito epifítico e é semi-umbrófila. Apresenta folha única, disposta no ápice de pseudobulbo roliço e quase imperceptível, arcuada a ereta, persistente, filiforme, sulcada, alongada, estreita, com 23-30 cm de comprimento e 0,5-1 cm de largura, presença de velame nas raízes (BONATES, 1993). Sua inflorescência é multiflora, com flores alvas e labelo internamente amarelo (Figura 1). Essa espécie é nativa do Brasil, porém não é endêmica. Sua distribuição no Brasil compreende os estados de Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima (Norte) e Mato Grosso (Centro-oeste). É encontrada em campinarana, florestas ciliares ou de galeria, florestas de igapó e de várzea e na savana amazônica (BARROS *et al.*, 2018). Não existem registros na literatura sobre sua ocorrência no estado do Tocantins, entretanto os espécimes utilizados no presente estudo foram coletados nos municípios de Lagoa da Confusão e Ipueiras, de acordo com os registros no Herbário do Tocantins (nº7338 e nº8986).

Levando-se em consideração o exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo estudar aspectos relacionados com a biometria de sementes, com a germinação e o desenvolvimento *in vitro*, e com a aclimatização de *Brassavola martiana*.

Figura 1. *Brassavola martiana* no Orquidário do Neamb/UFT (Campus de Porto Nacional).



Fonte: Foto obtida pela autora (2019).



## 2 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo *in vitro* de Plantas, do Núcleo de Estudos Ambientais (NEAMB), da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Porto Nacional.

### 2.1 Estudos biométricos

Para os estudos biométricos foram utilizadas sementes provenientes de três frutos, oriundos de polinização manual e com idade de 180 dias após a polinização (DAP). A metodologia consistiu na obtenção de fotos a partir de lâminas frescas com sementes montadas com água destilada. As imagens foram capturadas por microscópio óptico Leica DM 500, com câmera Leica ICC 50 HD acoplada. Posteriormente as medidas de comprimento e largura de 100 sementes foram tomadas utilizando o programa Anati Quanti versão 2.0 para Windows ® (AGUIAR *et al.*, 2007). Os cálculos estatísticos foram feitos por meio do programa SISVAR.

### 2.2 Influência da idade das sementes na germinação

Para verificar a influência da idade das sementes de *Brassavola martiana* no processo germinativo, plantas matrizes oriundas do orquidário do Campus de Porto Nacional (UFT) foram polinizadas manualmente, para geração de frutos tanto de autopolinização quanto de polinização cruzada. Os frutos formados foram coletados ao longo de três meses após a polinização conforme atingiam maturação na planta-mãe, antes da deiscência (Figura 2). Na medida em que foram sendo coletados os frutos foram armazenados à 5°C. Ao longo de 300 (DAP), a partir do 60º dia em intervalos de 30 dias, sementes oriundas desses frutos foram utilizadas em testes de germinação. Deste modo foram realizados teste com sementes com 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 dias após a polinização (DAP). Para cada um desses períodos foram utilizadas sementes oriundas dos dois tratamentos de polinização (autopolinização e polinização cruzada) separadamente.

Figura 2. Fruto de *Brassavola martiana* antes de ser coletado.



Fonte: Foto obtida pela autora (2019).

Após a retirada dos frutos, as sementes foram embebidas em água deionizada e autoclavada por 30 minutos. Logo em seguida foram desinfestadas por meio da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial na concentração de 15% [v/v] durante 10 minutos, seguido de duas lavagens de 15 minutos cada com água deionizada e autoclavada. Esse processo foi realizado em uma câmara de fluxo laminar. Depois da desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos com capacidade de 90 mL contendo 25 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOK, 1962) na concentração de 50% dos macronutrientes, e suplementados com 0,4 mg. L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg. L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 2% de sacarose, totalizando 10 frascos (repetições) por tratamento de idade e tipo de polinização. Os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 35-40 μmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. A análise da taxa de germinação foi realizada de acordo com Suzuki *et al.* (2009).

Com o intuito de verificar algumas condições meteorológicas na cidade de Porto Nacional (TO) durante os meses de frutificação de *Brassavola martiana* (fevereiro-abril), dados referentes à precipitação, umidade relativa do ar e temperatura nos anos em que foram realizados os experimentos (2018 e 2019), bem como no ano anterior (2017) foram obtidos do site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Em seguida esses dados foram utilizados

na plotagem de três gráficos diferentes contendo as médias de precipitação, umidade relativa do ar e temperatura.

### **2.3 Influência da temperatura no desenvolvimento *in vitro***

Para testar os efeitos da temperatura no desenvolvimento *in vitro* de *B. martiana* plantas ( $3,0 \pm 1,0$  cm de comprimento) oriundas do cultivo *in vitro*, sem raízes, foram transferidas para frascos Enlenmeyers com volume de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura Knudson C (ALVES, 2018) acrescido de 0,57 de benziladenina (BA) e 0,57 $\mu$ M do ácido naftalenoacético (ANA), os quais foram mantidos em câmaras de crescimento com temperaturas ajustadas para 25 (T1), 30 (T2) e 35° C (T3) totalizando três tratamentos. Foram realizadas 6 repetições (frascos contendo 5 plantas) por tratamento (n=30). Os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfuradas, cujos furos foram preenchidos com pequenos tufo de algodão umedecidos com uma solução de permanganato de potássio saturada após a inoculação dos explantes. Os resultados foram avaliados por meio das seguintes variáveis: número de brotos e raízes formados/explante, comprimento do maior broto (medida da base até a gema apical) e da maior raiz após 120 dias de cultivo.

### **2.4 Aclimatização**

A etapa de aclimatização foi dividida em duas fases. A fase 1, subdividida em fase 1a e fase 1b, consistiu na retirada das plantas do meio de cultura e plantio em recipientes plásticos comunitários contendo substrato sólido, que foram mantidos em sala de crescimento (fase 1a). Após 60 dias as plantas foram transferidas para potes plásticos individuais contendo substrato sólido e mantidos no mesmo ambiente (fase 1b). Na fase 2 as plantas oriundas da fase 1b foram transferidas para viveiro de mudas com 75% de retenção da radiação solar.

Para a fase 1a foram selecionadas 100 plantas (com raízes e folhas formadas), que foram retiradas do frascos de cultivo e lavadas em água corrente para a remoção de restos de meio de cultura. Em seguida essas plantas foram transferidas para 10 recipientes plásticos comunitários com 16 cm altura x 12 cm largura basal e com tampas (10 plântulas/pote) contendo um substrato misto composto por Bioplant [Nova Ponte, MG] e esfagno desidratado. Esses substratos foram testados nas proporções de 0:1 (T1); 1:0 (T2); 1:1 (T3) e 2:1 (T4). Os recipientes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 35-40  $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ . As plantas foram irrigadas em dias alternados

para manutenção do substrato úmido. Após 60 dias o resultado foi avaliado por meio da porcentagem de sobrevivência, altura das plantas (medida da base até a altura da maior folha), número de folhas e número de raízes por planta formadas.

Para a continuidade dos estudos de aclimatização, na fase 1b, 72 plântulas oriundas da fase anterior foram transferidas para vasos plásticos individuais, medindo 7 cm altura x 6 cm de diâmetro basal com quatro furos na parte inferior, contendo um substrato misto composto por Ouro Negro e Casca de Pinus nas proporções de 0:1 (T1), 1:0 (T2) e 1:1 (T3). A escolha desses dois substratos, foi baseada no fato de que estes apresentam partículas mais espessas sendo, portanto, menos densos e com maior aeração, visando, portanto, proporcionar a exposição das raízes a condições mais próximas ao ambiente onde as plantas naturalmente habitam. O regime de irrigação foi semelhante àquele da fase 1a, além disso, as plantas tiveram suas folhas aspergidas com água deionizada em dias alternados. A avaliação foi realizada após 60 dias e foram utilizadas as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência, altura das plantas (medida da base até a altura da maior folha) e número de folhas.

No que se refere à segunda fase de aclimatização, 45 plantas oriundas da fase 1b foram transferidas para o viveiro do Campus de Porto Nacional (UFT) com 75% de retenção do fluxo de radiação solar onde foram mantidas por 90 dias. Após esse período elas foram avaliadas por meio dos seguintes parâmetros: porcentagem de sobrevivência, altura das plantas (medida da base até a altura da maior folha), número de folhas, número de raízes formadas e comprimento da maior raiz. O regime de irrigação também foi semelhante àqueles descritos nas fases anteriores. Nos dias chuvosos a irrigação foi suspensa.

Para verificar a influência dos pigmentos fotossintéticos na segunda fase de aclimatização de *B. martiana* foi realizado a quantificação das clorofilas *a* e *b* e dos carotenóides em plantas oriundas dos três substratos utilizados, por meio do método de colorimetria proposto por Arnon em 1949, modificado para o presente estudo de acordo com Oliveira (2018). Deste modo, 1g de material fresco foi imerso em 5ml de solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) em tubos de ensaio completamente cobertos por papel alumínio de modo a impedir a entrada de luz. Foram realizados um total de quatro repetições por tratamento. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente durante 30 horas, logo em seguida foram realizadas as leituras de densidade óptica da solução a 470, 645 e 663 nm utilizando-se um espectrofotômetro Digimed, modelo DM-ESPEC. Para obtenção da massa seca, o material utilizado foi colocado por 48 horas em estufa a 50°C após a extração dos pigmentos. Ao final, os teores de clorofila foram determinados utilizando-se as equações propostas por Arnon (1949), e Lichtenthaler (1987):

Clorofila a =  $(12,4 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} / 1000 \cdot MS) \cdot \text{Volume}$

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

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

Carotenoides =  $(100 \cdot A_{470}) \cdot (1,82 \cdot \text{Clorofila a}) + (85,02 \cdot \text{Clorofila b}) \cdot (198) \cdot \text{Volume}$

sendo  $A_{663}$  = absorvância a 663 nm,  $A_{645}$  = absorvância a 645 nm,  $A_{470}$  = absorvância a 470 nm, Volume = volume da amostra em mL e MS = massa seca da amostra. Os valores das amostras foram expressos na unidade de  $\mu\text{g/g}$  de massa seca do material.

## 2.5 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado nesse estudo foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram normalidade foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade para comparação das médias. Aqueles que não apresentaram normalidade foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e as médias comparadas pelo teste de Dunn no nível de 5% de probabilidade. Os resultados em porcentagem da fase 1a e dos experimentos de temperatura foram transformados em arco seno de suas raízes antes do tratamento estatístico. As análises foram feitas utilizando o software estatístico Sisvar, versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Estudos biométricos

Os resultados referentes à descrição biométrica das sementes de *B. martiana* estão descritos na Tabela 1. As sementes apresentaram médias de 212,67  $\mu\text{m}$  de comprimento e 52,33  $\mu\text{m}$  de largura. Alomía *et al.* (2016) observaram variações para médias de comprimento e largura, respectivamente, de várias espécies de orquídeas do gênero *Vanilla*: *V. aroana* (431,24 e 312,12  $\mu\text{m}$ ), *V. calyculata* (393,41 e 320,12  $\mu\text{m}$ ), *V. rivasii* (339,41 e 320,82  $\mu\text{m}$ ) e *V. odorata* (310,74 e 222,21  $\mu\text{m}$ ). Assim, pode-se verificar que as sementes dessas espécies de *Vanilla* se mostraram mais arredondadas do que as de *B. martiana* que são mais alongadas e estreitas, com largura consideravelmente menor quando comparada com seu comprimento.

Estudos feitos por Swamy *et al.* (2004) descreveram sementes de *Aerides maculosum*, *Bulbophyllum mysorense*, *Liparis ellipitca*, *Oberonia ensiformis*, *Vanda parviflora* e *Xenikophyton smeeanum* que se mostraram mais semelhantes às de *B. martiana* uma vez que apresentam maior discrepância entre valores de comprimento e largura, de modo que as sementes das espécies citadas também são mais estreitas e compridas. Sementes de *Cyclopogon elatus* apresentaram médias de 690  $\mu\text{m}$  de comprimento e 91  $\mu\text{m}$  de largura, o que demonstra sementes com dimensões similares às da espécie aqui estudada (LALLANA; DI PERSIA, 2018). Entretanto, dimensões análogas não necessariamente significam formas semelhantes. Por exemplo, Verma *et al.* (2014) ao estudarem a biometria de sementes de *Cypripedium cordigerum*, *Goodyera biflora* e *Brachycorythis obcordata* obtiveram valores de comprimento maiores que de largura, porém suas formas variaram entre fusiforme, filiforme e espatuladas. Os mesmos autores também notaram que sementes de orquídeas epífitas tinham um tamanho relativamente pequeno quando comparadas com sementes de orquídeas que possuíam hábito terrícola.

As sementes de *B. martiana* apresentaram uma grande variação em suas dimensões, o que é demonstrado pelos altos coeficientes de variação. A maior variação observada foi para a largura (CV= 74,12%), entretanto, a variação para o comprimento também foi alta (CV= 62,07%). Os estudos previamente realizados com sementes de orquídea, aqui apontados, não apresentaram comentários quanto à variações intraespecíficas nas dimensões das sementes.

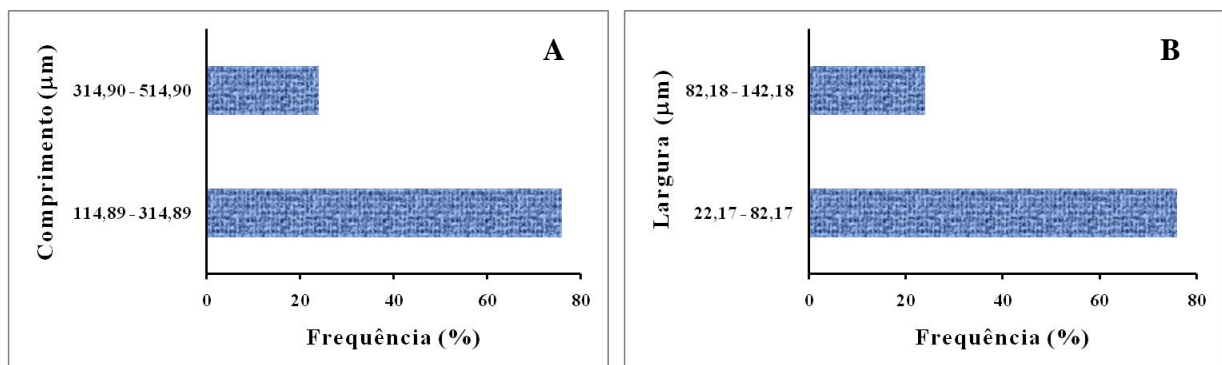
Tabela 1. Estatística descritiva para as variáveis comprimento e largura de sementes de *Brassavola martiana*.

Parâmetros	Comprimento (µm)	Largura (µm)
Média	212,67	52,33
Valor mínimo	114,89	22,17
Valor máximo	510,91	142,07
Coefficiente de variação (%)	62,07	74,12
Erro padrão da média	13,20	3,87

Fonte: Tabela obtida pela autora (2019).

Em relação ao comprimento, a classe de maior frequência relativa (Gráfico 1) foi a de 114,89 - 314,89 µm (76%). Para largura a classe de maior frequência foi a de 22,17 - 82,17 µm (76%). Gusmão *et al.* (2006) ressaltam que estudos biométricos compõem um instrumento de suma importância para demonstrar a variabilidade genética encontrada dentro de populações de uma mesma espécie e são também relevantes para diferenciar espécies dentro de um mesmo gênero, uma vez que estas podem ser bastante semelhantes de um ponto de vista macroscópico.

Gráfico 1. Frequências de comprimento (A) e largura (B) de sementes de *Brassavola martiana*



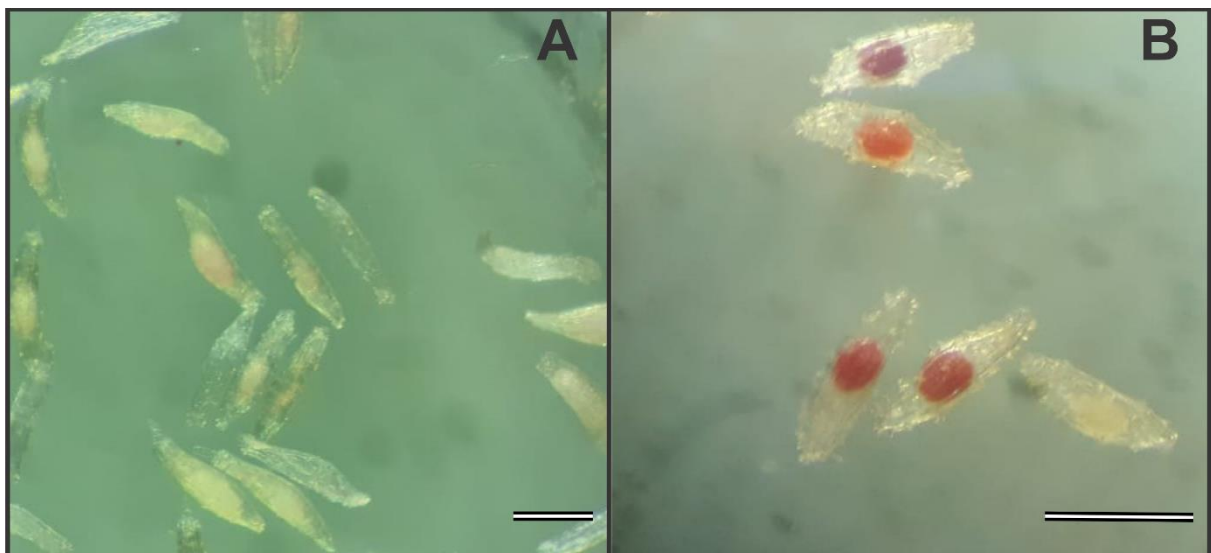
Fonte: Gráfico obtido pela autora (2019).

### 3.2 Influência da idade das sementes na germinação

Sementes com 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 DAP, oriundas tanto de autofecundação quanto de fecundação cruzada não germinaram. Tais resultados mostraram-se bastante inesperados, uma vez que foi verificado por Alves (2018), que sementes de *B. martiana* com 210 dias de idade apresentaram 64,4% de germinabilidade. É possível que no presente estudo essas sementes tenham sofrido algum tipo de interferência a ponto de terem sua viabilidade afetada. Entretanto, como os resultados relatados por Alves (2018) foram

satisfatórios, decidiu-se realizar um teste para verificar a viabilidade das sementes (teste de Tetrazólio) conforme Suzuki *et al.* (2012). O teste foi realizado com sementes de todos os frutos coletados, separando-as por tipo de polinização empregada. Além disso o teste também foi realizado com sementes obtidas de frutos polinizados naturalmente, onde não é possível determinar se ocorreu autopolinização ou polinização cruzada. Em todos os casos testados foi observado que as sementes apresentavam embriões inviáveis ou sementes sem embriões visíveis como mostra a Figura 3A. Para efeito comparativo, com o objetivo de verificar a eficácia da solução de Tetrazólio utilizada, foi realizado o mesmo teste em sementes recém colhidas da orquídea *Catasetum macrocarpum* as quais apresentaram embriões viáveis corados em vermelho (Figura 3B).

Figura 3. Sementes inviáveis de *Brassavola martiana* (A) e sementes viáveis de *Catasetum macrocarpum* (B) submetidas ao teste de Tetrazólio (Barras = 500 $\mu$ M).



Fonte: Fotos obtidas pela autora (2019).

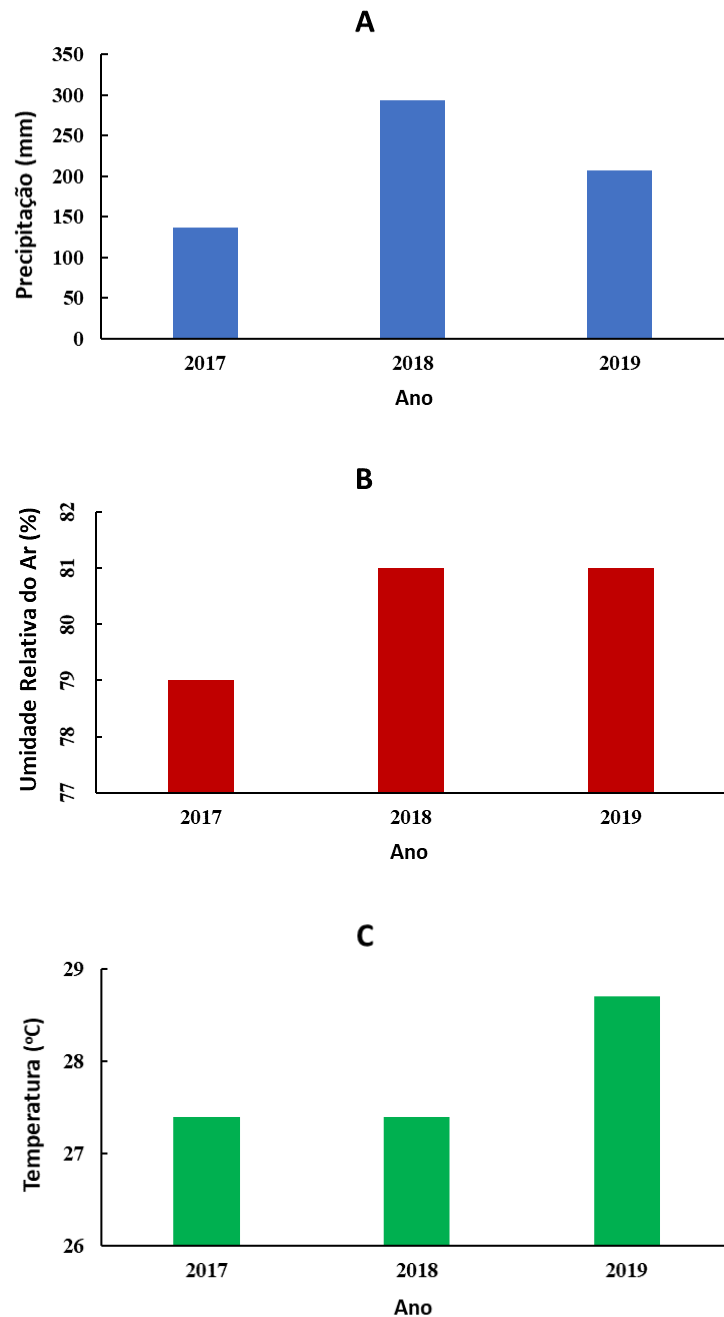
Após a coleta os frutos foram armazenados sob refrigeração (5°C) até os dias das inoculações das sementes para os testes de germinação. É possível que esse armazenamento a frio tenha contribuído para a perda de viabilidade das sementes de *B. martiana*. O armazenamento de sementes de orquídeas em baixas temperaturas tem sido reportado por diversos autores (MACEDO *et al.*, 2014; VUDALA; RIBAS, 2017; FRANCHESCHII *et al.*, 2019) e não tem afetado negativamente o processo de germinação. Embora não se possa afirmar com certeza, é possível que embriões de *B. martiana* sejam menos tolerantes ao frio. Por outro lado, Macedo *et al.* (2014) observaram taxas de viabilidade acima de 80% para as



sementes de *Brassavola tuberculata* que haviam sido armazenadas em refrigerador ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e uma viabilidade de 42% para aquelas que haviam sido deixadas em temperatura ambiente. Embora sejam espécies do mesmo gênero, seus embriões podem ter comportamentos diferentes quando submetidos às mesmas condições de armazenamento. Vudala e Ribas (2017) também relataram que sementes de *Hadrolaelia grandis* armazenadas durante 36 meses em temperaturas de  $-20$  e  $-80^\circ\text{C}$  obtiveram taxas de viabilidade de 64,24% e 81,86% respectivamente, o que indica que sementes de orquídeas podem ser armazenadas em baixas temperaturas, o que de acordo com os resultados aqui apresentados pode não ser o caso das sementes de *Brassavola martiana*.

Observou-se também a existência de sementes sem embriões (Figura 3A). Isso mostra que o processo de embriogênese não ocorreu nessas sementes (tanto no caso da autopolinização quanto na polinização cruzada). Nos anos dos experimentos (2018 e 2019) houve um considerável aumento na pluviosidade no município de Porto Nacional no período de frutificação (fevereiro-abril) o que contribuiu para um concomitante aumento na umidade relativa do ar quando comparado com 2017 (Gráfico 2) ao mesmo tempo em que se registrou temperatura média mais elevada em 2019. Assim, não se pode descartar a possibilidade de que esses fatores tenham causado um efeito negativo na formação de embriões de *B. martiana* em 2019.

Gráfico 2. Médias de precipitação (A), umidade relativa do ar (B) e temperatura (C) para o município de Porto Nacional, Tocantins, nos anos de 2017, 2018 e 2019 durante o período de frutificação de *Brassavola martiana* (fevereiro - abril).



Fonte: Gráficos obtidos pela autora com base em dados do INMET (2021).

Soares *et al.* (2014) sinalizam que fatores abióticos podem influenciar o número de sementes viáveis em orquídeas. Seaton *et al.* (2010) destacam as mudanças climáticas regionais como um fator que afeta muitos sistemas naturais, podendo assim prejudicar processos fisiológicos das plantas em seus habitats. Silva, Reis e Maciel (2020) ao estudarem as tendências da temperatura anual no estado do Tocantins relataram que Palmas e Porto Nacional foram as cidades que apresentaram maiores taxas de aumento na temperatura mínima entre os anos de 1961 até 2017. Porto Nacional também foi listado entre as localidades com maiores aumentos de temperatura máxima. Os autores concluem que as cidades do Tocantins estudadas, dentre elas o município de Porto Nacional, estão passando por um processo de maior retenção de energia na forma de calor sensível no período da noite, e que isso provavelmente se deve a uma perda cada vez maior de cobertura verde na superfície terrestre. Vojtkó *et al.* (2015) ao estudarem três espécies de orquídeas verificaram que as diferenças no sucesso reprodutivo (número de sementes/cápsula) entre anos secos e chuvosos não foram significativas, embora que para uma das espécies tenha ocorrido uma redução no seu sucesso reprodutivo quando o tempo era mais seco.

### **3.3 Influência da temperatura no desenvolvimento *in vitro***

Os resultados referentes à influência da temperatura no desenvolvimento *in vitro* da espécie estão apresentados na Tabela 2. A porcentagem de sobrevivência das plantas foi de 80% para o tratamento de 25°C e de 76,6% para o de 30°C, enquanto que o tratamento de 35°C não se mostrou adequado para esta variável, uma vez que a porcentagem de sobrevivência foi de apenas 35%. Para o número de raízes, comprimento da maior raiz e número de brotos foi significativamente superior aos demais. Em relação ao comprimento do maior broto não houve diferença significativa entre 25 e 30°C. O tratamento de 35°C apresentou os menores valores para essa variável. Assim, o tratamento de 25°C proporcionou o melhor desenvolvimento *in vitro* para *B. martiana*.

Lopez e Runkle (2005) apontam que para orquídeas do gênero *Cattleya* o crescimento ocorre de maneira mais rápida em temperaturas acima de 25°C. Para espécies do gênero *Cymbidium* temperaturas de 30°C são mais adequadas para melhor crescimento e maturidade dos pseudobulbos. Para a maioria das orquídeas do gênero *Dendrobium* um crescimento mais rápido ocorre em temperaturas variando entre 24 e 30°C. Johnson e Kane (2012) observaram que o desenvolvimento de plantas de *Bletia purpurea* é mais rápido à 25°C. Lopes *et al.* (2003) ao estudarem o gênero *Zygopetalum* constataram que o crescimento das plantas foi mais rápido

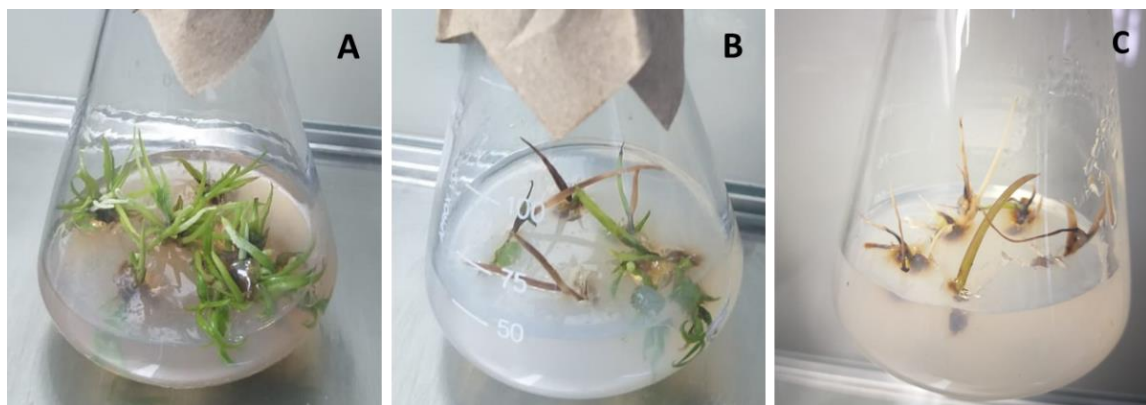
quando cultivadas em temperaturas próximas a 26°C, contudo nessa temperatura e em temperaturas mais altas observaram que as folhas desenvolveram inúmeras manchas necróticas. Para *Brassavola martiana* foi possível observar folhas parcial ou completamente necrosadas em temperaturas de 30 e 35°C (Figura 4B e C).

Tabela 2. Efeitos da temperatura no desenvolvimento *in vitro* de *Brassavola martiana* 120 dias após a transferência para câmaras de crescimento com temperaturas ajustadas para 25, 30 e 35°C. PS = porcentagem de sobrevivência; NR = número de raízes; CMR = comprimento da maior raiz, NB = número de brotos, CMB = comprimento do maior broto. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Dunn no nível de 5% de probabilidade.

Temperatura	Variáveis				
	Sobrevivência	NR	CMR	NB	CMB (cm)
25°C	80,0 a	8,67 a	3,00 a	4,42 a	2,24 a
30°C	76,6 a	3,41 b	1,44 b	2,41 b	1,63 ab
35°C	35,0 b	2,57 b	0,52 b	1,43 b	0,73 b

Fonte: Tabela obtida pela autora (2020).

Figura 4. Plantas de *Brassavola martiana* cultivadas *in vitro* em Erlenmeyers de 125 mL nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, em A, B e C, respectivamente. Em B e C observam-se folhas com manchas ou completamente necrosadas.



Fonte: Fotos obtida pela autora (2020).

Para *Psychomorphis pusilla* foi relatado que o melhor crescimento foi obtido a 27°C, temperatura semelhante à média das regiões tropicais no Brasil, onde a espécie é amplamente distribuída. Apesar disso, ao testarem as temperaturas mínima (22°C) e máxima (32°C), ocorrentes no local de origem, os resultados não foram positivos no cultivo *in vitro*. Esse resultado pode indicar que a melhor temperatura para o desenvolvimento *in vitro* de

determinada espécie pode não ser igual a melhor temperatura para o desenvolvimento *ex vitro* desta mesma espécie (VAZ; FIGUEIREDO-RIBEIRO; KERBAUY, 2004). Isso, por sua vez, poderia explicar o motivo do melhor desenvolvimento de *B. martiana* ocorrer a 25°C *in vitro*, enquanto a espécie cresce em temperaturas mais elevadas no ambiente natural.

### 3.4 Aclimatização

A porcentagem de sobrevivência das plantas bem como as variáveis analisadas na fase 1a estão descritas na Tabela 3. Independentemente das proporções dos substratos testados, a espécie apresentou resultados positivos durante essa primeira fase *ex vitro*, apresentando uma porcentagem de sobrevivência acima dos 93%. Nos tratamentos 1:1 e 2:1 (Bioplant : Esfagno) todos os indivíduos sobreviveram. Esses resultados indicam que os substratos utilizados foram eficazes para a sobrevivência das plantas. Eles propiciaram suprimento hídrico e aeração adequados capazes de garantir uma alta sobrevivência dos indivíduos. Considerando que a aclimatização é uma fase crítica e importante no processo de propagação *in vitro*, a espécie *B. martiana* se mostrou resistente ao primeiro transplante. Ferreira *et al.* (2018) também relataram taxas de sobrevivência acima de 90% para *Catasetum macrocarpum* na primeira fase de aclimatização utilizando os mesmos substratos e concentrações citadas acima (1:1 e 2:1). Esses autores afirmaram que a mistura de Esfagno + Bioplant foi vantajosa para a sobrevivência de *C. macrocarpum* quando comparado com o uso do Esfagno isoladamente; o mesmo foi observado para *B. martiana*. Estudando a aclimatização de *B. tuberculata*, Macedo *et al.* (2014) e Mengarda *et al.* (2017) verificaram que a porcentagem média de sobrevivência foi de 70%. Os primeiros autores apontam que a sobrevivência das plantas pode estar ligada à variabilidade genética dos indivíduos, havendo portanto, aqueles que se adequarão mais ou menos às condições *ex vitro*.

No que se refere às variáveis analisadas (Tabela 3), verificou-se que para a altura das plantas o melhor tratamento foi obtido na presença apenas do Bioplant, o qual foi significativamente superior ao tratamento 1:1. Os substratos contendo Esfagno foram significativamente superiores em relação ao número de folhas quando comparados com o tratamento de 1:0, contendo apenas Bioplant. Nas medições realizadas durante a transferência das plantas do meio de cultura para os substratos, essas apresentavam em média 4 folhas as quais nos tratamentos contendo Esfagno foram mantidas, e novas folhas foram formadas ao longo dos 60 dias de cultivo. A persistência da folha na planta vai depender de fatores como: a espécie, o substrato e a capacidade fotossintética de cada indivíduo (DORNELES; TREVELIN,

2011). Esses autores verificaram que para a espécie *Cattleya intermedia* a presença do Espagno no substrato pode ter assistido a produção de novas folhas, o que também foi observado para a espécie do presente estudo.

Tabela 3. Efeitos dos substratos Bioplant e Espagno na aclimatização de plantas de *Brassavola martiana* 60 dias após a transferência para condições *ex vitro*. PS = porcentagem de sobrevivência; AL = altura; NF = número de folhas; NR = número de raízes. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Bioplant : Espagno	Variáveis			
	PS	ALT	NF	NR
<b>0:1</b>	93,3 a	4,10 ab	5,2 a	3,7 ab
<b>1:0</b>	93,3 a	4,68 a	3,5 b	2,9 b
<b>1:1</b>	100,0 a	3,87 b	5,5 a	4,1 a
<b>2:1</b>	100,0 a	4,10 ab	5,1 a	3,9 ab

Fonte: Tabela obtida pela autora (2019).

Na proporção de 1:0, contendo apenas Bioplant, houve uma diminuição no número médio de folhas o que pode estar associado à senescência desse órgão e/ou com a não resistência da plântula ao transplante. Esses fatores se relacionam com a especificidade da espécie bem como com as circunstâncias do ambiente durante o período de aclimatização. Franco *et al.* (2007), explicitaram que o processo de abscisão foliar pode fazer parte de uma estratégia da planta, que ao reduzir sua área exposta e, assim, as taxas transpiratórias, conseguem minimizar os efeitos produzidos por diversos tipos de estresse, que aqui se traduzem na transferência para um ambiente menos controlado e favorável que o *in vitro*. Contudo é importante ressaltar que o mesofilo foliar é o tecido fotossintético mais ativo presente nas plantas superiores e portanto imprescindível para que estas cresçam com maior vigor e com melhores chances de sobrevivência (TAIZ; ZEIGER, 2004). Em relação às raízes o tratamento com proporções iguais de Espagno e Bioplant (1:1) apresentou o melhor resultado sendo ele significativamente superior ao tratamento contendo apenas Bioplant. O tratamento sem Espagno (1:0) foi o que apresentou o pior desempenho em termos de formação de raízes.

Considerando os dados anteriormente citados, sugere-se a utilização de Bioplant e Espagno na proporção de 1:1 como substrato inicial para a aclimatização de *B. martiana*. Esse

substrato atende as exigências da espécie nessa fase inicial de transferências para condições *ex vitro*, uma vez que apresentou bons resultados quanto ao número de raízes e folhas das plantas. Essas duas variáveis são de suma importância tanto para a absorção de água e fixação da planta no substrato quanto para a fotossíntese dos indivíduos nas fases posteriores do processo de aclimatização.

Os resultados das variáveis obtidas na Fase 1b utilizando-se os substratos Ouro Negro e Casca de *Pinus* estão apresentados na Tabela 4. A sobrevivência das plantas foi superior no tratamento de 1:1, enquanto que a Casca de *Pinus* usada isoladamente como substrato causou uma perda de 50% dos indivíduos. Dorneles e Travelin (2011), ao estudarem a aclimatização de *Cattleya Intermedia*, observaram uma taxa de sobrevivência de apenas 27% quando o substrato Casca de *Pinus* foi utilizado isoladamente. É notável que a mortalidade de plantas aumentou nessa fase em relação à anterior (Fase 1a), ou seja, a transferência das plantas para potes individuais onde ficaram completamente expostas às condições de umidade da sala de crescimento foi mais crítica do que a passagem do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* quando as plantas ainda permaneceram por 30 dias em recipientes fechados e, portanto, com maior umidade.

A altura das plantas foi maior no tratamento 1:1 com diferença significativa apenas quando comparado com o tratamento 1:0. Não foram detectadas diferenças significativas em relação ao número de raízes e folhas. O Ouro Negro foi escolhido para essa fase por ser um substrato mais grosso, no qual as raízes podem ser melhor “endurecidas” de modo que a planta tenha maior sucesso nas fases posteriores da aclimatização, visando uma melhor adaptação quando transferidas para forófitos em ambiente natural (FERREIRA *et al.*, 2018). Entretanto, nesse primeiro momento nos potes individuais observou-se uma diminuição do número de raízes quando comparado com a fase anterior. O mesmo ocorreu para o tratamento contendo apenas Casca de *Pinus* que, por sua vez, foi utilizado visando um melhor suporte para as raízes imitando seu modo de vida em seu hábitat natural. É possível que a queda abrupta de umidade, bem como o uso de substratos que são melhores em aeração do que em retenção de umidade tenham sido um fator bastante estressante em um primeiro momento para o sistema radicial das plântulas. Contudo, Mengarda *et al.* (2017), ao estudarem *B. tuberculata*, uma espécie do mesmo gênero que a aqui apresentada, ressaltaram que essa espécie depende principalmente da aeração de suas raízes. É possível que apesar de as plântulas terem inicialmente apresentado mais raízes, parte delas ainda eram muito frágeis para se adaptarem a um substrato mais espesso. Também houve uma diminuição no número de folhas nessa fase em relação à primeira, o que pode ser mais um indicativo do estresse sofrido pelos indivíduos.

Tabela 4. Efeito dos substratos Ouro Negro e Casca de Pinus na aclimatização de plantas de *Brassavola martiana* 60 dias após o plantio. PS = porcentagem de sobrevivência; AL = altura; NF = número de folhas; NR = número de raízes. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Ouro Negro : Casca de Pinus	Variáveis			
	PS (%)*	ALT	NF	NR
<b>0:1</b>	50,0	3,6 ab	3,6 a	1,4 a
<b>1:0</b>	70,0	2,9 b	3,4 a	1,7 a
<b>1:1</b>	75,0	4,1 a	3,7 a	1,1 a

\* Não foi possível realizar teste estatístico para essa variável.

Fonte: Tabela obtida pela autora (2019).

Deste modo, baseando-se na quantidade de plantas que sobreviveram nessa fase, bem como na maior altura média dos indivíduos o tratamento considerado mais adequado foi o de 1:1 (Ouro Negro : Casca de Pinus), sendo a sobrevivência um fator de extrema importância para o estabelecimento da espécie.

Os resultados referentes à segunda fase de aclimatização de *Brassavola martiana* estão apresentados na Tabela 5. A porcentagem de sobrevivência das plantas foi de 100% nos tratamentos de 1:0 e 0:1, e de 86,66% no tratamento de 1:1 o que indicou uma alta porcentagem de sobrevivência em todos os tratamentos. As variáveis de altura, número de folhas e número de raízes não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, entretanto demonstraram ser numericamente superiores no tratamento de 1:1. A única variável a apresentar diferença significativa foi o comprimento da maior raiz que se mostrou superior no tratamento 1:1 em relação à 1:0. Sendo assim a proporção de substrato indicada para a segunda fase de aclimatização da espécie *B. martiana* é a de 1:1.

Demattê e Demattê (1996) ao estudarem substratos alternativos para substituir o xaxim (caule de pteridófitas arborescentes) apontaram o uso de fibra de coco e de casca de Eucalipto para o cultivo de algumas orquídeas, pois são substratos que auxiliam na retenção de água. Mengarda *et al.* (2017) ao testarem diferentes substratos para aclimatização de *Brassavola tuberculata* recomendam o uso dos substratos Plantmax e Vermiculita na proporção de 1:1. Segundo esses autores tais substratos proporcionaram uma boa aeração para as raízes o que favoreceu o desenvolvimento das plantas. O substrato Ouro Negro, utilizado no presente estudo, também é benéfico no quesito aeração das raízes, e a Casca de *Pinus*, por sua vez, auxilia na fixação da planta ao substrato (Figura 5), o que, associado ao hábito epifítico da espécie, ajuda



no desenvolvimento das raízes de modo semelhante ao que ocorre em ambiente natural. Foi observado ainda, para *Brassavola martiana*, uma maior robustez das raízes nos substratos que apresentavam Casca de *Pinus*, além de velame já aparente.

Tabela 5. Efeitos dos substratos Ouro Negro e Casca de *Pinus* na segunda fase de aclimatização de *Brassavola martiana* 90 dias após a transferência para o Viveiro do Neamb/UFT. PS = porcentagem de sobrevivência; ALT= altura, NF = número de folhas, NR = número de raízes; CMR = comprimento da maior raíz. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Ouro Negro : Casca de Pinus	Variáveis				
	PS (%)*	ALT (cm)	NF	NR	CMR
<b>1:0</b>	100,0	5,63 a	5,33 a	4,2 a	2,24 b
<b>0:1</b>	100,0	5,23 a	4,60 a	3,4 a	3,94 ab
<b>1:1</b>	86,66	6,80 a	6,70 a	4,5 a	4,34 a

\* Não foi possível realizar teste estatístico para essa variável.

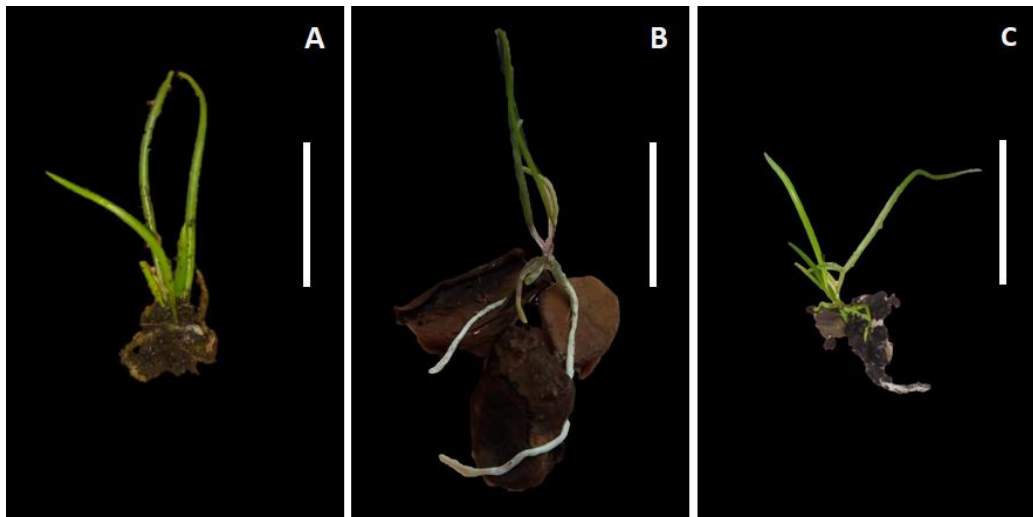
Fonte: Tabela obtida pela autora (2020).

Para a espécie *Catasetum macrocarpum* o uso de um substrato composto por areia, Casca de *Pinus* desfiada e húmus de minhoca na proporção 2:2:1 foi benéfico para o desenvolvimento das plantas em viveiro. O húmus de minhoca ofereceu um material orgânico rico em nutrientes, enquanto a areia e a casca de *Pinus* proporcionavam melhores propriedades físicas e fornecimento de água (MENEZES-SÁ *et al.*, 2019). Amaral *et al.* (2010) discutem que substratos com misturas de casca de coco, areia e casca de *Pinus* geralmente favorecem a aeração e retenção de umidade, o que ajuda no desenvolvimento e crescimento de raízes e no estabelecimento da planta. Silva *et al.* (2017) relatam que para o gênero *Dendrobium* o substrato formado por casca de *Pinus* e serragem vem sendo utilizados na aclimatização de plantas, para fins comerciais em larga escala na China.

As plantas de *B. martiana* foram transferidas para o ambiente de viveiro no período chuvoso, por ser uma época que favorece a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas, quando em comparação com o período de seca. O uso de substratos que não proporcionem uma boa aeração das raízes ou que retenham muita umidade pode ser prejudicial nessa fase, causando apodrecimento das raízes; entretanto substratos que percam a umidade muito rapidamente também são inadequados. Oliveira *et al.* (2021) que utilizaram o mesmo nível de

sombreamento do presente estudo relataram para *Cattleya nobilior* que o uso do substrato Bioplant sozinho em ambiente de viveiro foi o que apresentou pior desempenho para a sobrevivência dos indivíduos, uma vez que este perde umidade muito rapidamente quando exposto ao ambiente sombreado do viveiro. Deste modo é importante que os substratos escolhidos para esse processo não prejudiquem o sistema radicular das plantas, pois seu desenvolvimento propicia maior sobrevivência durante a aclimatização das espécies de orquídeas que poderão ser posteriormente transferidas para a terceira fase de aclimatização: transferência para condições de campo (SORACE *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2009).

Figura 5. Plantas de *Brassavola martiana* após 90 dias em viveiro com substratos Ouro negro e Casca de *Pinus* nas proporções 1:0 (A), 0:1 (B) e 1:1 (C). Barras = 10 cm



Fonte: Fotos obtida pela autora (2020).

Os resultados obtidos em relação à quantificação dos pigmentos fotossintéticos em *Brassavola martiana* ao final da segunda fase de aclimatização estão descritos na Tabela 6. No tratamento 1:1 as quantidades de clorofila *a* e de clorofila total foram significativamente superiores quando comparadas com o tratamento 0:1, que continha apenas casca de *Pinus*. A clorofila é um pré requisito essencial para a fotossíntese das plantas (STÖKEL; MEYER; GEBAUER, 2011). Carvalho (2005) afirma que existe uma correlação positiva entre clorofila, nitrogênio e taxa fotossintética. O tratamento 1:0 foi significativo para a variável clorofila *b* em relação aos demais. A clorofila *b* é um pigmento acessório, que amplia a faixa de luz que pode ser utilizada na fotossíntese; em folhas de plantas verdes cerca de um quarto da clorofila total é constituída desse pigmento (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Emer *et al.* (2017) ao estudarem uma espécie epifítica não orquídea (*Codonanthe devosiana* – Gesneriaceae)

relatarem que apesar de plantas que crescem em condições de sombreamento terem geralmente maior teor de clorofila *b*, isso não foi o observado em seu estudo mesmo nas plantas que foram submetidas aos maiores níveis de sombreamento. Lee (1988) afirma que os teores de clorofila podem variar muito entre as espécies e inclusive entre genótipos da mesma espécie, deste modo é possível que a diferença observada entre os teores de pigmentos seja atribuída às especificidades dos indivíduos e não necessariamente ao substrato utilizado. Não houve diferenças significativas para os teores de carotenóides entre os tratamentos. Ventura (2007) explicita que os carotenóides atuam como pigmentos acessórios na captura de energia luminosa e que também protegem o fotossistema de danos fotoinibitórios. Rego e Possamai (2008) indicam os conteúdos de clorofilas e carotenoides como fatores de suma importância para a adaptação das plantas aos ambientes. Assim, os resultados obtidos não permitiram apontar uma associação coerente entre a quantidade de pigmentos fotossintéticos produzidos por *B. martiana* e os substratos testados no presente estudo.

Tabela 6. Influência dos substratos Ouro Negro e Casca de *Pinus* na quantificação de pigmentos de *Brassavola martiana*. Ca = clorofila a; Cb= clorofila b, Ct = clorofila total, Cr = carotenóides. Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste Tukey no nível de probabilidade de 5%.

Ouro Negro : Casca de Pinus	Variáveis			
	Ca	Cb	Ct	Cr
1:0	5,29 ab	2,26 a	8,41 ab	2532,43 a
0:1	2,62 b	0,67 b	4,16 b	1997,42 a
1:1	7,59 a	0,94 b	12,07 a	1904,61 a

Fonte: Tabela obtida pela autora (2020).

Por fim, é importante ressaltar que fornecer às plantas um suporte relativamente similar ao de um forófito por meio dos substratos contendo Casca de *Pinus* foi benéfico para a adaptação dos indivíduos ao ambiente de viveiro, uma vez que as plantas dos tratamentos 1:1 e 0:1 apresentaram aparência saudável e sistema radicial visivelmente com melhor desenvolvimento do que aquelas do tratamento contendo apenas Ouro Negro. Com base nos resultados obtidos acredita-se que a utilização da Casca de *Pinus* na segunda fase de aclimatização tenha beneficiado *B. martiana* em sua adaptação ao ambiente de viveiro, proporcionando à espécie maior vigor para que siga satisfatoriamente para a terceira fase de aclimatização em campo.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sementes de *Brassavola martiana* possuem média de 212,67 µm de comprimento e 52,33 µm de largura. Foi verificado um alto coeficiente de variação para essas medidas. Os resultados obtidos indicam que sementes de *B. martiana* com até 300 dias após a polinização não germinaram sob condições *in vitro*, o que foi corroborado pelo teste de viabilidade do Tetrazólio. Os experimentos de temperatura mostram que a temperatura ideal para o desenvolvimento *in vitro* da espécie é de 25°C.

Em relação à aclimatização, as plantas de *B. martiana* devem ser inicialmente transferidas para recipientes comunitários contendo os substratos Bioplant e Esfagno na proporção 1:1 e mantidas em sala de crescimento por 60 dias (Fase 1a). Após esse período elas podem ser transplantadas para vasos individuais contendo os substratos Ouro Negro e Casca de *Pinus* na proporção de 1:1 e cultivadas durante 60 dias no mesmo ambiente anterior (Fase 1b). Na segunda fase de aclimatização, em viveiro, as plantas devem ser mantidas em potes individuais contendo os substratos Ouro Negro e casca de *Pinus* também na proporção de 1:1. É recomendado que a transferência das plantas para viveiro seja realizada durante período chuvoso.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T. V.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A. E FERREIRA, R. S. ANATI QUANTI: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta daninha**, v.25, p. 649-659, 2007.
- ALOMÍA, Y.A; MUÑOZ, E; ACOSTA-RANGEL, A.M; OTERO, J.T. Morphometric analysis of *Vanilla* seeds (Orchidaceae) by microscopic techniques. **Lankesteriana**, v.16, n.1, p. 21- 26, 2016.
- ALVES, L. R. **Análise da propagação e desenvolvimento inicial *in vitro*, e aclimatização de *Brassavola martiana* Lindl (Orchidaceae)**. 2018. 44f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Tocantins, 2018.
- AMARAL, T. L.; JASMIM, J. M.; ARAÚJO, J. S. P.; THIÉBAUT, J. T. L.; COELHO, F. C.; FREITAS, C. B. Adubação de orquídeas em substratos com fibra de coco. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 11-19, 2010.
- ARNON D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.
- BARROS, F.D.; 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. 2018. ORCHIDACEAE in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB37244>>. Acesso em: 20 Set. 2021.
- BONATES, L. C. M. Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia. II – Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma campina da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 23, n. 4, p. 315-348, 1993.
- BRASIL, Lei 9.605, 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Presidência da República**, Casa Civil, Brasília, DF, 12 de fevereiro de 1998.
- CABRAL, P. R. M. **Biologia reprodutiva e polinização de orquídeas nativas do estado de São Paulo: *Encyclia patens* Hook., *Phymatidium delicatulum* Lindl. e *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay**. 2014. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Entomologia) - Universidade de São Paulo, 2014.
- CARVALHO, A. P. F. **Estudo de características foliares de espécies de lenhosas de Cerrado e sua relação com os espectros de reflectância**. 2005. 142f. Tese (Doutorado em Ecologia)- Universidade de Brasília, Brasília. 2005.
- COSTA, M. A. P. C.; BASTOS, M. J. S. M.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídeas. In: Junghans, T.G.; Souza, A.S. (eds.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2009. p 373-392.

- DEMATTE, J. B. J.; DEMATTE, M. E. S. P. Estudos Hídricos com substratos vegetais para o cultivo de orquídeas epífitas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.31, n.11, p.803-813, 1996.
- DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia, Série Botânica**, v. 66, n.2, p. 167-174, 2011.
- EMER, A. A.; AVRELLA, E. D.; TEDESCO, M.; FIOR, C. S.; SCHAFFER, G. Níveis de sombreamento no desenvolvimento de mudas de *Codonanthe devosiana* Lem. Revista da 14ª jornada da pós graduação e pesquisa Congrega Urcamp. p. 2121-2131; 2017.
- 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, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (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**, v. 72, n. 1, p. 57-65, 2017.
- FERREIRA, W. M.; OLIVEIRA, S. P.; SUZUKI, R. M. , SILVA, K. L. F.; SOARES JÚNIOR, J. W. P. Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. **Rodriguésia** 69, n. 4, p. 2137-2151, 2018.
- FRANCESCHI, C. R. B.; SMIDT, E. C.; VIEIRA, L. N.; RIBAS, L. L. F. 2019. Storage and *in vitro* germination of orchids (Orchidaceae) seeds from Atlantic Forest – Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 91, n. 3, 2019.
- FRANCO, M.; GUEVARA, G.; MESA, N.; URUEÑA, G. Hardening of the national flower of Colombia, the threatened *Cattleya trianae* (Orchidaceae), from *in vitro* culture with previous invigoration phase. **Revista de Biologia Tropical**, v. 55, n. 2, p. 681-691, 2007.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, p. 183-260, 1998.
- GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA-JUNIOR, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). **Cerne**, v. 12, n.1, p.84-91, 2006.
- HOSSAIN, M. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, p. 3614-3619, 2008.
- JOHNSON, T. R.; KANE, M. E. Effects of temperature and light on germination and early seedling development of the pine pink orchid (*Bletia purpurea*). **Plant Species Biology, Kyoto**, v. 27, n. 2, p. 174-179, 2012.

- LALLANA, V.G; DI PERSIA, J F. Caracterización morfológica de semillas de cuatro especies de orquídeas terrestres nativas de Argentina. **Ciencias, Docencia y Tecnología**, v.29, n.57, p.272-284, 2018.
- LAUZER D.; ST-ARNAUD, M.; BARABE D. Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). **Lindleyana**, n. 9, p. 197–204, 1994.
- LEE, D.W.; Simulating forest shade to study the development ecology of tropical: juvenile growth in three vines in India. **Journal of Tropical Ecology**, v.4, p.281-292, 1988.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LOPEZ, R. G.; RUNKLE, E. S. Environmental Physiology of Growth and Flowering Orchids. **Hort Science**; v. 40, n. 7, p. 1969-1973, 2005.
- LOPEZ, R.G., RUNKLE, E.S.; HEINS, R. D.; WHITMAN, C. M. 2003. Temperature and photoperiodic effects on growth and flowering of *Zygopetalum* Redvale ‘Fire Kiss’ orchids. **Acta Hort**, v. 624, p. 155-162, 2003.
- 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.
- MENEZES-SÁ, T. S.A.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; COSTA, A. S.; FEITOSA ALCANTARA, R. B.; BLANK, A. F.; LUZ, J. M.Q. Conservação *in vitro* e aclimatização de Epidendroideae (Orchidaceae) de Sergipe, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 2, p. 356-366, 2019.
- MENGARDA, L.H.G.,; COLA, G.P.A.; OLIVEIRA, .F.S.C.; FREITAS, A.R. Multiplication, rooting *in vitro*, and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. (orchidaceae), an orchid endemic to the Brazilian Atlantic rainforest. **Bioscience Journal**, v.33, n.3, p.730-738, 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. C. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya Warneri* T. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v. 2, n. 2, p. 16-21, 2007.
- NIEVOLA, C. C.; KRAUS, J. E.; FRESCHI, L., SOUZA, B. M.; MERCIER, H. Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. **In Vitro Plant Cellular & Developmental Biology**, v. 41, p.832-837, 2005.
- OLIVEIRA, J. R. G. **Análise da multiplicação e desenvolvimento inicial in vitro, e aclimatização de Encyclia flava (Lindl.) Porto & Brade (Orchidaceae)**. 2018. 35f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós- Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Tocantins, 2018.

- OLIVEIRA, S. L. A.; SILVA, K. L. F.; OLIVEIRA, R. J.; SOUZA, M. J.; OLIVEIRA, J. R. G.; FERREIRA, W. M. Germinação *in vitro*, desenvolvimento inicial e aclimatização de *Cattleya nobilior* Rchb.f. (Orchidaceae): uma abordagem para evitar a eventual extinção dessa exuberante e quase ameaçada espécie do Cerrado. **Diversitas Journal**, v. 6, n.2, p.2167-2191, 2021.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6a. ed. Rio de Janeiro: 2001.
- REGO, G.M. & POSSAMAI, E. Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas de Jequitibá-Rosa (*Cariniana legalis*). Comunicado Técnico 128, Colombo, PR, EMBRAPA, 2008.
- RUIZ, B. C.; LAGUNA, C. A.; IGLESIAS, A. L. G.; DAMON, A.; MARÍN, H. T. N. J.; AZPIROZ, R. H. S.; MORENO, M. J. L. Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr. (Orchidaceae). **Phyton: International Journal of Experimental Botany**, v. 77, p. 203-215, 2008.
- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, Rogério M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.
- SEATON, P. T.; HU, H.; PERNER, H.; PRITCHARD, H. W. Ex situ conservation of Orchids in a Warming World. **The New York Botanical Garden**, v. 76, p. 193-203, 2010.
- SILVA, J.A.T.; 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.
- SILVA, R. A.; REIS, E. S.; MACIEL, G. F. Tendências da temperatura anual no estado do Tocantins. **Nativa, Sinop**, v.8, n.4, p.544-551, 2020.
- SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; TATARA, M. B.; SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R. Identificação da viabilidade de sementes de Orquídeas pelo teste de tetrazólio. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 35, n.5, p. 2275-2284, 2014.
- SORACE, M.; FARIA, R. T.; YAMAMOTO, L. Y.; SCHNITZER, J.; TAKAHASHI, L. S. A. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 195-200, 2007.
- SOUSA, G. G. **Germinação e crescimento *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE)**. 2013. 92f. Tese (Doutorado em Agronomia- Produção Vegetal) - Universidade Federal da Grande Dourados, 2013.
- 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.; 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.
- SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 48, n. 5, p. 500-511, 2012.
- SWAMY, K. K.; KUMAR, H. N. K.; RAMAKRISHNA, T. M.; RAMASWAMY, S. N. Studies on Seed Morphometry of Epiphytic Orchids from Western Ghats of Karnataka. **Taiwania**, v. 49, n. 2, p. 124- 140, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Trad. SANTARÉM, E. R.; MARIATH, J. E.; ASTARITA, L. V.; DILLENBURG, L. R.; ROSA, L. M. G.; OLIVEIRA, P. L. 3 ed., Porto Alegre. Artmed, 2004.
- VAZ, A. P. A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; KERBAUY, G. B. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. **Plant Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 42, n. 5, p. 411-415, 2004.
- 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.
- VERMA, J; SHARMA, K; THAKUR, K; SEMBI, J. K; VIJ, S.P. Study on seed morphometry of some threatened Western Himalayan orchids. **Turkish Journal of Botany**, v. 38, p. 234- 251, 2014.
- VOJYKÓ, A. E; SONKOLY, J; LUKÁCS, B. A; MOLNÁR, V. A. Factors affecting reproductive success in three entomophilous orchid species in Hungary. **Acta Biologica Hungarica**, v. 66, n. 2, p. 231- 241, 2015.
- VUDALA, S. M.; RIBAS, L. L. F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 1-7, 2017.
- YEW, C. K.; HEW, C. S. Orchid pseudobulbs – ‘false’ bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival. **Sci. Hortic**, v. 83, p. 165-172, 2000.