



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Elinton Soares Pontes

Morfogênese e histodiferenciação de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos em duas espécies de *Cattleya* lindl. (Orchidaceae) em sistema *in vitro*

Florianópolis

2025

Elinton Soares Pontes

Morfogênese e histodiferenciação de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos em duas espécies de *Cattleya* lindl. (Orchidaceae) em sistema *in vitro*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Ciências
Orientadores: Prof^ª. Dr^ª, Rosete Pescador (UFSC)

Florianópolis
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca da UFSC

Soares Pontes, Elinton

Morfogênese e histodiferenciação de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos em duas espécies de *Cattleya lindl.* (Orchidaceae) em sistema in vitro / Elinton Soares Pontes ; orientadora, Rosete Pescador, 2025.

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Orchidaceae. 3. Protocormo. 4. Propagação. 5. Conservação. I. Pescador, Rosete. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Elinton Soares Pontes

Morfogênese e histodiferenciação de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos em duas espécies de *Cattleya* lindl. (Orchidaceae) em sistema *in vitro*

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 19 de setembro de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Lirio Luiz Dal Vesco
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcos Valdir Stefenon
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais



Documento assinado digitalmente
Valdir Marcos Stefenon
Data: 08/12/2025 11:37:15-0300
CPF: ***.138.149-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Documento assinado digitalmente
Rosete Pescador
Data: 08/12/2025 10:29:30-0300
CPF: ***.337.599-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Dra. Rosete Pescador
Orientadora

Florianópolis, 2025

RESUMO

A Mata Atlântica constitui um dos principais hotspots mundiais de biodiversidade abrigando inúmeras espécies endêmicas. Este bioma, inclui as orquídeas do gênero *Cattleya Lindl.*, que apresentam grande valor ecológico e ornamental, porém, encontram-se ameaçadas pela perda de habitat e da coleta predatória. A baixa taxa de frutificação, a dependência de fungos micorrízicos para germinação e as sementes microscópicas sem reservas nutritivas tornam a regeneração natural limitada. Para tanto, as técnicas de cultivo *in vitro* tornam-se ferramentas essenciais para a conservação. Neste estudo, investigou-se a propagação *in vitro* a partir de diferentes fontes de explantes de duas espécies de *Cattleya*: *C. purpurata* e *C. warneri*, utilizando diferentes concentrações de dois tipos de fitorreguladores. Sementes maduras de *C. purpurata* foram cultivadas em meio de cultura MS. As avaliações morfohistológicas foram efetuadas até 128 dias de cultivo, em relação ao desenvolvimento embrionário até a formação de plântulas. Para *C. warneri*, segmentos foliares foram cultivados em meio de cultura MS, modificado, com diferentes concentrações de TDZ e BAP, visando a indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs). Dados referentes à indução, número e porcentagens de ESPs por explante foliar, foram coletados após 90 dias de cultivo. Amostras representativas das culturas foram coletados aos 0, 7, 14, 28, 54, 90 dias após a inoculação, para as avaliações da morfologia e histodiferenciação das ESPs. Em *C. purpurata*, o intumescimento inicial, reorganização celular e degeneração do suspensor foram observados após 7 dias de cultivo. enquanto que, a emergência dos protocormos com rizóides basais e atividade meristemática ocorreu após 28 dias. A formação de folhas verdadeiras e raízes adventícias foram observados entre 90 e 128 dias de cultivo, marcando a transição para plântulas funcionais. O tipo e a concentração dos fitorreguladores influenciaram, significativamente ($p < 0,05$), a formação de ESPs em *C. warneri*. O TDZ demonstrou superioridade regenerativa., com maior número médio de ESPs por explante na concentração de 5,0 μM (2,8 ESPs) e dose ótima estimada em 6,03 μM . Enquanto que, o BAP apresentou menor eficiência quando comparado com TDZ. As ESPs originaram-se de células epidérmicas e subepidérmicas vacuolizadas, com intensa atividade mitótica, diferenciando-se posteriormente em rizóides, primórdios foliares e meristemas apicais funcionais. Os resultados confirmam que o cultivo *in vitro* é uma ferramenta eficiente para micropropagação e estudos de desenvolvimento embrionário. Fornecendo, portanto, protocolos aplicáveis à regeneração de germoplasma e preservação da diversidade genética de espécies de *Cattleya*.

Palavras-chave: *Cattleya*; propagação *in vitro*; conservação.

ABSTRACT

The Atlantic Forest is one of the world's main biodiversity hotspots, harboring numerous endemic species. This biome includes orchids of the genus *Cattleya* Lindl., which have high ecological and ornamental value but are threatened by habitat loss and predatory collection. The low fruiting rate, dependence on mycorrhizal fungi for germination, and microscopic seeds lacking nutrient reserves make natural regeneration limited. Therefore, in vitro culture techniques become essential tools for conservation. In this study, the in vitro propagation from different explant sources of two *Cattleya* species—*C. purpurata* and *C. warneri*—was investigated using different concentrations of two types of plant growth regulators. Mature seeds of *C. purpurata* were cultured on MS medium. Morphohistological evaluations were carried out up to 128 days of culture, focusing on embryonic development up to seedling formation. For *C. warneri*, leaf segments were cultured on modified MS medium with different concentrations of TDZ and BAP to induce protocorm-like structures (PLSs). Data on the induction, number, and percentage of PLSs per leaf explant were collected after 90 days of culture. Representative samples of the cultures were collected at 0, 7, 14, 28, 54, and 90 days after inoculation for morphological and histodifferentiation analyses of the PLSs. In *C. purpurata*, initial swelling, cell reorganization, and suspensor degeneration were observed after 7 days of culture, while the emergence of protocorms with basal rhizoids and meristematic activity occurred after 28 days. The formation of true leaves and adventitious roots was observed between 90 and 128 days of culture, marking the transition to functional seedlings. The type and concentration of plant growth regulators significantly ($p < 0.05$) influenced PLS formation in *C. warneri*. TDZ showed superior regenerative capacity, with the highest mean number of PLSs per explant at 5.0 μM (2.8 PLSs) and an estimated optimal dose of 6.03 μM , while BAP exhibited lower efficiency compared to TDZ. The PLSs originated from vacuolated epidermal and subepidermal cells with intense mitotic activity, later differentiating into rhizoids, leaf primordia, and functional apical meristems. The results confirm that in vitro culture is an efficient tool for micropropagation and embryonic development studies, providing applicable protocols for germplasm regeneration and preservation of the genetic diversity of *Cattleya* species.

Keywords: *Cattleya*; in vitro propagation; conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da família Orchidaceae.....	11
Figura 2 - <i>Cattleya purpurata</i> (Lindl. & Paxton) Van den Berg	16
Figura 3 - <i>Cattleya warneri</i> T. Moore.	17
Figura 4 - Morfohistodiferenciação de <i>Cattleya purpurata</i> (Lindl. & Paxton) Vander Berg. .	47
Figura 5 - Morfohistodiferenciação de <i>Cattleya purpurata</i> (Lindl. & Paxton) Vander Berg. .	50
Figura 6 - Morfohistodiferenciação de <i>Cattleya purpurata</i> (Lindl. & Paxton) Vander Berg. .	52
Figura 7 - Curvas regressão para indução de ESPs em <i>Cattleya warneri</i> T. Moore	65
Figura 8 - Formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em explantes foliares de <i>Cattleya warneri</i> T. Moore.	70
Figura 9 - Formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em explantes foliares de <i>Cattleya warneri</i> T. Moore.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIB – Ácido indolbutírico.

ABA – Ácido abscísico

AC – Ápice caulinar

BAP – 6-benzilaminopurina (ou 6-benziladenina).

CDKA/CYCD – Cyclin-Dependent Kinase A / Cyclin D.

CNCFlora – Centro Nacional de Conservação da Flora.

co – Corpo do embrião

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

ESP(s) – Estruturas semelhantes a protocormos.

FAA70 – Formaldeído, Ácido Acético e Álcool etílico 70%

Fe-EDTA – Etilenodiamino tetraacetato de ferro

fo / pf – Folha em desenvolvimento / Primórdios foliares.

G1 – Fase G1 do ciclo celular. Etapa do ciclo celular anterior à síntese de DNA.

IAA – Ácido indolacético.

IUCN – International Union for Conservation of Nature.

KT – Cinetina

LED(s) – Light Emitting Diode(s) / Diodo(s) emissor(es) de luz.

MAC – Meristema Apical Caulinar.

Mg·L⁻¹ – Miligrama por litro

ME – Microscopia Estereoscópica.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MO – Microscopia Óptica.

mm – Milímetro.

µm – Micrômetro.

MS – Meio de cultura de Murashige & Skoog.

NaClO – Hipoclorito de sódio.

NAA – Ácido naftalenoacético.

PCR – Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase.

PGR – Regulador de crescimento vegetal (Plant Growth Regulator).

pm / pr – Primórdios foliares / Pelos radiculares.

RNA – Ácido ribonucleico.

ri – Rizóides.

su – Suspensor

TDZ – Thidiazuron

TIS – Temporary Immersion Systems / Sistemas de Imersão Temporária.

te / teg – Testa ou tegumento

μM – Micromolar.

UV – Ultravioleta.

ZR – Zeatina ribosídeo.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1	FAMÍLIA ORCHIDACEAE	11
1.2	CONSERVAÇÃO E IMPORTÂNCIA DAS ORQUÍDEAS BRASILEIRAS	13
1.3	GÊNERO <i>CATTLEYA</i> LINDL.....	15
1.4	PROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS: ESTRATÉGIAS CONVENCIONAIS E BIOTECNOLÓGICAS	17
1.5	CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS EM ORQUÍDEAS	19
1.6	ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPS).....	20
1.7	FATORES QUE INFLUENCIAM O CULTIVO <i>IN VITRO</i>	24
1.8	FITORREGULADORES E SUA FUNÇÃO NA MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	26
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
2.	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
	MORFODIFERENCIAÇÃO INICIAL DO DESENVOLVIMENTO DE <i>Cattleya purpurata</i> (Lindl. & Paxton) VAN DEN BERG A PARTIR DE SEMENTES CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	39
3.1.	INTRODUÇÃO	41
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.2.1.	Sementes	42
3.2.2.	Procedimentos para o cultivo <i>in vitro</i>	43
3.2.3.	Análise em Microscopia Estereoscópica (ME) e Microscopia Óptica (MO)	43
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
	INDUÇÃO E MORFODIFERENCIAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS em <i>Cattleya warneri</i> COM DIFERENTES TEORES E REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL	57
4.1.	INTRODUÇÃO.....	59
4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.2.1.	Material vegetal e condições de cultivo.....	61
4.2.2.	Análise em Microscopia Estereoscópica (ME)	62
4.2.3.	Análise em Microscopia Óptica (MO)	62
4.2.4.	Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	63
4.2.5.	Análise Estatística.....	63
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	63

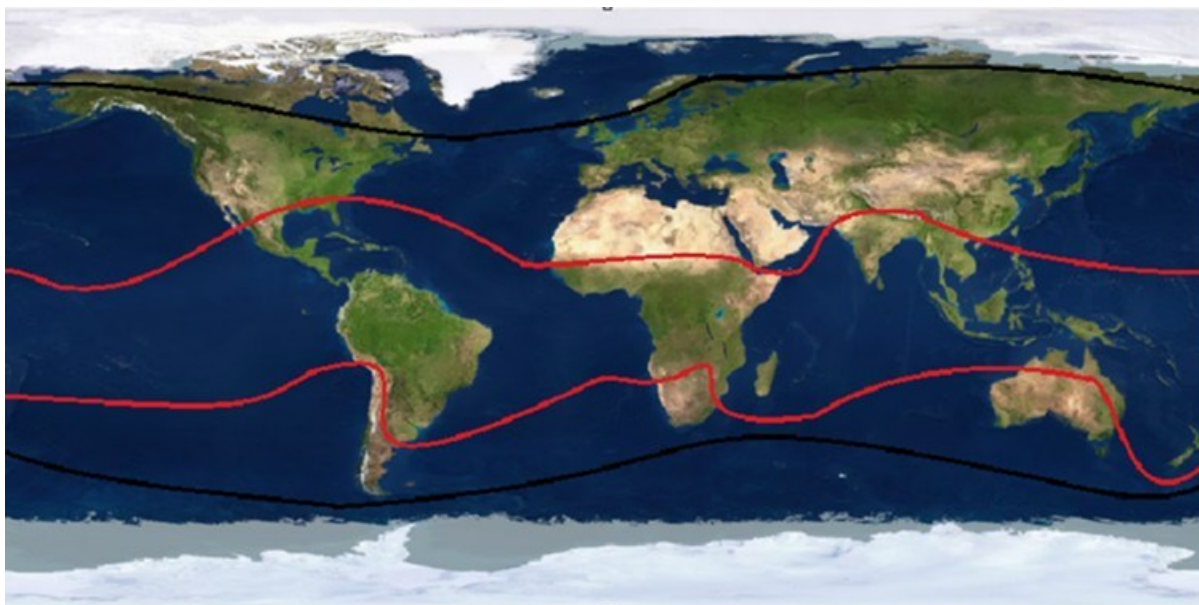
4.3.1 Indução de Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs).....	63
4.3.2 Morfohistodiferenciação das Esps	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	78

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

A família Orchidaceae, destaca-se como uma das maiores e mais diversificadas entre as angiospermas, abrangendo aproximadamente 736 gêneros e 28.000 espécies (Schiff, 2017; Liu et al., 2023). Essas plantas, que representam cerca de 7% da diversidade de angiospermas, têm distribuição cosmopolita, ocorrendo desde regiões temperadas, como o Alasca, até áreas subantárticas, como a Terra do Fogo (Figura 1). No entanto, sua maior riqueza está concentrada nos trópicos, particularmente no neotrópico, onde se encontram as formas mais especializadas, incluindo a maioria das espécies epífitas (Pansarin, 2009). Além de sua ampla distribuição geográfica, as orquídeas impressionam pela variedade de formas, cores e adaptações ecológicas, o que as torna um dos grupos vegetais mais fascinantes e estudados da botânica.

Figura 1 - Distribuição da família Orchidaceae.



A linha contínua representa os limites de distribuição de espécies terrestres e a linha pontilhada as espécies epífitas. Fonte: Adaptado de Dressler (1993).

Orchidaceae está classificada na subdivisão Angiospermae, classe Monocotyledoneae e ordem Liliales, sendo tradicionalmente dividida em seis subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Spiranthoideae, Orchidoideae, Epidendroideae e Vandoideae. As duas últimas destacam-se pelo grande número de espécies exploradas economicamente, sobretudo no mercado de flores e plantas ornamentais (Fritsche et al. 2022).

A ocupação de diferentes tipos de ambientes está fortemente relacionada às formas de vida apresentadas pelas espécies. A maioria das orquídeas são epífitas, vivendo sobre outras plantas sem parasitá-las, mas também existem representantes rupícolas, saprófitas e terrícolas, o que evidencia a notável plasticidade ecológica do grupo (Silveira, 2023; Pansarin, 2009), sendo conhecidas por sua elevada tolerância ecológica e estratégias reprodutivas complexas. Características que as tornam modelos valiosos para o estudo da evolução das plantas que, em análises filogenéticas revelam relações intrincadas entre as espécies, destacando sua complexidade evolutiva (Liu et al., 2023). Constantemente, novas espécies são descritas, e os recentes avanços na genética molecular permitem a reclassificação de espécies e gêneros com base em análises filogenéticas, aprimorando a compreensão da diversidade e das relações evolutivas dentro da família (Van Den Berg et al., 2009).

A crescente demanda global por orquídeas, tanto para os mercados ornamental, medicinal quanto alimentício, tem impulsionado a coleta indiscriminada de espécimes silvestres, intensificando as ameaças à conservação dessas espécies (Bullough et al., 2021; Ticktin et al., 2020; Hinsley et al., 2018). Segundo Sut et al. (2017), além do valor ornamental, as orquídeas apresentam expressivo potencial terapêutico devido à produção de compostos bioativos. Espécies produtoras de fenóis, alcaloides e terpenoides têm se destacado por suas propriedades farmacológicas, especialmente no tratamento de câncer e doenças neurodegenerativas, o que evidencia a relevância do grupo como fonte de novos fármacos. A subfamília Epidendroideae, em especial, possui gêneros de enorme valor horticultural, como *Cattleya*, *Guarianthe* e *Rhyncholaelia*, entre outros, todos com ocorrência natural no Brasil e amplamente utilizados na produção de híbridos comerciais, em razão da beleza e diversidade de suas flores (Van Den Berg et al., 2009).

O interesse científico pelas orquídeas é antigo, impulsionado pela enorme variabilidade morfológica, anatômica e fisiológica dessas plantas, bem como pela sua impressionante adaptação aos mais diversos climas e pela multiplicidade de agentes polinizadores presentes em cada região (Castro et al., 2022). Além disso, as orquídeas desempenham um papel fundamental na manutenção da estabilidade dos ecossistemas florestais, devido ao seu elevado grau de especialização e à notável adaptação às condições climáticas e oligotróficas extremas (Benzing, 1990).

No Brasil, de acordo com a Lista de Espécies da Flora do Brasil (Van Den Berg, 2025), são descritas pouco mais de 2.600 espécies de orquídeas, das quais aproximadamente 1.400 são consideradas endêmicas. Uma significativa parcela dessas espécies ocorre em áreas montanhosas da Mata Atlântica, um dos biomas mais biodiversos do mundo. As formações

montanhosas funcionam como barreiras naturais que isolam populações de plantas, favorecendo a especiação e elevando os índices de endemismo. Contudo, a Mata Atlântica é também um dos biomas mais ameaçados pela ação antrópica, restando atualmente apenas cerca de 12,4% de sua cobertura em estado mais bem preservado (SOS Mata Atlântica, 2022).

1.2 CONSERVAÇÃO E IMPORTÂNCIA DAS ORQUÍDEAS BRASILEIRAS

A diversidade das orquídeas no Brasil é notável, com uma rica variedade de espécies que desempenham papéis ecológicos, ornamentais e econômicos significativos. As orquídeas, pertencentes à família Orchidaceae, constituem uma das maiores famílias de plantas, com uma distribuição geográfica que varia amplamente, refletindo adaptações a diferentes ecossistemas, como florestas tropicais e subtropicais (Barros, 1990; Ferreira Filho; Barbarena, 2023).

As orquídeas desempenham papéis ecológicos fundamentais na manutenção da biodiversidade e na estabilidade dos ecossistemas. Suas interações especializadas com polinizadores, mediadas por adaptações morfológicas, fisiológicas e pela produção de compostos voláteis orgânicos, garantem a polinização cruzada e promovem o fluxo gênico (Ramya et al., 2020). Além disso, sua simbiose micorrízica altamente diversificada, envolvendo fungos de Basidiomycota e Ascomycota, é crucial para a germinação e nutrição, destacando-se como a mais complexa entre as associações micorrízicas (Favre-Godal et al., 2020; Hugh-Donovan, 2022). Como epífitas, muitas orquídeas contribuem para a estruturação e complexidade de florestas tropicais sem atuar como parasitas, sendo componentes vitais da flora em biomas como a Amazônia (Da Silva et al., 2021). Assim, sua presença influencia desde interações bióticas (atração de polinizadores e defesa contra herbívoros) até processos ecológicos em larga escala, reforçando sua importância para a conservação dos ecossistemas.

A presença e diversidade de orquídeas são também indicadoras valiosas da qualidade do habitat e da saúde dos ecossistemas. Moraes et al. (2015), ao caracterizarem a composição florística da família Orchidaceae em uma mata ciliar de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual em Araras, São Paulo, evidenciaram que a riqueza dessas espécies reflete diretamente as condições ambientais e o grau de conservação dos habitats.

No aspecto ornamental, as orquídeas ocupam um lugar de destaque pela sua apreciada estética e pela singularidade de suas flores, sendo amplamente cultivadas e comercializadas para uso em arranjos florais e decoração. A importância ornamental das orquídeas é confirmada por Siqueira et al. (2014), que, ao elaborarem uma lista de verificação da distribuição espacial das espécies de Orchidaceae no estado de Santa Catarina, identificaram a ocorrência de 121 gêneros e 560 espécies aceitas, sendo a subfamília Epidendroideae a mais representativa. Esses

dados evidenciam não apenas a biodiversidade florística local, mas também o potencial ornamental e econômico dessa família.

A demanda por orquídeas ornamentais tem impulsionado significativamente a indústria de floricultura no Brasil, com destaque para o comércio e a produção em larga escala, visando atender ao mercado nacional e internacional. O cultivo e a venda de orquídeas geram receitas expressivas, alimentando a cadeia produtiva (Siqueira et al., 2014). Além disso, a diversidade de orquídeas brasileiras atrai turistas, pesquisadores e colecionadores, fortalecendo atividades econômicas relacionadas ao ecoturismo e à pesquisa científica. Um exemplo disso é o levantamento florístico realizado no município de Igarapé-Miri, no Pará, onde foram registradas 58 espécies distribuídas em 38 gêneros, a maioria ocorrendo como epífitas na Floresta de Terra Firme, o que reforça o potencial turístico e científico da flora local (Ferreira Filho; Barbarena, 2023).

Embora a diversidade das orquídeas no Brasil seja impressionante, a fragmentação e a degradação dos habitats naturais representam ameaças sérias à sobrevivência de muitas espécies, evidenciando a necessidade urgente de ações de conservação e de manejo sustentável. A megadiversidade da família Orchidaceae na Mata Atlântica, por exemplo, foi destacada por Barberena et al. (2022), que ressaltaram sua importância ecológica para a conservação, especialmente no que se refere às espécies da subtribo Laeliinae. Essas espécies, além do valor ornamental, possuem potenciais benefícios econômicos, particularmente em áreas de conservação como o Parque Nacional do Itatiaia, onde a subtribo Laeliinae representa 15% da flora orquídea, incluindo diversas espécies raras e ameaçadas. O tratamento taxonômico abrangente realizado por esses autores identificou 6 gêneros e 33 espécies de Laeliinae nesse parque, evidenciando a riqueza e a necessidade de preservação desse patrimônio natural.

Inventários florísticos realizados em outras regiões do Brasil também reforçam a elevada diversidade da família Orchidaceae e a importância de sua conservação. Na Fazenda São Maximiano, no município de Guaíba, Rio Grande do Sul, um estudo revelou um aumento de 13 espécies em comparação a levantamentos anteriores, envolvendo táxons exclusivamente epífitos, com destaque para a subtribo Pleurothallidinae, que foi registrada localmente como a mais rica, com 16 espécies distribuídas em 8 gêneros (Buzatto et al., 2006; 2007). Outro exemplo significativo é o levantamento realizado na Mata do Baú, no município de Barroso, em Minas Gerais, onde Neto & Forzza (2003) relataram a ocorrência de várias espécies de Orchidaceae, demonstrando a importância de estudos florísticos para a documentação e conservação da diversidade orquidológica brasileira. Assim, o conjunto dessas pesquisas evidencia não apenas a extraordinária riqueza das orquídeas brasileiras, mas também a sua

vulnerabilidade diante das pressões ambientais, ressaltando a necessidade de estratégias integradas de conservação.

1.3 GÊNERO *CATTLEYA* LINDL.

O gênero *Cattleya* foi originalmente estabelecido por John Lindley, em 1822, na obra “Collectanea Botanica”, ao descrever a espécie brasileira *Cattleya labiata* (Lindley, 1821). Considerado um dos principais gêneros de espécies de orquídeas de importância ornamental, é valorizado por colecionadores no Brasil e no mundo, além de ser reconhecido como o principal gênero de orquídeas ornamentais do Neotrópico. *Cattleya sp.* passou por mudanças nomenclaturais que expandiram seu número de espécies, ao incorporar diversas seções anteriormente pertencentes a *Sophranitis* e *Laelia*. Esses ajustes foram fundamentados em estudos moleculares que demonstraram que o gênero *Laelia* deveria compreender as espécies anteriormente classificadas como *Schomburgkia* (Van Den Berg, 2025). Como resultado dessas alterações, *Cattleya sp.* tornou-se o quarto maior gênero da subtribo Laeliinae, destacando-se pela ampla variedade de espécies naturais e híbridos (Van Den Berg et al., 2009).

Trata-se de um gênero exclusivamente neotropical, que abrange aproximadamente 120 espécies, em sua maioria epífitas, embora algumas sejam rupícolas ou terrícolas (LIZ, 2017). No Brasil, são reconhecidas cerca de 105 espécies aceitas, sendo 98 delas endêmicas, além de inúmeros híbridos naturais e artificiais (Van Den Berg, 2025). A maior parte dessas espécies encontra abrigo em habitats montanhosos, embora algumas tenham se adaptado ao calor e à umidade das planícies, contribuindo para a diversidade ecológica do gênero (Withner, 1988). Além do território brasileiro, a distribuição do gênero também se estende pela região andina, desde o leste da Venezuela até Trinidad, alcançando ao norte a América Central e chegando ao sul do México (Van Den Berg, 2005).

Cattleya purpurata ((Lindl. & Paxton) Van den Berg) (Figura 2), uma orquídea endêmica do Brasil, é encontrada naturalmente nas Regiões Sudeste (São Paulo) e Sul (Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (Barros et al., 2018). Ocorre também no Paraná (CNC Flora, 2012) e Rio de Janeiro (Buzatto et al., 2010). As principais características desta espécie são representadas por plantas com uma folha sob pseudobulbos subclavados. A maioria das folhas é oblonga, porém algumas são quase arredondadas. As flores são grandes de 15-20 cm de diâmetro, aromáticas, vistosas e com coloração que varia do rosa escuro a púrpura ametista (Whitner 1988).

Figura 2 - *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Van den Berg.



Fonte: (Golatoski, 2025).

Em destaque, *Cattleya warneri* T. Moore é uma orquídea epífita cujas características incluem plantas com folhas elíptico-lanceoladas sobre pseudobulbos claviformes, variando de 10 a 30 cm de comprimento, além de rizomas com três entrenós. Suas inflorescências possuem até quatro flores grandes, aromáticas e vistosas, com pétalas de tonalidades que variam do rosa escuro a púrpura, sépalas em rosa claro ou lilás, e labelo levemente trilobado, com o lobo mediano de cor rosa escuro e os laterais longos, rosa claro, envolvendo quatro polínias (Van Den Berg, 2021).

As flores de *C. warneri* (figura 3), consideradas as maiores entre todas as espécies brasileiras do gênero, o que as torna altamente vistosas e, conseqüentemente, severamente coletadas, dificultando sua observação na natureza (Flora e Funga do Brasil, 2023). A espécie é similar à *Cattleya labiata*, diferenciando-se, entretanto, pela época de floração: enquanto *C. labiata* floresce no início da primavera, *C. warneri*, descrita por T. Moore em 1862, floresce entre os meses de junho e julho (Menezes, 1994). Trata-se de uma espécie endêmica do Brasil, restrita aos domínios da Mata Atlântica, em ambientes de Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila, ocorrendo nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e, possivelmente, no Rio de Janeiro.

Figura 3 - *Cattleya warneri* T. Moore.



Fonte: Naoki Takebayashi (2015).

1.4 PROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS: ESTRATÉGIAS CONVENCIONAIS E BIOTECNOLÓGICAS

A transição das ferramentas de melhoramento convencional para abordagens biotecnológicas tem proporcionado avanços significativos na produção de cultivares de orquídeas com características que não são obtidas pelo melhoramento tradicional (Töyräänvuori, 2023). Essa evolução tecnológica é essencial para suprir as crescentes demandas do setor ornamental e para promover a conservação de espécies ameaçadas.

O desenvolvimento de protocolos de cultura de tecidos constitui um pré-requisito fundamental para qualquer manipulação biotecnológica em nível celular e molecular (Piria; Pajmohan; Suresh, 2008). Entre as técnicas mais empregadas destacam-se a micropropagação e a indução de estruturas semelhantes a protocormos (protocorm-like bodies – PLBs), que facilitam a multiplicação clonal em larga escala.

A propagação *in vitro* de orquídeas pode ser realizada utilizando meios de cultura semissólidos ou sistemas de imersão temporária (temporary immersion systems – TIS), cada um com benefícios e limitações distintas. Estudos recentes destacam que a utilização do meio

½ MS favorece a maior formação de protocormos, destacando as vantagens do TIS em reduzir os custos de produção e melhorar as taxas de crescimento das plantas, ao mesmo tempo em que aborda as limitações dos sistemas semissólidos (Nongdam et al., 2023).

Além disso, a biotecnologia tem se mostrado uma ferramenta promissora na superação de desafios relacionados ao cultivo e conservação de orquídeas, cujas perspectivas de globalização impactarão consideravelmente a indústria nos próximos anos (Tiwari et al., 2022). Tais intervenções incluem desde a otimização da propagação até estratégias para garantir a conservação *ex situ* de espécies ameaçadas. Dentre as abordagens biotecnológicas mais eficientes destaca-se a propagação em massa de orquídeas por meio de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs). Essa técnica permite a produção rápida e eficaz de mudas, beneficiando-se de novas tecnologias que aumentam a eficiência, como o uso de biorreatores de imersão temporária e fontes de luz específicas, como diodos emissores de luz (Leds). Ademais, os recentes avanços no sequenciamento do genoma de espécies como *Phalaenopsis equestris* possibilitam uma caracterização molecular mais detalhada, ampliando o potencial e a segurança da aplicação dessas técnicas em larga escala (Cardoso; Zanello; Chen, 2020).

No contexto da propagação convencional, destaca-se que processos como a germinação de sementes e a maturação de plantas são demorados e frequentemente ineficientes. Em contrapartida, estratégias biotecnológicas como a micropropagação viabilizam a produção rápida e livre de patógenos de plantas uniformes, reduzindo significativamente o tempo e aumentando a eficiência no cultivo de orquídeas (Zahara, 2017). A utilização de diferentes tipos de explantes, como folhas e caules florais, também influencia o sucesso da regeneração, apresentando amplo potencial regenerativo para folhas, sobretudo em espécies do gênero *Cattleya* (Fristche, 2022; De Conti, 2016; Liz, 2013).

O uso combinado de reguladores de crescimento vegetal e de condições ambientais controladas favorece a regeneração e a floração *in vitro*, com destaque para a rápida produção de embriões em espécies como *Dendrobium Chao Praya Smile* (Zahara, 2017).

Por sua vez, a biotecnologia moderna integra uma gama de estratégias que incluem não apenas a cultura *in vitro* e a micropropagação, mas também técnicas avançadas como a cultura de protoplastos, a variação somaclonal e a engenharia genética. Tais intervenções ampliam a capacidade de reprodução, resistência a patógenos e produção de plantas livres de vírus, aspectos essenciais para o cultivo comercial e sustentável de orquídeas (Hossain; Kant; Van, 2013).

A aplicação dessas técnicas biotecnológicas tem aumentado efetivamente a produção de plantas de orquídeas nativas e híbridas, contribuindo tanto para atender à demanda do

mercado quanto para apoiar a conservação de espécies ameaçadas. A embriogênese somática e a indução de brotações por meio de reguladores de crescimento são práticas que ampliam a produção e a diversidade genética disponível para a indústria ornamental (Semiarti, 2018).

Ademais, os avanços na biotecnologia de orquídeas também contemplam a germinação *in vitro*, a produção de ESPs e a indução do florescimento, sendo essas estratégias fundamentais tanto para fins comerciais quanto para programas de conservação (Chen, 2002).

1.5 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS EM ORQUÍDEAS

A cultura de tecidos vegetais constitui uma ferramenta fundamental para o cultivo de orquídeas, pois possibilita a propagação rápida e com maior qualidade por meio do isolamento de tecidos em condições controladas. Essa técnica favorece taxas superiores de crescimento e a obtenção de plantas livres de patógenos (Su'ud, 2025; Peat & Jones, 2012). Entre os procedimentos aplicados à micropropagação de orquídeas, destaca-se a indução e a multiplicação de protocormos, etapa crucial para a regeneração de diversas espécies. As condições assépticas inerentes ao cultivo *in vitro* reduzem significativamente o risco de contaminações, resultando em plantas mais vigorosas e resistentes (Peat & Jones, 2012). Além disso, a formulação de meios de cultura voltados à propagação rápida tem demonstrado aumentar substancialmente o crescimento e a adaptabilidade de plântulas de orquídeas (Anyu, 2017). Em *Epidendrum cinnabarinum* (Santana, 2025), observou-se maior porcentagem de brotação quando o meio foi suplementado com $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP, em comparação ao tratamento com $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Outro avanço relevante é o uso de elicitores para estimular a síntese de metabólitos secundários e a promover a proteção das plantas, ou a transformação genética mediada por *Agrobacterium*, quando associadas as estratégias que ampliam a resistência das orquídeas a agentes patogênicos, são técnicas que possibilitam a inserção de características benéficas nos genomas das plantas (Su'udi et al., 2024). Bem como, a tecnologia de nanobolhas surge como uma inovação promissora, promovendo melhorias significativas nos parâmetros de crescimento, como peso e comprimento radicular, em plântulas de *Cattleya sp.* O tratamento com nanobolhas não apenas favorece o desenvolvimento das plantas, mas também aumenta sua resiliência (Mustakim et al., 2024).

Além disso, a inoculação fúngica tem se mostrado uma prática eficiente. A integração de fungos benéficos, como Tricholomataceae e Glomus mosseae, no processo de cultura de tecidos potencializa o enraizamento e permite o transplante direto das plântulas, eliminando a necessidade de etapas de aclimação prévia (Xiao Chen, 2014). Apesar das vantagens, a cultura

de tecidos pode gerar uniformidade genética, o que implica na redução da biodiversidade e levanta preocupações quanto à sustentabilidade a longo prazo dessas práticas (Su'udi et al., 2024).

Outras abordagens incluem a aplicação de meios de cultura específicos para diferentes espécies. O método descrito por Gu e Tao (2018) para orquídeas borboletas envolve a desinfecção de folhas jovens, indução de protocormos, multiplicação e enraizamento, resultando em mudas de alta eficiência. De forma semelhante, a propagação de orquídeas joia de Fujian, conforme relatado por Chen e Huang (2011), baseia-se na seleção e tratamento estéril das plantas, indução de gemas e cultivo em larga escala, assegurando alta produtividade, qualidade e sustentabilidade ambiental. Outro exemplo bem-sucedido é a propagação e endurecimento *in vitro* de *Aerides multiflora* e *Rhyncostylis retusa*, que alcançaram taxas de germinação entre 94% e 97% e índices de sobrevivência de até 100% em *R. retusa*, destacando-se como estratégia eficaz para conservação e uso sustentável dessas espécies (Lal et al., 2023).

Protocolos alternativos, como o uso de suplementos naturais, também mostram eficácia. Nicomrat e Anantasaran (2015) demonstraram que a suplementação do meio de cultura com banana Kluai Namwa melhora significativamente o crescimento das orquídeas, enquanto o cozimento do meio a 100°C por 60 minutos elimina patógenos.

A utilização de reguladores de crescimento como o thidiazuron (TDZ) é outro avanço notável, pois essa citocinina sintética promove de forma eficaz a regeneração e multiplicação de espécies recalcitrantes à propagação (Mohanraj, 2018). Estudos recentes indicam que reguladores naturais, como extrato de cebola, podem estimular o crescimento de raízes em plântulas de *Phalaenopsis amabilis*, enquanto a água de coco não mostrou efeito significativo (Triani; Ilham, 2024).

Finalmente, protocolos otimizados para propagação rápida incluem etapas bem definidas de cultura primária, propagação e enraizamento, resultando em mudas saudáveis, com alta taxa de sobrevivência e crescimento acelerado, conforme demonstrado por Zhang (2017).

Assim, a cultura de tecidos vegetais representa uma ferramenta indispensável para a produção comercial, conservação e melhoramento genético das orquídeas, sendo continuamente aprimorada por meio de avanços biotecnológicos que prometem revolucionar as práticas de cultivo.

1.6 ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPS)

As estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) constituem estruturas essenciais no processo de micropropagação de orquídeas, destacando-se por sua morfologia e função

análogas aos embriões zigóticos. Esses corpos são frequentemente induzidos *in vitro* a partir de diversos tecidos vegetais, especialmente segmentos foliares, e apresentam a capacidade de se desenvolverem em plantas completas, configurando-se como elementos fundamentais para a propagação clonal de orquídeas (Lee et al., 2013).

Do ponto de vista citológico, as ESPs compartilham características com os embriões zigóticos, como citoplasma vacuolado, presença de grânulos de amido e corpos proteicos nas fases iniciais de sua formação (Lee et al., 2013). Entretanto, estudos moleculares têm indicado que as ESPs não derivam do processo de indução da embriogênese somática, sendo essa diferenciação evidenciada pela expressão de fatores de transcrição específicos e proteínas associadas ao desenvolvimento embrionário e apresentam tecidos morfológicamente diferentes (Chen et al., 2019).

A indução das ESPs pode ser obtida por meio de diferentes métodos, como o uso de segmentos foliares de híbridos comerciais, prática que tem se mostrado eficiente na regeneração clonal de plântulas (Zanello; Cardoso, 2019). Além disso, os ESPs têm sido amplamente utilizados em programas de mutagênese, como irradiação gama, visando à obtenção de variantes de orquídeas com valor econômico, demonstrando sua versatilidade como ferramenta de melhoramento vegetal (Dehgahi; Joniyasa, 2017).

Embora associados predominantemente às orquídeas, o conceito de ESPs também tem sido aplicado a estruturas semelhantes em outras espécies vegetais, indicando sua relevância potencial em diferentes contextos de cultura de tecidos vegetais (Da Silva, 2013). A literatura sugere que, embora o termo protocormo e o conceito de ESP sejam tradicionalmente vinculados às orquídeas, eles podem ser empregados de maneira mais ampla para descrever estruturas similares em outros grupos de plantas (Da Silva, 2014).

Pesquisas recentes reforçam o potencial dos ESPs na biotecnologia de orquídeas. Por exemplo, a indução de ESPs em segmentos foliares de híbridos de *Phalaenopsis* mostraram que a cultivar 'Ph908' apresentou a maior eficiência, com aproximadamente 25 ESPs por segmento foliar, quando cultivada em meio contendo 0,25 mg L⁻¹ de TDZ (Zanello; Cardoso, 2019). Paralelamente, técnicas de mutagênese utilizando radiação gama mostraram que a taxa de sobrevivência dos ESPs é inversamente proporcional à dose de irradiação, enquanto induzem variações morfológicas nas plântulas regeneradas (Dehgahi; Joniyas, 2017).

A aplicação de elicitores também se destaca como uma estratégia eficaz na proliferação de ESPs e na produção de metabólitos secundários. O extrato de levedura e a glutamina aumentaram significativamente o teor de dendrobina, enquanto a irradiação

ultravioleta (UV) estimulou a síntese de antocianinas em ESPs de *Dendrobium* 'Sabin Blue' (Chin et al., 2021).

Outra abordagem inovadora envolve a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando ESPs como explantes para a introdução de genes-alvo em orquídeas do gênero *Phalaenopsis*. Este método permitiu a regeneração de plantas transgênicas resistentes à higromicina, com a integração do transgene confirmada por PCR e Southern blot (Heo et al., 2009).

No que se refere à otimização de meios de cultura, o uso de meio basal de Murashige e Skoog (MS) modificado, com força reduzida, resultou em um aumento de 23% na proliferação de ESPs, especialmente quando associado à suplementação com Fe-EDTA em um quarto da dosagem habitual (Chin et al., 2021). Estudos também demonstraram que ESPs podem ser utilizados como explantes para indução de calos, como observado em *Dendrobium* 'Sonia-28', onde o calo proliferou eficientemente após seis semanas de cultivo em meio ideal, mesmo sem a necessidade de adição de triptona (Mei et al., 2012).

Nesse contexto, a totipotência celular em plantas refere-se à capacidade de uma única célula regenerar uma planta completa, sendo esse um princípio fundamental para as técnicas de cultura de tecidos vegetais. Essa característica é regulada por fatores genéticos, hormonais e ambientais, e é explorada por meio de diversas metodologias *in vitro*, como cultura de sementes, utilização de explantes vegetativos, indução de calos e formação de ESPs. Tais técnicas são essenciais para o avanço da biotecnologia vegetal, promovendo tanto o melhoramento genético quanto a conservação de espécies (Ezhova, 2003; Pasternak et al., 2020; Xu et al., 2019).

A germinação de sementes *in vitro* é um método que envolve a germinação e o desenvolvimento inicial de sementes sob condições controladas, visando à obtenção de mudas estéreis. Esta técnica é amplamente utilizada para a produção de plantas livres de patógenos, bem como para investigações acerca do controle genético da totipotência, uma vez que as sementes constituem material biológico homogêneo para experimentos (Ezhova, 2003).

Explantos vegetativos consistem em fragmentos de plantas, como folhas, caules ou raízes, utilizados como fonte para o estabelecimento de culturas de tecidos. Esses explantes podem ser reprogramados para originar novas plantas por meio de processos como organogênese direta ou embriogênese somática, destacando-se assim a plasticidade do desenvolvimento vegetal (Pasternak et al., 2020). O sucesso desta técnica depende principalmente do estado metabólico do explante e das condições hormonais do meio de cultura, especialmente do equilíbrio entre auxinas e citocininas, que regula a indução e o desenvolvimento de novas estruturas (Pasternak et al., 2020).

A indução de calos refere-se à formação de uma massa celular indiferenciada a partir de tecidos vegetais. Posteriormente, essas células podem ser estimuladas a se rediferenciar, regenerando uma planta completa. Esta técnica é indispensável para o estudo da regulação genética e hormonal da totipotência, visto que a formação e o desenvolvimento de calos são fortemente influenciados por genes que mantêm o estado meristemático das células e sua sensibilidade a hormônios vegetais (Ezhova, 2003; Oinam; Kothari, 1995). A indução de calos embriogênicos a partir de segmentos de coleóptilo, como demonstrado em *Oryza sativa* L., é um exemplo clássico do potencial regenerativo de explantes vegetativos mediante condições adequadas de cultivo (Oinam; Kothari, 1995).

As estruturas semelhantes a protocormos, conhecidos como ESPs, são estruturas morfológicamente análogas aos estágios iniciais do desenvolvimento de plântulas, especialmente em orquídeas. A formação das ESPs ocorre a partir de células somáticas cultivadas *in vitro* sob condições específicas, evidenciando a capacidade das células vegetais de reprogramar seu destino e expressar sua totipotência (Xu et al., 2019). Este método é amplamente utilizado na propagação clonal de orquídeas, sendo considerado altamente eficiente para a multiplicação rápida e a conservação de germoplasma dessas espécies (Xu et al., 2019).

Apesar da eficácia dessas técnicas no aproveitamento da totipotência celular, desafios persistem quanto à compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes. Estudos recentes ressaltam a complexidade da interação entre fatores genéticos, hormonais e ambientais no controle da totipotência. A expressão de genes que regulam o estado meristemático e a sensibilidade hormonal das células, como *SERK* e *ABRUPTUS PINOID*, desempenha papel central na determinação do destino celular e na promoção da regeneração *in vitro* (Ezhova, 2003; Lu et al., 2015).

Pesquisas envolvendo mutantes de *Arabidopsis thaliana* mostram que alterações dos teores hormonais e na sensibilidade das células podem impactar significativamente processos como a formação de calos e a regeneração de órgãos, destacando o papel fundamental da regulação hormonal e genética na totipotência *in vitro* (Ezhova, 2003). Além disso, fatores epigenéticos, como alterações na metilação do DNA e na estrutura da cromatina, também têm sido apontados como determinantes importantes na aquisição e manutenção da totipotência (Lu et al., 2015).

Assim, avanços na compreensão desses processos poderão impulsionar o desenvolvimento de novas tecnologias em regeneração e melhoramento vegetal, contribuindo para a sustentabilidade agrícola e a conservação da biodiversidade (Xu et al., 2019).

1.7 FATORES QUE INFLUENCIAM O CULTIVO *IN VITRO*

A formação das ESPs na cultura de tecidos vegetais é influenciada por diversos fatores críticos, entre os quais se destacam o tipo de explante, a composição do meio de cultura e a aplicação de reguladores de crescimento. Cada um desses elementos exerce papel fundamental na determinação do sucesso dos processos de regeneração *in vitro*. Diversos estudos mostram que diferentes tipos de explantes resultam em distintas eficiências de regeneração. Por exemplo, explantes de hipocótilo e raízes apresentaram maiores taxas de formação de brotos quando comparados aos explantes foliares em *Passiflora setacea* (Vieira et al., 2014). De forma semelhante, segmentos nodais de *Quercus robur* proporcionaram um maior desenvolvimento de brotos quando oriundos de posições intermediárias do caule, evidenciando que a origem do explante é um fator determinante para a eficiência da regeneração (Puddephat et al., 1997).

O meio de cultura também afeta significativamente a formação de ESPs. O meio Murashige e Skoog (MS), suplementado com reguladores de crescimento específicos, tem se mostrado eficaz em diversos estudos. Em *Passiflora suberosa*, por exemplo, o meio MS proporcionou os melhores resultados, independentemente da concentração de 6-benziladenina (BA) utilizada (Garcia et al., 2011).

Em orquídeas *Dendrobium crepidatum*, observou-se que a combinação de BAP ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e NAA ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) aumentou significativamente a indução de calo, resultando em 83,3% de formação de calo após 6 semanas, mostrando a importância da composição do meio na morfogênese *in vitro* (Pyati, 2023). De forma complementar, em *Dendrobium candidum*, a formação e a repropagação de ESPs foram favorecidas pelo meio basal H3P4, suplementado com $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NAA e cinetina. A adição de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose ao meio também promoveu aumento no crescimento das ESPs (Jang et al., 2019). A aplicação de reguladores de crescimento é essencial para promover a formação de brotos e a indução de ESPs. O uso de 6-benziladenina (BA) foi determinante para a indução de brotos em explantes foliares de *Passiflora setacea* (Vieira et al., 2014). No entanto, efeitos distintos podem ser observados dependendo do regulador e da espécie. Em *Dendrobium*, por exemplo, enquanto o NAA afetou significativamente a altura do explante, o BAP não apresentou impacto notável sobre a organogênese, ressaltando a especificidade das respostas aos diferentes reguladores (Maghfirah et al., 2024).

Em outras culturas, como a do abacaxizeiro 'caiena suave', estabelecida a partir de explantes de ponta de brotos em meio basal MS, a suplementação com baixas concentrações de BAP ($0,1\text{-}0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foi considerada um método econômico e eficiente para a propagação *in*

vitro, promovendo melhor regeneração. Além disso, o meio MS de meia força induziu maior comprimento e número de raízes (Akin-Idowu et al., 2014).

A escolha do tipo de explante é igualmente determinante. Em estudos recentes, pontas de brotos demonstraram elevada eficiência na regeneração adventícia em meio MS suplementado com reguladores como 6-BA, ácido indolacético (IAA) e cinetina (KT), alcançando uma taxa de regeneração de 77,78% e uma taxa de enraizamento adventício de 97,78% com IAA (Ai et al., 2024).

A cultura de tecidos vegetais, além de representar uma abordagem biotecnológica para a propagação de plantas, promove a clonagem de indivíduos geneticamente idênticos e livres de patógenos, aumentando o rendimento e a qualidade das safras. Esta tecnologia também possui aplicações relevantes na biorremediação, na produção de produtos farmacêuticos e na obtenção de metabólitos secundários, com culturas de calos eficazes para a produção de compostos terapêuticos (Sidik et al., 2024).

Além disso, Gowsalya et al. (2025) destacam que fatores como o tipo de explante e a composição do meio de cultura são determinantes para o sucesso da propagação *in vitro* em espécies florestais, como *Santalum album* L. (sândalo-indiano), especialmente frente à crescente demanda global e à necessidade de estratégias de conservação. Os reguladores de crescimento influenciam diretamente a formação e o enraizamento de múltiplos brotos, além de desempenharem papel fundamental na embriogênese somática, enraizamento formação de ápices caulinares e na aclimatização das plantas regeneradas.

Embora fatores como o tipo de explante, o meio de cultura e os reguladores de crescimento sejam essenciais para a formação bem-sucedida de ESPs, as condições ambientais, como luz e temperatura, também desempenham papéis significativos no processo geral de regeneração. Em *Quercus robur*, por exemplo, o desenvolvimento da parte aérea e a formação subsequente de múltiplos brotos foram influenciados pela posição do explante nodal, pela temperatura de incubação e pela duração do fotoperíodo. Coeficientes de multiplicação para segmentos de caule aumentaram após subculturas, com temperaturas mais elevadas e dias mais longos promovendo maior frequência no desenvolvimento das brotações (Puddephat et al., 1997).

Além disso, análises de citometria de fluxo têm sido utilizadas para confirmar a estabilidade genética de plantas regeneradas, como demonstrado em *Passiflora setacea*, onde não foram observadas variações de ploidia, estabelecendo um protocolo seguro para a organogênese *in vitro* e para a avaliação da estabilidade genética dos regenerantes (Vieira et al., 2014).

Portanto, a otimização da formação de ESPs requer uma abordagem multifatorial, integrando a escolha adequada do explante, a formulação ideal do meio de cultura, a seleção precisa dos reguladores de crescimento e o controle rigoroso das condições ambientais, a fim de maximizar a eficiência da regeneração *in vitro* e garantir a qualidade e estabilidade das plantas obtidas.

1.8 FITORREGULADORES E SUA FUNÇÃO NA MORFOGÊNESE *IN VITRO*

Os reguladores de crescimento vegetal desempenham papel essencial na cultura de tecidos, atuando como sinalizadores que desencadeiam processos de divisão, diferenciação e regeneração celular. Essa capacidade de regeneração, por meio de organogênese ou embriogênese somática, decorre da plasticidade das células vegetais e é fortemente modulada pela ação hormonal (George, 1993; Huang et al., 2012). Entre os fitormônios, as citocininas constituem uma classe central, responsáveis por estimular a divisão celular, induzir brotos e retardar a senescência foliar, além de interagirem sinergicamente com as auxinas para manter o equilíbrio entre a formação de raízes e parte aérea (Srivastava, 2002; Gao, 2020; Lestari, 2011). Na cultura de tecidos, são determinantes para a eficiência da propagação clonal, pois regulam a desdiferenciação, a organogênese e a embriogênese somática.

A atuação das citocininas pode variar conforme o genótipo, o tipo de explante e a proporção em relação às auxinas, o que demanda a otimização cuidadosa de protocolos (Lestari, 2011). Em nível molecular, elas desencadeiam reprogramação transcricional e epigenética, ativando fatores de transcrição como WUSCHEL e SHOOT MERISTEMLESS, fundamentais para a identidade do meristema caulinar e a formação de órgãos (Fukudome; Koiwa, 2018; Hnatuszko-Konka et al., 2021). Além disso, participam da regulação de processos de desenvolvimento mediados pela luz, incluindo diferenciação de cloroplastos, expansão foliar e estabelecimento do metabolismo autotrófico (Taiz & Zeiger, 2017).

O TDZ apresenta efeito de citocinina e originalmente registrado como desfolhante de algodão, mas amplamente utilizado em protocolos de cultura de tecidos pela sua alta eficiência na indução de brotos, regeneração de protoplastos e indução de flores *in vitro* (Huetteman; Preece, 1993; Kim et al., 2003). Em orquídeas, o TDZ é notório por induzir a formação de ESPs, sendo considerado mais eficaz que outras citocininas nesse processo (Liz, 2017; Fritsche et al., 2022; De Conti, 2016). Sua ação envolve múltiplos mecanismos, como modulação de auxinas endógenas, alteração de membranas celulares e estímulo à embriogênese somática (Guo et al., 2011; Kou et al., 2016). Contudo, seu uso excessivo pode causar anomalias morfogênicas

e necrose, especialmente em espécies lenhosas, o que exige ajustes finos de concentração e tempo de exposição (Vinoth; Ravindhran, 2018).

Outra citocinina amplamente empregada é o BAP, tradicionalmente utilizada na indução e multiplicação de brotos em diversas espécies vegetais. O BAP promove divisão e proliferação celular, estimulando organogênese direta e indireta, além de modular processos fisiológicos e bioquímicos, como a expressão de genes relacionados à fotossíntese e ao metabolismo antioxidante (Mohammadi et al., 2024; Zhao, 2024; Li, 2021). Apesar de sua eficácia, concentrações elevadas podem provocar distúrbios morfofisiológicos, como necrose apical e alterações no desenvolvimento foliar, o que reforça a necessidade de ajustes específicos conforme a espécie e o explante utilizados (Martins et al., 2022; Noor Camellia, 2025).

Assim, tanto o TDZ quanto o BAP representam ferramentas fundamentais na micropropagação e na regeneração de plantas *in vitro*. O sucesso do protocolo depende, entretanto, da definição adequada das concentrações, combinações hormonais e condições de cultivo, de modo a potencializar os efeitos positivos e minimizar respostas adversas. Dessa forma, os reguladores de crescimento vegetal se configuram como elementos-chave na modulação da morfogênese *in vitro*, possibilitando avanços significativos na propagação de espécies de interesse agrônomo, ornamental e medicinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, N.; FAISAL, M.; HUSSAIN, S. A.; ANIS, M. Regulation of morphogenesis and improvement in shoot multiplication in *Vitex* species using thidiazuron. In: FAISAL, M.; ALATAR, A. A. (ed.). *Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator*. Singapore: Springer, 2018. p. 343–349. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_18.
- AI, Yang et al. The impacts of plant growth regulators on the rapid propagation of *Gardenia jasminoides* Ellis in tissue culture. *Forests*, v. 15, n. 3, p. 446, 2024.
- AKIN-IDOWU, P. E.; AKINYEMI, S. O. S.; IBITOYE, D. O. Influence of medium type and growth regulators on in vitro micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* (L.), var. Smooth cayenne). *African Journal of Plant Science*, v. 8, n. 9, p. 450–456, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJPS2014.1184>.
- ANDRIOLLI, Bruna Vargas. *Criopreservação de sementes e caracterização morfo-histológica da germinação in vitro de Cattleya crispa Lindl.* 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.
- BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M. *Orchidaceae* In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Orchidaceae>. Acesso em: 5 jun. 2025.
- BARROS, F. de. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras. *Acta Botanica Brasilica*, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33061990000100013>. Acesso em: 27 maio 2025.
- BUZATTO, C. R. et al. Levantamento florístico das Orchidaceae ocorrentes na Fazenda São Maximiano, município de Guaíba, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, n. 2-3, p. 19-25, abr./set. 2007.
- BUZATTO, C. R. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae: Laeliinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 8, n. 4, 2010.
- BULLOUGH, L. et al. Orchid obscurity: understanding domestic trade in wild-harvested orchids in Viet Nam. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 9, p. 631795, 2021.
- CARDOSO, J. C.; ZANELLO, C. A.; CHEN, J.-T. An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 3, p. 985, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS21030985>. Acesso em: 27 maio 2025.
- CASTRO, J. B.; PERDOMO, O.; SINGER, R. B. Pollination biology and reproductive success in four Brazilian species of *Gomesa* (Orchidaceae: Oncidiinae): specific pollinators, but high pollen loss and low fruit set. *Plant Species Biology*, v. 37, n. 1, p. 132-147, 2022.
- CHANG, C.; CHANG, W.-C. Effect of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Willd in vitro. *Plant Growth Regulation*, v. 30, p. 171–175, 2000.

CHANG, Cheng et al. A fluorescent carbazole derivative: high sensitivity for quadruplex DNA. *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 22, p. 6177-6183, 2003.

CHEN, F. Advances in the micropropagation and breeding of orchid. *Journal of Fujian Agricultural University*, 2002. Disponível em: https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-FJND200204017.htm. Acesso em: 27 maio 2025.

CHEN, J.-C.; TONG, C.-G.; LIN, H.-Y.; FANG, S.-C. *Phalaenopsis* LEAFY COTYLEDON1-induced somatic embryonic structures are morphologically distinct from protocorm-like bodies. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 1594, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01594>. Acesso em: 27 maio 2025.

CHEN, Y.; HUANG, B. Method for producing Fujian jewel orchid by plant tissue culture. 2011. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN101953307A/en>. Acesso em 21 dez 2024.

CHEN, D. et al. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53–MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene*, v. 26, n. 35, p. 5029-5037, 2007.

CHIN, C. K. et al. Modified basal culture medium improves proliferation of *Dendrobium* Sabin Blue's protocorm-like bodies (PLBs). *Biologia*, v. 76, n. 5, p. 1433-1443, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11756-021-00743-8>. Acesso em: 27 maio 2025.

CNCFLORA. *Cattleya warneri* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya warneri](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya%20warneri)>. Acesso em: 14 mar. 2025.

DA SILVA, J. A. T. Should the term protocorm-like body be used exclusively for orchids? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 21, p. 161-166, 2014. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153035438>. Acesso em: 27 maio 2025.

DE CONTI, D. *Physiological and biochemical characterization of the pattern of development of protocorm-like bodies of Cattleya tigrina A. Richard*. 2016. 144f. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

DEHGHAHI, R.; JONIYAS, A. Gamma irradiation-induced variation in *Dendrobium* Sonia-28 orchid protocorm-like bodies (PLBs). *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, v. 7, n. 2, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000151>. Acesso em: 27 maio 2025.

DHIMAN, N. et al. In vitro morphogenesis of some Himalayan flora using TDZ: a potential plant growth regulator. In: FAISAL, M.; ALATAR, A. A. (ed.). *Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator*. Singapore: Springer, 2018. p. 247–271. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_12. Acesso em: 27 maio 2025.

DINANI, E. T. et al. Thidiazuron: modulator of morphogenesis in vitro. In: FAISAL, M.; ALATAR, A. A. (ed.). *Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator*. Singapore: Springer, 2018. p. 1–36. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_1. Acesso em: 23 ago 2025.

DRESSLER, R. *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press, 1981.

EL-SHOWK, S.; RUONALA, R.; HELARIUTTA, Y. Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development*, v. 140, n. 7, p. 1373-1383, 2013.

EMERY, R. J. N.; KISIALA, A. The roles of cytokinins in plants and their response to environmental stimuli. *Plants*, v. 9, n. 9, p. 1158, 2020.

EZHOVA, T. A. Genetic control of totipotency of plant cells in an in vitro culture. *Russian Journal of Developmental Biology*, v. 34, n. 4, p. 197-204, 2003.

FAVRE-GODAL, Q. et al. Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. *Mycorrhiza*, v. 30, n. 1, p. 5–22, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00572-020-00934-2>. Acesso em: 25 ago. 2025.

FERREIRA FILHO, R; BARBERENA, F. Orchidaceae of the municipality of Igarapé-Miri, Pará, Brazilian Amazon. *Rodriguésia*, v. 73, p. e01432021, 2023. DOI: 10.1590/2175-7860202273103. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/366915677_Orchidaceae_of_the_municipality_of_Igarape-Miri_Para_Brazilian_Amazon/citation/download. Acesso em: 27 maio 2025.

VAN DEN BERG, C. *Cattleya* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB11329>. Acesso em: 15 set. 2025.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. *Cattleya warneri*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB1469>. Acesso em: 27 maio 2025.

FRITSCH, Y. et al. *Cattleya tigrina* (Orchidaceae) in vitro regeneration: main factors for optimal protocorm-like body induction and multiplication, plantlet regeneration, and cytogenetic stability. *South African Journal of Botany*, v. 149, p. 96–108, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.059>.

FUKUDOME, A.; KOIWA, H. Cytokinin-overinduced transcription factors and thalianol cluster genes in CARBOXYL-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 4-silenced *Arabidopsis* roots during de novo shoot organogenesis. *Plant Signaling & Behavior*, v. 13, n. 9, p. e1513299, 2018.

GAO, S. Function and mechanism study of plant cytokinins. *International Conference on Biomedical Engineering*, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1145/3397391.3397395>. Acesso em: 25 ago. 2025.

GARCIA, R. et al. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 106, n. 1, p. 47–54, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11240-010-9892-4>. Acesso em: 25 ago. 2025.

GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture: the technology. Part 1*. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.

GOLATOWSKI, O. *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Van den Berg. Disponível em: <https://www.golatofski.de/Pflanzenreich/gattung/c/cattleya.html>. Acesso em: 30 ago. 2025.

GOWSALYA, M. et al. Optimizing in vitro micropropagation strategies in *Santalum album* L. through different explants. *Plant Science Today*, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.14719/pst.5991>. Acesso em: 14 nov. 2025.

GRANER, E. M. et al. TDZ pulsing evaluation on the in vitro morphogenesis of peach palm. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 19, n. 2, p. 283–288, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S12298-012-0160-4>. Acesso em: 25 ago. 2025.

GU, F.; TAO, S. Tissue culture method for butterfly orchid. 2018.

GUO, B. et al. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 8984–9000, 2011.

HEO, J.; HUA, S. Z. An overview of recent strategies in pathogen sensing. *Sensors*, v. 9, n. 6, p. 4483–4502, 2009.

HINSLEY, A. et al. A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 186, n. 4, p. 435–455, 2018.

HNATUSZKO-KONKA, K. et al. Cytokinin signaling and de novo shoot organogenesis. *Genes*, v. 12, n. 2, p. 265, 2021.

HOSSAN, M. M.; KANT, R.; VAN, P. T. The application of biotechnology to orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 32, n. 2, p. 69–139, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.715984>. Acesso em: 27 maio 2025.

HUGH-DOVONAN, S. Root-associated fungi in Orchidaceae: diversity, phylogeny, ecology, and outstanding questions. *bioRxiv*, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.12.16.519622>. Acesso em: 25 ago. 2025.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 33, p. 105–119, 1993.

INSIGHTS into biosynthesis and signaling of cytokinins during plant growth, development and stress tolerance. In: *Springer eBooks*, p. 153–187, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-031-05427-3_7. Acesso em: 25 ago. 2025.

JANG, J. et al. Effect of plant growth regulators and carbon sources on proliferation and shoot formation of PLBs in *Dendrobium candidum*. *Journal of Plant Biotechnology*, v. 46, n. 1, p. 9–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5010/JPB.2019.46.1.009>. Acesso em: 25 ago. 2025.

KESHISHIAN, E. A.; RASHOTTE, A. M. Plant cytokinin signalling. *Essays in Biochemistry*, v. 58, p. 13–27, 2015.

KIBA, T.; SAKAKIBARA, H. Role of cytokinin in the regulation of plant development. In: *Annual Plant Reviews*. Springer, 2010. p. 237–254. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_13. Acesso em: 25 ago. 2025.

KIM, S. W. et al. Plant regeneration of rose (*Rosa hybrida*) from embryogenic cell-derived protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 73, n. 1, p. 15–19, 2003.

KOU, Y. et al. Thidiazuron triggers morphogenesis in *Rosa canina* L. protocorm-like bodies by changing incipient cell fate. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 557, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00557>. Acesso em: 25 ago. 2025.

LAL, A. et al. Clonal propagation and hardening of epiphytic orchids (*Aerides multiflora* and *Rhyncostylis retusa*) for sustainable conservation and utilization. *South African Journal of Botany*, v. 162, p. 402–411, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.09.029>. Acesso em: 27 maio 2025.

LEE, Y.-I.; HSU, S.-T.; YEUNG, E. C. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. *American Journal of Botany*, v. 100, n. 11, p. 2121–2131, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3732/AJB.1300193>. Acesso em: 27 maio 2025.

LESTARI, E. G. Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal Bioteknologi Indonesia*, v. 7, n. 1, p. 63–68, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.21082/JBIO.V7N1.2011.P63-68>. Acesso em: 25 ago. 2025.

LINDLEY, John. *Collectanea botanica, or, Figures and botanical illustrations of rare and curious exotic plants*. London: Printed by Richard and Arthur Taylor; sold by J. and A. Arch, 1821–1826. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/6215>. Acesso em: 02 dez. 2025.

LI, S.; ZHENG, H.; ZHANG, X. S.; SUI, N. Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. *Plant Cell Reports*, v. 40, n. 2, p. 271–282, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00299-020-02612-1>. Acesso em: 25 ago. 2025.

LIU, L. et al. Comparative and phylogenetic analyses of nine complete chloroplast genomes of Orchidaceae. *Scientific Reports*, v. 13, p. 48043, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48043-2>. Acesso em: 27 maio 2025.

LIZ, R. D. Elucidação da morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) de espécies de *Cattleya* Lindl. micropropagadas. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

LIZ, R. S. Gênero *Cattleya*. In: CARVALHO, F. A. (org.). *Orquídeas brasileiras*. São Paulo: Editora UFSP, 2017. p. 123–145.

LU, X. et al. Base-resolution maps of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reveal genome-wide DNA demethylation dynamics. *Cell Research*, v. 25, n. 3, p. 386–389, 2015.

MAGHFIRAH, U.; KESUMAWATI, E.; RAHMAWATI, M. Determinação da concentração de ANA e BAP no processo organogênico de PLB cultivado em *Dendrobium* in vitro. *Jurnal Ilmiah Estudante de Agricultura*, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.17969/jimfp.v9i3.29075>. Acesso em: 25 ago. 2025.

MARHAVÝ, P. et al. Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental Cell*, v. 21, n. 4, p. 796–804, 2011.

MARTINS, M. J. et al. 6-Benzylaminopurine and kinetin modulations during in vitro propagation of *Quercus robur* (L.): an assessment of anatomical, biochemical, and physiological profiling of shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 151, p. 149–164, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02339-9>.

MEI, T. A. et al. Exquisite protocol of callus induction and protocorm-like bodies (PLBs) regeneration of *Dendrobium sonia*-28. *Australian Journal of Crop Science*, v. 6, n. 5, p. 793–800, 2012.

MENEZES, Lou C. *Cattleya warneri*. Naturalia Publications, 1994. ISBN 2909717151

MOHAMMADI, M. et al. A highly efficient organogenesis system based on 6-benzylaminopurine and indole-6-butyric acid in *Suaeda glauca*—a medicinal halophyte under varying photoperiods. *Industrial Crops and Products*, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118672>.

MOHANRAJ, R. Role of Thidiazuron in Tissue Culture of Orchids. In: *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*. Singapore: Springer, 2018. p. 455–462. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_26. Acesso em: 27 maio 2025.

MOK, M. C.; MARTIN, R. C.; MOK, D. W. S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 36, n. 2, p. 102–107, 2000.

MORAES, C. P. de et al. Floristic and ecology of Orchidaceae in semideciduous seasonal forest fragment in Araras, São Paulo, Brazil. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 8, n. 3, p. 665–681, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2015v8n3p665-681>. Acesso em: 27 maio 2025.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 34, n. 4, p. 267–275, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02822732>.

MUSTAKIM, M. et al. The new technology for in vitro culture with induction of nanobubbles (NBsN₂ and NBsO₂) in *Cattleya* sp. *Biomedical and Pharmacology Journal*, v. 13, n. 2, p. 459–465, 2024. DOI: <https://doi.org/10.14421/biomedich.2024.132.459-465>. Acesso em: 27 maio 2025.

NETO, L. M.; FORZZA, R. C. A família Orchidaceae em um fragmento de floresta estacional semidecidual, no município de Barroso, Minas Gerais, Brasil. 2003.

NICOMRAT, D.; ANANTASARAN, J. A reliable homemade tissue culture protocol for *Dendrobium* orchid cultivation. *Applied Mechanics and Materials*, v. 804, p. 227–230, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/AMM.804.227>. Acesso em: 27 maio 2025.

NONGDAM, P. et al. Orchid micropropagation using conventional semi-solid and temporary immersion systems: a review. *Plants*, v. 12, n. 5, p. 1136, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12051136>. Acesso em: 27 maio 2025.

NOOR CAMELLIA, N. A. et al. The impact of 6-benzylaminopurine (BAP) on plant growth, micro-rhizome induction and phytochemical content of black ginger (*Kaempferia parviflora*) using two in vitro culture systems. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 2025. DOI: <https://doi.org/10.9734/jabb/2025/v28i22013>.

NOVIKOVA, T. I.; ZAYTSEVA, Y. G. TDZ-induced morphogenesis pathways in woody plant culture. In: *Plant Cell Culture Protocols*. Singapore: Springer, 2018. p. 61–94. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_3.

OINAM, G. S.; KOTHARI, S. L. Totipotency of coleoptile tissue in indica rice (*Oryza sativa* L. cv. CH 1039). *Plant Cell Reports*, v. 14, n. 4, p. 245–248, 1995.

PANSARIN, E. R.; PANSARIN, L. M. The family Orchidaceae. In: CAMERON, K. M. (ed.). *Genera Orchidacearum*. Vienna: Springer, 2009. p. 1–15. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-211-99755-0_1. Acesso em: 27 maio 2025.

PASTERNAK, T. et al. From single cell to plants: mesophyll protoplasts as a versatile system for investigating plant cell reprogramming. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 12, p. 4195, 2020.

PEAT, G.; JONES, M. A protocol for rapid, measurable plant tissue culture using stem disc meristem micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *The School Science Review*, v. 93, n. 345, p. 93–98, 2012.

PIRIA, R. S.; RAJMOHAN, K.; SURESH, S. In vitro production of protocorms and protocorm like bodies in orchids – a review. *Agricultural Reviews*, v. 29, n. 1, p. 40–47, 2008. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083154373>. Acesso em: 27 maio 2025.

PUDDEPHAT, I. J.; ALDERSON, P. G.; WRIGHT, N. A. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. in vitro. *Journal of Experimental Botany*, v. 48, n. 4, p. 951–962, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/48.4.951>.

PYATI, A. N. In vitro regeneration of an endangered medicinal orchid *Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxton through protocorm like bodies. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, v. 33, n. 1, p. 1–8, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3329/ptcb.v33i1.66753>.

RAMYA, M. et al. Volatile organic compounds from orchids: from synthesis and function to gene regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 3, p. 1160, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21031160>.

RUAN, J.; YI, P. Exogenous 6-benzylaminopurine inhibits tip growth and cytokinesis via regulating actin dynamics in the moss *Physcomitrium patens*. *Planta*, v. 256, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03914-2>.

SAKAKIBARA, H. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 95–114.

SANTANA, M. M. Crescimento e multiplicação *in vitro* de *Epidendrum cinnabarinum* em meio de cultura suplementado. São Cristóvão, 2024. Monografia (Graduação em Ecologia) – Departamento de Ecologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2024. Disponível em: <https://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/22120>. Acesso em: 27 maio 2025.

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

SHAN, X.; LI, D.; QU, R. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 36, n. 3, p. 207–210, 2000.

SCHIFF, J. L. *Rare and exotic orchids: their nature and cultural significance*. Cham: Springer International Publishing, 2018.

SCHMÜLLING, T. New insights into the functions of cytokinins in plant development. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 21, n. 1, p. 40–49, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s003440010046>. Acesso em: 27 maio 2025.

SCHWARZ, O. J. Plant growth regulator effects in the *in vitro* propagation of three hardwood tree genera: *Castanea*, *Juglans*, and *Quercus*. Dordrecht: Springer, 1987. v. 6, p. 113–135. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-017-1793-9_6. Acesso em: 27 maio 2025.

SEMIARTI, E. Orchid biotechnology for Indonesian orchids conservation and industry. In: *Proceedings of the AIP Conference*, 2018. p. 020022. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.5050118>. Acesso em: 27 maio 2025.

SIDIK, N. J. et al. A mini review of plant tissue culture: the role of media optimization, growth regulators in modern agriculture, callus induction and the applications. *AUIQ Complementary Biological System*, v. 1, n. 2, p. 96–109, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.70176/3007-973x.1019>. Acesso em: 27 maio 2025.

SILVA, A. C. D. Inoculação de bactérias promotoras de crescimento em orquídeas epífitas na fase de aclimatização. 2021 44 f. Mestrado em Agronomia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2021.

SILVEIRA, C. K. et al. Acclimatisation of orchids using plant growth-promoting bacteria and humic acids. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v. 98, n. 6, p. 807–813, 2023.

SIQUEIRA, C. E.; ZANIN, A.; MENINI NETO, L. Orchidaceae in Santa Catarina: update, geographic distribution and conservation. *Check List*, v. 10, n. 6, p. 1452–1478, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.15560/10.6.1452>. Acesso em: 27 maio 2025.

SOS MATA ATLÂNTICA. *SOS Mata Atlântica*. 2022. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/causas/mata-atlantica>. Acesso em: 14 nov. 2025.

SRIVASTAVA, L. M. Cytokinins. In: *Plant Growth and Development*. San Diego: Academic Press, 2002. p. 191–204. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012660570-9/50149-0>. Acesso em: 27 maio 2025.

SU'UDI, M. et al. Plant breeding techniques in tissue culture to improve the quality of orchids. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, v. 30, n. 1, p. 116–122, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.18343/jipi.30.1.116>. Acesso em: 27 maio 2025.

SUT, S.; MAGGI, F.; DALL'ACQUA, S. Bioactive secondary metabolites from orchids (Orchidaceae). *Chemistry & Biodiversity*, v. 14, n. 10, p. e1700172, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700172>. Acesso em: 27 maio 2025.

ŠMERINGAI, J.; PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFOVÁ, P.; PERNISOVÁ, M. Cytokinins – regulators of de novo shoot organogenesis. *Frontiers in Plant Science*, v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1239133>. Acesso em: 27 maio 2025.

TAKEBAYASHI, N. *Cattleya warneri* T. Moore. *Orchis Borealis*, 2015. Disponível em: <https://orchidborealis.blogspot.com/2015/09/cattleya-warneri.html>. Acesso em: 30 ago. 2025.

TICKTIN, T. et al. Synthesis of wild orchid trade and demography provides new insight on conservation strategies. *Conservation Letters*, v. 13, n. 2, p. e12697, 2020.

TORRES, S. B.; CASEIRO, R. F.; RODO, A. B.; MARCOS FILHO, J. Testes de vigor em sementes de maxixe (*Cucumis anguria* L.) com ênfase ao teste de condutividade elétrica. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 20, n. 2, p. 480–483, 1998.

TÖYRÄÄNVUORI, J. Breeding of orchids using conventional and biotechnological methods: advances and future prospects. In: *Orchid Biotechnology*. Singapore: Springer, 2023. p. 27–58. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-99-1079-3_2. Acesso em: 27 maio 2025.

TRIANI, N.; ILHAM, A. Pengaruh zat pengatur tumbuh alami terhadap jumlah akar e quantidade de folhas de plântulas de anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis*) de forma *in vitro*. *Gontor Agrotech Science Journal*, v. 10, n. 1, p. 57–65, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.21111/agrotech.v10i1.12282>. Acesso em: 27 maio 2025.

VAN DEN BERG, C. Distribution of *Cattleya* species. *Orchid Digest*, v. 69, n. 2, p. 96–107, 2005.

VAN DEN BERG, C. et al. Molecular phylogenetics of Laeliinae (Orchidaceae): a contribution from combined plastid DNA sequences. *Lindleyana*, v. 22, n. 3, p. 184–199, 2009.

VAN DEN BERG, C. *Cattleya warneri*. In: *Flora e Funga do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB1469>. Acesso em: 27 maio 2025.

VANKOVA, R. Cytokinin regulation of plant growth and stress responses. In: *Plant Hormones*. New York: Springer, 2014. p. 55–79. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0491-4_3. Acesso em: 27 maio 2025.

VIEIRA, L. M. et al. In vitro plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 50, n. 6, p. 738–745, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11627-014-9650-0>. Acesso em: 18 maio 2025.

VINOTH, A.; RAVINDHRAN, R. In vitro morphogenesis of woody plants using thidiazuron. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. (ed.). *Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator*. Cham: Springer, 2018. p. 211–229.

XU, K. et al. NAA at a high concentration promotes efficient plant regeneration via direct somatic embryogenesis and SE-mediated transformation system in *Ranunculus sceleratus*. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 18321, 2019.

WITHNER, C. L. *The Cattleyas and Their Relatives: The Cattleyas*. Portland: Timber Press, 1988.

ZAHARA, M. A review: micropropagation of *Phalaenopsis* sp. from leaf and flower stalk explants. *Jurnal Natural*, v. 17, n. 2, p. 91–95, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.24815/JN.V17I2.8130>. Acesso em: 27 maio 2025.

ZANELLO, C. A.; CARDOSO, J. C. PLBs induction and clonal plantlet regeneration from leaf segment of commercial hybrids of *Phalaenopsis*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 94, n. 5, p. 627–631, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1600384>. Acesso em: 27 maio 2025.

ZHANG, L. N. et al. Optimization of tissue culture and rapid propagation technology system of *Pleione*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, v. 40, p. 2275–2278, 2017.

ZHAO, T. et al. Delineation of the impacts of varying 6-benzylaminopurine concentrations on physiological, biochemical and genetic traits of different olive cultivars under in vitro conditions. *AoB Plants*, v. 16, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plae038>. Acesso em: 12 set 2025.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a propagação *in vitro* de duas espécies do gênero *Cattleya* com ênfase na caracterização da morfohistodiferenciação de *Cattleya purpurata* desde a germinação de sementes até a formação de plântulas, e na indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em *Cattleya warneri*, visando contribuir para estratégias de propagação e conservação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever os principais estágios de desenvolvimento *in vitro* de *C. purpurata* desde a germinação até a formação de plântulas, por análises morfohistológicas.
2. Estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* de explantes foliares de *C. warneri* T Moore para indução de ESPs com diferentes concentrações de TDZ e BAP
3. Realizar análises anatômicas e histológicas para caracterizar os diferentes estágios de desenvolvimento das ESPs em *C. warneri* T. Moore.

3. CAPÍTULO I

MORFODIFERENCIAÇÃO INICIAL DO DESENVOLVIMENTO DE *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) VAN DEN BERG A PARTIR DE SEMENTES CULTIVADAS *IN VITRO*.

RESUMO

A Mata Atlântica é um dos principais *hotspots* mundiais de biodiversidade, abrigando elevado número de espécies endêmicas, incluindo a família Orchidaceae, que apresenta grande importância ecológica e ornamental. Dentro desse grupo, o gênero *Cattleya* reúne mais de 100 espécies e encontra-se amplamente ameaçado pela perda de habitat e pela coleta ilegal. *C. purpurata* orquídea endêmica do Brasil, distribui-se ao longo da Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste e é considerada vulnerável pela IUCN. Além das pressões antrópicas, apresenta características biológicas que limitam sua regeneração natural, como a baixa taxa de frutificação e a dependência de fungos micorrízicos para a germinação das sementes. As sementes de Orchidaceae são microscópicas, sem endosperma ou cotilédones, possuindo reduzidas reservas nutritivas, o que resulta em baixas taxas de germinação natural. O cultivo *in vitro* constitui alternativa fundamental para superar tais restrições, permitindo a germinação assimbiótica em condições controladas, a micropropagação em larga escala e o desenvolvimento de protocolos de conservação. Neste estudo, teve como objetivo descrever os estágios de desenvolvimento *in vitro* de *C. purpurata* desde a germinação até a formação de plântulas. Sementes maduras de *C. purpurata* foram submetidas ao cultivo *in vitro* em meio MS suplementado, possibilitando o acompanhamento do desenvolvimento desde a fase embrionária até a formação de plântulas. As análises morfológicas e histológicas revelaram que os embriões apresentaram estrutura simples, sem cotilédone, e com suspensor funcional. Observou-se intumescimento inicial em 7 dias, seguido pela reorganização celular e pela degeneração do suspensor. Após cerca de 28 dias, registrou-se a ruptura da testa e o surgimento dos protocormos, caracterizados por coloração esverdeada, presença de rizóides basais e atividade meristemática apical. Ao longo do cultivo, os protocormos exibiram expansão lateral, desenvolvimento de primórdios foliares e início da fotossíntese. Com 90 a 128 dias, foram observados estômatos, folhas verdadeiras e o surgimento das primeiras raízes adventícias, marcando a transição para a fase de plântula. A morfo-histodiferenciação registrada em *C. purpurata* assemelha-se a descrições de outras Orchidaceae, confirmando o protocormo como estágio crucial para a sobrevivência e regeneração da espécie. Os resultados reforçam a relevância do cultivo *in vitro* para a produção de mudas, o estudo do desenvolvimento embrionário e a implementação de estratégias de conservação para orquídeas ameaçadas.

Palavras-chave: *Cattleya purpurata*; cultivo *in vitro*; germinação assimbiótica; desenvolvimento de protocormos; conservação de orquídeas.

ABSTRACT

The Atlantic Forest is one of the world's main biodiversity hotspots, harboring a high number of endemic species, including the Orchidaceae family, which has great ecological and ornamental relevance. Within this group, the genus *Cattleya* comprises more than 100 species and is widely threatened by habitat loss and illegal collection. *Cattleya purpurata*, an orchid endemic to Brazil, is distributed along the Atlantic Forest of the southern and southeastern regions and is considered vulnerable by the IUCN. In addition to anthropogenic pressures, the species exhibits biological traits that limit its natural regeneration, such as low fruit set and dependence on mycorrhizal fungi for seed germination. Orchidaceae seeds are microscopic, lack endosperm and cotyledons, and contain minimal nutrient reserves, resulting in low natural germination rates. In vitro culture is a fundamental alternative to overcome these constraints, enabling asymbiotic germination under controlled conditions, large-scale micropropagation, and the development of conservation protocols. This study aimed to describe the in vitro developmental stages of *C. purpurata* from germination to seedling formation. Mature seeds of *C. purpurata* were cultured in supplemented MS medium, allowing the monitoring of development from the embryonic phase to seedling formation. Morphological and histological analyses revealed that embryos showed a simple structure, lacking a cotyledon, and possessing a functional suspensor. Initial swelling was observed at 7 days, followed by cellular reorganization and suspensor degeneration. After approximately 28 days, testa rupture occurred and protocorms emerged, characterized by greenish coloration, the presence of basal rhizoids, and apical meristematic activity. Throughout cultivation, protocorms exhibited lateral expansion, development of leaf primordia, and the onset of photosynthesis. Between 90 and 128 days, stomata, true leaves, and the first adventitious roots were recorded, marking the transition to the seedling stage. The morpho-histodifferentiation observed in *C. purpurata* resembles descriptions for other Orchidaceae, confirming the protocorm as a crucial stage for species survival and regeneration. The results reinforce the relevance of in vitro culture for seedling production, the study of embryonic development, and the implementation of conservation strategies for threatened orchids.

Keywords: *Cattleya purpurata*; in vitro culture; asymbiotic germination; protocorm development; orchid conservation.

3.1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica abriga uma das maiores concentrações de espécies endêmicas do planeta. Novas espécies continuam sendo descritas regularmente, tanto de plantas quanto de animais, indicando que a diversidade real é subestimada (Lima et al. (2025); Campos-Rocha et al. (2023). Entre as famílias mais representativas desse bioma, destaca-se a Orchidaceae, cujos gêneros e espécies desempenham papel relevante na manutenção da diversidade vegetal e funcionam como bioindicadores do estado de conservação das florestas, dada sua elevada sensibilidade às perturbações antrópicas em ambientes primários (Furtado et al., 2018)

O gênero *Cattleya*, composto por aproximadamente 102 espécies, além de diversas variedades e híbridos, possui reconhecido valor ornamental e econômico. Entretanto, encontra-se incluído na Lista Vermelha de espécies ameaçadas de extinção (CNCFlora, 2012; The Plant List, 2022). Trata-se de um grupo predominantemente epífito, que sobrevive mediante estratégias de absorção de água e nutrientes provenientes de matéria orgânica acumulada em substratos próximos às raízes (Andriolli, 2019).

Dentre essas espécies, *Cattleya purpurata* ((Lindl. & Paxton) Van den Berg), constitui um importante representante da flora brasileira, com distribuição endêmica ao longo da Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste. Apresenta hábito herbáceo, rizomas com três entrenós, pseudobulbos portando uma folha lanceolada e flores de notável valor ornamental, geralmente brancas com labelo púrpura venulado, observadas entre outubro e dezembro (Van Den Berg, 2008; 2020). Sua ocorrência natural estende-se do Rio Grande do Sul ao litoral norte de São Paulo.

Apesar de sua relevância, a espécie vem sofrendo forte declínio populacional em decorrência da coleta ilegal e da destruição de habitats, sendo classificada como vulnerável pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) (Nascimento, 2019). Registros indicam sua extinção local em estados como Rio de Janeiro e São Paulo, onde não é observada há décadas (CNCFlora, 2013). Além dos impactos antrópicos, *C. purpurata* apresenta fatores biológicos que agravam sua vulnerabilidade, como baixa taxa de frutificação (Caballero et al., 2016) e a dependência de associações micorrízicas específicas para a sobrevivência de indivíduos juvenis (Oliveira, 2023).

No ciclo reprodutivo das orquídeas, as sementes, microscópicas e com reduzidas reservas nutritivas, são formadas em cápsulas que podem conter milhares de unidades (Arditti; Ghani, 2000). Apesar da elevada produção, apenas 0,2–0,3% germina em condições naturais (Singh, 1992). A ausência de cotilédones e o endosperma vestigial tornam o embrião altamente

dependente da associação simbiótica com fungos micorrízicos para absorção de nutrientes essenciais, especialmente carbono, durante as fases iniciais do desenvolvimento (Zhao, 2024, Miura, 2023; Yeh, 2019).

Para superar essas limitações, técnicas de cultivo *in vitro* vêm sendo amplamente empregadas, possibilitando a germinação assimbiótica de sementes sob condições controladas. Esse método, associado à micropropagação, permite a multiplicação rápida, produção de mudas livres de patógenos e conservação de espécies com dificuldades de propagação natural (Arditti; Ernst, 1984; Damiani, 2008). Além disso, favorece estudos anatômicos e fisiológicos fundamentais para o aprimoramento de protocolos de conservação.

Diversos trabalhos já exploraram aspectos morfoanatômicos de espécies do gênero *Cattleya*. Silva Júnior et al. (2013) investigaram o efeito de diferentes concentrações de ureia em folhas cultivadas *in vitro*; Gallo et al. (2016) analisaram a anatomia de sementes e protocormos; e Bazzicalupo et al. (2021) compararam métodos de germinação simbiótica e assimbiótica em *C. purpurata*. Essas pesquisas reforçam a importância dos estudos de morfohistodiferenciação para compreender o desenvolvimento embrionário e protocormal, subsidiando estratégias de micropropagação, filogenia e conservação (Ayyasamy et al., 2017).

As sementes de orquídeas originam protocormos, estruturas tuberiformes descritas pela primeira vez por Treub (1890), que representam estágio intermediário entre o embrião e a plântula (Leroux et al., 1997). Os protocormos apresentam ampla diversidade morfológica, podendo ser esféricos, ovais, discóides ou ramificados, e desempenham papel crucial na transição até a formação de tecidos vegetativos diferenciados (Batygina et al., 2003).

Diante desse cenário, este capítulo tem como objetivo analisar a morfohistodiferenciação de *Cattleya purpurata* em condições de cultivo *in vitro*, abrangendo desde a germinação das sementes até a formação de protocormos e plântulas, a fim de fornecer subsídios para estratégias de conservação e manejo biotecnológico da espécie.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Sementes

Sementes extraídas de cápsulas maduras, em início de deiscência, foram excisadas de plantas matrizes de *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Van Den Berg., provenientes do Instituto de Pesquisas Ambientais, localizado no Jardim Botânico (coordenadas -23.642516, -46.622122), bairro Água Funda, São Paulo – SP, fornecidas pelo pesquisador Rogério Mamoru Suzuki. As sementes foram encaminhadas ao Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia Vegetal

da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram submetidas a desinfestação e, posteriormente, a procedimentos de cultivo que possibilitaram a germinação e as análises estruturais.

3.2.2. Procedimentos para o cultivo *in vitro*

A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, sequencialmente, com a imersão em água destilada autoclavada por 10 min. Em seguida, tratadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% de cloro ativo por 10 min e posteriormente, três lavagens sucessivas com água destilada autoclavada de acordo com a metodologia descrita por Suzuki et al. (2009), com adaptações. Em seguida, alíquotas de 100 μL de sementes foram inoculadas, com auxílio de micropipetador, em frascos de vidro com capacidade de 240 mL, contendo 30 mL de meio de cultura básico contendo os macros e micronutrientes de MS (Murashige; Skoog, 1962), isento de fitorreguladores e adicionado de 2 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de vitaminas de Morel (Morel; Wetmore, 1951), 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, 2,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carvão ativado e geleificado com 6,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Agar-agar. O pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem à 120 °C, por 20 minutos.

Cada unidade experimental foi constituída de 10 frascos, contendo uma alíquota (100 μL), com estimativa de aproximadamente 400 sementes arranjados em forma de DCC, com dez repetições. Os frascos foram selados com filme plástico e mantidos em sala de crescimento climatizada, a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa média de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Para as análises morfohistológicas foram coletadas amostras aos 0, 7, 14, 21, 28, 54, 90 e 128 dias de cultivo. O registro dos dados foi através de fotomicrografia, das etapas desde a germinação e desenvolvimento do embrião, passando pela fase de protocormo, até o estágio de plântula.

3.2.3. Análise em Microscopia Estereoscópica (ME) e Microscopia Óptica (MO)

Amostras representativas das culturas coletadas em cada dias de cultivo foram submetidas as análises morfológicas com auxílio de microscópio estereoscópico Olympus SZH10 (Tóquio, Japão), equipado com câmera Olympus DP71 e software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, EUA), no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (UFSC).

Para análise histológica, as amostras foram fixadas em FAA₇₀ (Formaldeído, ácido Acético e Alcool etílico) (Johansen, 1940) e desidratadas em série etílica crescente até álcool 99,5°GL. Para confecção de lâminas permanentes, o material foi desidratado e infiltrado em

hidroxietilmetacrilato (Leica® Historesin, Heidelberg, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo de rotação SLEE CUT 4055 (Mainz, Alemanha), produzindo cortes de 5 µm de espessura. As secções foram coradas com azul de toluidina (O'Brien et al., 1965) e analisadas em microscópio óptico Olympus BX40, equipado com câmera digital DP71 e o mesmo software de captura de imagens.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Análises morfohistológicas de desenvolvimento pós-seminal, das culturas *in vitro* de *C. purpurata* possibilitaram a caracterização detalhada das rotas de diferenciação desde a fase embrionária até a formação de plântulas (Figuras 4, 5 e 6). Durante a triagem inicial das sementes (Figura 4A), foi constatado que parte das sementes, em teste de viabilidade com tetrazólio eram viáveis, corada de vermelho (Figura 4B esquerda) e outras não possuíam embrião, sendo classificadas como inférteis (Figura 4B direita). Essa variação estrutural, anteriormente relatada em outras Orchidaceae, pode estar associada à ausência de fecundação, à degeneração do megagametófito ou a mecanismos de autoincompatibilidade (Duarte et al., 2020). Mesmo quando ocorre a diferenciação dos tegumentos, o embrião pode não se desenvolver, resultando em sementes com apenas a estrutura da testa, que exerce função protetora e, em *C. purpurata*, correspondeu a uma única camada de células espessadas.

No presente estudo, observou-se que a espécie apresentou sementes com comprimento médio de aproximadamente 500 µm, com embriões elipsoidais envolvidos por uma testa delgada e transparente, conforme o padrão descrito para Orchidaceae (Figuras 4A e C). O embrião, reduzido e formado por poucas células, não apresentou cotilédones nem endosperma, característica típica do grupo (Arditti, 1992). Essa limitação estrutural está diretamente associada à necessidade de interação simbiótica com fungos micorrízicos para viabilizar a germinação natural, visto que os fungos fornecem nutrientes essenciais nos estágios iniciais e podem permanecer associados ao longo do ciclo de vida da planta (Raven, 1999). Em condições de cultivo *in vitro*, essa função simbiótica é substituída pelo meio de cultura, que fornece os nutrientes necessários em ambiente asséptico. Resultados semelhantes foram relatados por Bazzicalupo et al. (2021), que registraram sementes com comprimento médio de 800 µm, apresentando um suspensor relativamente longo, formado por duas a três células alongadas conectando o corpo do embrião à porção terminal do suspensor.

O suspensor de *C. purpurata* foi identificado como um filamento composto por células bisseriadas na região de inserção com o embrião e células unisseriadas em contato com os tecidos maternos (Figuras 4C e D). Além de fixar o embrião, o suspensor atua como canal preferencial para transporte e absorção de nutrientes (Taiz & Zeiger, 2004; Yeung, 2022). Estudos recentes mostram que o suspensor desempenha papel ativo no desenvolvimento embrionário inicial, funcionando como órgão especializado de absorção, com células que podem assumir características morfofisiológicas semelhantes às células de transferência (Yeung, 2022; Clutter, 1978; 1979; Offler et al., 2002; Offler & Patrick, 2020).

Observações realizadas neste estudo corroboram as descrições de Gallo et al. (2016), segundo os quais o tegumento das sementes de Laeliinae é composto por uma única camada de células. Essa conformação estrutural, associada à presença de espaços aéreos entre o tegumento e o embrião, favorece tanto a dispersão anemocórica quanto a capacidade de molhabilidade das sementes, sendo um fator importante para a eficiência germinativa e a interação simbiótica com fungos micorrízicos (Arditti, 2000; Barthlott, 1975). A túnica embrionária apresentou paredes celulares periclinais espessadas longitudinalmente, enquanto a extremidade superior da semente era aguda e a região micropilar apresentava formato truncado (Figuras 4A e E), em concordância com Gao (2023). As células embrionárias puderam ser agrupadas em duas regiões distintas: uma central, com células maiores e vacuoladas, e outra periférica, formada por células menores com núcleos conspícuos, associadas ao suspensor (Figuras 4D, F e G). Padrão semelhante de polarização celular foi descrito em *Dendrobium chrysotoxum*, onde células com núcleos proeminentes ocupam a extremidade superior e células vacuoladas localizam-se na região micropilar, próxima ao suspensor (Gao, 2023).

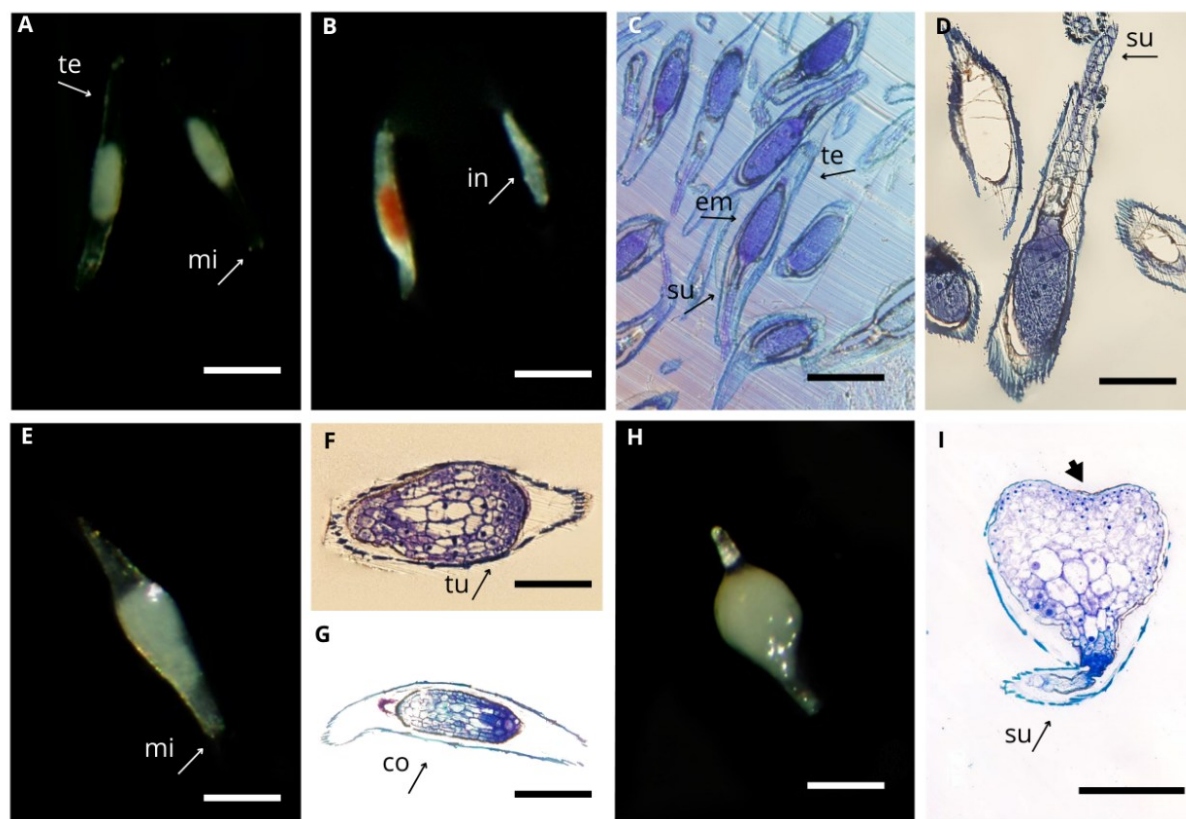
Após sete dias de cultivo *in vitro*, os embriões apresentaram intumescimento na região central (Figuras 4E e F)), reflexo da hidratação e da mobilização inicial das reservas. Esse fenômeno, considerado um dos primeiros sinais de germinação em Orchidaceae, está associado ao aumento do volume celular e à reorganização metabólica. Apesar da expansão embrionária, a testa permaneceu íntegra nesse estágio. Em algumas espécies de orquídeas, esse intumescimento pode ocorrer sem a ruptura do tegumento (Pereira et al., 2011), enquanto em outras o desenvolvimento só prossegue mediante associação com fungos simbiossiontes adequados (Peterson et al., 1998; Pereira et al., 2015).

Esse padrão germinativo está em consonância com descrições anteriores para Orchidaceae, nas quais a germinação ocorre pelo intumescimento embrionário, seguido pela mobilização progressiva de reservas lipídicas e protéicas (Manning; Staden, 1987; Liz, 2013).

Em *Phalaenopsis amabile*, por exemplo, foram observadas gotículas lipídicas em células do suspensor nas fases iniciais, as quais, com a maturidade, deram lugar ao acúmulo de corpos lipídicos e protéicos no citoplasma em substituição aos vacúolos de amido (Moraes et al., 2022). Embora possuam reservas mínimas (Barthlott; Grosse-Veldmann; Korotkova, 2014), as sementes de Orchidaceae apresentam elevada tolerância à dessecação e comportamento ortodoxo, garantindo longevidade em condições de baixa temperatura e umidade (Seaton et al., 2010; Merritt et al., 2014; Fileti et al., 2021).

Na segunda semana de cultivo, observou-se o intumescimento progressivo do embrião de *C. purpurata*, que passou a apresentar porção do centro para o ápice mais globosa e mudança gradual da coloração amarelada para verde-claro (Figura 4H). As células basais próximas ao suspensor também adquiriram tonalidade esverdeada, enquanto na extremidade apical notaram-se células pequenas, fortemente coradas e agrupadas, evidenciando intensa atividade proliferativa (Figuras 4H e I). Em contraste, as células basais mostraram-se maiores e vacuoladas, e as laterais organizavam-se de modo a marcar o início da formação dos primórdios foliares (Figura 4I). Nesse estágio, iniciou-se também a degeneração do suspensor, concomitante ao estabelecimento dos rizóides. Dinâmica semelhante foi descrita em outras Orchidaceae. Em *Dendrobium chrysotoxum*, Gao (2023) observou a embebição das sementes já no primeiro dia após a inoculação, seguida pelo intumescimento do embrião entre 3 e 5 dias e pela ruptura da testa entre 13 e 15 dias, processo associado ao acúmulo de água em células de maior volume. Em *Cattleya amethystoglossa*, Liz (2013) relatou que, na região basal, não foram identificados indícios de ápice radicular, uma vez que as estruturas precursoras se degeneraram juntamente com o suspensor; contudo, as células da camada externa diferenciaram-se em rizóides. De forma análoga, em algumas espécies, o embrião pode apenas intumescer ou avançar até a ruptura da testa (Pereira et al., 2011; Peterson et al., 1998), processo que em condições naturais pode depender da associação micorrízica para prosseguir o desenvolvimento (Peterson et al., 1998). Em *Vanilla planifolia*, o aumento do volume celular na camada basal do embrião foi determinante para a ruptura da testa e a transição para a fase de protocormo (Philip et al., 1988).

Figura 4 - Morfohistodiferenciação de *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Vander Berg.



Morfohistodiferenciação de *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Vander Berg, cultivada in vitro, no período de 0 a 14 dias após a inoculação acompanhada em microscopia estereoscópica (A, B, E e H) e óptica (C, D, F, G e I): **A)** Sementes em dia zero, antes da inoculação. **B)** Teste de viabilidade com tetrazólio: semente viável corada de vermelha (esquerda) e semente sem embrião (in) (direita). **C)** Secção longitudinal da semente, envolvida pela testa (te), contendo o embrião (em), ligado à região basal por suspensor (su); **D)** Secção longitudinal da semente com suspensor (su) composta por células uni e bisseriadas; **E)** Embrião intumescido aos 7 dias com a micrópila (mi); **F-G)** Embrião em secção longitudinalal formado por túnica (tu) e corpo (co); **H)** Embrião globoso na região apical aos 14 dias, ainda envolto pela testa; presença de suspensor (su) na região basal; **I)** Secção longitudinal da semente com início da degeneração do suspensor, no polo basal e início do ápice caulinar no polo oposto (cabeça de seta). Barras: A, B e C = 200 μ m; D = 100 μ m; E, F, G e H = 150 μ m; I = 250 μ m.

Na terceira semana de cultivo, essas características em *C. purpurata* tornaram-se mais pronunciadas, embora a testa permanecesse íntegra nesse estágio (Figura 5A). O crescimento celular mostrou-se mais evidente, marcado por divisões anticlinais nas células da túnica e divisões em múltiplos planos no corpo do embrião, refletindo intensa atividade mitótica. Também foram observadas expansões laterais na região apical e a formação de protomeristemas, identificados por grupos de células pequenas com núcleos conspícuos (Figura 5B). Segundo Batygina et al. (2003), protocormos de Orchidaceae podem originar múltiplos centros meristemáticos; entretanto, em *C. purpurata*, a atividade concentrou-se

preferencialmente no ápice caulinar. Resultados semelhantes foram descritos por Liz, onde o intumescimento embrionário nas primeiras semanas de cultivo *in vitro* foi acompanhado por diferenciações histológicas que levaram ao surgimento de um ápice meristemático no extremo oposto ao suspensor, além da formação inicial da região radicular, incluindo hipófise e centro quiescente.

Na quarta semana de cultivo (28 dias), verificou-se a ruptura da testa, marcando a conclusão do processo de germinação e a emergência dos protocormos. Essas estruturas apresentavam formato globoso, coloração esverdeada e sinais de atividade fotossintética (Figura 5C). Nesse estágio, registrou-se também a degeneração completa do suspensor, a protrusão apical e o estabelecimento da bipolaridade embrionária, caracterizada pela diferenciação de um ápice caulinar e de um ápice radicular inicialmente associado ao suspensor (Figura 5B e D). Em *C. purpurata*, assim como em outras Orchidaceae, a radícula embrionária sofre degeneração, sendo posteriormente substituída por raízes adventícias em estágios mais avançados do desenvolvimento (Gallo, 2016).

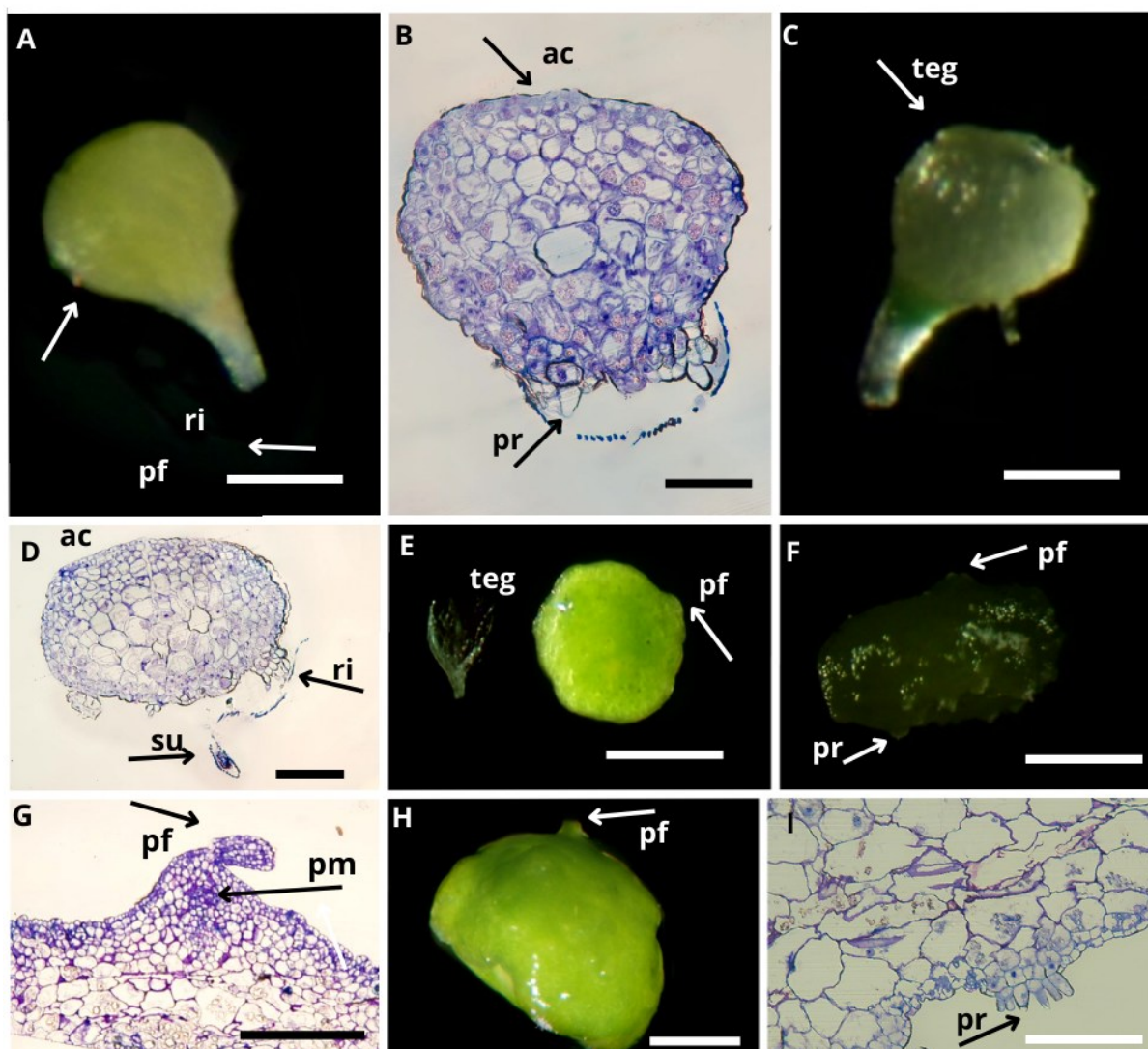
A maioria das sementes de orquídeas apresenta embriões pouco diferenciados, sem cotilédones e endosperma, germinando em protocormos antes de se tornarem plântulas (Arditti, 1992). O protocormo representa, portanto, um estágio crucial do ciclo de vida da orquídea, atuando como estrutura de transição entre embrião e plântula, além de constituir o principal sítio de interação simbiótica e de formação do meristema caulinar.

Do ponto de vista anatômico, os protocormos de *C. purpurata* mostraram grande semelhança com os descritos em outras Orchidaceae (Gao, 2023, Yeng, 2022; Gallo, 2016). Na região apical, próxima à testa, e na basal, as células parenquimáticas apresentaram menor volume em comparação às demais, e, na porção basal, foram observados rizóides (Figuras 5B e D). A região central destacou-se pelo elevado nível de atividade mitótica, associado à intensa vacuolização celular. Essa organização morfoanatômica corresponde ao padrão descrito para diversas espécies, incluindo *Dactylorhiza* spp. (Gallo, 2016; Gao, 2023; Liu, 2022; Guo 2021)) e *Cyrtopodium glutiniferum* (Pereira et al., 2015).

Em *C. purpurata*, os protocormos exibiram posteriormente uma expansão lateral mais pronunciada, com as células basais da camada de revestimento originando rizóides logo após a completa degeneração do suspensor (Figuras 5B e D). À medida que o desenvolvimento progrediu, os protocormos mantiveram-se globulares, aumentando gradualmente de diâmetro, adquirindo formato esférico e coloração verde-clara (Figura 5E). Na região apical, observou-se o surgimento de uma protrusão, sinalizando o início da formação dos primórdios foliares (Figuras 5E, F, G e H). Os protomeristemas estavam localizados na porção superior do

protocormo e apresentavam grupos de células pequenas com núcleos conspícuos, indicativo de intensa atividade meristemática (Figura 5G). Resultados semelhantes foram reportados por Liz (2013), na qual os protocormos também apresentaram expansão lateral e achatamento da porção basal. Em *C. purpurata*, não se observou desenvolvimento do ápice radicular (Figura 5H), uma vez que estruturas precursoras degeneraram juntamente com o suspensor; ainda assim, células da camada de revestimento formaram pêlos radiculares (Figuras 5B, D e I). A ocorrência de pêlos radiculares é uma característica comum nos protocormos de diversas orquídeas, tanto em cultivo in vitro quanto em condições naturais (Yamamoto, 2017; Pereira, 2005; Nishimura, 1981), tendo sido identificada, por exemplo, na epiderme basal de *Catasetum pileatum* após três semanas de cultivo (Kraus et al., 2006). De forma análoga, Pereira (2015) observou em *Cyrtopodium glutiniferum* que as células parenquimáticas da região apical dos protocormos apresentavam menor volume em comparação com as demais células, enquanto na região micropilar (basal) elas eram vacuoladas e acompanhadas por rizóides unicelulares. A morfologia e a anatomia desses protocormos coincidem com padrões descritos para outros gêneros de Orchidaceae, como *Dactylorhiza* spp. (Starke, 2024; Gao, 2023).

Figura 5 - Morfohistodiferenciação de *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Vander Berg.



Morfohistodiferenciação de *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Vander Berg, cultivada in vitro, no período de 21 a 54 dias após a inoculação, acompanhada em microscopia estereoscópica (A, C, E, F e H) e óptica (B, D, G e I): **A)** Embrião esverdeado aos 21 dias envolvido pelo tegumento; **B)** Secção longitudinal de protocormo com maior atividade meristemática no ápice caulinar (ac); expansões laterais correspondem a pelos radiculares (pr); **C)** Rompimento parcial do tegumento (teg) aos 28 dias, marcando o início da fase de protocormo; **D)** Secção longitudinal do protocormo: rizóides (ri), suspensor em degeneração (su) e ápice caulinar (ac); **E-F)** Rompimento completo do tegumento (teg); e início da formação dos primórdios foliares (pf); **F)** Protocormo com base achatada e presença de rizóides (ri) e formação dos primórdios foliares (pf); **G)** Secção longitudinal de protocormo com ápice caulinar e primórdios foliares (pf) e protomeristemas (pm); **H)** Presença de primórdios foliares (pf) e alongamento da parte aérea no ápice; **I)** Pelos radiculares (pr) na base do protocormo. Barras: A, C = 300 µm; B, G, I = 200 µm; D = 250 µm; E = 1,0 mm; F, H = 500 µm.

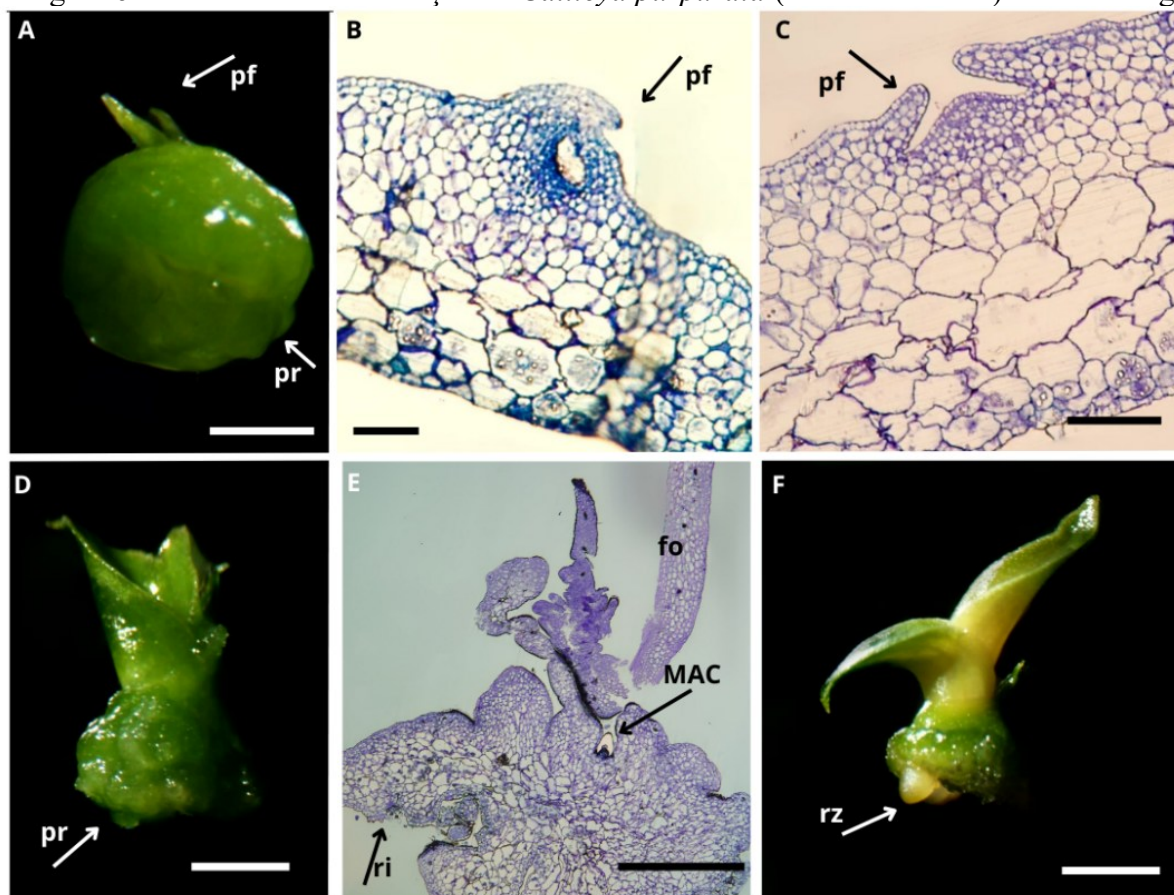
A protrusão observada na superfície apical dos protocormos alongou-se progressivamente, originando os primórdios foliares (Figura 6A). Durante esse processo, as células protomeristemáticas centrais assumiram caráter meristemático, apresentando reduzido

volume e elevada razão núcleo/citoplasma. Esse agrupamento celular evoluiu para a formação do meristema apical caulinar (MAC), delimitado pela abertura de uma fenda entre o MAC e os tecidos adjacentes, o que caracteriza o estabelecimento inicial dessa estrutura (Figuras 6B e C). Na região basal, desenvolveram-se numerosos rizóides em aglomerados, derivados do alongamento de células epidérmicas (Figura 6D). Nos estágios mais avançados, por volta de 90 dias de cultivo, observou-se a formação de múltiplos primórdios foliares e, na região basal, o aparecimento de rizóides restritos a essa porção. Os cortes histológicos revelaram ainda uma depressão inicial no centro do protocormo, correspondente ao meristema apical caulinar (MAC), localizado logo abaixo da primeira folha (Figura 6E). Em sequência, registrou-se o desenvolvimento completo do MAC, já contendo primórdios foliares inseridos na estrutura do protocormo.

A primeira folha verdadeira tornou-se visível a partir do sulco apical (Figura 6E e F). Análise em Microscopia Estereoscópica evidenciaram, na mesma fase, a formação de um primórdio radicular adventício próximo ao meristema apical caulinar (MAC) (Figura 6F), caracterizando o início da fase de plântula. Subsequentemente, raízes emergiram na base do protocormo, enquanto uma segunda folha verdadeira se desenvolvia. Nesse estágio, as plântulas de *C. purpurata* apresentavam raízes e folhas bem definidas, além da persistência da estrutura foliar inicial interpretada como cotilédone.

Após aproximadamente 128 dias de cultivo, os protocormos exibiam folhas e primórdios radiculares proeminentes e uma região basal ovalada e achatada na interface com o substrato. A partir desse período, a estrutura basal deixou de apresentar morfologia tuberiforme, acompanhada pelo desenvolvimento progressivo das folhas. A formação das primeiras raízes coincidiu com essa fase, consolidando a transição do protocormo para a plântula propriamente dita (Figura 6F).

Figura 6 - Morfohistodiferenciação de *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Vander Berg.



Morfohistodiferenciação de *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Vander Berg, cultivada *in vitro*, no período de 54 a 128 dias após a inoculação, acompanhada em microscopia estereoscópica (A, D e F) e óptica (B, C E): **A)** Presença de primórdios foliares (pf) e alongamento da parte aérea no ápice; **B-C)** Secção longitudinal do protocormo com primórdios foliares (pf); **D)** Alongamento da parte aérea e desenvolvimento dos primórdios radiculares (pr) na base do protocormo; **E)** Protocormos com folhas (fo) em desenvolvimento no ápice e rizóides persistentes na base, ainda sem raízes verdadeiras, caracterizando estágio pré-plântula e meristema apical caulinar (MAC); **F)** Protocormo aos 128 dias, já com folha expandida, e primeira raiz em desenvolvimento (rz). Barras: A = 1,0 mm; B, C = 500 µm; D = 3,0 mm; E = 1,0 mm; F = 5,0 mm.

O estudo caracterizou detalhadamente o desenvolvimento pós-seminal de *Cattleya purpurata* em cultivo *in vitro*, evidenciando etapas sucessivas desde o embrião até a formação da plântula. A espécie apresentou o padrão típico de Orchidaceae, incluindo embrião reduzido, suspensor funcional e germinação baseada no intumescimento embrionário. A morfogênese protocórmica seguiu o modelo observado em orquídeas do gênero *Cattleya*, com formação de protomeristemas, rizóides basais e estabelecimento precoce da bipolaridade embrionária. A ruptura da testa e o desenvolvimento de raízes marcaram a transição das sementes para a fase de protocormo e plântula respectivamente, culminando no surgimento de folhas verdadeiras e raízes adventícias. Os resultados ampliam o conhecimento morfoanatômico sobre o

desenvolvimento inicial da espécie e fornecem subsídios para estudos voltados à micropropagação e conservação *ex situ*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIOLLI, Bruna Vargas. Criopreservação de sementes e caracterização morfo-histológica da germinação *in vitro* de *Cattleya crispa* Lindl. 2019. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2019.
- ARDITTI, J. *Fundamentals of Orchid Biology*. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- BAZZICALUPO, M. et al. Seed micromorphology, *in vitro* germination, and early-stage seedling morphological traits of *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Van den Berg. *Horticulturae*, v. 7, n. 11, 480, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110480>. Acesso em: 30 ago. 2025.
- CAMPOS-ROCHA, A.; et al. To print in red ink: two new species of *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Plant Ecology and Evolution*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.5091/plecevo.95601>
- FURTADO S. G. et al. Diversity high up: a cloud forest of the Serra da Mantiqueira as a vascular epiphyte hotspot. *Rodriguésia* (2018). <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869201>.
- GALLO, F.; SOUZA, L.; MILANEZE-GUTIERRE, M.; ALMEIDA, O. Seed structure and *in vitro* seedling development of certain Laeliinae species (Orchidaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, v. 87, p. 68-73, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.01.005>. Acesso em: 30 ago. 2025.
- GAO, X.; WANG, Y.; DENG, D.; LUO, Y.; SHAO, S.; LUO, Y. Morphogenesis changes in protocorm development during symbiotic seed germination of *Dendrobium chrysotoxum* (Orchidaceae) with its mycobiont, *Tulasnella* sp. *Horticulturae*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050531> Acesso em: 30 ago. 2025.
- GUO, B.; ZENG, S.; YIN, Y.; LI, L.; WU, K.; FANG, L. Characterization of phytohormone and transcriptome profiles during protocorm-like bodies development of *Paphiopedilum*. *BMC Genomics*, v. 22, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08087-y>
- JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 1940.
- 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.
- LIMA, V. R. S.; et al. Distribution patterns, richness, endemism and conservation of Phyllanthaceae in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 97, n. 2, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202520240912>.
- LIZ, Rafaela Duarte de. *Elucidação da morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de espécies de Cattleya Lindl. micropropagadas*. 2013. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

LIU, X.; FANG, Y.; YANG, J.; WAN, X.; YIN, Z. Post-embryonic development and seedling morphogenesis of *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw. under asymbiotic culture condition. *South African Journal of Botany*, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.062>.

MIURA, C.; FURUI, Y.; YAMAMOTO, T.; et al. Autoactivation of mycorrhizal symbiosis signaling through gibberellin deactivation in orchid seed germination. *Plant Physiology*, v. 194, p. 546-563, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad517>

MORAES, M. C. Conservação de sementes de *Catasetum* (Orchidaceae): germinação e perfis lipídicos. 2022. 92f. Tese Doutorado em Agronomia - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2022. Disponível em: <http://bdtd.unoeste.br:8080/jspui/handle/jspui/1485>

PEREIRA, M. et al. Characterization of seed germination and protocorm development of *Cyrtopodium glutiniferum* (Orchidaceae) promoted by mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp. *Acta Botanica Brasílica*, v. 29, n. 4, p. 567-574, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0078>. Acesso em: 30 ago. 2025.

PEREIRA, O.; KASUYA, M.; ROLLEMBERG, C.; BORGES, A. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizotonióides. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, p. 199–206, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-06832005000200005> SILVA JÚNIOR, J. M. et al. Changes in anatomy and chlorophyll synthesis in orchids propagated *in vitro* in the presence of urea. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 35, p. 65-72, 2013.

STARKE, M.; KAPUSTA, M.; PLACHNO, B.; BOHDANOWICZ, J. Immunolocalization of Extensin and Pectin Epitopes in *Liparis loeselii* Protocorm and Protocorm-like Bodies. *Cells*, v. 13, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells13231985>

SUZUKI, R. M. et al. *In vitro* germination and growth of *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & VP Castro (Orchidaceae), an endangered species of the Brazilian flora. *Hoehnea*, v. 36, p. 657-666, 2009.

VAN DEN BERG, C. *Cattleya* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB582441>. Acesso em: 27 ago. 2025.

YAMAMOTO, T. et al. Quantitative evaluation of protocorm growth and fungal colonization in *Bletilla striata* (Orchidaceae) reveals less-productive symbiosis with a non-native symbiotic fungus. *BMC Plant Biology*, v. 17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1002-x>

YEH, C.; CHUNG, K.; LIANG, C.; TSAI, W. New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. *Applied Sciences*, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app9030585>.

YEUNG, E. A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*, v. 58, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0188-4>.

YEUNG, E. The orchid embryo – “an embryonic protocorm”. *Botany*, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjb-2022-0017>. Acesso em: 30 ago. 2025.

ZHAO, D.; MOU, Z.; RUAN, Y. Orchids acquire fungal carbon for seed germination: pathways and players. *Trends in Plant Science*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.02.001>

4. CAPÍTULO II

INDUÇÃO E MORFODIFERENCIAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS em *Cattleya warneri* COM DIFERENTES TEORES E REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO

As orquídeas constituem uma das famílias mais diversas das angiospermas e apresentam elevado grau de especialização ecológica. No Brasil, cerca de 2.600 espécies são registradas, das quais aproximadamente 1.400 são endêmicas, grande parte restrita à Mata Atlântica. Entre os gêneros de maior relevância, *Cattleya* destaca-se pelo valor ornamental e pela importância para a conservação genética. Entretanto, a germinação natural é limitada devido ao tamanho microscópico das sementes e à dependência de associações micorrízicas. A cultura de tecidos representa uma alternativa eficaz para superar essas restrições, permitindo a formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs), caracterizadas por totipotência celular e capacidade de regenerar plântulas completas. Neste estudo, objetivou-se avaliar a indução, a morfologia e a histodiferenciação de ESPs a partir de explantes foliares de *Cattleya warneri* submetidos a diferentes concentrações dos reguladores de crescimento TDZ e BAP. Para isso, explantes foliares foram cultivados em meio MS modificado, suplementado com TDZ ou BAP nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 μM . As estruturas regenerativas formadas ao longo de 128 dias de cultivo foram analisadas por microscopia estereoscópica, óptica e eletrônica de varredura. A resposta morfogênica foi avaliada por meio de modelos lineares generalizados e regressão quadrática, a fim de identificar padrões de indução relacionados aos tratamentos hormonais. Os resultados demonstraram que tanto o tipo quanto a concentração do regulador influenciaram significativamente a indução de ESPs ($p < 0,05$). O TDZ apresentou desempenho superior, produzindo o maior número médio de ESPs por explante na concentração de 5,0 μM , além de uma dose ótima estimada em 6,03 μM pela regressão quadrática. Em contraste, a BAP exibiu baixa eficácia, sem tendência significativa, com valores próximos a 0,5 ESPs por unidade experimental. Do ponto de vista morfológico, a formação das ESPs teve início na base dos explantes, originada de células epidérmicas e subepidérmicas submetidas a divisões assimétricas e intensa atividade mitótica. Ao longo do desenvolvimento, observou-se a diferenciação de rizóides, a expansão lateral das estruturas e o estabelecimento de primórdios foliares e meristemas apicais funcionais. Esses achados confirmam a eficiência do TDZ na regeneração *in vitro* de *C. warneri*, fornecendo subsídios para protocolos de micropropagação, conservação de germoplasma e estudos sobre plasticidade celular em Orchidaceae.

Palavras-chave: *Cattleya warneri*; embriogênese somática; estruturas semelhantes a protocormos; TDZ; BAP; micropropagação; cultura de tecidos.

ABSTRACT

Orchids constitute one of the most diverse families of angiosperms and exhibit a high degree of ecological specialization. In Brazil, approximately 2,600 species are recorded, of which around 1,400 are endemic, largely restricted to the Atlantic Forest. Among the most relevant genera, *Cattleya* stands out for its ornamental value and importance for genetic conservation. However, natural germination is limited due to the microscopic size of the seeds and their dependence on mycorrhizal associations. Tissue culture represents an effective alternative to overcome these constraints, enabling the formation of protocorm-like bodies (PLBs), characterized by cellular totipotency and the ability to regenerate complete plantlets. In this study, the aim was to evaluate the induction, morphology, and histodifferentiation of PLBs from leaf explants of *Cattleya warneri* subjected to different concentrations of the growth regulators TDZ and BAP. To this end, leaf explants were cultured on modified MS medium supplemented with TDZ or BAP at concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10.0 μM . The regenerative structures formed over 128 days of culture were analyzed using stereoscopic, optical, and scanning electron microscopy. The morphogenic response was evaluated using generalized linear models and quadratic regression in order to identify induction patterns associated with hormonal treatments. The results demonstrated that both the type and concentration of the regulator significantly influenced PLB induction ($p < 0.05$). TDZ showed superior performance, producing the highest mean number of PLBs per explant at 5.0 μM , with an optimal estimated dose of 6.03 μM according to quadratic regression. In contrast, BAP exhibited low effectiveness, with no significant trend and values close to 0.5 PLBs per experimental unit. From a morphological perspective, PLB formation began at the base of the explants, originating from epidermal and subepidermal cells undergoing asymmetric divisions and intense mitotic activity. Throughout development, the differentiation of rhizoids, lateral expansion of the structures, and the establishment of leaf primordia and functional shoot apical meristems were observed. These findings confirm the efficiency of TDZ in the *in vitro* regeneration of *C. warneri*, providing support for micropropagation protocols, germplasm conservation, and studies on cellular plasticity in Orchidaceae.

Keywords: *Cattleya warneri*; somatic embryogenesis; protocorm-like bodies; TDZ; BAP; micropropagation; tissue culture.

4.1. INTRODUÇÃO

As orquídeas constituem uma das famílias de angiospermas mais diversificadas e evoluídas do planeta, ocupando ampla variedade de habitats e nichos ecológicos. A família Orchidaceae, pertencente à subdivisão Angiospermae, classe Monocotyledoneae e ordem Liliales, reúnem aproximadamente 736 gêneros e 28.000 espécies (Schiff, 2017; Liu et al., 2023). De distribuição cosmopolita, suas espécies ocorrem desde regiões frias, como o norte da Suécia e o Alasca, até áreas temperadas do Cone Sul da América, estando os táxons epifíticos majoritariamente restritos às regiões tropicais e subtropicais.

O interesse científico pelas orquídeas está associado à grande plasticidade morfológica, anatômica e fisiológica, além da interação especializada com diferentes polinizadores (CASTRO et al., 2017). Essa alta especialização contribui para a manutenção da diversidade dos ecossistemas tropicais, especialmente em ambientes oligotróficos, como ressaltado por Benzing (1990). Globalmente distribuídas, com exceção de regiões polares e desérticas, as espécies apresentam múltiplas formas de vida, incluindo epífitas, rupícolas, terrícolas e saprófitas (Silveira, 2023).

No território brasileiro, a família apresenta cerca de 2.600 espécies descritas, das quais aproximadamente 1.400 são endêmicas (Flora & Funga do Brasil, 2020). Muitas delas concentram-se em áreas de relevo montanhoso da Mata Atlântica, bioma que alia elevada biodiversidade e alto grau de endemismo, mas que apresenta apenas 12,4% de cobertura florestal bem preservada, em virtude da ação antrópica (SOS Mata Atlântica, 2022). Nesse contexto, as orquídeas não apenas representam patrimônio biológico, mas também estão entre os grupos mais vulneráveis à fragmentação de habitats e à coleta predatória.

Entre os gêneros de maior importância ornamental destaca-se *Cattleya* Lindl., descrito originalmente por John Lindley em 1822, com a publicação da espécie brasileira *Cattleya labiata* Lindl. (Lindley, 1821). O gênero sofreu reestruturações taxonômicas recentes com a incorporação de espécies anteriormente alocadas em *Laelia* e *Sophranitis*, posicionando-se como o quarto maior da subtribo Laeliinae (Van Den Berg et al., 2009). Atualmente, engloba cerca de 120 espécies de distribuição exclusivamente neotropical, sendo o Brasil seu principal centro de diversidade, com mais de 100 espécies aceitas, das quais a maioria endêmica (Flora & Funga do Brasil, 2023).

O ciclo reprodutivo das orquídeas distingue-se das demais angiospermas principalmente pela peculiaridade de suas sementes. Estas possuem dimensões microscópicas, embriões indiferenciados e ausência de endosperma, dependendo de associações micorrízicas para a

germinação em ambiente natural (Arditti, 1992; Liz, 2017). Durante a germinação, o embrião origina um corpo clorofilado, desprovido de folhas, caules e raízes, denominado protocormo. Tal estrutura, descrita por Treub em 1890, representa um estágio único do desenvolvimento pós-seminal das Orchidaceae (Arditti, 2008).

No cultivo *in vitro*, a regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) tem sido relatada a partir de diferentes explantes, incluindo folhas, raízes, ápices caulinares e hastes florais (Kerbaudy; Estelita, 1996; Roy et al., 2007; Chen; Chang, 2000). Essas estruturas apresentam morfologia globular e comportamento totipotente, funcionando como unidades regenerativas que podem originar novas plântulas. Embora ainda haja debate sobre sua natureza, ESPs são geralmente interpretadas como produtos da embriogênese somática, processo no qual células somáticas, sem fusão gamética, originam embriões comparáveis aos zigóticos (Maheswaran; Williams, 1985; Fritsche, 2012). Desde os trabalhos pioneiros de Georges Morel (1960; 1964), que cunhou o termo *protocorm-like bodies* (PLBs) ao estudar a regeneração em *Cymbidium*, a indução de ESPs consolidou-se como método fundamental para propagação clonal em orquídeas. Atualmente, a micropropagação baseada na formação de ESPs é considerada uma ferramenta-chave tanto para o comércio ornamental quanto para programas de conservação, permitindo multiplicação massiva de genótipos de interesse, recuperação de populações naturais e estudos sobre plasticidade celular e morfogênese (Arditti, 2008; Liz, 2017).

As citocininas, fitohormônios derivados da adenina, desempenham papel essencial na diferenciação celular, organogênese e regeneração de tecidos vegetais (Neto et al., 2023; Taiz & Zeiger, 2017). Entre os reguladores sintéticos mais utilizados, destacam-se o Thidiazuron (TDZ) e a 6-Benzilaminopurina (BAP), que atuam como sinalizadores na indução de ESPs em orquídeas.

O TDZ (*N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea*), inicialmente registrado como desfolhante de algodão (Arndt et al., 1976), apresenta potente atividade de citocinina, sendo capaz de induzir organogênese, embriogênese somática e regeneração de brotos em diversas espécies (Huetteman; Preece, 1993; Li et al., 2002; Chang; Cheng, 2003). Sua ação envolve modificações de membranas, regulação da absorção de nutrientes e estímulo à síntese e transporte de hormônios endógenos como o Ácido Indol Acético (Guo et al., 2011). Em orquídeas, o TDZ é amplamente associado à indução eficiente de ESPs, apresentando resultados superiores aos obtidos com outras citocininas em vários gêneros (Chen; Chang, 2000; Malabadi et al., 2004; Vasudevan; Van Staden, 2011; Gantait; Sinniah, 2012). A BAP, por sua vez, é uma citocinina sintética consolidada em protocolos de micropropagação, atuando na divisão e

proliferação celular e promovendo a formação de brotos, calos e órgãos adventícios (Mohammadi et al., 2024; Zhao, 2024). Concentrações moderadas de BAP estimulam organogênese direta ou indireta, enquanto doses excessivas podem causar anomalias, como folhas atrofiadas, necrose apical e alterações anatômicas (Martins et al., 2022; Ruan, 2022). Além disso, a BAP regula a expressão de genes relacionados à fotossíntese, ao metabolismo antioxidante e à diferenciação celular (Li, 2021; Zhao, 2024). Quando combinada a auxinas, como o Ácido Indolbutírico (IBA), sua ação é potencializada, favorecendo tanto a regeneração quanto o enraizamento (Mohammadi et al., 2024).

Assim, tanto o TDZ quanto o BAP representam reguladores-chave na indução e multiplicação de ESPs em orquídeas, sendo a seleção do composto e o ajuste preciso de suas concentrações fatores essenciais para o êxito da micropropagação e para aplicações voltadas à conservação e à horticultura. Diante desse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a indução, a morfologia e a histodiferenciação de ESPs a partir de explantes foliares de *Cattleya warneri* submetidos a diferentes concentrações de TDZ e BAP.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Para a indução de Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs), foram utilizadas as segundas folhas, da base para o ápice, de plântulas de *Cattleya warneri* cultivadas *in vitro*. Essas plantas foram previamente micropropagadas a partir de sementes.

O meio de cultura utilizado para a indução das ESPs foi baseado na formulação salina MS de Murashige e Skoog (1962), contendo metade da concentração de macro e micronutrientes, adicionado de vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951), peptona de soja ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), fosfato monossódico (NaH_2PO_4) ($170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarose ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e suplementado com diferentes concentrações de BAP ou TDZ. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 e em seguida a adição de Phytigel Sigma® ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e autoclavagem a 121°C , sob pressão de 1,3 atm, durante 15 minutos.

Explantes foliares (0,7 – 1.0 mm), excisados a partir de brotos jovens (tamanho 5 – 10 cm), mantidos em cultivo por 12 meses, foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 15 mL de meio por placa. Após a inoculação, as placas foram seladas com filme plástico (PVC) e mantidas em sala de crescimento climatizada, à temperatura média de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), sob fotoperíodo de 16 horas de luz, com intensidade luminosa média de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi um bifatorial: 2 x 7, com 14 tratamentos: dois fitorreguladores (BAP e TDZ) com sete concentrações (0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 μM) suplementados ao meio de cultura MS/2, descrito anteriormente. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 15 mL de meio por placa. Cada placa foi inoculada 5 explantes foliares, dispostos em DCC e dez repetições. Dados de número e porcentagens de ESPs induzidas por explante foliar foram coletados após 90 dias de cultivo. Amostras representativas, durante a diferenciação e desenvolvimento das culturas, foram coletadas aos 0, 7, 14, 28, 54, 90 e 128 dias após a inoculação, para as análises por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e registros fotográficos em microscopia estereoscópica (ME).

4.2.2. Análise em Microscopia Estereoscópica (ME)

Para a análise morfológica, as imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio estereoscópico Olympus, modelo SZH10 (Tóquio, Japão), acoplado a um sistema de captura de imagens Olympus DP71, com o auxílio do software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, EUA), no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2.3. Análise em Microscopia Óptica (MO)

Para o estudo histológico por microscopia óptica, foram preparadas lâminas permanentes. As amostras foram fixadas em solução de Formaldeído Álcool Ácido Acético 50% (FAA₅₀), e desidratadas em série etanólica gradual, sendo posteriormente conservadas em etanol 70° GL, conforme descrito por Ruzin (1999).

Em seguida, as amostras foram desidratadas até etanol 96° GL e posteriormente infiltradas em hidroxietilmetacrilato (Leica® Historesin, Heidelberg, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. As secções histológicas foram obtidas com 5 μm de espessura, utilizando micrótomo de rotação SLEE Cut 4055 (Mainz, Alemanha). As secções foram distendidas sobre lâminas contendo água, dispostas sobre chapa aquecedora a 42 °C. Após a secagem, as lâminas foram coradas com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,8, conforme metodologia de O'Brien et al. (1965). As observações e registros das imagens foram realizados em microscópio óptico Olympus BX40, equipado com sistema de captura de imagens Olympus DP71, utilizando o software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, EUA), no LFDGV – UFSC.

4.2.4. Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras, após fixação e desidratação conforme descrito no item (5.2.3), foram submetidas à secagem em ponto crítico de CO₂, utilizando-se equipamento modelo CPD 030 (Leica®, Viena, Áustria), conforme metodologia proposta por Horridge e Tamm (1969).

As amostras secas foram fixadas sobre suportes de alumínio com fita de carbono dupla face e posteriormente metalizadas com uma camada de ouro de aproximadamente 20 nm, utilizando metalizadora modelo EM SCD 500 (Leica®, Viena, Áustria).

A análise ultraestrutural foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JSM-6390LV (Jeol®, Tóquio, Japão) a 8 Kv, pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2.5. Análise Estatística.

Os dados referentes à indução de ESPs em explantes foliares de *Cattleya warneri* foram submetidos à análise estatística no ambiente R, versão 2023.09.0 (R Core Team, 2016). Considerando-se que se tratam de dados de contagem, com variância superior à média, característica típica de sobredispersão em experimentos biológicos, foi ajustado um modelo do tipo Generalized Linear Model (GLM), com distribuição quasi-Poisson e função de ligação logarítmica. No modelo, foram considerados como fatores fixos o tipo de fitorregulador (TDZ ou BAP), a concentração aplicada (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 µM) e a interação entre ambos. A significância dos efeitos principais e da interação foi avaliada por meio da Análise de Deviance (teste qui-quadrado Type II de Wald).

Para descrever com maior precisão a resposta morfogênica às diferentes concentrações de cada regulador, foram ajustados modelos de regressão polinomial de segundo grau separadamente para TDZ e BAP. A significância dos coeficientes linear e quadrático foi verificada, e as equações ajustadas foram representadas graficamente para melhor visualização dos padrões de resposta.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 Indução de Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs)

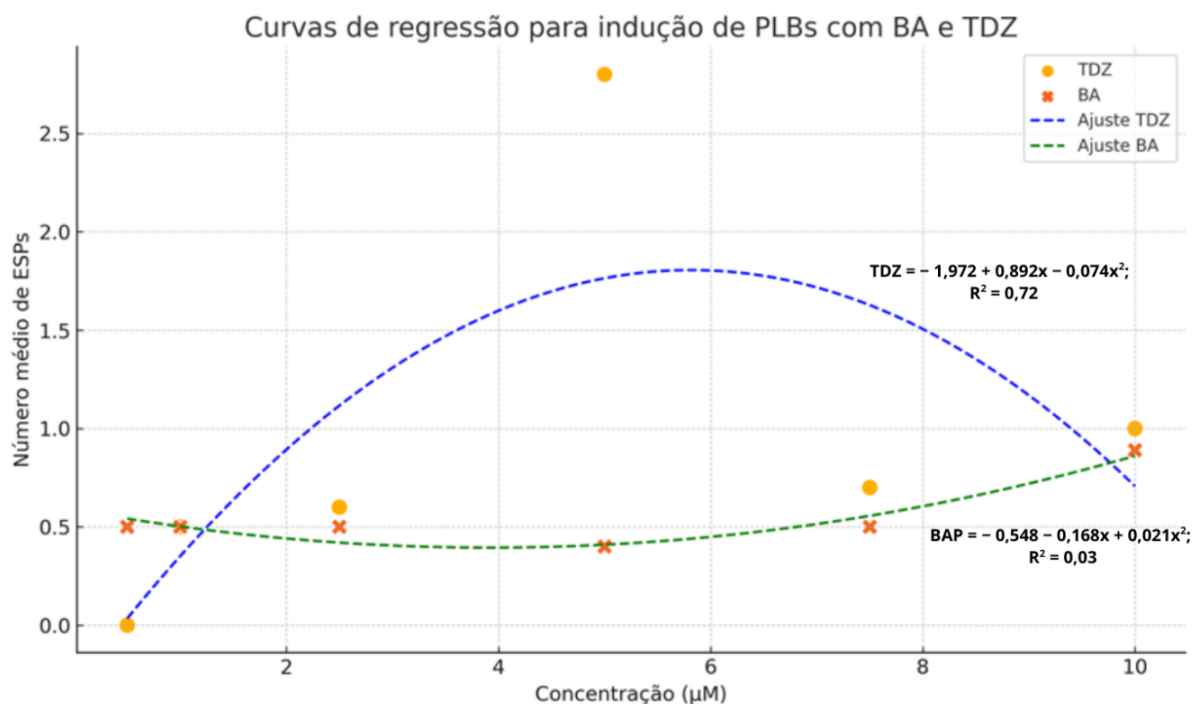
A indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em explantes foliares de *Cattleya warneri* foi significativamente influenciada tanto pelo tipo de fitorregulador, quanto pela concentração utilizada (Figura 7). O fator regulador de crescimento apresentou efeito significativo ($p = 0,013$), enquanto o fator concentração (µM) mostrou-se altamente significativo ($p < 0,0001$). Além disso, a interação entre tipo de regulador e concentração

também foi estatisticamente significativa ($p = 0,0006$), indicando que a resposta morfogênica dos explantes depende da combinação específica entre o tipo de regulador e sua dosagem.

A suplementação de 5,0 μM de TDZ promoveu a maior média estimada de ESPs por placa (2,8 ESPs/explante) e diferenciou-se, significativamente dos demais tratamentos testados. Observou-se também que, o uso das concentrações de 7,5 e 10,0 μM de TDZ resultaram em médias 0,7 e 1,0 ESPs, respectivamente, porém, não se diferenciaram em relação ao uso de BAP. Da mesma forma, as menores respostas morfogênicas, em número de ESPs por explante, foram observadas em meios de cultura com a suplementação de BAP.

A resposta à aplicação do TDZ foi modelada por regressão quadrática, com ajuste altamente significativo ($p < 0,001$), revelando um padrão de resposta curvilíneo típico. O modelo indica um aumento inicial na indução de ESPs com a elevação da concentração, seguido por redução do efeito em doses mais altas, configurando um comportamento clássico de estímulo-resposta hormonal. A derivação desta equação e projeções teóricas (Figura 6), pode-se estimar uma dose ótima de 6,03 μM de TDZ e que, pode-se obter uma produção máxima esperada de 0,72 ESPs. Concentrações superiores a esse valor tendem a reduzir ou inibir a resposta regenerativa dos ESPs, possivelmente, por citotoxicidade ou desbalanço hormonal (George et al., 2008). Em contraste, o modelo ajustado para BAP não apresentou significância estatística ($p > 0,2$), e os coeficientes linear e quadrático não diferiram de zero. Os dados indicam ausência de tendência ou curvatura significativa, sugerindo que o BAP, nas concentrações testadas, não exerceu influência relevante sobre a indução de ESPs em *C. warneri*. Em oposição, o TDZ demonstrou não apenas um efeito estatisticamente significativo, mas também uma resposta biologicamente expressiva e promissora para protocolos de propagação *in vitro*.

Figura 7 - Curvas regressão para indução de ESPs em *Cattleya warneri* T. Moore



Curvas regressão para indução de ESPs em *Cattleya warneri* T. Moore com diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 μM) de BAP e TDZ, após 90 dias de cultivo.

A maior eficácia do TDZ em comparação ao BAP pode ser atribuída à sua reconhecida atividade citocinínica e à capacidade de induzir reprogramação celular em tecidos com baixa competência regenerativa. Como um regulador de crescimento com propriedades tanto citocinínicas quanto auxínicas, o TDZ estimula a divisão celular, a desdiferenciação e a reorganização metabólica dos tecidos vegetais (Erland et al., 2020; Guo et al., 2011). Essa atuação multifuncional contribui para sua eficiência em explantes menos responsivos (Zayachkovskaya et al., 2023), reforçada ainda pela maior estabilidade metabólica decorrente de sua estrutura não purínica (Amoo et al., 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por De Conti (2016), Liz (2017) e Fritsche et al. (2022); em *Cattleya tigrina*, onde a indução direta de ESPs a partir de tecido foliar também foi favorecida pelo TDZ. Embora a concentração ideal no estudo de Fritsche et al. (2022) tenha sido mais elevada (25 μM), o padrão de resposta seguiu uma curva quadrática comparável, com recomendação de doses moderadas de 9 μM para evitar variação somaclonal.

Outros estudos corroboram a eficácia do TDZ em orquídeas. Pyati (2022) observou alta taxa de indução de embriões somáticos em *Dendrobium ovatum* com a combinação de 4,54 μM de TDZ e 2,69 μM de ANA, enquanto Rittirat et al. (2014) relatam que o TDZ foi mais eficaz que o BAP na indução de ESPs a partir de explantes foliares de *Phalaenopsis cornu-*

cervi quando suplementado com 9 μM de TDZ. Em *Rosa canina*, Kou et al. (2016) elucidaram mecanismos hormonais associados ao TDZ, incluindo o aumento de zeatina ribosídeo (ZR) e ácido indolacético (IAA) e a repressão do transporte polar de auxinas, culminando na ativação de genes de manutenção de células-tronco. Tais efeitos ajudam a explicar a indução direta de ESPs em *C. warneri* sem formação de calo intermediário. Adicionalmente, Mose et al. (2017) verificaram rápida indução de embriões somáticos em *Phalaenopsis amabilis* com TDZ, com estruturas formadas em apenas 11 dias, desempenho semelhante ao observado no presente estudo.

O TDZ mostrou ainda efeitos semelhantes às auxinas e citocininas, embora, quimicamente, seja totalmente diferente das estruturas clássicas desses hormônios. Vários eventos fisiológicos e bioquímicos nas células são induzidos ou potencializados pelo TDZ, como alterações na fluidez da membrana, absorção e transporte de nutrientes, bem como a modulação de reguladores endógenos (Ahmad; Shahzad, 2018). Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente elucidado, há evidências crescentes de que o TDZ pode desencadear cascatas morfogênicas que culminam em divisão e diferenciação celular.

No presente estudo, o BAP mostrou desempenho inferior ao TDZ na indução de ESPs. No entanto, Ramos, Goelzer e Damiani (2020) relataram que 4,44 μM de BAP sob espectro de luz vermelha aumentou a massa fresca de calos de *Cattleya nobilior*, sem, contudo, alterar significativamente o número ou coloração dos protocormos. Tais efeitos reforçam o potencial do BAP para manter tecidos viáveis, ainda que sua atividade morfogênica direta seja limitada. Tee et al. (2010) observaram que a eficiência da suplementação do BAP, no meio de cultura, também varia conforme a espécie e que, o uso de 22,18 μM de BAP induziram ESPs em *Dendrobium Bobby Mesina Red*. Enquanto que, em *Vanda Somsri Pink*, estes autores observaram que as respostas mais efetivas foram com o uso de NAA ou picloram. Bem como, a orientação vertical dos explantes também foi decisiva para a indução, apontando a influência de fatores morfofisiológicos além do tipo de PGR.

A combinação de BAP com auxinas foi mais eficiente do que seu uso isolado em *Dendrobium sonia-28*, conforme demonstrado por Julkiflee, Uddain e Subramaniam (2014). O uso de BAP com NAA em meio 1/2 MS aumentou significativamente a taxa de crescimento de ESPs. Por outro lado, o uso exclusivo de BAP reduziu a taxa de crescimento, evidenciando a importância da interação hormonal. Maghfirah et al. (2024) reforçam esse entendimento ao relatarem que, em *Dendrobium*, a organogênese foi influenciada apenas pela concentração de NAA, sem efeitos significativos do BAP isoladamente.

Assim, os dados aqui apresentados reiteram que, embora amplamente utilizado, o BAP possui eficácia morfogênica variável e limitada, sendo mais eficiente quando associado a auxinas ou utilizado em protocolos específicos de multiplicação de brotos. Em contraste, o TDZ demonstrou ser mais versátil e potente para indução direta de estruturas protocormóides em diferentes gêneros de orquídeas, incluindo *Cattleya warneri*. Dessa forma, os resultados deste estudo evidenciam o potencial do TDZ como ferramenta central para protocolos de propagação voltados à conservação e uso sustentável de germoplasma nativo.

4.3.2 Morfohistodiferenciação das Esps

A análise anatômica conduzida durante a indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em *Cattleya warneri* T. Moore revelou alterações morfogênicas progressivas em relação ao tempo de cultivo *in vitro*. No estágio inicial, a região basal dos segmentos foliares apresentava-se íntegra, sem protuberâncias ou sinais de diferenciação celular (Figura 8A) e divisões celulares ativas (Figura 8B), indicando um estado de quiescência inicial dos tecidos. Entretanto, após sete dias de cultivo, foram observadas as primeiras evidências do processo morfogênético, com discreto intumescimento na base dos explantes (Figura 8C). Essa alteração estrutural esteve acompanhada por modificações anatômicas específicas, como a vacuolização e divisão das células parenquimáticas (Figura 8D). Segundo Dornelas (2003), a morfogênese em tecidos vegetais é regulada por sinais endógenos e exógenos, como hormônios, nutrientes e fatores ambientais, os quais, em associação com mecanismos de comunicação intercelular, estabelecem gradientes e polaridade tecidual.

Nessa perspectiva, a presença de células intensamente vacuolizadas e com núcleos fortemente corados sugere a ocorrência de divisões assimétricas, comumente associadas à formação de tecidos especializados em sistemas regenerativos. Nesse contexto, os eventos observados nos estágios iniciais de cultivo *in vitro* sugerem a formação de zonas de transição morfogênética na base dos explantes, funcionalmente análogas a meristemas, onde ocorre a reorganização espacial dos tecidos e o estabelecimento da competência regenerativa. A capacidade das células epidérmicas e subepidérmicas de responder a estímulos hormonais com proliferação coordenada e crescimento direcionado evidencia a plasticidade morfogênética desses tecidos e ressalta o papel decisivo do controle hormonal preciso na indução das ESPs em *C. warneri*.

As alterações morfológicas tornaram-se mais evidentes após 14 dias de cultivo, com acentuado alongamento e divisões das células epidérmicas, manutenção da vacuolização e divisões nas camadas subepidérmicas e ocorrência de divisões celulares intensas, tanto

periclinais quanto anticlinais, caracterizadas por núcleos fortemente corados (Figuras 8E e F) indicando a ativação inicial da reprogramação celular. Essas alterações morfofisiológicas refletem a indução de vias de sinalização responsáveis pela proliferação e redirecionamento do destino celular, eventos essenciais para a formação das ESPs. A capacidade adaptativa das células epidérmicas e parenquimáticas frente aos estímulos ambientais, como os reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, tem sido apontada como um fator decisivo para a manutenção da integridade tecidual durante a reativação mitótica. Segundo Serra & Robinson (2020), a orientação da divisão celular em plantas não segue apenas a lógica do caminho simétrico mais curto, podendo ser alterada por estresses mecânicos locais, proteínas polares e pela sinalização hormonal. A presença de divisões assimétricas nas células epidérmicas e parenquimáticas de *C. warneri* pode refletir a atuação combinada desses fatores, modulando o posicionamento dos núcleos e a formação de novas paredes celulares deslocadas do centróide, como observado em outros sistemas regenerativos. Além disso, Tardieu e Granier (2000) descreveram que, em monocotiledôneas, as divisões celulares concentram-se em zonas próximas à inserção foliar, região coincidente com a base dos explantes de *C. warneri*. Tal observação reforça a hipótese de que essa porção da folha apresenta maior competência mitótica devido à sua natureza juvenil e à elevada sensibilidade aos reguladores de crescimento presentes no meio.

Aos 21 dias de cultivo, a análise histológica revelou divisões celulares múltiplas, resultando na formação de agrupamentos celulares e com intensa atividade mitótica, localizados na face adaxial da região basal dos explantes (Figuras 8G e H). Esses agrupamentos indicam o avanço do processo morfogenético iniciado nas semanas anteriores, refletindo uma fase mais avançada da reprogramação celular e do estabelecimento da competência regenerativa. Simultaneamente, nesse estágio, também foram observados o rompimento de células altamente vacuolizadas e sinais de necrose celular no mesofilo foliar (Fig. 8H). Essa degeneração pode estar associada à alta demanda metabólica imposta pela atividade meristemática em formação, uma vez que células em divisão requerem grande aporte energético e nutricional. Como consequência, os tecidos do mesofilo, menos ativos nesse processo, tornam-se funcionalmente inativos, apresentando vacúolos expandidos, aumento do volume celular e, por fim, lise e morte celular. Esse padrão de degeneração tecidual também foi observado por Liz (2013) em estudos com *Cattleya tigrina*, sugerindo que a intensa atividade celular localizada pode comprometer a integridade das regiões adjacentes dos explantes.

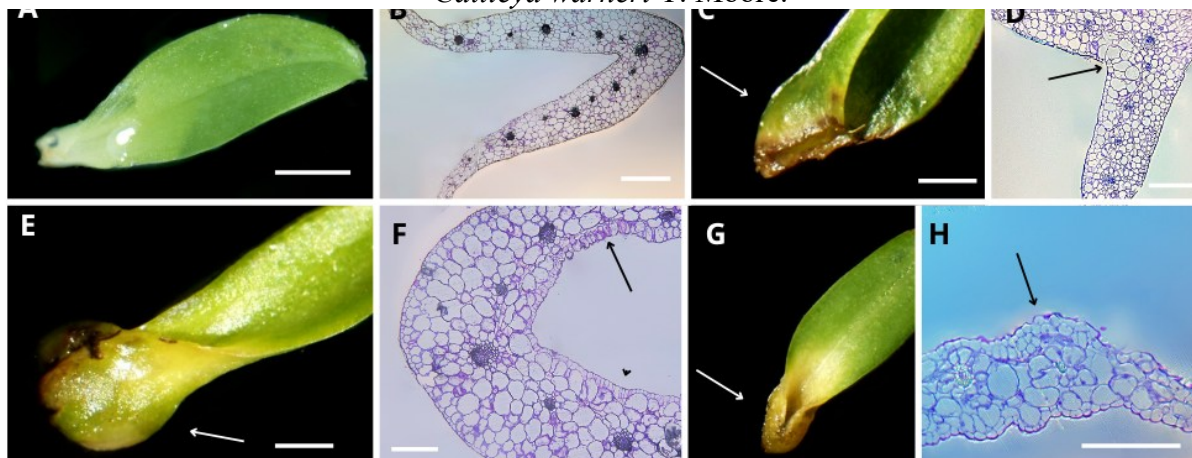
Neste estudo, a formação das ESPs iniciou-se a partir de divisões celulares nas camadas epidérmicas, estendendo-se progressivamente aos tecidos subjacentes, nas regiões de

protuberância. Esse comportamento é semelhante ao relatado por Begum et al. (1994), que observaram a origem das ESPs a partir de células epidérmicas e subepidérmicas vacuolizadas, com citoplasma denso e núcleos fortemente corados após duas semanas de cultivo. Em *Phalaenopsis bellina*, Khoddamzadeh et al. (2011) também relataram a formação de ESPs a partir de células epidérmicas da parte basal de explantes foliares, enquanto Liz (2013) observou que, em *C. tigrina*, a competência morfogênica estava restrita às células epidérmicas, não sendo constatada a origem de ESPs nas camadas subepidérmicas. Ainda segundo a autora, embora as ESPs se formassem ao longo da metade basal da folha nos estágios iniciais, aos 15 dias de cultivo sua formação passou a se concentrar exclusivamente na região basal. Esse padrão é coerente com os relatados por Chen et al. (2019), que, ao estudarem *Phalaenopsis aphrodite*, descreveram divisões celulares iniciando-se na epiderme dos protocormos, originando massas celulares friáveis compostas por pequenas células com citoplasma denso. De modo semelhante, Yeung (2017) ressaltou que o meristema apical do broto em orquídeas pode se originar a partir do endosperma do protocormo, destacando a plasticidade e a capacidade regenerativa dos tecidos vegetais *in vitro*.

A epiderme vegetal exerce papel essencial na diferenciação celular ao integrar sinais endógenos e exógenos que modulam a dinâmica do crescimento e o destino celular. Trata-se de um tecido altamente sensível, que responde precocemente a estímulos hormonais, ambientais e físicos, sendo frequentemente o primeiro a iniciar eventos de reprogramação celular em sistemas regenerativos, como os observados na propagação *in vitro* de orquídeas. De acordo com Guimil & Dunand (2007), o processo de diferenciação celular epidérmica envolve a coordenação entre expansão celular, crescimento polarizado e remodelação da parede celular. A expansão é impulsionada pela pressão de turgor, resultante do aumento vacuolar, enquanto a anisotropia da expansão, necessária para a formação de protuberâncias e estruturas regenerativas, depende do afrouxamento localizado da parede e do direcionamento preciso da secreção de vesículas. Essas áreas de expansão orientada, por sua vez, atuam como polos de crescimento morfogênético, nos quais a maquinaria celular é reorganizada para gerar formas especializadas. Ainda segundo os autores, outro mecanismo chave é a endoreduplicação, processo no qual o DNA nuclear é replicado sem mitose subsequente. Esse fenômeno leva ao aumento do conteúdo genético e ao crescimento celular, sendo especialmente associado à diferenciação epidérmica. A elevação no conteúdo de DNA confere maior capacidade metabólica às células e está fortemente correlacionada à formação de estruturas especializadas, como tricomas e células-guarda. Portanto, a endoreduplicação contribui tanto para o aumento do volume celular quanto para a aquisição de funções específicas.

O controle desses processos é regulado por fitohormônios, os quais são determinantes para o equilíbrio entre proliferação e diferenciação. Como apontado por Tank et al. (2014), citocininas, auxinas e giberelinas atuam em diferentes fases do ciclo celular, influenciando a expressão de genes reguladores. A citocinina, por exemplo, promove a transição da fase G1 do ciclo celular por meio da ativação do complexo CDKA/CYCD, o que favorece tanto a mitose quanto a transição para a endoreduplicação, dependendo do contexto e da concentração hormonal (Tank et al. (2014). Além disso, os mesmos autores relatam que esses hormônios afetam a transcrição de genes envolvidos no ciclo celular e regulam post-translacionalmente a atividade de complexos envolvidos na divisão e diferenciação celular. A regulação hormonal fina, especialmente em tecidos epidérmicos cultivados *in vitro*, é, portanto, decisiva para a indução de estruturas regenerativas.

Figura 8 - Formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em explantes foliares de *Cattleya warneri* T. Moore.



Formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em explantes foliares de *Cattleya warneri* T. Moore, entre 0 e 21 dias após a inoculação: **A-B)** Folhas no tempo 0 (controle); **C)** Folhas aos 7 dias com intumescimento da face abaxial (seta); **D)** corte longitudinal evidenciando células parenquimáticas vacuoladas; **E)** intensificação do intumescimento; **F)** células epidérmicas alongadas (cabeça de seta) e em divisão anticlinal e periclinal (seta); **G-H)** Proliferação intensa de células epidérmicas abaxial e adaxial com divisões periclinal e anticlinal. Barras: A = 5.0mm; B = 500 µm; C, E = 2.0 mm; D, F = 500 µm; G = 2.0 mm; H = 200 µm.

A diferenciação das estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em *Cattleya warneri* tornou-se evidente aos 28 dias de cultivo, período em que a análise histológica revelou intensa histodiferenciação. As células epidérmicas das faces abaxial e adaxial apresentavam divisões em múltiplos planos (Figura 9A), indicando atividade meristemática inicial. Em algumas regiões, essa proliferação celular promoveu a ruptura parcial da epiderme, permitindo o surgimento das ESPs (Figuras 9B, C, D e E). A presença de células com citoplasma denso e

núcleos fortemente corados (Figura 9B) reforça o caráter altamente mitótico desse estágio. Resultados semelhantes foram descritos por Liz (2013) em *C. tigrina*, onde ESPs já eram observadas aos sete dias de cultivo, predominantemente nas regiões média e basal da face abaxial das folhas, muitas vezes acompanhadas pela formação de rizóides.

Aos 54 dias de cultivo, as ESPs encontravam-se em estágio mais avançado, caracterizado pelo evidente aumento de volume (Figura 9F) e pela ruptura completa da epiderme, frequentemente acompanhada pela formação de pêlos radiculares (Figuras 9F e G). A emergência externa dessas estruturas, já visível a olho nu, indica um avanço significativo na diferenciação e o início da autonomia funcional, especialmente à medida que os tecidos foliares originais passam por degeneração progressiva. Padrão semelhante foi relatado por Huang e Chung (2011) em híbridos de *Lycaste*, nos quais ESPs originadas de calos exibiam organização zonada tipo túnica-corpúsculo, com meristemas apical e foliar bem definidos. Essa mesma organização foi observada nas ESPs mais desenvolvidas de *C. warneri* (Figura 9H), que apresentaram corpo delimitado por células epidérmicas e organização interna compatível com meristemas em formação (Figura 9I). De maneira semelhante, Lee et al. (2013) demonstraram que calos compactos e friáveis oriundos de protocormos podem originar ESPs, frequentemente caracterizadas por células isodiamétricas, divisões assimétricas e crescimento polarizado, aspectos também registrados neste estudo.

Além do desenvolvimento individual, observou-se a expansão lateral das ESPs, sugerindo a formação de novas estruturas a partir de unidades já estabelecidas, caracterizando um padrão de regeneração cíclica (Figuras 9G e H). Esse processo se alinha ao conceito descrito por Haccius (1978), segundo o qual embriões somáticos ou estruturas embrionárias secundárias podem gerar novos embriões, mantendo ciclos contínuos de propagação. Esse tipo de regeneração também foi relatado em *Euterpe precatoria* por Ferreira (2022), que registrou elevadas taxas de proliferação embrionária e ocorrência de embriogênese secundária a partir de calos embrionários. Fenômeno semelhante foi relatado por Liz (2013) em *C. tigrina*, com a proliferação de ESPs secundárias originadas de estruturas iniciais. Complementarmente, estudos como os de Lo et al., (2022) demonstraram que protocormos seccionados de espécies híbridas do gênero *Phalaenopsis* podem originar novas ESPs na presença de reguladores de crescimento, evidenciando o potencial proliferativo dessas estruturas em protocolos de propagação massal. Embora não descrevam diretamente a indução de ESPs a partir de estruturas já completamente formadas, tais relatos reforçam a plasticidade regenerativa observada em *C. warneri*.

No que se refere à funcionalidade meristemática das ESPs, Yeung (2017), ao investigar *Epidendrum ibaguense*, destacou que o objetivo final do protocormo é o estabelecimento de um meristema apical caulinar, cuja emergência marca a transição para a fase de plântula. Segundo o autor, esse meristema é caracterizado por células do polo apical com alta razão núcleo/citoplasma, ausência de amido e citoplasma denso, seguidas pela protrusão de primórdios foliares organizados em domo.

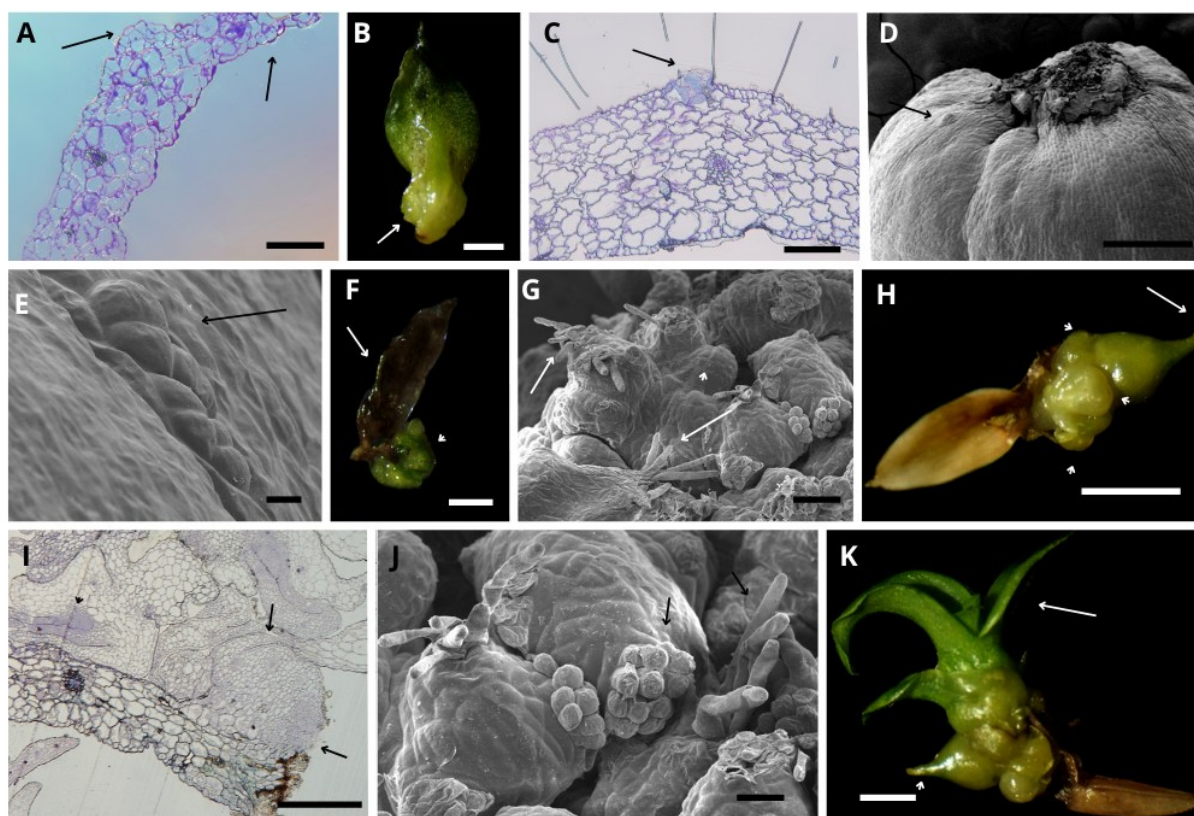
Em *Cattleya warneri*, observações realizadas aos 90 dias de cultivo revelaram ESPs caracterizadas por protoderme organizada, primórdios foliares, folhas em desenvolvimento e intensa atividade meristemática, evidenciada por divisões celulares em múltiplos planos (Figuras 9I, J e K). Alguns agrupamentos de ESPs também apresentaram sinais claros de avanço morfogênico, como ápice caulinar proeminente e diferenciação inicial de tecidos provasculares rizóides (Figuras 9H e I). Resultados semelhantes foram descritos por Fritsche (2012) em *C. warneri*, em que a regeneração de plantas ocorreu a partir do segundo ou terceiro subcultivo em meio isento de reguladores, e por Liz (2013), que observou ápice foliar em ESPs da mesma espécie aos 70 dias de cultivo. Em *Dendrobium candidum*, Zhao et al. (2008) caracterizaram estruturas equivalentes como “embriões somáticos globulares”, que evoluem para ESPs com meristema caulinar ativo.

No presente estudo, as ESPs de *C. warneri* apresentaram células meristemáticas com citoplasma denso e núcleos conspícuos, características que confirmam seu elevado potencial proliferativo (Figura 9I). Não foi registrada formação de raízes nos estádios iniciais, padrão semelhante ao observado em por Liz (2013) em *C. tigrina* durante germinação assimbiótica, na qual protocormos não desenvolvem raiz nos primeiros estágios. Esse comportamento está associado ao fato de orquídeas, enquanto monocotiledôneas, desenvolverem raízes adventícias, visto que a raiz embrionária degenera precocemente (Liz, 2013). Assim, os protocormos representam estruturas intermediárias entre embrião e plântula, em que o ápice caulinar se encontra em formação inicial e a absorção de nutrientes é realizada por rizóides basais, que substituem temporariamente a função radicular (Zhao et al., 2008). De modo análogo, as ESPs de *C. warneri* formadas neste estudo não desenvolveram raízes nos estádios iniciais, mas rizóides funcionais capazes de fixação e absorção direta dos nutrientes do meio de cultura (Figuras 9G e J). A análise histológica indicou que essas estruturas se originaram majoritariamente de células epidérmicas da face abaxial da folha inoculada, concentrando-se na região basal.

Em conjunto, os resultados confirmam a plasticidade morfogenética dos tecidos de *C. warneri* sob condições *in vitro*. A indução, organização e diferenciação das ESPs refletem

processos coordenados de divisão celular, formação de meristemas, crescimento polarizado e ativação de sinais hormonais, culminando na emergência de primórdios foliares e ápices caulinares funcionais. Como discutido por Chen et al. (2019), a presença de meristemas organizados dentro das ESPs reforça sua natureza totipotente e capacidade de regeneração completa em plântulas, destacando seu potencial para protocolos de propagação e conservação. Além disso, a formação contínua de novas ESPs a partir de estruturas já estabelecidas evidencia um ciclo regenerativo autorrenovável. Esse comportamento, associado à natureza meristemática e à indução de rizóides funcionais, confirma a utilidade das ESPs como modelo experimental para investigações sobre competência morfogênica, incluindo a regulação epigenética. Nesse contexto, a metilação de DNA desempenha papel central, definindo quais genes de totipotência e morfogênese permanecem ativos ou silenciados, modulando se as estruturas progridem para plântulas completas ou permanecem em estado indiferenciado.

Figura 9 - Formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em explantes foliares de *Cattleya warneri* T. Moore.



Formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em explantes foliares de *Cattleya warneri* T. Moore, entre 28 e 90 dias após a inoculação: **A)** Corte longitudinal do explante foliar divisões celulares intensas na parte abaxial e adaxial (setas); **B)** Explante foliar com ESP em evidência (seta); **C)** Corte longitudinal mostrando ESP rompendo a camada epidérmica; **D)** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) destacando ESP emergindo do tecido foliar; **E)** (MEV) ESPs rompendo a epiderme do tecido foliar; **F)** Tecido do explante foliar necrosado

(seta) e ESPs proliferando sobre outras (cabeça de seta); **G**) ESPs. proliferando sobre outras ESPs (cabeça de seta), pelos radiculares (seta). **H**) ESP desenvolvida, ápice caulinar (seta), ESPs se desenvolvendo a partir de outras ESPs (cabeça de seta); **I**) Primórdios foliares (seta direita) ESP induzida a partir de células epidérmicas em intensa atividade (seta esquerda) e detalhe do protomeristema caulinar (cabeça de seta); **J**) ESPs originadas de outras ESPs, com presença de pelos radiculares (setas); **K**) Plântulas derivadas de ESPs, apresentando primórdios foliares, folhas expandidas (setas) e novos ESPs (cabeça de seta). **Barras:** A, B, C, D = 500 µm; E = 20 µm; F = 5,0 mm; G = 100 µm; H, K = 2.0 mm; I = 200 µm; J = 50 µm.

O presente estudo demonstrou que o TDZ é o regulador de crescimento mais eficiente para a indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em *Cattleya warneri*, apresentando resposta significativa superior ao BAP, que por sua vez mostrou baixa efetividade. A análise morfoanatômica confirmou intensa atividade meristemática nas regiões epidérmicas, formação organizada de protoderme, primórdios foliares e rizóides, além de capacidade de proliferação secundária das ESPs. Esses achados fortalecem o potencial do TDZ como agente-chave em protocolos de regeneração direta e micropropagação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regulation*, v. 63, p. 197–206, 2011.
- BEGUM, A. A.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through in vitro culture of other tissue of *Cymbidium* PLB. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, v. 63, p. 663–673, 1994.
- CHEN, J.C.; TONG, C.-G.; LIN, H.-Y.; FANG, S. C. *Phalaenopsis leafy cotyledon1*-Induced somatic embryonic structures are morphologically distinct from protocorm-like bodies. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 1594, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01594>.
- CHEN, Y.; PILUEK, C. Effects of thidiazuron and N⁶-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*. *Plant Growth Regulation*, v. 16, p. 99–101, 1995.
- DORNELAS, M. C. Signal transduction, cell division, differentiation and development: towards unifying mechanisms for pattern formation in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202003000100001>.
- ERLAND, L.; GIEBELHAUS, R.; VICTOR, J.; MURCH, S.; SAXENA, P. The morphoregulatory role of thidiazuron: metabolomics-guided hypothesis generation for mechanisms of activity. *Biomolecules*, v. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom10091253>
- FRITSCHKE, Y.; DA SILVA, D.; GUERRA, M.; DEOLA, F.; HOLDERBAUM, D. *Cattleya tigrina* (Orchidaceae) in vitro regeneration: main factors for optimal protocorm-like body induction and multiplication, plantlet regeneration, and cytogenetic stability. *South African Journal of Botany*, v. 149, p. 96–108, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.059>.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. *Plant propagation by tissue culture: volume 1: The background*. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.
- GRANIER, C. et al. Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34(cdc2) kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiology*, v. 124, n. 3, p. 1393–1402, 2000. DOI: 10.1104/pp.124.3.1393.
- GUIMIL, S.; DUNAND, C. Cell growth and differentiation in *Arabidopsis* epidermal cells. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, n. 14, p. 3829–3840, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/JXB/ERM253>. Acesso em: 30 ago. 2025.
- GUO, B.; BILAL, H. A.; AMIR, Z.; XU, L.; YANG, H. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 8984–9000, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/ajb11.636>
- HUANG, C. H.; CHUNG, J. P. Efficient indirect induction of protocorm-like bodies and shoot proliferation using field-grown axillary buds of a *Lycaste* hybrid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 106, p. 31–38, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9890-6>. Acesso em: 30 ago. 2025.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 33, p. 105–119, 1993.

JULKIFLEE, A. L.; UDDAIN, J.; SUBRAMANIAM, S. Efficient micropropagation of *Dendrobium sonia-28* for rapid PLBs proliferation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v. 26, n. 6, p. 545–551, 2014.

KHODDAMZADEH, A. A. et al. In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson. *Plant Growth Regulation*, v. 65, n. 2, p. 381–387, 2011.

KOU, Y. et al. Thidiazuron triggers morphogenesis in *Rosa canina* L. protocorm-like bodies by changing incipient cell fate. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 557, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00557>. Acesso em: 30 ago.2025.

LEE, Y.; HSU, S.; YEUNG, E. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. *American Journal of Botany*, v. 100, n. 11, p. 2121–2131, 2013. DOI: 10.3732/ajb.1300193.

FERREIRA, J.; SILVA-CARDOSO, I. de A.; MEIRA, R. de O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 148, p. 667–686, 2022. DOI: 10.1007/s11240-022-02227-2.

LIZ, R. D. Citometria de fluxo, análisesultraestruturais e bioquímica de estruturas semelhantes a protocormos (esps) de *Cattleya tigrinae*. Richard. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

LIZ, R. D. Elucidação da morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de espécies de *Cattleya* Lindl. Micropropagadas. 2013. Dissertação. (Mestre em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

LO, K. C.; GANSAU, J.; SHIH, C. C.; KAO, C. T. Shoot development through modified transverse thin cell layer (tTCL) culture of *Phalaenopsis hybrid* protocorms. *Horticulturae*, v. 8, n. 3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030206>

MOSE, W. et al. The influence of thidiazuron on direct somatic embryo formation from various types of explant in *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume orchid. *Hayati Journal of Biosciences*, v. 24, n. 4, p. 201–205, 2017.

MAGHFIRAH, U., KESUMAWATI, E., & RAHMAWATI, M. Determinação da concentração de ANA e BAP no processo organogênico de PLB cultivado em *Dendrobium in vitro*, 2024. *Jurnal Ilmiah Estudante de Agricultura*, 9(3), 1–7. <https://doi.org/10.17969/jimfp.v9i3.29075>

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, v. 34, n. 4, p. 267–275, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02822732>. Acesso em: 30 ago. 2025.

PYATI, A. N. In vitro propagation of orchid (*Dendrobium ovatum* (L.) Kraenzl.) through somatic embryogenesis. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, v. 32, n. 1, p. 53–66, 2022.

QIANG, C. et al. The high-frequency induction of adventitious shoots and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis* with added thidiazuron. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 78, p. 17903–17909, 2011.

R DEVELOPMENT Core Team 2016. R: A language and environment for statistical computing [Computer software]. Vienna, Austria. Available from <http://www.R-project.org>.

RAMOS, J. C. M.; GOELZER, A.; DAMIANI, C. R. Espectro luminoso e BAP na indução de PLBs a partir de calos de *Cattleya nobilior* Rchb. f. (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, v. 14, n. 4, p. 402–411, 2020.

RITTIRAT, S.; KLAOCHEED, S.; THAMMASIRI, K. Enhanced efficiency for propagation of *Phalaenopsis cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchb. f. using trimmed leaf technique. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, v. 8, p. 336–339, 2014.

SERRA, L.; ROBINSON, S. Plant cell divisions: variations from the shortest symmetric path. *Biochemical Society Transactions*, v. 48, n. 6, p. 2743–2752, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20200529>. Acesso em: 30 ago. 2025.

TARDIEU, F. et al. Quantitative analysis of cell division in leaves: methods, developmental patterns and effects of environmental conditions. *Plant Molecular Biology*, v. 43, p. 555–567, 2000. DOI: 10.1023/a:1006438321386.

TANK, J. G.; PANDYA, R. V.; THAKER, V. S. Phytohormones in regulation of the cell division and endoreduplication process in the plant cell cycle. *ChemInform*, v. 45, n. 30, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/CHIN.201430288>. Acesso em: 30 ago. 2025.

TEE, C. S. et al. A preliminary study of protocorm-like-bodies (PLBs) induction using leaf explants of *Vanda* and *Dendrobium* orchids. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, v. 18, n. 1, p. 189–191, 2010.

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

ZAYACHKOVSKAYA, T.; ALYOKHINA, K.; MINEYKINA, A.; ROMANOVA, O.; VJURTS, T.; TUKUSER, Y.; ZAYACHKOVSKY, V.; ERMOLAEV, A.; KAN, L.; FOMICHEVA, M.; DOMBLIDES, E. Optimizing different medium component concentration and temperature stress pretreatment for gynogenesis induction in unpollinated ovule culture of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Horticulturae*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080900>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo reforça a relevância do cultivo *in vitro* como uma ferramenta estratégica para a propagação, conservação e compreensão do desenvolvimento de espécies do gênero *Cattleya*, com destaque para *C. purpurata* e *C. warneri*. A caracterização detalhada das fases embrionárias e do estabelecimento de plântulas de *C. purpurata* evidenciou o papel central do protocormo na sobrevivência e no desenvolvimento inicial da espécie. A análise morfo-histológica elucidou processos celulares e estruturais desde o intumescimento inicial até a formação de folhas verdadeiras e raízes adventícias, confirmando que o cultivo *in vitro* supera limitações naturais, como a baixa germinação e a dependência de fungos micorrízicos.

A investigação sobre a indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) em *C. warneri* demonstrou a superioridade do TDZ em relação ao BAP, sendo estimada uma concentração ótima de 6,03 μM para maximizar a formação dessas estruturas. A caracterização anatômica e histológica das ESPs contribuiu para a compreensão da plasticidade celular e dos mecanismos de diferenciação, reforçando o potencial desses protocolos para conservação *ex situ* e manutenção de germoplasma.

No contexto dos reguladores de crescimento vegetal, os achados desta dissertação evidenciam sua importância na modulação da morfogênese *in vitro*. O TDZ apresentou alta atividade citocinínica, favorecendo brotação, embriogênese somática e regeneração, embora exija ajustes precisos para evitar efeitos deletérios, como vitrificação e necrose. O BAP, por sua vez, mostrou-se eficiente na estimulação da divisão e proliferação celular, desde que mantido o equilíbrio hormonal adequado. Assim, o sucesso da micropropagação depende da interação entre reguladores, tipo de explante, meio de cultivo e condições físico-químicas, aliado ao monitoramento histológico para aperfeiçoamento dos protocolos.

A literatura recente corrobora esses resultados, demonstrando avanços no entendimento molecular, bioquímico e anatômico das ESPs em espécies de *Cattleya* e outras Orchidaceae. Pesquisas envolvendo dinâmica de poliaminas, carboidratos, AIA, metilação de DNA, além de abordagens ultraestruturais, contribuem para elucidar os fatores que determinam a indução e diferenciação dessas estruturas. Estudos sobre criopreservação e armazenamento de sementes ampliam as possibilidades de conservação de longo prazo, enquanto investigações sobre espectros luminosos e condições ambientais indicam caminhos promissores para aprimorar protocolos.

As perspectivas futuras incluem a expansão dos estudos de indução de ESPs para outras espécies do gênero *Cattleya*, avaliando diferentes combinações de reguladores, formulações nutricionais e condições ambientais, como espectro de luz e fotoperíodo. A integração de técnicas de biotecnologia molecular poderá aprofundar o entendimento sobre expressão gênica durante a embriogênese somática e a diferenciação celular, abrindo novas possibilidades para programas de recuperação de espécies ameaçadas e para o melhoramento genético. Ademais, pesquisas sobre a aclimatização ex vitro e a regeneração somática podem fortalecer estratégias de conservação e aumentar a eficiência dos sistemas de produção.

Em síntese, os resultados obtidos reforçam a importância da micropropagação como ferramenta essencial para mitigar a perda de biodiversidade, preservar espécies endêmicas da Mata Atlântica e apoiar iniciativas de manejo e conservação de orquídeas no Brasil. As evidências geradas não apenas ampliam o conhecimento científico sobre o desenvolvimento inicial de Orchidaceae, mas também oferecem bases sólidas para o avanço de práticas sustentáveis em conservação e biotecnologia vegetal.