



GRACIELLE VIDAL SILVA ANDRADE

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *CATTLEYA SCHILLERIANA*
(RCHB.F): UMA ABORDAGEM COM BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS**

**LAVRAS-MG
2024**

GRACIELLE VIDAL SILVA ANDRADE

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *CATTLEYA SCHILLERIANA* (RCHB.F): UMA
ABORDAGEM COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Prof^{da}. Dr^a. Michele Valquíria dos Reis
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.

Andrade, Gracielle Vidal Silva.

Conservação *in vitro* de *Cattleya schilleriana* (Rchb.f): uma
abordagem com bactérias endofíticas / Gracielle Vidal Silva
Andrade. - 2024.

63 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Coorientadora: Michele Valquíria dos Reis.

Tese (doutorado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras,
2024.

Bibliografia.

1. Microbioma vegetal. 2. Cultura de tecidos vegetais. 3.
Bactérias endofíticas promotoras de crescimento vegetal. I. Pasqual,
Moacir. II. Reis, Michele Valquíria dos. III. Título.

GRACIELLE VIDAL SILVA ANDRADE

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *CATTLEYA SCHILLERIANA* (RCHB.F.): UMA
ABORDAGEM COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS**

***IN VITRO* CONSERVATION OF *CATTLEYA SCHILLERIANA* (RCHB.F.): AN
APPROACH WITH ENDOPHYTIC BACTERIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 26 de março de 2024.

Dr.^a. Joyce Dória

UFLA

Dr. Filipe Almendagna Rodrigues

GDM

Dr. Adriano Bortolotti da Silva

UNIFENAS

Dr.^a. Ester Alice Ferreira

EPAMIG

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

**LAVRAS-MG
2024**

Aos que dividiram esta caminhada comigo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e a todos que contribuíram para concretização desse sonho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade. O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) e ao CNPq.

Aos meus pais pelo amor incondicional e apoio.

Ao meu namorado pela incrível paciência, por me apoiar independentemente das minhas decisões, por todo amor e carinho, agradeço.

Agradeço imensamente ao meu querido orientador Moacir Pasqual, muito obrigada pelos conselhos ensinamentos e principalmente por me incentivar a continuar sempre. Gratidão!

À Professora Dr^a Joyce Dória sou imensamente grata pelos conselhos, ensinamentos e amizade. Gratidão!

Ao Dr. Filipe Almendagna Rodrigues pelos ensinamentos compartilhados, agradeço.

À Professora Dr^a Michele Valquíria dos Reis agradeço a paciência, ensinamentos e a disposição.

À Marli, uma verdadeira mãezona do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, sempre disposta ajudar de toda forma possível, além de se preocupar com a saúde física e mental de cada um de nós, agradeço.

Aos laboratoristas Vantuil e Anita, pelos conselhos e colaboração durante todo o trabalho, agradeço.

Aos colegas de laboratório, obrigada por tornarem os dias de trabalho mais divertidos com muitas histórias e risadas.

Por fim a todos que de forma direta ou indireta ajudaram nesta caminhada meu agradecimento!

Muito obrigada!

“Quando pensei que tudo estava perdido, Deus me segurou em suas mãos e mudou a minha história”.

RESUMO

O cultivo *in vitro* apresenta alto potencial de germinação, multiplicação e regeneração para as plantas da família Orchidaceae e segue o caminho adequado para as fases de morfogênese e maturação. Em habitat natural, sementes de orquídeas se associam com microrganismos específicos para que ocorra à germinação e, logo formam estruturas conhecidas como “corpos semelhantes a tubérculos” de formato esférico, aclorofilada nas espécies epífitas. Porém, *in vitro* este processo de germinação é conhecido por “protocormos” e, não necessita da associação à microrganismos. Porém, microrganismos endofíticos podem estar presentes no interior dos tecidos vegetais de plantas micropropagadas. Bactérias endofíticas promotoras de crescimento vegetal podem beneficiar plantas hospedeiras através dos mecanismos de ação direta e indireta. Compreender a função ecológica das bactérias endofíticas e sua interação com plantas hospedeiras e, aptidão dessas plantas cultivadas pode trazer benefícios para aclimação de orquídeas, fase crítica do ciclo da cultura, com alta taxa de mortalidade. O desenvolvimento de estratégias para as orquídeas como para espécie *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.), severamente ameaçada de extinção, pode promover o crescimento de protocormes melhorando sua reintrodução *in situ* ou mesmo comercialização. Portanto, é essencial técnicas de cultura de tecidos vegetais para auxiliar na conservação, multiplicação como também investigar à comunidade bacteriana endofítica de plantas micropropagadas e os fatores que moldam a comunidade desses microrganismos como auxílio a espécies ameaçadas de orquídeas extinção para futura reintrodução *in locu*.

Palavras-chave: Microbioma vegetal. Cultura de tecidos vegetais. Bactérias endofíticas promotoras de crescimento vegetal.

ABSTRACT

In vitro cultivation presents a high potential for germination, multiplication and regeneration for plants in the Orchidaceae family and follows the appropriate path for the morphogenesis and maturation phases. In their natural habitat, orchid seeds associate with specific microorganisms for germination to occur and then form structures known as “tubercle-like bodies” with a spherical shape, achlorophyllous in epiphytic species. However, *in vitro* this germination process is known as “protocorms” and does not require association with microorganisms. However, endophytic microorganisms may be present within the plant tissues of micropropagated plants. Plant growth-promoting endophytic bacteria can benefit host plants through direct and indirect mechanisms of action. Understanding the ecological function of endophytic bacteria and their interaction with host plants and the fitness of these cultivated plants can bring benefits for the acclimatization of orchids, a critical phase of the crop cycle, with a high mortality rate. The development of strategies for orchids, such as the species *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.), severely threatened with extinction, can promote the growth of protocorms, improving their reintroduction *in situ* or even commercialization. Therefore, plant tissue culture techniques are essential to assist in conservation, multiplication, as well as investigating the endophytic bacterial community of micropropagated plants and the factors that shape the community of these microorganisms as an aid to endangered species of orchids for future reintroduction *in locu*.

Keywords: Plant microbiome. Plant tissue culture. Plant growth-promoting endophytic bacteria.

IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

O cultivo *in vitro* desempenha um papel fundamental na germinação, multiplicação e regeneração das plantas da família Orchidaceae, facilitando as fases de morfogênese e maturação. No ambiente natural, as sementes de orquídeas requerem a associação com microrganismos específicos para germinar, formando estruturas conhecidas como "corpos semelhantes a tubérculos". Em contraste, no cultivo *in vitro*, este processo é chamado de "protocormos" e ocorre independentemente da presença desses microrganismos. Além disso, microrganismos endofíticos podem estar presentes nos tecidos vegetais de plantas micropropagadas, enquanto as bactérias endofíticas promotoras do crescimento vegetal beneficiam as plantas hospedeiras por meio de mecanismos tanto diretos quanto indiretos. É essencial compreender a função ecológica das bactérias endofíticas e sua interação com as plantas hospedeiras para melhorar a aclimatação das orquídeas, uma fase crítica no ciclo de cultivo que frequentemente apresenta alta taxa de mortalidade. O desenvolvimento de estratégias para espécies como a *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.), que enfrenta grave risco de extinção, pode promover o crescimento de protocormos e facilitar sua reintrodução *in situ* ou sua comercialização. Portanto, técnicas avançadas de cultura de tecidos vegetais são essenciais não apenas para auxiliar na conservação e multiplicação das orquídeas, mas também para investigar a comunidade bacteriana endofítica de plantas micropropagadas e os fatores que influenciam essa comunidade. Isso pode ser crucial para apoiar espécies ameaçadas de orquídeas na reintrodução futura em seu habitat natural.

SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS

In vitro cultivation plays a fundamental role in the germination, multiplication and regeneration of plants from the Orchidaceae family, facilitating the morphogenesis and maturation phases. In the natural environment, orchid seeds require association with specific microorganisms to germinate, forming structures known as "tuber-like bodies". In contrast, *in vitro* cultivation, this process is called "protocorms" and occurs independently of the presence of these microorganisms. Furthermore, endophytic microorganisms may be present in the plant tissues of micropropagated plants, while plant growth-promoting endophytic bacteria benefit host plants through both direct and indirect mechanisms. It is essential to understand the ecological function of endophytic bacteria and their interaction with host plants to improve orchid acclimatization, a critical phase in the cultivation cycle that often has a high mortality rate. The development of strategies for species such as *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.), which faces a serious risk of extinction, can promote the growth of protocorms and facilitate their reintroduction *in situ* or their commercialization. Therefore, advanced plant tissue culture techniques are essential not only to assist in the conservation and multiplication of orchids, but also to investigate the endophytic bacterial community of micropropagated plants and the factors that influence this community. This could be crucial to supporting endangered orchid species in future reintroduction into their natural habitat

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Orchidaceae	17
2.2 Corpos semelhantes à protocormos (PLBs)	18
2.3 Recursos naturais da família Orchidaceae	19
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO II: CONSERVATION STRATEGIES AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF <i>CATTLEYA SCHILLERIANA</i> (RCHB.F.) UNDER SLOW GROWTH CONDITIONS AND OSMOLYTE SUPPLEMENTATION	24
1 INTRODUCTION	27
2 MATERIALS AND METHODS	28
2.1 Plant material	28
2.2 Micropropagation	29
2.3 Measurements of biochemical characters and morphophysiological parameters	30
2.3.1 Malondialdehyde activity	31
2.3.2 Hydrogen peroxide (H₂O₂) activity	31
2.3.3 Enzyme activity assay	31
2.3.4 Measurement of chlorophyll and carotenoid contents	32
2.3.5 Membrane stability index	32
2.3.6 Morphological evaluation	32
2.3.7 <i>Ex vitro</i> evaluation	33
2.4 Experimental design	33
3 RESULTS AND DISCUSSION	33

3.1	Conserving for <i>in vitro</i> propagation	33
3.2	Changes in Biochemical and morphophysiological parameters	34
3.3	Changes in membrane stability index	42
3.4	<i>Ex vitro</i> response	43
4	CONCLUSION	45
	REFERENCES	46
CAPÍTULO III: EXPLORANDO BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO CATALISADORES PARA O CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>CATTLEYA SCHILLERIANA</i> (RCHB.F.): “UMA ABORDAGEM PARA CONSERVAÇÃO”		
		49
1	INTRODUÇÃO	51
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	Isolamento de bactérias endofíticas	52
2.2	Purificação, caracterização e estocagem das bactérias isoladas	53
2.3	Avaliações dos mecanismos promotores de crescimento vegetal	53
2.3.1	Fixação biológica de nitrogênio	53
2.3.2	Solubilização de fosfato	53
2.3.3	Solubilização de zinco	54
2.3.4	Produção de ácido indol-acético (AIA)	54
2.3.5	Produção de HCN e sideróforos	55
2.3.6	Ensaio <i>in vitro</i> para tolerância ao estresse por salinidade	55
2.4	Preparação do inóculo bacteriano endofítico	55
2.5	Condições de cultura e desenvolvimento <i>in vitro</i>	56
2.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	56
2.7	Transplante e aclimação	56
2.8	Análise estatística	57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1	Isolados bacterianos endofíticos	57
3.2	Colonização bacteriana endofítica	58
3.3	Desempenho dos protocormes (PLBs)	61
4	CONCLUSÕES	62

REFERÊNCIAS	63
--------------------------	-----------

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

As regiões do Espírito Santo e Bahia pertence ao bioma da Mata Atlântica brasileira tal como é considerado um dos hot spot para espécie *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) (Orchidaceae). Em contrapartida, devido ação antrópica apresenta risco iminente de extinção. Isso faz com que seja necessária tomada de decisões urgentes para à conservação dessa orquídea (ABRAHAM; AUVAROZA, 2024).

Técnicas de propagação de plantas por cultura de tecidos vegetais estão associadas ao ambiente de cultivo em condições assépticas que vão desde a germinação, passando pela fase de protocormes, tipicamente das orquídeas, até a formação de plantas que logo poderão ser aclimatizadas. Entretanto, pode co-ocorrer o predomínio de microrganismos benéficos na multiplicação *in vitro* de plantas, podendo até mesmo ocupar órgãos vegetais internos, como bactérias endofíticas que, em contrapartida, podem auxiliar na promoção de crescimento das orquídeas como na fase de aclimatização, fase crítica da orquidicultura com alta taxa de mortalidade. Entretanto, o potencial dessas bactérias endofíticas realizar tais processos biológicos depende da interação entre hospedeiro-microrganismo (GOH *et al.*, 2024).

Bactérias endofíticas apresentam mecanismos benéficos às plantas que podem ser de ação direta e indireta. Isso faz com que existam dois mecanismos bem definidos. No qual podem promover diretamente o crescimento vegetal através da fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfato, produção de fitohormônios ou indiretamente auxiliando na proteção de plantas. A produção de cianeto de hidrogênio (HCN), sideróforos, antibióticos, entre outros têm sido apontados como inibidores de microrganismos fitopatogênicos. Porém, a biodisponibilidade entre planta e bactéria endofítica é dinâmico podendo apresentar traços adaptativos modelados por tal condição mantida em condições de propagação *in vitro* (CHUA *et al.*, 2024).

O cultivo *in vitro* de *C. schilleriana* (Rchb.f.) pode ser explorado através da microbiota rizosférica associado ao hábito de crescimento epífita, apoiado pela biodisponibilidade de traços adaptativos diante aos intempéries climáticos. Essas estratégias podem assegurar o sucesso reprodutivo de transição da fase *in vitro* para *ex vitro* e auxiliar no sucesso reprodutivo desta orquídea. Utilizar de interações de microrganismos endofíticos

com órgãos vegetais, tal como acontece nas raízes de orquídeas pode apontar mobilidade no processo de repicagens *in vitro* e permanecer efetivas na aclimatização das plantas. Assim, nossos resultados podem ser estendidos à reintrodução dessa orquídea *in locu* e permitir à conservação e multiplicação da espécie com equilíbrio precedente para interações ecossistêmicas de *C. schilleriana* (Rchb.f.).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Orchidaceae

Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas com flores, e existem aproximadamente 30.000 espécies de orquídeas das quais 75% são epífitas (incluindo hemiepífitas) (KINDLMANN; KULL; MCCORMICK, 2023). E, estão listadas no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção (CITES) (CHUGH *et al.*, 2009). O gênero *Cattleya* Lindley inclui orquídeas nativas da América tropical e representa um gênero muito importante para o mercado devido à sua alta variabilidade genética, grande capacidade de recombinação genética e flores apresentando cores atrativas, durabilidade, forma e tamanho.

Cattleya schilleriana (Rchb.f.) é uma espécie de orquídea epífita bifoliada que se caracteriza por seus pseudobulbos cilíndricos e inflorescências finas e cerosas que variam de tons magenta-roxas de rosa-lilás, com labelo geralmente mais escuro e contrastante. Por ser endêmica brasileira, a espécie habita a Mata Atlântica do nordeste (Bahia) e sudeste (Espírito Santo) do Brasil, onde cresce naturalmente em habitats como florestas úmidas e matas de altitude (Reflora, 2024). Entretanto, tem sido intensamente coletada, devido ao seu alto potencial ornamental. E, está ameaçada de extinção devido à uma combinação de fatores como recolha excessiva para comercialização de plantas ornamentais, urbanização, destruição de habitat causada pela fragmentação ou degradação de ecossistemas naturais e alterações climáticas (CISNEROS-MARRERO *et al.*, 2024).

A propagação de orquídeas ameaçadas de extinção tem dependido de programas de conservação, utilizando recursos genéticos disponíveis para sobrevivência a longo prazo (ALIBRANDI *et al.*, 2020; ARIYANTI *et al.*, 2024). O estabelecimento de protocolos para propagação *in vitro*, desenvolvimento de protocormos e conhecimentos sobre a biologia e ecologia das orquídeas de acordo com sua evolução são necessários. As orquídeas também desempenham papel crucial, servindo como espécies emblemáticas, abrindo caminho para a conservação eficaz do habitat (KINDLMANN; KULL; MCCORMICK, 2023; SCRAMONCIN *et al.*, 2024).

O cultivo de orquídeas é uma tarefa desafiadora devido à morfologia complexa de suas flores, e interações altamente diferenciadas e especializadas com seus visitantes florais. Sabe-se que as especializações das flores estão relacionadas à interação com seus agentes polinizadores, tendo a família Orchidaceae experimentado alta pressão seletiva e irradiação

adaptativa no processo evolutivo (TIWARI *et al.*, 2024; OSPINA-M *et al.*, 2024).

Após a polinização e a fecundação, o fruto da orquídea pode apresentar milhares de sementes minúsculas (geralmente pesando μg) sem endosperma. Além disso, seu ciclo de vida requer a associação com fungos micorrízicos específicos durante os estágios iniciais de desenvolvimento deixaram as orquídeas vulneráveis a pequenas alterações bióticas e abióticas (TINOAMMINI; AAZHIVAENDHAN; KUMAR, 2024).

2.2 Corpos semelhantes à protocormos (PLBs)

No ambiente natural, as sementes da família Orchidaceae germinam para formar corpos semelhantes a tubérculos de formato esférico, chamados de protocormos, exclusivo de orquídeas, sendo clorofilada nas espécies epífitas (Guo, *et al.* 2024). Porém, não continuam o desenvolvimento da germinação enquanto não houver associação com fungos micorrizos específicos. Quando esta associação acontece, o fungo fornece a nutrição inicial, com o aporte de carboidratos e de compostos nitrogenados ao protocormo e quando fotossintetizante, disponibiliza carbono, na forma de fotoassimilados (MIURA *et al.*, 2023). Os corpos semelhantes à protocormos (PLBs) são semelhantes à germinação natural, porém suas estruturas são formadas *in vitro* (BALTAZAR-BERNAL *et al.*, 2024). Apesar de sua origem somática, a análise morfológica e histológica dos estágios iniciais de desenvolvimento dos PLBs é comparável à dos embriões zigóticos.

A germinação de orquídeas via sementes é uma abordagem ideal para o cultivo de mudas, pois se trata do embrião zigótico. Os PLBs podem ser induzidos usando vários explantes, tais sementes, segmentos nodais, pseudobulbo ou pseudocaule, etc., que por sua vez se diferenciam em brotos, raízes e parte aérea (QI *et al.*, 2024).

A cultura de tecidos vegetais é um método rápido para propagação em massa bem como o cultivo de orquídeas comerciais. O cultivo *in vitro*, possui imenso potencial de regeneração e segue o caminho adequado para as fases de morfogênese e maturação. Vários trabalhos têm relatado à indução de PLBs a partir de sementes em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), livre de reguladores de crescimento enquanto outros sugerem a combinação de citocinina (BAP, TDZ) e auxina (AIA, ANA) (RIANAWATI *et al.*, 2024; CHAI *et al.*, 2024). Nas orquídeas, acredita-se que a exigência de nutrientes para a germinação das sementes e posterior desenvolvimento seja específica da espécie (ARDITTI; ERNST, 1993; MAHDAVI *et al.*, 2024).

2.3 Recursos naturais da família Orchidaceae

Plantas saudáveis são hospedeiras de uma comunidade diversificada de microrganismos tanto na superfície (epífitas) quanto dentro dos tecidos vegetais (endófitos) (XIN *et al.*, 2024; WIPPEL *et al.*, 2023). Os endófitos, são principalmente bactérias e fungos, os quais abrigam-se e nutrem-se das plantas hospedeiras e simultaneamente beneficiam os hospedeiros (LI *et al.*, 2022). Por exemplo, bactérias endofíticas podem produzir compostos que promovam o crescimento vegetal através de mecanismos diretos e indiretos. Os diretos incluem a melhoria da nutrição das plantas, fornecendo nutrientes através da fixação de nitrogênio atmosférico (N₂) e solubilização de minerais do solo [incluindo fósforo (P), potássio (K), zinco (Zn) e ferro (Fe)] e, melhorando o crescimento das plantas também através da modulação dos níveis de fitoormônios (incluindo auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico). Já os mecanismo de ação indiretos envolvem a melhoria da saúde das plantas, suprimindo fitopatógenos por meio do parasitismo, competição de nutrientes e nichos na rizosfera, produção de compostos antagônicos (como sideróforos) e estimulação sistêmica das plantas resistência à condições de estresse (AKTER *et al.*, 2022; KUNDA *et al.*, 2021).

No entanto, o estilo de vida das bactérias endófitos em cultura de tecidos vegetais ainda é, em grande parte, um mistério. A função ecológica dos endófitos depende de sua interação com a planta hospedeira e aptidão do hospedeiro e da estrutura da comunidade endofítica do hospedeiro (BIGET *et al.*, 2024). Com isso, compreender como a comunidade endofítica de plantas cultivadas *in vitro* é formada pode ajudar a desenvolver estratégias de conservação de espécies ameaçadas de extinção promovendo o crescimento de protocormos e objetivando sua reintrodução *in situ* ou mesmo a comercialização (Kumari *et al.*, 2023). Portanto, torna-se essencial investigar a comunidade endofítica bacteriana e os fatores que moldam a estrutura da comunidade desses microrganismos.

Estudos abrangentes sobre estruturas de comunidades bacterianas e seus principais mecanismos de promoção de crescimento vegetal impulsionadores da espécie *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) são escassos. Por outro lado, alguns estudos mostram que a diversidade de comunidades bacteriana endofíticas em outras orquídeas são principalmente destinadas ao microbioma radicular (NARANJO *et al.*, 2023; JÚNIOR *et al.*, 2011), bem como em outros órgãos da planta (FARIA *et al.*, 2013). Em um estudo com a espécie *Cattleya walkeriana* mostrou que a comunidade bacteriana endofítica era diferente entre os habitats de cultivo e órgãos vegetais (folhas e raízes). Além disso, a microbiota endofítica

estava significativamente correlacionada com os parâmetros do hábitat do hospedeiro (Andrade *et al.*, 2023). No entanto, esse estudo não separou comunidades do microbioma radicular e foliar, mas as trataram como uma só quando suplementando ao meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o que explica o efeito em condições assépticas, já que a inoculação das bactérias endofíticas foi exposta aos PLBs em condições *in vitro*. Estudos sobre *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) são raros, enquanto o principal foco de interesse tem sido conservação da planta e para fins micropropagação para fins comerciais (FRANCISQUETI *et al.*, 2024). Portanto, a necessidade de estudos abrangentes sobre a comunidade endofítica bacteriana de *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) é urgente.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, T.; AUVAROZA, T. **A vulnerability analysis and strategic framework for the sustainability of sarawak lowland endangered orchids established through an urban orchid botanic garden.** 2024. Tese de Doutorado. University of Essex.
- ANDRADE, G. V. S. *et al.* Plant-endophytic bacteria interactions associated with root and leaf microbiomes of *Cattleya walkeriana* and their effect on plant growth. **Scientia Horticulturae**, v. 309, p. 1–15, 2023.
- ARDITTI, J.; KRIKORIAN, A. D. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 122, n. 3, p. 183–241, 1996.
- ARIYANTI, E. E.; MUDIANA, D.; YULIA, N. D. Propagation of *Habenaria beccarii* Schltr. by in vitro culture in purwodadi botanic garden. In: AIP Conference Proceedings. AIP Publishing, 2024. (Vol. 3001, No. 1). Propagation of *Habenaria beccarii* Schltr. by in vitro culture in purwodadi botanic garden. In: AIP Conference Proceedings. AIP Publishing, 2024.
- ALIBRANDI, P. *et al.* Diversity and structure of the endophytic bacterial communities associated with three terrestrial orchid species as revealed by 16S rRNA gene metabarcoding. **Frontiers in Microbiology** 11, p. 604964, 2020.
- AKTER, Y. *et al.* Bioactive potentiality of secondary metabolites from endophytic bacteria against SARS-COV-2: An in-silico approach. **PLoS One**, v. 17, n. 8, p. e0269962, 2022.
- BALTAZAR-BERNAL, O.; MORA-GONZÁLEZ, E. G.; RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A. Orchid micropropagation using temporary immersion systems: a review. **Micropropagation Methods in Temporary Immersion Systems**, 227–244, 2024.
- BIGET, M. *et al.* Intra-and inter-annual changes in root endospheric microbial communities of grapevine are mainly deterministic. **Plant and Soil**, v. 494, n. 1, p. 217–233, 2024.
- CHAI, L. C.; ALDERSON, P. G. E.; CHIN, C. F. Exogenous Cytokinin Induces Callus and Protocorm-Like-Bodies (PLBs) Formation in Vitro Root Tips of *Vanilla planifolia* Andrews (early view). **Tropical Life Sciences Research**, p. 1–26, 2024.
- CHUA, R. W.; SONG, K. P.; TING, A. S. Y. Characterization and antimicrobial activities of bioactive compounds from endophytic *Trichoderma asperellum* isolated from *Dendrobium* orchids. **Biologia**, v. 79, n. 2, p. 569–584, 2024.
- CISNEROS-MARRERO, I. V. *et al.* Conservación in vitro a mediano plazo de Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews; Orchidaceae). **Polibotánica**, n. 57, p. 145–155, 2024.
- FARIA, D. C. *et al.* Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 217–221, 2013.
- FRANCISQUETI, A. M. *et al.* Orchid seeds are not always short-lived in a conventional seed bank. **Annals of Botany**, v. 133, n. 7, p. 941–952, 2024.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. *et al.* Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 729–737, 2011.

GOH, L. P. W *et al.* Plant Growth Promoting Endophytic Microorganisms from Orchids for A Sustainable Agriculture. **Journal of Tropical Biodiversity & Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2024.

GUO, B. *et al.* Tissue culture via protocorm-like bodies in an orchids hybrids *Paphiopedilum SCBG Huihuang90*. **Plants**, v. 13, n. 2, p. 1–12, 2024.

KINDLMANN, P.; KULL, T.; MCCORMICK, M. The Distribution and diversity of orchids. **MDPI**, v. 15, p. 810, 2023.

KUMARI, P. *et al.* Plants and endophytes interaction: a “secret wedlock” for sustainable biosynthesis of pharmaceutically important secondary metabolites. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 1–19, 2023.

KUNDA, P.; MUKHERJEE, A.; DHAL, P. K. Insights into endophytic bacterial diversity of rice grown across the different agro-ecological regions of West Bengal, India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1–13, 2021.

LI, Z. *et al.* Biosynthetic mechanisms of secondary metabolites promoted by the interaction between endophytes and plant hosts. **Frontiers in Microbiology**, v. 13 , p. 1–28, 2022.

MAHDAVI, Z. *et al.* Utilizing Machine Learning to Optimize Macronutrients for Enhanced in-vitro Growth of *Phalaenopsis* Plantlets. Available, SSRN 4689300.

MIURA, C.; PUJASATRIA, G. C.; KAMINAKA, H. Understanding the Molecular Mechanisms of Orchid Mycorrhizal Symbiosis from Genetic Information. In: *Advances in Orchid Biology, Biotechnology and Omics*. Singapore: Springer Nature Singapore, p. 1–25, 2023.

NARANJO, H. D. *et al.* Uncovering genomic features and biosynthetic gene clusters in endophytic bacteria from roots of the medicinal plant *alkanna tinctoria*tausch as a strategy to identify novel biocontrol bacteria. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 4, p. e00747–23, 2023.

OSPINA-M, A. *et al.* The sweet path of Hansel and Gretel: pollination system of *Masdevallia hortensis* Luer & R. Escobar (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in a cloud montane forest of the Cordillera Occidental, in Colombia. **Plants**, v. 11, n. 7, p. 1–16, 2024.

QI, X. *et al.* Embryo development of *dendrobium officinale* in relation to seed germination *in vitro*. **Biology Bulletin**, v. 50, n. 13, p. S277–S288, 2024.

RIANAWATI, S. *et al.* In vitro growth response of PLBs *Dendrobium* var. *Syafrina* Bum Agrihorti on several media using plant growth regulator BAP and NAA. In: *AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing, 2024.

SCRAMONCIN, L.; GERDOL, R.; BRANCALEONI, L. How effective is environmental

protection for ensuring the vitality of wild orchid species? A case study of a protected area in Italy. **Plants**, v. 13, n. 5, p. 1–15, 2024.

SIREGAR, A. *et al.* The effect of NAA and BAP in induction of protocorm like bodies (PLB) *Cattleya* sp. orchid *in vitro*. In: **Proceedings of the 8th Annual International Seminar on Transformative Education and Educational Leadership. Aisteel 2023, 19 September 2023, Medan, North Sumatera Province, Indonesia.** 2023.

TINOAMMINI, N.; AAZHIVAENDHAN, G.; KUMAR, T. S. *In vitro* germination and optimization of basal media for protocorm-like bodies proliferation in *Dienia ophrydis* (J. Koenig) Seidenf. **Rhizosphere**, v. 29, p. 1–7, 2024.

TIWARI, P. *et al.* Advances in orchid biology: biotechnological achievements, translational success, and commercial outcomes. **Horticulturae**, v. 10, n. 2, p. 1–28, 2024.

VAN DEN BERG, C. *Cattleya* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB11343>>. Acesso em: 06 mar. 2024

XIN, W. *et al.* Root microbiota of tea plants regulate nitrogen homeostasis and theanine synthesis to influence tea quality. **Current Biology**, v. 34, n. 4, p. 1–38, 2024.

WIPPEL, K. Plant and microbial features governing an endophytic lifestyle. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 76, p. 1–10, 2023.

CAPÍTULO II

CONSERVATION STRATEGIES AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *CATTLEYA SCHILLERIANA* (RCHB.F.) UNDER SLOW GROWTH CONDITIONS AND OSMOLYTE SUPPLEMENTATION

Gracielle Vidal Silva Andrade¹, Michele Carla Nadal², Filipe Almendagna Rodrigues³, Michele Valquíria dos Reis⁴, Moacir Pasqual⁵, Joyce Doria⁶

¹Department of Agriculture, Federal University of Lavras, P.O. Box 3037, Lavras, MG 37200-900, Brazil, graciellevidal@hotmail.com, ORCID ID: 0000-0001-6449-8694

²Escuela de Ciencias Agrícolas y Veterinarias, Universidad Viña del Mar, Agua Santa 7055, Viña del Mar, Valparaíso, Chile; michecn@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-8774-8374

³Department of Agriculture, Federal University of Lavras, P.O. Box 3037, Lavras 37200-900, MG, Brazil; filipealmendagna@yahoo.com.br, ORCID ID: 0000-0003-2433-4374

⁴Department of Agriculture, Federal University of Lavras, P.O. Box 3037, Lavras 37200-900, MG, Brazil; michele.reis@ufla.br, ORCID ID: 0000-0003-0379-2384

⁵Department of Agriculture, Federal University of Lavras, P.O. Box 3037, Lavras 37200-900, MG, Brazil; m.pasqual@ufla.br, ORCID ID: 0000-0001-5612-9186

⁶Department of Agriculture, Federal University of Lavras, P.O. Box 3037, Lavras 37200-900, MG, Brazil; joyce.doria@ufla.br, ORCID ID: 0000-0002-7727-5016

ABSTRACT

Cattleya schilleriana (Rchb.f.) an endemic orchid species of Brazil, is facing an imminent threat of extinction due to a multifaceted combination of factors, primarily habitat loss and intensive exploitation of its natural populations. In this article, we aim to explore strategies for micropropagation *C. schilleriana* (Rchb.f.) under slow growth conditions for conservation purposes and germplasm availability to mitigate massive collection. However, there is a scarcity of information regarding conservation measures tailored to this orchid species. In this regard, osmolytes are small molecules naturally found *in vivo*, capable of preserving synergy among various taxa under stress conditions. The effects of 100% and 50% MS (Murashige & Skoog) culture medium salts were investigated both individually and combined with three osmolytes: sucrose, mannitol, and sorbitol. The addition of osmolytes affected the physiological, morphological, and biochemical characteristics of *C. schilleriana* (Rchb.f.). Sucrose, a compatible osmolyte in MS medium, increased leaf number, aerial part length, and photosynthetic activity. Hydrogen peroxide levels increased along with the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX). Superoxide dismutase (SOD) activity varied alongside malondialdehyde content. Mannitol and sorbitol in 100% MS medium, similar to sucrose in 50% MS medium, enhanced rhizogenesis during conservation. Additionally, the membrane stability index was affected by *in vitro* maintenance and growth stress. Subsequently, during acclimatization, while osmolyte activity remained slightly higher than that of the control plant, it allowed for increased *ex vitro* survival. Our results suggest that *C. schilleriana* (Rchb.f.) exhibits a significant adaptive response to conservation, possibly due to the mitigation of oxidative damage through the activation of the antioxidant system and the increment of stable and protective osmolytes, such as sorbitol and mannitol, at higher levels.

Keywords: *In vitro* preservation. Mannitol. Sorbitol. Sucrose.

**ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE
CATLEYA SCHILLERIANA (RCHB.F.) SOB CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO
LENTO E SUPLEMENTAÇÃO OSMÓLITA**

RESUMO

Cattleya schilleriana (Rchb.f.), uma espécie de orquídea endêmica do Brasil, enfrenta uma ameaça iminente de extinção devido a uma combinação multifacetada de fatores, principalmente perda de habitat e exploração intensiva de suas populações naturais. Neste artigo, pretendemos explorar estratégias de micropropagação de *C. schilleriana* (Rchb.f.) sob condições de crescimento lento para fins de conservação e disponibilidade de germoplasma para mitigar a coleta massiva. No entanto, há escassez de informações sobre medidas de conservação adaptadas a esta espécie de orquídea. Nesse sentido, os osmólitos são pequenas moléculas encontradas naturalmente *in vivo*, capazes de preservar a sinergia entre vários táxons sob condições de estresse. Os efeitos dos sais do meio de cultura MS 100% e 50% (Murashige & Skoog) foram investigados tanto individualmente quanto combinados com três osmólitos: sacarose, manitol e sorbitol. A adição de osmólitos afetou as características fisiológicas, morfológicas e bioquímicas de *C. schilleriana* (Rchb.f.). A sacarose, um osmólito compatível em meio MS, aumentou o número de folhas, o comprimento da parte aérea e a atividade fotossintética. Os níveis de peróxido de hidrogênio aumentaram junto com a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). A atividade da superóxido dismutase (SOD) variou juntamente com o conteúdo de malondialdeído. Manitol e sorbitol em meio MS 100%, semelhante à sacarose em meio MS 50%, melhoraram a rizogênese durante a conservação. Além disso, o índice de estabilidade da membrana foi afetado pela manutenção *in vitro* e pelo estresse de crescimento. Posteriormente, durante a aclimatação, embora a atividade osmólítica tenha permanecido ligeiramente superior à da planta de controle, permitiu um aumento da sobrevivência *ex vitro*. Os resultados sugerem que *C. schilleriana* (Rchb.f.) apresenta uma resposta adaptativa significativa à conservação, possivelmente devido à mitigação do dano oxidativo através da ativação do sistema antioxidante e do incremento de osmólitos estáveis e protetores, como sorbitol e manitol, em níveis superiores.

Palavras-chave: Preservação *in vitro*. Manitol. Sorbitol. Sacarose.

1 INTRODUCTION

Cattleya schilleriana (Rchb.f.) (Orchidaceae) belongs to the largest group of flowering plants in the world (AUNG BANG *et al.*, 2022; PARK *et al.*, 2023; RAI *et al.*, 2024), with its exquisite beauty, large and attractive flowers, the *C. schilleriana* (Rchb.f.) an orchid endemic to Brazil, falls into a threatened category according to the "Official List of Threatened Species of Brazilian Flora - Annex 1 Ordinance MMA No. 148, of June 7, 2022".

This epiphytic flower originates from the Brazilian regions of the northeast (state of Bahia) and southeast (states of Espírito Santo and Rio de Janeiro) (VAN DEN BERG, 2022). It constitutes a rarity observed in nature, as it is an orchid considered endangered in the northeast and Espírito Santo, with less than 10% of the remaining plants. Additionally, this fact makes the native survivors even more susceptible to extraction extrativismo.

In addition to the pressure exerted by illegal collection and trade, another aspect impacting the number of native specimens is the threat posed by biotic and abiotic stressors, such as rising temperatures and more extensive and recurrent episodes of El Niño and La Niña, which alter rainfall patterns. Furthermore, urban development across its range is severely compromising the species' current habitat (WANG *et al.*, 2017).

In this context, conservation alternatives for the species are fundamental to prevent the complete loss of this genetically valuable ornamental material. Although in situ conservation of orchids is the recommended approach, slow growth and dependency on symbiotic relationships with mycorrhizal fungi for germination underscore the importance of governmental intervention in preserving their natural habitats (ZHAO *et al.*, 2024; Mennicken *et al.* 2024). An alternative strategy to preserve biodiversity is *in vitro* conservation of plant germplasm, using slow-growth procedures facilitated by the use of osmolytes, or through cryopreservation (KUMAR *et al.*, 2024; KESHRI *et al.*, 2021).

Osmolytes have been of interest in various research areas due to their role in regulating biological processes and catalytic activities (MEENA; KISHORE, 2023). Considering the strong impact of these molecules on biomacromolecules during stress situations, advances in plant tissue culture techniques represent a promising strategy for characterization, multiplication, storage, and establishment of germplasm, with potential application in ecological restoration protocols (HÖLLRING *et al.*, 2023; PHILLIPS; GARDA, 2019). This contrasts with supplementation with inorganic ions in hyperosmotic MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) culture medium, which can trigger broad sensitivity to changes by destabilizing proteins and nucleic acids. Osmolytes can be utilized to make

substantial progress in the *in vitro* and *in situ* conservation of threatened species with multifaceted attributes in the Orchidaceae family (DEPLAZES-ZEMP, 2018; TIWARI *et al.*, 2022).

The impact of *in vitro* conservation can induce osmotic stress and lead to the formation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical (O^{-2}), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^{\cdot}) in plant cells with subsequent membrane damage. However, plants can mitigate oxidative damage through the activation of antioxidant enzymes and the accumulation of osmolytes that effectively scavenge ROS (MANSOOR *et al.*, 2022, MITTLER *et al.*, 2022).

To date, no studies have been reported on the conservation of *C. schilleriana* (Rchb.f.). Therefore, it is imperative to implement conservation and propagation strategies for the phylogenetic resources of this taxon challenged by the scarce knowledge about this unique species. This study aimed to investigate different *in vitro* cultures by comparing concentrations of Murashige and Skoog (MS) medium under different osmolyte concentrations for *C. schilleriana* (Rchb.f.). The data collected in this study will be used for germplasm storage, maintenance of this threatened species, and future investigations into reintroduction methods.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

Cattleya schilleriana (Rchb.f.) (Figure 1), the parent orchid, belongs to the ornamental plant collection at the Plant Tissue Culture Laboratory, situated in the Department of Agriculture (DAG) at the Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil (21°13'30.93" S, 44°58'18.53" W, 931 m altitude). Capsule of *C. schilleriana* (Rchb.f.) were surface-sterilized using 70% ethanol for 1 minute followed by 0.7% sodium hypochlorite (NaClO) for 5 minutes. Subsequently, the capsule were rinsed three times in sterile water and seed germinated on MS médium (Murashige and Skoog, 1962) medium with 5.5 g L⁻¹ agar and without plant growth regulators (PGR). The pH of the medium was adjusted to 5.8 ± 0.2 and autoclaved at 1.5 kg cm⁻² and 121 °C for 20 minutes. The MS medium was dispensed into disposable 100 mm x 15 mm Petri dishes and incubated at 25 ± 2 °C under an irradiance of 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provided by LED lamps. Seed germination was observed within the first 60 days, while seeds exhibited enlargement into round, green structures, namely protocorms

(PLBs).

Figure 1 – *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.). (A) Inflorescences; (B) Seed; (C) Capsule; (D) Protocorms (PLBs).



Source: From the author (2024).

2.2 Micropropagation

Individual protocorms (7 mm) were transferred to 200 mL flasks containing 50 mL of MS medium. The gelling agent used was 5.5 g L⁻¹ agar[®]. They were maintained under the same conditions as *in vitro* seedling. A (2x3x3)+2 factorial design was employed with the inclusion of two additional treatments. Was used (MS) Murashige and Skoog salts at total concentration (100%) and half concentration (50%), supplemented with osmolytes (sucrose, mannitol, and sorbitol) at different concentrations (1%, 2%, and 3%), as follows (Table 1):

Table 1 – Treatments evaluated for slow growth in the orchid *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.).

Treatment Code	MS	Carbon Source		
	Ionic Strength	Sucrose (%)	Mannitol (%)	Sorbitol (%)
T1	100%	1	0	0
T2	100%	2	0	0
T3	100%	3	0	0
T4	50%	1	0	0
T5	50%	2	0	0
T6	50%	3	0	0
T7	100%	0	1	0
T8	100%	0	2	0
T9	100%	0	3	0
T10	50%	0	1	0
T11	50%	0	2	0
T12	50%	0	3	0
T13	100%	0	0	1
T14	100%	0	0	2
T15	100%	0	0	3
T16	50%	0	0	1
T17	50%	0	0	2
T18	50%	0	0	3
T19	100%	0	0	0
T20	50%	0	0	0

T1: 1 % sucrose (MS 100%); T2: 2% sucrose (MS 100%); T3: 3 % sucrose (MS 100%); T4: 1% sucrose (MS 50%); T5: 2 % sucrose (MS 50%); T6: 3% sucrose (MS 50%); T7: 1 % mannitol (MS 100%); T8: 2% mannitol (MS 100%); T9: 3 % mannitol (MS 100%); T10: 1% mannitol (MS 50%); T11: 2 % mannitol (MS 50%); T12: 3% mannitol (MS 50%); T13: 1 % sorbitol (MS 100%); T14: 2% sorbitol (MS 100%); T15: 3 % sorbitol (MS 100%); T16: 1% sorbitol (MS 50%); T17: 2% sorbitol (MS 50%); T18: 3% sorbitol (MS 50%); T19: MS 100% e T20: MS 50%.

Source: From the author (2024).

2.3 Measurements of biochemical characters and morphophysiological parameters

The biochemical and morphophysiological characters were recorded after 12 months of *in vitro* conservation.

2.3.1 Malondialdehyde activity

The malondialdehyde (MDA) content was determined as described by Wang *et al.* (2018). Ground plants (100 mg) were homogenized in 500 μL of 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged for 10 min at $13,000 \times g$ at 4°C . The supernatant (200 μL) was mixed with 600 μL of 20% TCA adjusted with 0.5% 2-thiobarbituric acid (TBA); incubated at 95°C for 30 min. The reaction was terminated on ice for 5 min, and absorbance at 450, 532, and 600 nm was measured using a spectrophotometer (DHINDSA *et al.*, 1981). The MDA content was calculated by the formula:

$$\text{MDA (nmol.g}^{-1}\text{ FW)} = [6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - (0,56 \times A_{450})] \times V - 1 W$$

Were, V = volume (cm^3); W = weight (mg).

2.3.2 Hydrogen peroxide (H_2O_2) activity

The concentration of H_2O_2 in the plants was estimated with slight modifications to a method described by Velikova *et al.* (2000). 100 mg of plant tissue was homogenized with 1.6 mL of 0.1% trichloroacetic acid (TCA) in an ice bath for 30 min and centrifuged at $15,000 \times g$ for 4 min at 4°C . Subsequently, 0.5 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.8) and 1 mL of 1 M KI (Potassium Iodide) were added to 0.5 mL of supernatant and kept in the dark for 1 h. Absorbance was measured at 390 nm. Finally, the H_2O_2 content was quantified with a standard curve and expressed as $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ FW}$ (ALEXIEVA *et al.*, 2001).

2.3.3 Enzyme activity assay

For enzyme determination, 100 mg of fresh leaves were homogenized in 3 cm^3 of 50 mM. Tris buffer at $0-4^\circ\text{C}$, containing 1 mM EDTA- Na_2 and 7.5% polyvinylpyrrolidone. Samples were centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 min at 4°C , and total soluble enzyme activities were measured using a spectrophotometer (HAFEZ *et al.*, 2020). Catalase (CAT) activity was measured using the method described by Aebi (1984), based on the decomposition of H_2O_2 resulting in decreased ultraviolet absorption of H_2O_2 [extinction coefficient ($\epsilon = 39 \mu\text{mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)] at 240 nm by Catalase. The reaction contained 200 μL of enzyme extract and was added to a reaction mixture of 1.5 mL of 50 mM sodium phosphate (pH 7.8), 300 μL of 0.1 M H_2O_2 ,

and 1.0 mL of distilled water. For Ascorbate peroxidase (APX) activity, 200 μL of enzyme extract was added to a reaction mixture of 50 mmol L^{-1} potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mmol L^{-1} ASC, and 0.1 mmol L^{-1} H_2O_2 . APX activity was determined by monitoring the decrease at 290 nm for 1 min in 1 mL of the reaction mixture. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured according to Beyer and Fridovich (1987), by monitoring the inhibition of the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT). The amount of enzyme causing 50% inhibition of the rate of NBT photo-reduction in 1 min at 560 nm was defined as one unit of SOD activity. The specific activity of APX, CAT, and SOD was expressed in units/mg FW (BEYER JR; FRIDOVICH, 1987). Where, FW is the fresh weight.

2.3.4 Measurement of chlorophyll and carotenoid contents

Following the method by Cheng, Yoshikawa and Cross (2024), fresh leaf samples of *C. schilleriana* (Rchb.f.) were kept in 80% acetone solution in the refrigerator. The absorbance of the supernatant was measured using a spectrophotometer at wavelengths of 663 nm, 645 nm, and 470 nm for chlorophyll *a*, *b*, and carotenoids, respectively:

$$\text{Chlorophyll } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = [(12.72 \times \text{OD } 663) - (2.59 \times \text{OD } 645)] \times V \text{ (mL)}/\text{FW (mg)} \quad (1)$$

$$\text{Chlorophyll } b \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = [(22.8 \times \text{OD } 645) - (4.67 \times \text{OD } 663)] \times V \text{ (mL)}/\text{FW (mg)} \quad (2)$$

$$\text{Carotenoids} = (1000 \times A_{470} - 3.27 \times a - 104 \times b)/229 \quad (3)$$

where, FW is fresh weight.

2.3.5 Membrane stability index

Method as described by Khanna-Chopra and Selote (2007) was used for the estimation of membrane stability index using a conductivity meter. Leaf samples of 100 mg were thoroughly washed in double distilled water and placed in 10 mL distilled water with two sets. One set was heated for 30 min at 40 °C in a water bath and electrical conductivity was measured (C1). The second set was boiled for 10 min at 100 °C in a boiling water bath and electrical conductivity was measured (C2). The MSI was estimated by the equation given below:

$$\text{MSI} = [1 - (C1)/(C2)] \times 100 \quad (4)$$

2.3.6 Morphological evaluation

The plants were harvested for morphological studies and evaluated: the number of leaves and roots per plant; mean root length; aerial part height; fresh weight and dry weight (mg) were recorded.

2.3.7 *Ex vitro* evaluation

Ten rooted plants were selected from each treatment for acclimatization tolerance. The plants were removed from the flasks and washed with running water to remove adherent gelling agent. Subsequently, they were transferred to a 200-cell tray (54.7x 28.7x 5) cm containing autoclaved sphagnum as orchid substrate. The plants were maintained in a greenhouse and irrigated three times per week. They were fertilized weekly with 300 ppm of orchid maintenance fertilizer 20-20-20 (N-P₂O₅-K₂O) (FORTH[®], Orchids maintenance, São Paulo, Brazil). *Ex vitro* survival of the plants was assessed for all treatments after 30 days.

2.4 Experimental design

The experiments were arranged in a completely randomized design, where random plants were selected and grouped for each treatment. Data were subjected to analyses of variance (ANOVA) and means were compared by Scott-Knott ($\alpha = 0.05$) test using statistical software R (R Core Team, 2017).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Conserving for *in vitro* propagation

Establishing a protocol for *in vitro* conservation involves not only rescuing threatened and vulnerable taxa from extinction, such as the orchid *C. schilleriana* (Rchb.f.), but also timely utilization and proliferation of the species (KUMAR *et al.*, 2024). This process involves responding to stimuli, generating and transmitting signals, and initiating physiological and biochemical alterations. The MS medium demonstrated (i) providing necessary support for the *in vitro* cultivation of the orchid *C. schilleriana* (Rchb.f.) and (ii) exploring osmolytes (sucrose, mannitol, and sorbitol) for efficient management (Figures 2 and

3). The MS medium with total concentrations (100%) is not entirely exclusive to half concentrations (50%), which exhibit a high degree of plasticity and are capable of maintaining the orchid's life cycle *ex vitro* (Figure 5). The results of this research may offer dynamic insights into *in vitro* cultivation concerning conservation that are easily adoptable for managing *in situ* reintroduction.

3.2 Changes in Biochemical and morphophysiological parameters

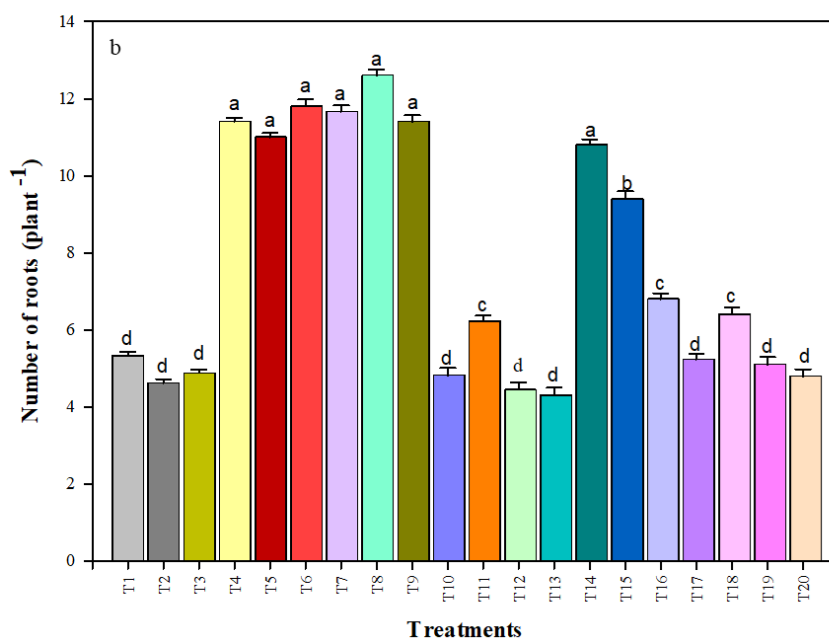
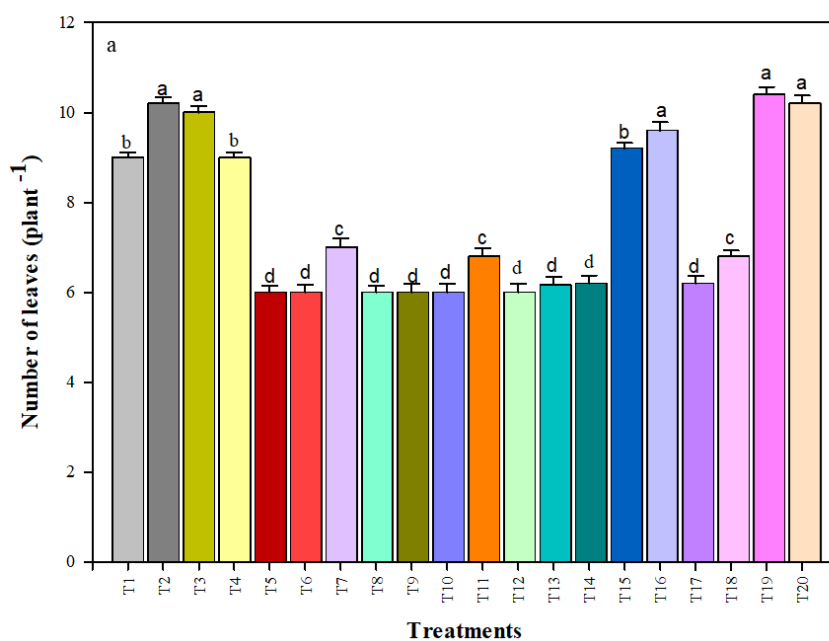
Significant differences were observed among the different cultivation methods for *in vitro* conservation of *C. schilleriana* (Rchb.f.). Notably, the Murashige and Skoog (MS) medium at 50% and 100% concentrations, when supplemented with 3% sucrose, demonstrated high efficacy in promoting morphogenesis, inducing the formation of multiple leaves (Figure 2 a) and stimulating plant development (Figure 2 d), reflected in substantial increases in the levels of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids in *C. schilleriana* (Rchb.f.) (Figure 2-g, h, i respectively).

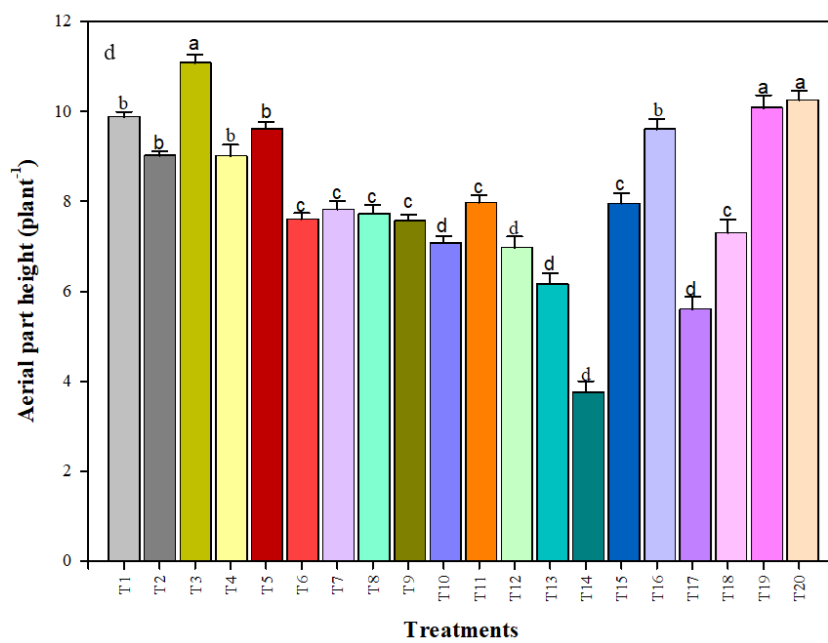
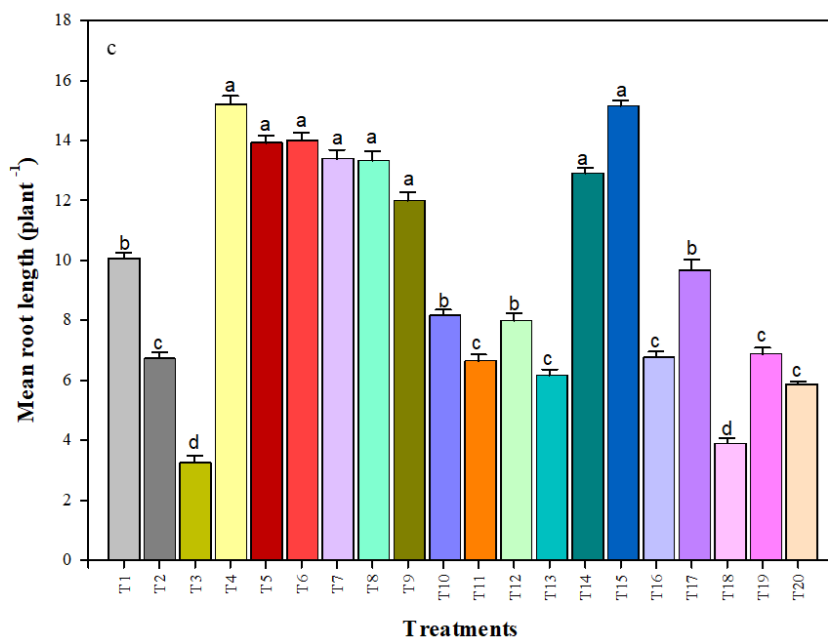
In contrast, MS medium at 100% concentration with sorbitol (1 - 2%) reduced the number of leaves by an average of 39%, as well as plant growth and development by (39 - 63%) (Figures 2 a, d), and decreased the levels of chlorophyll *a* (67 and 70%), chlorophyll *b* (68 and 67%), and carotenoids (50% and 57%), respectively (Figures 2 f, g, h). Meanwhile, MS medium at 50% concentration supplemented with mannitol (1 - 3%) and sorbitol (2%) reduced leaf quantity by around 40%, limiting vegetative growth by over 30%, which correlates with a decrease of over 68% in chlorophyll *a* and *b* activity, and a restriction of over 50% in carotenoid synthesis compared to the control (Figures 2 a, d, g, h, i) respectively.

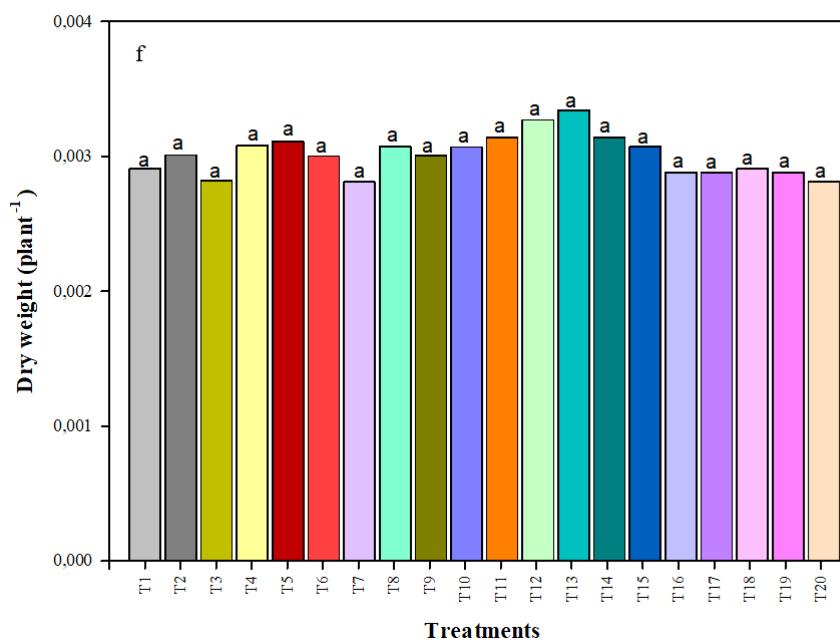
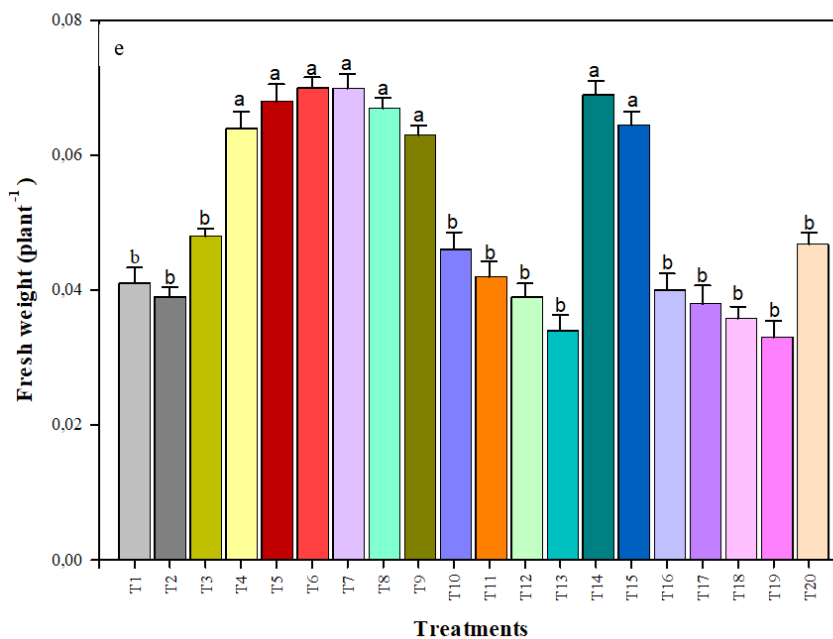
The intra-plant effect highlights a dynamic interaction, wherein the number of leaves exerts direct influence on light interception and consequently on photosynthetic yield (ALNUSAIRE *et al.*, 2022). This association underscores the complexity of plant eco-physiology, emphasizing the importance of morphophysiology *in vitro* optimization and consequently in *ex situ* conservation (LICHTENTHALER *et al.*, 2022).

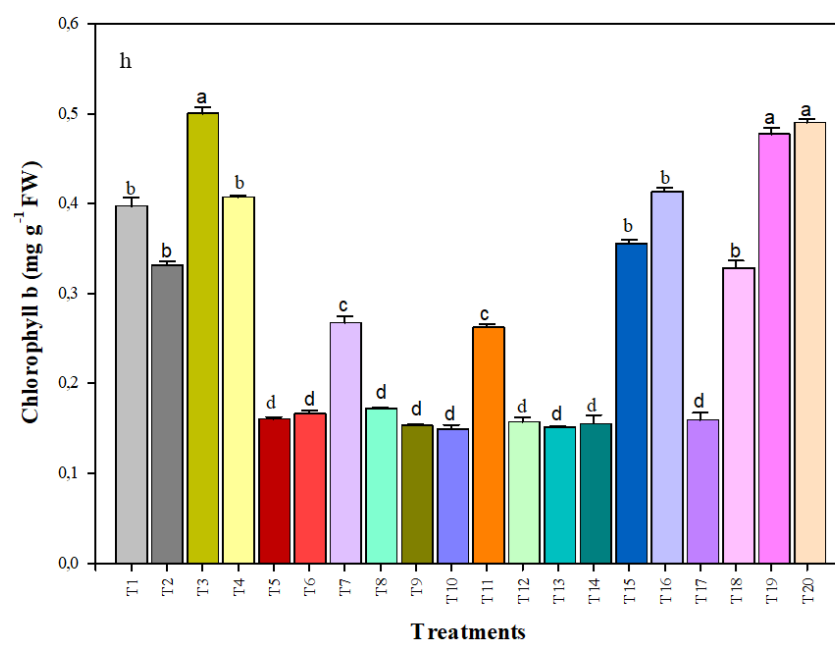
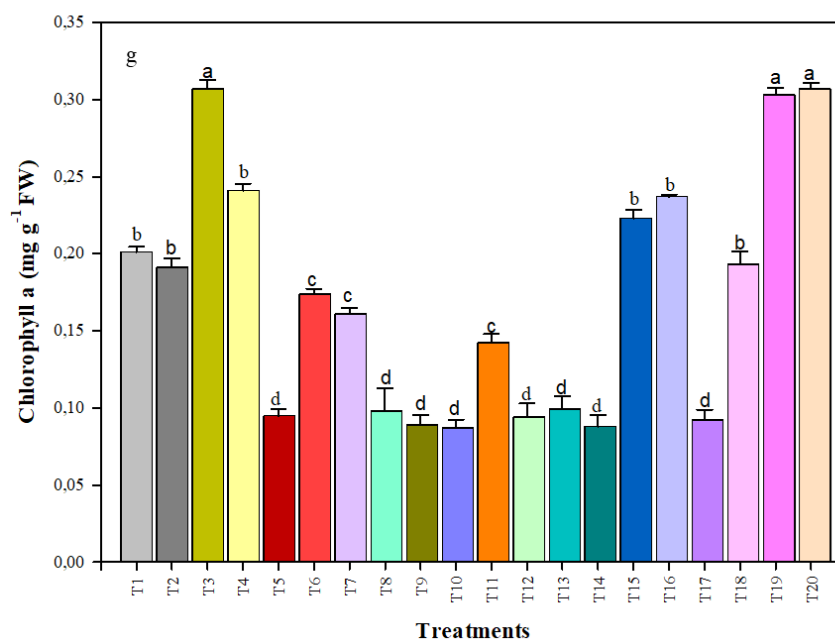
Figure 2 – Interactive effect of morphophysiological parameters *C. schilleriana* (Rchb.f.) viz., (a) number of leaves, (b) number of roots, (c) mean root length (d) aerial part height, (e) fresh weight, (f) dry weight, (g) chlorophyll *a* content, (h) chlorophyll *b* content, and (i) carotenoids. The data is mean of 25 replications. Treatments: T1: 1 % sucrose (MS 100%); T2: 2% sucrose (MS 100%); T3: 3 % sucrose (MS 100%); T4: 1% sucrose (MS 50%); T5: 2 % sucrose (MS 50%); T6: 3% sucrose (MS 50%); T7: 1 % mannitol (MS 100%); T8: 2%

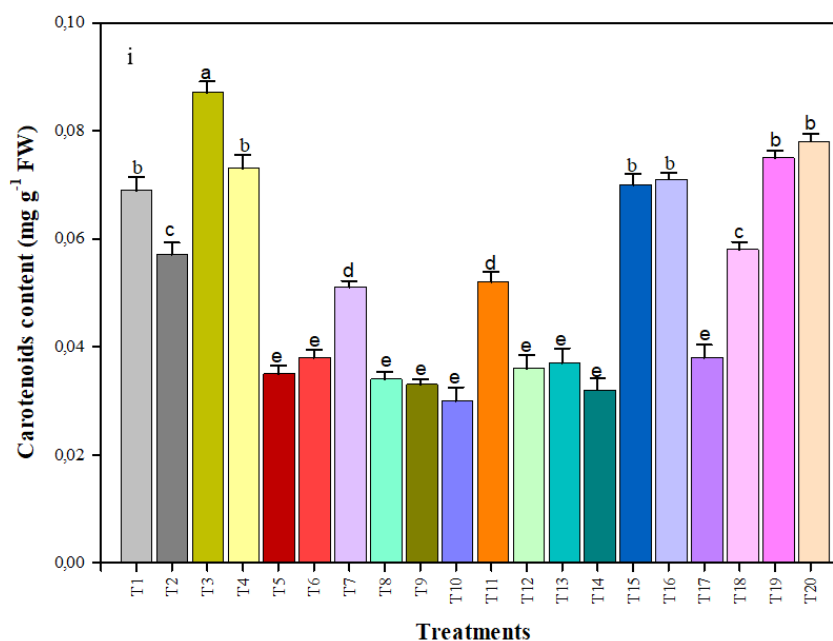
mannitol (MS 100%); T9: 3 % mannitol (MS 100%); T10: 1% mannitol (MS 50%); T11: 2 % mannitol (MS 50%); T12: 3% mannitol (MS 50%); T13: 1 % sorbitol (MS 100%); T14: 2% sorbitol (MS 100%); T15: 3 % sorbitol (MS 100%); T16: 1% sorbitol (MS 50%); T17: 2% sorbitol (MS 50%); T18: 3% sorbitol (MS 50%); T19: MS 100% e T20: MS 50%.











Source: From the author (2024).

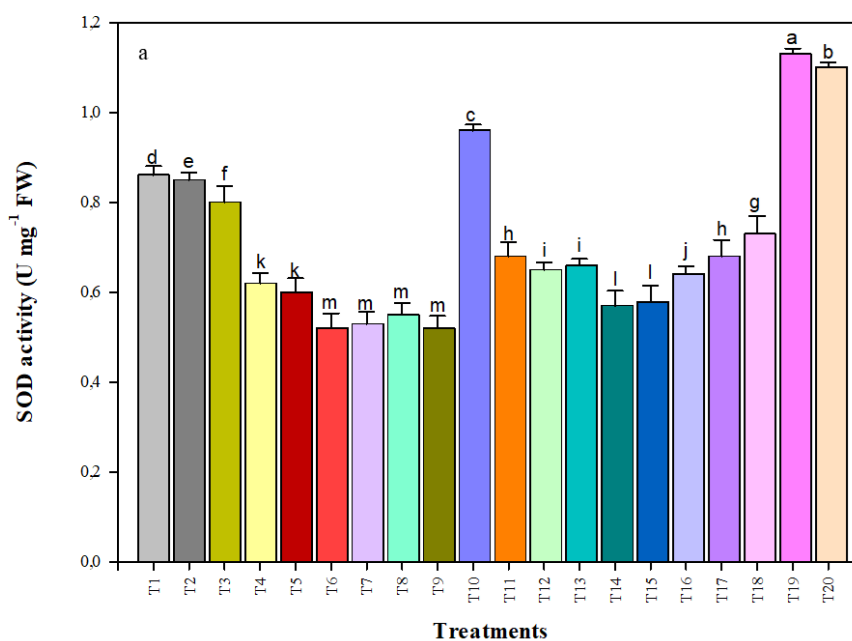
In stress situations, carbohydrate osmolytes such as the disaccharide sucrose at 1% to 3% added to Murashige and Skoog (MS) 50% medium, and sugar alcohols like 1% to 3% mannitol and 2% sorbitol in MS 100% medium, played vital roles as antioxidants (Figure 3), protecting plant cells against damage caused by reactive oxygen species (ROS) during *in vitro* osmotic tolerance in *C. schilleriana* (Rchb.f.) plants.

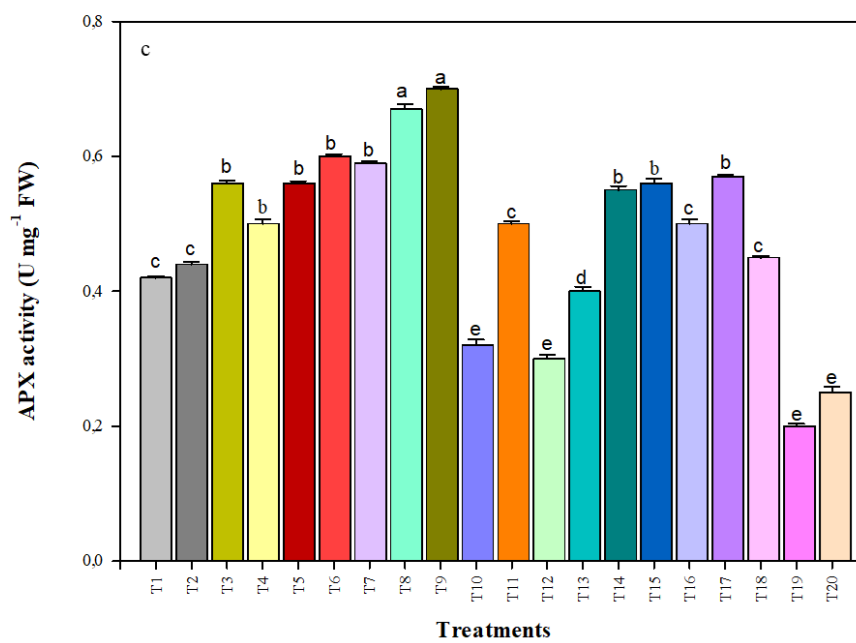
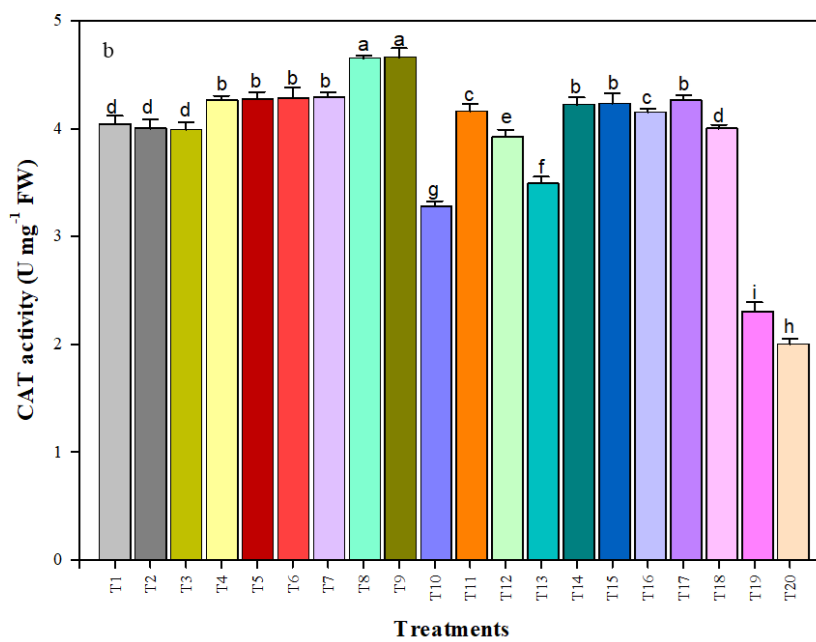
The regulation of ROS/H₂O₂ levels involved a reduction in superoxide dismutase (SOD) enzyme activity, in contrast to increased enzymatic activity of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) relative to control groups (Figures 3 a, b, c) (SAHOO *et al.*, 2018). Variations in the activity of these antioxidant enzymes are closely related to rhizogenesis potential, characterized by an increase in the number of roots and root growth in *C. schilleriana* (Rchb.f.) plants (as illustrated in Figures 2 b, c). Besides acting as osmolytes, these substances assist in ROS detoxification, maintaining membrane integrity (Figure 4), stabilizing enzymes, and proteins (AFSHARI *et al.*, 2024; BATOOL *et al.*, 2020).

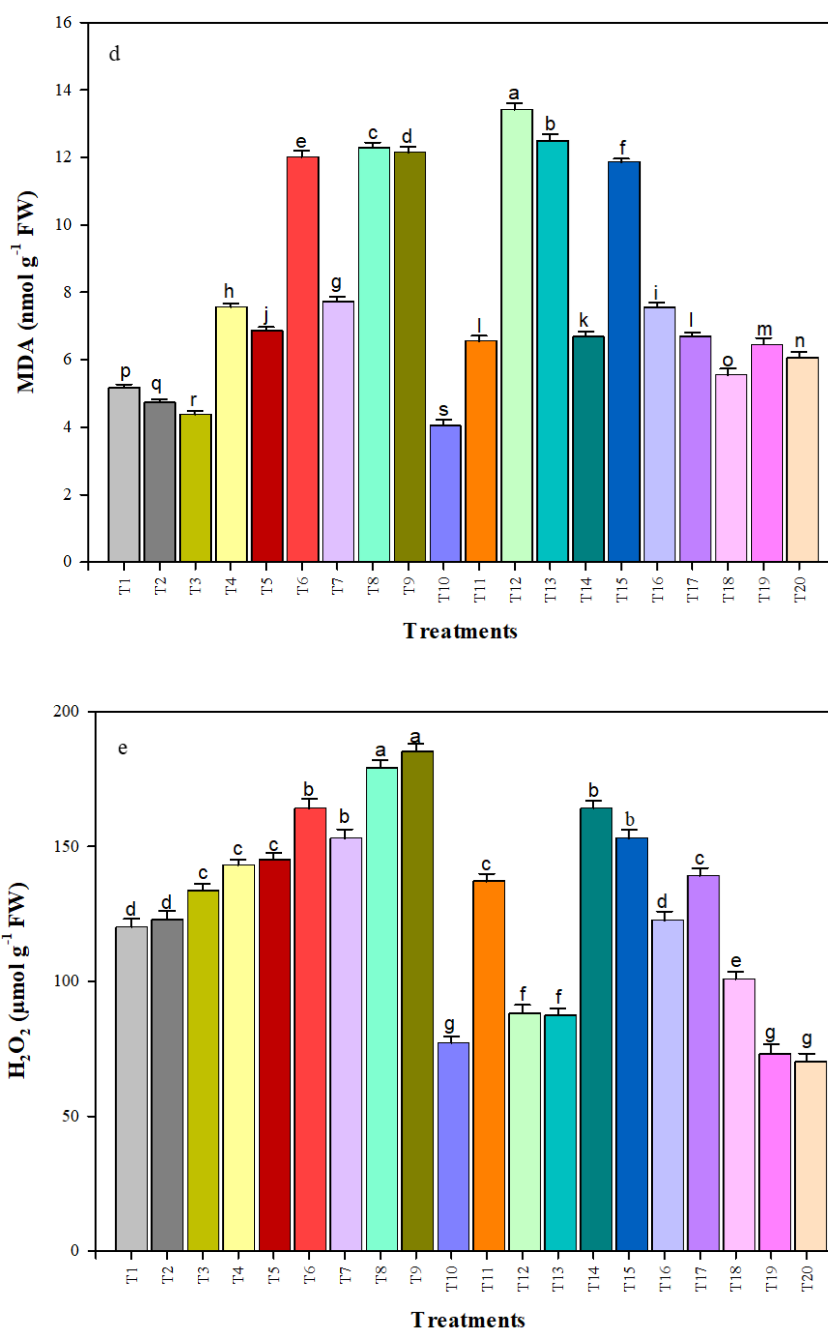
Specific signaling pathways associated with malondialdehyde (MDA) values (Figure 3 d), varied during the conservation process. The overall increase in MDA is directly related to the intensity of stress endured during the conservation period without subcultures, possibly resulting from spontaneous reactions of reactive oxygen species (ROS) with organic molecules present in membranes (CALZADILLA *et al.* 2022). However, we cannot rule out the possibility of increased membrane leakage contributing to the elevation of MDA. These

results suggest a remarkable adaptive capacity of *C. schilleriana* (Rchb.f.) metabolism during the conservation period.

Figura 3 – Interactive effect of biochemical parameters on *C. schilleriana* (Rchb.f.) viz., (a) superoxide dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), (c) ascorbate peroxidase (APX), (d) malonaldehyde (MDA), and (e) hydrogen peroxide (H₂O₂). The data is mean of 25 replications. Treatments: T1: 1 % sucrose (MS 100%); T2: 2% sucrose (MS 100%); T3: 3 % sucrose (MS 100%); T4: 1% sucrose (MS 50%); T5: 2 % sucrose (MS 50%); T6: 3% sucrose (MS 50%); T7: 1 % mannitol (MS 100%); T8: 2% mannitol (MS 100%); T9: 3 % mannitol (MS 100%); T10: 1% mannitol (MS 50%); T11: 2 % mannitol (MS 50%); T12: 3% mannitol (MS 50%); T13: 1 % sorbitol (MS 100%); T14: 2% sorbitol (MS 100%); T15: 3 % sorbitol (MS 100%); T16: 1% sorbitol (MS 50%); T17: 2% sorbitol (MS 50%); T18: 3% sorbitol (MS 50%); T19: MS 100% e T20: MS 50%.







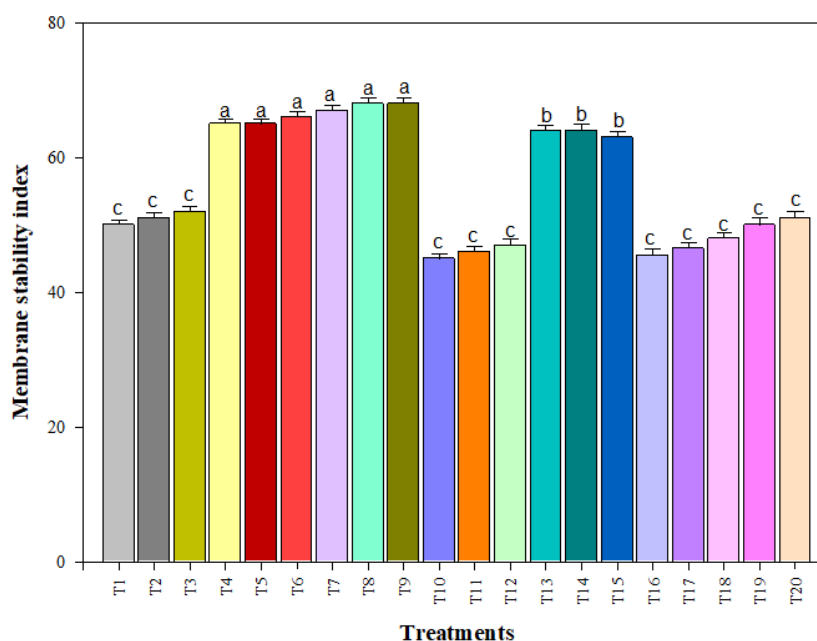
Source: From the author (2024).

3.3 Changes in membrane stability index

In vitro conservation significantly altered leaf membrane stability in *C. schilleriana* (Rchb.f.) plants (Figure 5). Under control conditions in Murashige and Skoog (MS) 100% and 50% medium, leaf membrane stability did not differ significantly. *C. schilleriana* (Rchb.f.) plants showed less decrease in membrane stability with supplementation of sucrose in MS 100% medium and mannitol and sorbitol in MS 50%

medium. Membrane stability decreased as enzymatic stress levels increased in MS medium at both 100% and 50% concentrations (Figure 5). Furthermore, the membrane stability index averaged 45 in MS 50% medium supplemented with mannitol and sorbitol, and around 51 in control plants, whereas those in MS 100% medium with supplementation of the same osmolytes exhibited a membrane stability index above 60 under *in vitro* conservation.

Figure 4 – Membrane stability index in *C. schilleriana* (Rchb.f.) plants under *in vitro* conservation. The data is mean of 25 replications. Treatments: T1: 1 % sucrose (MS 100%); T2: 2% sucrose (MS 100%); T3: 3 % sucrose (MS 100%); T4: 1% sucrose (MS 50%); T5: 2 % sucrose (MS 50%); T6: 3% sucrose (MS 50%); T7: 1 % mannitol (MS 100%); T8: 2% mannitol (MS 100%); T9: 3 % mannitol (MS 100%); T10: 1% mannitol (MS 50%); T11: 2 % mannitol (MS 50%); T12: 3% mannitol (MS 50%); T13: 1 % sorbitol (MS 100%); T14: 2% sorbitol (MS 100%); T15: 3 % sorbitol (MS 100%); T16: 1% sorbitol (MS 50%); T17: 2% sorbitol (MS 50%); T18: 3% sorbitol (MS 50%); T19: MS 100% e T20: MS 50%.



Source: From the author (2024).

3.4 *Ex vitro* response

Maintaining metabolic homeostasis in *in vitro* culture without subcultures results in

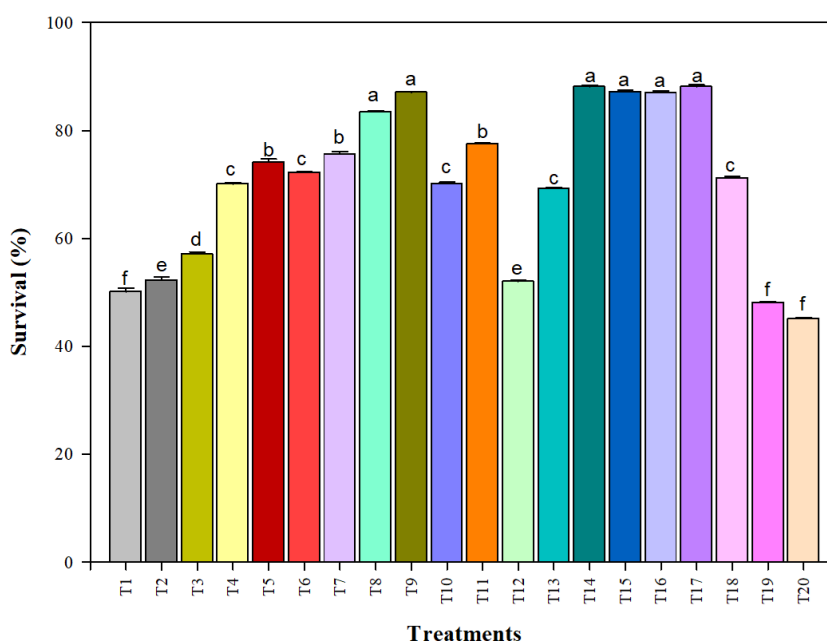
increased production of reactive oxygen species (ROS) in *C. schilleriana* (Rchb.f.) plants. Understanding the biosynthetic processes involved in *in vitro* maintenance is crucial for the improvement of agricultural conservation techniques. The use of MS nutrient medium, in conjunction with osmotic agents, emerges as an important pathway in response to slow growth, leading to a reduction in cell division rate and photosynthetic activity (DARRAGH *et al.*, 2024).

The activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), through the regulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) content, influences various physiological processes, including rhizogenesis, which directly affects one of the main pathways of water and nutrient absorption during *ex vitro* adaptation (ANDRADE *et al.*, 2023). Enhancement of the antioxidant defense system is one of the adaptive mechanisms of plants to adverse environments (Figure 5). Cellular redox homeostasis is considered an ‘integrator’ of metabolism and environment information, controlling plant growth and acclimation responses (VIEIRA *et al.*, 2024).

The transition from an *in vitro* to an *ex vitro* environment may have triggered photoprotective mechanisms in response to photosynthetic efficiency, aiming to increase carbon assimilation and membrane stability, metabolically activating them and influencing plant vitality. Adaptive processes can be attributed to the CAM (crassulacean acid metabolism) metabolism observed in *C. schilleriana* (Rchb.f.), and its responses to synergistic interactions with the environment. However, these biosynthetic processes for *in vitro* maintenance provide energy for functional cellular processes, rather than directly resulting in dry mass increment (Figure 4), assisting in subsequent processes (CHO *et al.*, 2024). This study has the potential to contribute to the development of *ex situ* conservation strategies and bioprospecting with plants of the species *C. schilleriana* (Rchb.f.).

Figure 5 – *Ex vitro* response in *C. schilleriana* (Rchb.f.) The data is mean of 25 replications.

Treatments: T1: 1 % sucrose (MS 100%); T2: 2% sucrose (MS 100%); T3: 3 % sucrose (MS 100%); T4: 1% sucrose (MS 50%); T5: 2 % sucrose (MS 50%); T6: 3% sucrose (MS 50%); T7: 1 % mannitol (MS 100%); T8: 2% mannitol (MS 100%); T9: 3 % mannitol (MS 100%); T10: 1% mannitol (MS 50%); T11: 2 % mannitol (MS 50%); T12: 3% mannitol (MS 50%); T13: 1 % sorbitol (MS 100%); T14: 2% sorbitol (MS 100%); T15: 3 % sorbitol (MS 100%); T16: 1% sorbitol (MS 50%); T17: 2% sorbitol (MS 50%); T18: 3% sorbitol (MS 50%); T19: MS 100% e T20: MS 50%.



Source: From the author (2024).

4 CONCLUSION

A protocol for the *in vitro* conservation of *C. schilleriana* (Rchb.f.) by growth inhibition has been established, contributing significantly to preservation strategies and germplasm reintroduction of this important source of plant genetic resources.

REFERENCES

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. **Academic press**, p. 121–126, 1984.
- AFSHARI, M. *et al.* Essential oil profiles, improvement of enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems in different populations of *Salvia subg. Perovskia* by irrigation management. **Industrial Crops and Products**, v. 208, p. 1–20, 2024.
- ALEXIEVA, V. *et al.* The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 12, 1337–1344, 2001.
- ALNUSAIRE, T. S.; AL-MUSHHIN, A. A.; SOLIMAN, M. H. Role of Ascorbic Acid in Alleviating Abiotic Stress in Crop Plants. In *Antioxidant Defense in Plants: Molecular Basis of Regulation*. **Singapore: Springer Nature Singapore**, p. 259–283, 2022.
- ANDRADE, G. V. S. *et al.* Plant-endophytic bacteria interactions associated with root and leaf microbiomes of *Cattleya walkeriana* and their effect on plant growth. **Scientia Horticulturae**, v. 309, p. 1–15, 2023.
- AUNG, W. T. Effects of Different Natural Extracts and Plant Growth Regulators on Plant Regeneration and Callus Induction from Pseudobulbs Explants through *in vitro* Seed Germination of Endangered Orchid *Bulbophyllum auricomum* Lindl. **Journal of Bio-Environment Control**, v. 31, n. 2, p. 133–141, 2022.
- BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian journal of biological sciences**, v. 15, n. 3, p. 413–428.
- BATOOL, T. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2020.
- BEYER JR, W. F.; FRIDOVICH, I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. **Analytical biochemistry**, v. 161, n. 2, p. 559–566, 1987.
- CALZADILLA, P. I. *et al.* Assessing photosynthesis in plant systems: A cornerstone to aid in the selection of resistant and productive crops. **Environmental and Experimental Botany**, v. 201, p. 1–19, 2022.
- CHENG, S.; YOSHIKAWA, K.; CROSS, J. S. Influence of synthetic and natural microfibers on the growth, substance exchange, energy accumulation, and oxidative stress of field-collected microalgae compared with microplastic fragment. **Science of the Total Environment**, v. 908, p. 1–14, 2024.
- CHO, A.; CHUNG, S. W.; KIM, Y. J. (2024). Calcium ammonium nitrate applications for improved leaf growth and photosynthetic responses in the CAM orchid *Phalaenopsis* under elevated CO₂ in a greenhouse. **Scientia Horticulturae**, v. 324, 112601, 2024.

DARRAGH, K.; RAMÍREZ, S. R. The transcriptomic signature of adaptations associated with perfume collection in orchid bees. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 37, n. 2, p. 141–151, 2024.

DEPLAZES-ZEMP, A. ‘Genetic resources’, an analysis of a multifaceted concept. **Biological Conservation**, v. 222, p. 86–94, 2018.

DHINDSA, R. S.; PLUMB-DHINDSA, P. A. M. E. L. A.; THORPE, T. A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. **Journal of Experimental Botany**, v. 32, n. 1, p. 93–101, 1981.

HAFEZ, Y. *et al.* Beneficial effects of biochar and chitosan on antioxidative capacity, osmolytes accumulation, and anatomical characters of water-stressed barley plants. **Agronomy**, v. 10, n. 5, p. 1–18, 2020.

HÖLLRING, K. *et al.* (2023). Morphology as indicator of adaptive changes of model tissues in osmotically and chemically changing environments. **Biorxiv**, 2023-01.

HITCHCOCK, A. *et al.* Redesigning the photosynthetic light reactions to enhance photosynthesis—the PhotoRedesign consortium. **The Plant Journal**, v. 109, n. 1, 23–34, 2022.

JOHNSON, T. R. *et al.* Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. **Plant cell, Tissue and organ culture**, v. 90, p. 313–323, 2007.

KHANNA-CHOPRA, R.; SELOTE, D. S. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 276–283, 2007.

KESHRI, P. K. *et al.* Biological potential of bioactive metabolites derived from fungal endophytes associated with medicinal plants. **Mycological Progress**, v. 20, n. 5, p. 577–594, 2021.

KHALEGHI, A. *et al.* Morphological, physiochemical and antioxidant responses of *Maclura pomifera* to drought stress. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

KUMAR, J. *et al.* A comprehensive review on threats and conservation status of orchids. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 43–47, 2024.

LICHTENTHALER, H. K.; BABANI, F. And chlorophylls to carotenoids $(a+b)/(x+c)$ in C_4 plants as compared to C_3 plants. **Photosynthetica**, v. 60, n. 1, p. 3–9, 2022.

MANSOOR, S. *et al.* Reactive oxygen species in plants: from source to sink. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2022.

MEENA, P.; KISHORE, N. Synergistic effects of osmolytes on solvent exclusion and resulting protein stabilization: Studies with sucrose, taurine and sorbitol individually and in combination. **Journal of Molecular Liquids**, v. 372, p. 1–10, 2023.

- MENNICKEN, S. *et al.* Diversity of mycorrhizal fungi in temperate orchid species: comparison of culture-dependent and culture-independent methods. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 2, p. 1–22, 2024.
- MITTLER, R. *et al.* Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 10, p. 663–679, 2022.
- PARK, H. B. *et al.* Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the endangered orchid species *Cypripedium guttatum*. **Plants**, v. 12, n. 22, p. 1–13, 2023.
- PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 55, 242–257, 2019.
- RAI, P.; BHUTIA, K.; MOKTAN, S. Comparative study on root anatomy of six species of Himalayan *Dendrobium Swartz.* **Flora**, v. 310, , 2024.
- SAHOO, M. R. *et al.* Photosynthetic, physiological p. 1–11 and biochemical events associated with polyethylene glycol-mediated osmotic stress tolerance in taro (*Colocasia esculenta L. Schott*). **Photosynthetica**, v. 56, n. 4, p. 1069–1080, 2018.
- Tiwari, P. *et al.* Biotechnological interventions in orchids: recent updates, translational success, and commercial outcomes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 6, p. 1–38, 2022.
- VAN DEN BERG, C. *Cattleya* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB11343>>. Acesso em: 16 ago. 2022
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. J. P. S. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant science**, v. 151, n. 1, p. 59–66, 2000.
- VIEIRA, T. L. *et al.* Expanding the Distribution of *Prosthechea jauana* (Orchidaceae) in the Pantepui and Highlighting the Urgent Need for Conservation Strategies in the Region in Face of Climate Change. **Plants**, v. 13, n. 2, p. 1–12, 2024.
- WANG, M. *et al.* Rice premature leaf senescence 2, encoding a glycosyltransferase (GT), is involved in leaf senescence. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–13, 2018.
- ZHAO, Z. *et al.* Organelle genomes of *epipogium roseum* provide insight into the evolution of mycoheterotrophic orchids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 3, p. 1–14, 2024.

CAPÍTULO III

EXPLORANDO BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO CATALISADORES PARA O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *CATTLEYA SCHILLERIANA* (RCHB.F.): “UMA ABORDAGEM PARA CONSERVAÇÃO”

RESUMO

Cattleya schilleriana (Rchb.f.) é uma orquídea epífita ameaçada de extinção utilizada para fins ornamentais. Existe uma exploração contínua na natureza devido à recolha ilegítima e às alterações climáticas. Para controlar o risco potencial de extinção, não existem medidas conservacionistas para espécie ou protocolos para manutenção dos microrganismos endofíticos. O estudo se concentra em abordar o isolamento de bactérias endofíticas de *C. schilleriana* (Rchb.f.) proveniente do cultivo *in vitro* e aumentar a proliferação de corpos semelhantes à protocormos (PLB), otimizando o meio basal MS. Também visa melhorar a interpretação errônea dos resultados de inoculação de microrganismos em cultura de tecidos vegetais juntamente com teste de promoção de crescimento vegetal pelos microrganismos. O meio basal (MS) foi reduzido a 90% e suplementado com cinco isolados obtidos do microbioma radicular de *C. schilleriana* (Rchb.f.) *in vitro*. Os endofíticos obtidos são capazes de produzir ácido indol-acético e sideróforos, fixar nitrogênio atmosférico e solubilizar fósforo. O meio MS reduzido e suplementado com biológicos (endofítico) promoveu maior crescimento dos PLBs em comparação ao grupo controle, além de melhorar todos os parâmetros de crescimento e auxílio na aclimatização. O estudo contribui no estabelecimento e crescimento de PLB e possível protocolo para programas de conservação.

Palavras-chave: Orchidaceae. Microrganismos simbiotes. Conservação.

**EXPLORING ENDOPHYTIC BACTERIA AS CATALYST FOR THE *IN VITRO*
GROWTH OF *CATTLEYA SCHILLERIANA* (RCHB.F.): “AN APPROACH TO
CONSERVATION”**

ABSTRACT

Cattleya schilleriana (Rchb.f.) is an endangered epiphytic orchid used for ornamental purposes. There is continuous exploitation in nature due to illegal collection and climate change. To control the potential risk of extinction, there are no conservation measures for the species or protocols for maintaining endophytic microorganisms. The study focuses on addressing the isolation of endophytic bacteria from *C. schilleriana* (Rchb.f.) from *in vitro* culture and increasing the proliferation of protocorm-like bodies (PLB) by optimizing the MS basal medium. It also aims to improve the misinterpretation of results from inoculation of microorganisms in plant tissue culture along with testing for plant growth promotion by microorganisms. The basal medium (MS) was reduced to 90% and supplemented with five isolates obtained from the root microbiome of *C. schilleriana* (Rchb.f.) *in vitro*. The endophytes obtained are capable of producing indole acetic acid and siderophores, fixing atmospheric nitrogen and solubilizing phosphorus. The reduced MS medium supplemented with biologicals (endophytic) promoted greater growth of PLBs compared to the control group, in addition to improving all growth parameters and aiding acclimatization. The study contributes to the establishment and growth of PLB and possible protocol for conservation programs.

Keywords: Orchidaceae. Symbiotic microorganisms. Conservation.

1 INTRODUÇÃO

A *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) (Orchidaceae) é uma espécie de orquídea que faz parte do maior grupo de plantas com flores (AUNG BANG *et al.*, 2022). Entretanto, está sob ameaça de extinção devido a uma série de fatores. Estressores bióticos e abióticos, juntamente com o desenvolvimento urbano afeta seu habitat e têm contribuído significativamente para essa situação preocupante. Adicionalmente, a pressão decorrente da coleta e comércio ilegais também tem exercido impacto negativo significativo sobre as populações desta espécie (MUTUM CHANU *et al.*, 2023). Neste cenário, *C. schilleriana* (Rchb.f.), endêmica do Brasil, encontra-se em uma categoria de risco, conforme a “Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção - Anexo 1 Portaria MMA Nº 148, de 7 de junho de 2022”. Esta orquídea epífita é encontrada principalmente no nordeste (Bahia) e sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro), regiões reconhecidas como hotspots de biodiversidade para a espécie no Brasil (VAN DEN BERG, 2022). *C. schilleriana* (Rchb.f.) foi categorizada em perigo de extinção na Bahia com menos de 90% das plantas remanescentes e no Espírito Santo, tornando-se vulnerável ao extrativismo nos remanescentes nativos.

O pequeno tamanho das sementes de orquídea, caracterizada pela ausência de reservas de nutrientes e por um embrião indiferenciado e minúsculo, é uma limitação severa para a reprodução sexuada *in situ* em orquídeas (Masoudi *et al.* 2022). Por esta razão, para que ocorra a germinação de sementes de orquídeas torna-se necessária a associação simbiótica com fungos micorrízicos, porém, as taxas de germinação são baixas ($\leq 1\%$) (CHEN *et al.*, 2020). Além disso, desafios associados ao lento crescimento, especialização de polinizadores e limitação das condições climáticas para multiplicação levam a uma série de preocupação para conservação de orquídeas *C. schilleriana* (Rchb.f.) e de populações de microrganismos naturais (MUTUM *et al.*, 2023).

Técnicas de germinação assimbiótica permitem manter a variabilidade genética e preservação do material genético clonal (PÉREZ-ESCOBAR *et al.*, 2020). Além disso, meios de cultura, como o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), têm sido utilizados com sucesso para germinação de diversas espécies de orquídeas. Uma estratégia promissora envolve o uso de bactérias endofíticas, especificamente promotoras de crescimento vegetal adsorvida ao crescimento de plantas cultivadas *in vitro*. No entanto, outras técnicas têm sido empregadas para remover contaminantes do meio de cultivo *in vitro*, incluindo fungos e bactérias.

Microrganismos benéficos podem auxiliar no cultivo *in vitro* como no processo de transição *ex vitro* estimulando o desenvolvimento de plântulas mais rápido e reduzindo o

tempo de cultivo. A aclimatização é a última etapa de um protocolo de micropropagação, é a adaptação das mudas antes de passarem para um ambiente natural ou comercial. É importante que as mudas se aclimatizem com sucesso para que se estabeleçam no seu habitat natural e contribuam para o repovoamento dos indivíduos. Portanto, é prioritário estabelecer programas que visem aumentar a sua propagação e ao mesmo tempo contribuir para a conservação deste valioso recurso vegetal (RAMÍREZ-MOSQUEDA *et al.*, 2019). No entanto, não existe atualmente um protocolo eficaz para a propagação de *C. schilleriana* (Rchb.f.). Conseqüentemente, há interesse crescente em explorar abordagens ambientalmente corretas e sustentáveis para remediar o crescimento vegetal.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo isolar de bactérias endofíticas associadas ao cultivo *in vitro* de orquídea *C. schilleriana* (Rchb.f.), bem como investigar a interação das bactérias com protocormos para promoção do crescimento e desenvolvimento como alternativa para conservação e aclimatização das plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento de bactérias endofíticas

A espécie *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) utilizada no estudo pertence à coleção de orquídeas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, Brasil (21° 13' 30.93" S, 44° 58' 18.53" W, 931 m altitude).

Amostras de 1 g de raízes foram coletadas de plantas de *C. schilleriana* (Rchb.f.) micropropagadas em diferentes estágios de crescimento e, em seguida, desinfestadas em hipoclorito de sódio a 50% por três minutos e etanol a 70% (v/v) por um minuto, e posterior lavagem em triplicata em água deionizada autoclavada.

As amostras foram maceradas em almofariz e transferidas posteriormente para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril (NaCl 0,8%) e centrifugado por 30 min a 120 rpm, correspondendo a diluição 10^{-1} . Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em tubos de ensaio tomando-se 1 mL da solução original em 9 mL de solução salina estéril até a diluição 10^{-7} . Após a diluição seriada, alíquotas 100 μ L dos tubos de ensaio de cada uma das diluições foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri contendo o meio de cultivo sólido ágar nutriente (5 g L⁻¹ de Peptona; 3 g L⁻¹ de extrato de carne; 5 g L⁻¹ de NaCl e 15 g L⁻¹ de ágar para o crescimento bacteriano. Logo após, as placas foram incubadas em BOD à

30°C por 24 h. A contagem do crescimento das bactérias endofíticas no meio de cultivo foi realizada pela técnica de contagem direta.

2.2 Purificação, caracterização e estocagem das bactérias isoladas

As bactérias isoladas foram crescidas em caldo nutriente líquido (5 g L⁻¹ de Peptona; 3 g L⁻¹ de extrato de carne; 5 g L⁻¹ de NaCl. Posteriormente, pelo método de estrias paralelas, as bactérias foram mantidas em placas de Petri contendo o mesmo de cultura suplementado com 15 g L⁻¹ de ágar, em triplicata foram incubadas em BOD à 30°C por 24 horas e repetidas três vezes consecutivas para purificação dos isolados. As colônias foram caracterizadas de acordo com as células (forma e coloração Gram) e das colônias (diâmetro, borda, forma, brilho, textura, elevação e cor) visando à diferenciação dos morfotipos. As culturas puras foram estocadas à -20°C em criotubos contendo glicerol 20% para utilização em análises posteriores.

2.3 Avaliações dos mecanismos promotores de crescimento vegetal

2.3.1 Fixação biológica de nitrogênio

A seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) foi realizada a partir da metodologia descrita por Döbereiner *et al.* (1995). As bactérias isoladas foram crescidas em meio caldo nutriente líquido sob agitação por 24 horas à 30°C e rotação 120 rpm. Alíquotas de 100 µL das soluções bacterianas foram inoculadas em triplicata, em tubos de ensaio de 10 mL contendo 5mL do meio de cultura semissólido NFb sem adição de nitrogênio, e incubadas à 30 °C, em BOD por sete dias. Posteriormente, por meio de estrias compostas em triplicata, em placa de Petri foram transferidas para os mesmos meio de cultivos, porém sólidos para confirmação das bactérias diazotróficas. A formação de halo ou uma película aerotóxica típica na superfície do meio foi considerada como crescimento satisfatório podendo ou não ocorrer mudança de coloração do meio de cultura considerada como fixadores de nitrogênio indicando redução do nitrogênio atmosférico em amônia.

2.3.2 Solubilização de fosfato

As bactérias endofíticas foram crescidas em meio Caldo Nutriente líquido por 24 h a 30 °C e 120 rpm em shaker. Alíquotas de 20 µL das soluções bacterianas foram ajustada a densidade óptica à um comprimento de onda de 600 nm para um valor igual a 0,5 (equivalente a 1×10^8 células/mL) e colocadas em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido: 10 g L⁻¹ de glicose, 5 g L⁻¹ de cloreto de amônio (NH₄Cl), 1 g L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl), 1 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (Mg SO₄.7H₂O), 5,0 g L⁻¹ de fosfato de fosfato de cálcio, 15 g L⁻¹ de ágar, 1 L de água destilada a pH 7,0 e incubadas a 30°C por sete dias, em triplicata. A formação do halo translúcido em torno das colônias solubilizadores foi positiva.

2.3.3 Solubilização de zinco

O potencial de solubilização de zinco dos isolados endofíticos foi determinado pela inoculação pontual em meio de cultura Tris-mínimo: HCl 6,06 g L⁻¹; NaCl 4,68 g L⁻¹; KCl 1,49 g L⁻¹; NH₄Cl 1,07 g L⁻¹; Na₂SO₄ 0,43 g L⁻¹; MgCl₂.2H₂O 0,2 g L⁻¹; CaCl₂.2H₂O, 30 mg L⁻¹, 1,5% de ágar e 0,1% (p/v), 0,1% de zinco insolúvel na forma de zinco sulfato (ZnSO₄), pH 7,0 (SHARMA *et al.*, 2012). As placas foram incubadas durante 14 dias a 30°C e examinadas quanto à formação de zonas halo em torno das colônias para solubilização do zinco.

2.3.4 Produção de ácido indol-acético (AIA)

A determinação da produção de ácido indol-acético foi realizada usando o método colorimétrico Salkowski, preparado a partir de cloreto férrico em ácido sulfúrico (GORDON; WEBER, 1951; LOACES *et al.*, 2011). Os isolados foram cultivados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio caldo nutriente com pH ajustado para 6.8 a 7.0, incubados a 30°C durante 48 horas sob agitação constante de 120 rpm em shaker. Em seguida, a concentração de células bacterianas foi ajustada para 1×10^8 células/mL pela densidade óptica em espectrofotômetro (densidade óptica de 0,5 em comprimento de onda de 600 nm). Posteriormente, foram transferidos 5% (v/v) da cultura bacteriana com auxílio de uma micropipeta para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio caldo nutriente suplementado com triptofano (100 µg/mL). Os tubos de ensaio foram incubados em BOD a 30°C por 72 horas no escuro sob agitação constante de 120 rpm. Após esse período, a cultura bacteriana foi submetida à centrifugação a 12000rpm por 5 minutos e o sobrenadante recuperado. A

produção de auxina foi determinada pela mistura de 1 mL do sobrenadante recuperado, com 1 mL do Reagente de Salkowski (1,875g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 150 mL de H_2SO_4 a 35% e 100 mL de água). Em seguida, a mistura foi incubada em BOD a 30°C por 10 minutos no escuro. Após a incubação da mistura, a mudança na coloração róseo-avermelhada das amostras foi considerada indicador de produção de auxina. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana.

2.3.5 Produção de HCN e sideróforos

Para a produção de HCN, foi realizado a inoculação pontual dos isolados bacterianos em meio King's B suplementado com 0,4% (p/v) de glicina. Um papel de filtro Whatman saturado com solução alcalina de ácido pícrico (2% de Na_2CO_3 em 0,5% de ácido pícrico) foi colocado nas tampas superiores das placas de Petri e monitorado por 4 dias quanto ao desenvolvimento da cor vermelho-marrom a partir do amarelo do papel de filtro. , que serviu de indicador para a produção de HCN (MILLER; HIGGINS, 1970).

A produção de sideróforos foi determinada pelo ensaio Chrome Azurol S (CAS) de acordo com Schwyn & Neilands (1987). As colônias bacterianas foram inoculadas em placas de ágar CAS e incubadas a 28°C por 14 dias. O desenvolvimento de um halo amarelo-alaranjado ao redor do crescimento foi um indicador de isolados bacterianos produtores de sideróforos.

2.3.6 Ensaio *in vitro* para tolerância ao estresse por salinidade

Para caracterização da tolerância ao sal, o crescimento dos isolados foi observado a 28°C por 72 h em meio LB ágar, suplementado com concentração de 0,5–1% de NaCl (BARRA *et al.*, 2016).

2.4 Preparação do inóculo bacteriano endofítico

Para preparação do inóculo endofítico livre de células (SLC), as bactérias endolíticas foram crescidas previamente em o caldo nutriente (CN) por 24 h a 120rpm em agitação orbital. Em seguida, esses microrganismos ($\text{OD}_{600}=1$) foram centrifugado a 4.000 rpm por 10 min e filtrados através de um filtro de membrana 0.22- μm para obter pellets livre de células

bacterianas para posterior inoculação em meio de cultura.

2.5 Condições de cultura e desenvolvimento *in vitro*

Cápsula de sementes maduras de *C. schilleriana* (Rchb.f.), foram esterilizadas na superfície usando etanol 70% por 1 min seguido de hipoclorito de sódio 0,8% (NaClO, Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH) por 5 minutos. As sementes foram enxaguadas três vezes em água estéril e secas em papel filtro e, transferidas para placas de Petri (150 mm de diâmetro e 20 mm de altura) contendo 15 ml dos meios de cultura Murashige e Skoog (MS) sem reguladores de crescimento vegetal. A germinação das sementes e breve alargamento efêmero nomeado de protocormos (PLB) foram observados após 30 dias. Posteriormente foram transferidos para frasco de 200 ml contendo 50 ml dos seguintes meios de cultura: 100%, v/v (MS); 10%, v/v (MS); meio 10%, v/v (MS) +100 µl da inoculo bacteriano endolítico distinto. Todos os meios foram suplementados com 5,6 g L⁻¹ de ágar ® e incubados a 25 ± 2 °C sob uma irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes (60 W Osram®). Foram colocados cinco PLBs em cada frasco, com quinze repetições, totalizando 75 explantes por tratamento e permaneceram por 120 dias. As plantas ao final do cultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: número médio de raízes, comprimento médio das raízes, comprimento médio da parte aérea, área foliar e massa fresca das plântulas.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os tecidos vegetais foram fixados com solução de glutaraldeído 3% (v/v) em tampão cacodilato de sódio (CaCO) 0,1M, em pH 7,2, por 24 horas. Posteriormente, seguiu-se a etapa de pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄) concentração 1% (v/v) em tampão CaCO por 2 horas, e então as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Posteriormente, os tecidos desidratados foram secos em aparelho de ponto crítico com fluxo de CO₂, e as amostras foram recobertas com 30nm de ouro, montadas em stubs de alumínio com fita de carbono. O material vegetal foi analisado em microscópio eletrônico de varredura, modelo JEOL JSM-6390LV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Lavras.

2.7 Transplante e aclimação

As plantas foram retiradas dos frascos, lavadas e transplantadas em bandejas de polipropileno 15 células (comprimento: 34 cm x largura: 21 cm x altura: 6,5 cm) contendo 5 g do substrato sphagnum Vitaplan®. Cada tratamento foi composto por 20 plantas e cinco repetições. As plantas foram aclimatadas em casa de vegetação em temperatura ambiente (25 ± 2 °C dia / 20 ± 2 °C noite), sob fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. E irrigadas manualmente a cada três dias. Após 30 dias, a taxa de sobrevivência foi registrada.

2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e repetidos pelo menos uma vez. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 0,05$). Os dados foram processados no software estatístico R.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Isolados bacterianos endofíticos

Um total de cinco bactérias endofíticas foi isolado da raiz de *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) cultivada *in vitro*, das quais todas foram capazes de produzir ácido indol-acético (AIA), fixar nitrogênio atmosférico (FNB), produzir sideróforo (SID) e solubilizar fósforo (P) (Tabela 1). Essa biodisponibilidade das bactérias endofíticas (simbiontes) fornecer fósforo às plantas estimula diretamente à fixação de nitrogênio, aumentando a disponibilidade de oligoelementos e produção de hormônios como AIA. O AIA endógeno, juntamente ao AIA sintetizado por simbiontes aumenta a secreção de exsudados pelas raízes das plantas que servem diretamente como fonte de energia para bactérias promotoras de crescimento associadas às raízes, melhorando seu crescimento e a eficiência de colonização (Figura 1) (ANDRADE *et al.*, 2023).

A produção de HCN (cianeto de hidrogênio) não foi observada no isolado UFLACS02, enquanto todos os outros isolados apresentou mudança de coloração do papel de filtro picrato amarelo para marrom-avermelhado. A capacidade de solubilização de Zinco dos

isolados bacterianos foi avaliada através da determinação da zona de solubilização em meio Tris-minimal suplementado com $ZnSO_4$ não observado nos isolados UFLACS02 e UFLACS05. A inoculação de biológicos pode diminuir a dependência de nutrientes químicos ao meio MS e atender a necessidades de macronutrientes como nitrogênio e fósforo e de micronutriente como zinco (KAMRAN *et al.*, 2017). Além disso, os isolados UFLACS01 e UFLACS04 apresentou potencial para tolerar concentrações de sal (0,5 %) em condições de estresse osmótico. Portanto, poderiam ser utilizados como inoculantes biológicos ao meio MS 100%, (v/v MS), hiperosmótico.

Tabela 1 – Bactérias endofíticas (+) positivo e (-) negativo para os mecanismos de promoção de crescimento vegetal dos isolados radicular de *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) *in vitro*. (AIA) produção de ácido indol-3-acético; (FNB) fixação biológica de nitrogênio; (SID) produção de sideroforo; (HCN) produção de HCN; (Zn) solubilização de zinco; (P) solubilização de fósforo e (NaCl) solubilização de cloreto de sódio.

Código dos isolados	AIA	FBN	SID	HCN	Zn	P	NaCl	
							0,5%	1%
UFLA-CS001	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA-CS002	+	+	+	+	-	+	-	-
UFLA-CS003	+	+	+	-	+	+	-	-
UFLA-CS004	+	+	+	+	+	+	+	-
UFLA-CS005	+	+	+	+	-	+	-	-

Fonte: Da autora (2024).

3.2 Colonização bacteriana endofítica

A interação benéfica ente protocormos de *C. schilleriana* (Rchb.f.) e a inoculação de isolados bacterianos endofíticos (simbiontes) ao meio de cultura (MS) pode ser resultado da seleção interespecie dos microrganismos que compõem o microbioma radicular associado à co-evolução da orquídea (PÉREZ-ESCOBAR *et al.*, 2024). Essa interação resultou primeiramente na formação do sistema radicular em detrimento da parte aérea (Figura 1B), favorecendo adaptação e sobrevivência da orquídea (Hartman, Schmid *et al.* 2023). Os simbiontes colonizaram tanto inter quanto extracelularmente os espaços radiculares que, de

outra forma, poderiam ser colonizados por outros microrganismos não-alvo no microbioma radicular (Figura 1F) (NADAL *et al.*, 2022). Este ambiente proporciona uma interação complexa entre a planta-simbionte no cultivo *in vitro* e contribui na alocação dos recursos para absorção de água e nutrientes pelo aumento da capilaridade e higroscopia no tecido radicular (Santos and Silva 2023).

Após o estabelecimento, os endofíticos são expostos ao microambiente interno do hospedeiro, apresentando alta variabilidade e dinamismo ao longo do desenvolvimento das plantas. Essa dinâmica demanda uma notável adaptabilidade por parte dos endófitos que as habitam (ALIBRANDI *et al.*, 2022). Portanto, a colonização, distribuição e a diversidade de endofíticos são influenciadas pelas características genéticas e ecologia do hospedeiro (WU *et al.*, 2021). Estudos evidenciam que o genoma dos endofíticos contém informações codificadas para características favoráveis às suas plantas hospedeiras (OROZCO-MOSQUEDA *et al.* 2021).

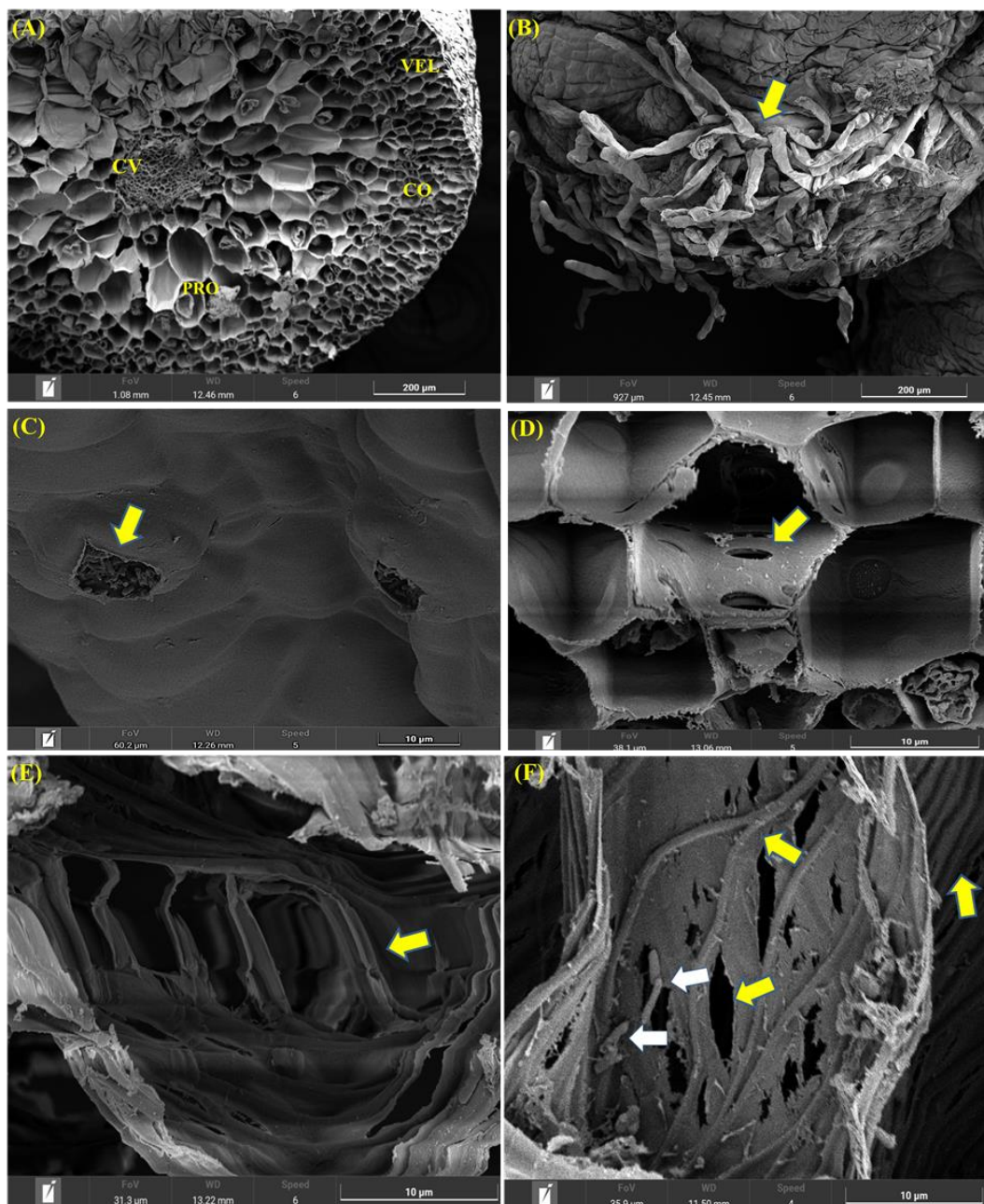
A interdependência entre *C. schilleriana* (Rchb.f.) e simbiontes indicam que, à medida que as plantas liberam exsudatos pelas raízes (Figura 1B) (YAO *et al.* 2023), atuam como moléculas sinalizadoras, para os endofíticos que são capazes de aprimorar o crescimento radicular dos protocormes por meio de mecanismos PCV, induzindo a síntese de compostos bioativos (MISHRA *et al.*, 2023).

A estrutura radicular de *C. schilleriana* (Rchb.f.), apresenta cilindro vascular central com medula parenquimática, adjacente ao córtex com a endoderme em contato direto com o cilindro vascular e um velame multiestratificado composto por até 6 camadas (Figura 1A). À medida que as células amadurecem, o protoplasto desaparece, deixando apenas as paredes celulares. As traqueídes das células do velame exibem espessamento reticuladas e numerosas pontuações de diferentes tamanhos em suas paredes terminais que se alongam na presença dos simbiontes endofíticos, incluindo células de passagem com protoplasma enquanto as células lignificadas são alongadas e sem citoplasma (Figura 1D e 1E). A estrutura radicular favorece a multiplicação e disseminação dos simbiontes, evidenciada pela maior presença no velame e uma maior frequência de exsudatos (biofilme) no córtex. O velame oferece suporte mecânico e evita a dessecação e o colapso celular durante aclimação (Figura 2), além da proteção contra radiação ultravioleta na síntese de flavonoides da orquídea epífita (PRADHAN *et al.*, 2022).

A eficácia desses simbiontes pode ser alcançada com redução da concentração de sais ao meio MS. Entretanto, essa interface é dinâmica, e a adoção de práticas de isolamento e co-inoculação na mesma espécie amplia o potencial de sinergismo entre orquídeas e

microrganismos, proporcionando benefícios significativos para insights futuros de reintrodução dessas plantas em seus habitats naturais (ANDRADE *et al.*, 2023; EVANS *et al.*, 2023). Nesse contexto de produção, conservação e reintrodução de orquídeas, tem significativa importância a co-inoculação de seus microrganismos benéficos (RAI *et al.*, 2022).

Figura 6 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.). A) Secção transversal de raiz, mostrando (CV) cilindro vascular, o córtex (CO), velame (VEL) e protoplasma (PRO). B) Formação do sistema radicular em protocormos. C) Abertura estomática, no tecido foliar mostrando a presença de simbiontes. D) Detalhe do córtex, através do velame e células de passagem. E) Alongamento da parede celular das células do velame. F) Estrias e poros (seta amarela), simbiontes (seta branca) no interior do velame radicular.



Fonte: Da autora (2024).

3.3 Desempenho dos protocormes (PLBs)

A inoculação de simbiontes biológicos em protocormes *in vitro* promoveu o maior alongamento radicular como também da área foliar/parte aérea e melhora da biomassa de *C. schilleriana* (Rchb.f.). Além do aumento da taxa de sobrevivência (Tabela 2). O desempenho dos protocormes revelaram que podem transduzir os sinais derivados de simbiontes, resultando no conjunto de ferramentas compartilhadas como aparelhos de uma via de simbiose comum. Acredita-se que esta via opere a jusante da sinalização planta-simbionte e promovem a capacidade biotrófico obrigatório dentro das células vegetias (CALEVO; DUFFY, 2023).

Tabela 2 – NR=número de raízes; CMR=comprimento médio raiz; CPA=comprimento médio da parte aérea; AF=área foliar; MF=massa fresca; ao cultivo *in vitro* de *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) no meio Murashige e Skoog (MS) 100% (v/v); 10% (v/v MS) e 10% (v/v MS) e suplementação de distintos isolados bacterinaos endofíticos. S= taxa de sobrevivência *ex vitro*.

Tratamento	NR #	CMR	CPA ----mm----	AF	MF mg	S %
100%, (v/v MS)	4,3 f	22,35 f	12,84 f	4,97 e	0,0753 f	66
10%, (v/v MS)	1,95 g	7,75 g	5,89 g	1,48 g	0,0085 g	45
10%, (v/v MS) + UFLACS01	4,42 e	24,4 e	14,61 e	4,39 f	0,1271 e	92
10%, (v/v MS) + UFLACS02	5,23 d	27,0 c	15,29 d	5,30 d	0,1607 d	92
10%, (v/v MS) + UFLACS03	7,36 a	33,8 a	19,52 a	7,11 a	0,1724 c	98
10%, (v/v MS) + UFLACS04	6,67 c	30,5 b	16,57 c	6,13 c	0,208 a	95
10%, (v/v MS) + UFLACS05	6,91 b	26,2 d	17,61 b	6,57 b	0,1905 b	97
CV(%)	0,75	1,52	1,19	0,98	1,12	-

Média seguida pela mesma letra em uma coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2024).

Os mecanismos ecológicos dos microrganismos conferem características adicionais de promoção de crescimento vegetal (PCV), como resultado bioissorção de metabólitos microbianos diretos, como fitohormônios. Além disso, esses microrganismos são atores-chave e medeia o ciclo biogeoquímico para disponibilidade de nutrientes, como nitrogênio, fósforo e potássio, que são principais nutrientes promotores de crescimento para as plantas. Os

microrganismos usam carbono orgânico como fonte de energia para impulsionar o processo de reciclagem e auxílio no processo de aclimação. A co-inoculação de isolados endolíticas funcionalmente cultiváveis e a elucidação dos mecanismos do processo de crescimento e desenvolvimento são altamente valiosos para sobrevivência. Uma vez que a conservação e reintrodução de espécies ameaçadas de extinção requer a produtividade agrícola de forma sustentável no ambiente de cultivo (PETROLI *et al.*, 2024).

A abordagem para conservar essas espécies requer uma interação complexa de preservação de habitats naturais (conservação *in situ*), desenvolvimento e aplicação de metodologias de conservação *ex situ*, e uma melhor compreensão de cultivo comercial. Conseqüentemente, existe a necessidade de desenvolver ferramentas que liguem a atividade de microrganismos benéficos com as suas orquídeas hospedeiras, para garantir interações biológicas, estabilidade ecológica e crescimento favorável para ambos os organismos que possam, por sua vez, apoiar a sua conservação (NUAMMEE *et al.*, 2024; ALIBRANDI *et al.*, 2020)

Além disso, simbioses poderiam ser partilhados a nível nacional e internacional, melhorando os esforços de conservação das orquídeas em todo o mundo. Semelhante aos bancos de sementes, o desenvolvimento de bancos de microrganismos benéficos reduzirá a possibilidade de extinção de espécies de orquídeas ameaçadas através da disponibilidade para programas de reintrodução e práticas propagação (PETROLI *et al.*, 2024).

No entanto a maior taxa sobrevivência, e o estabelecimento de novas gerações no seu habitat e a ampliação da distribuição das orquídeas podem ser analisados com outras variáveis. Portanto, os resultados do presente estudo podem ajudar a explorar novos recursos para práticas em cultura de tecidos vegetais e acelerar o desenvolvimento sustentável para produtividade agrícola. A suplementação do meio de cultivo mediada por bactérias endolíticas é um campo emergente e deve ser focado para manter a sobrevivência *ex vitro*.

4 CONCLUSÕES

O uso de bactérias endofíticas como suplemento biológico ao meio de cultura (MS) reduzido tem duplo benefício: melhorar a adaptação de *Cattleya schilleriana* (Rchb.f.) ao ambiente *ex vitro* e mitiga a questão preminente de microrganismos ao cultivo *in vitro*, uma preocupação significativa ao ambiente de cultura de tecidos. O processo de ativação de microrganismos benéficos latente ao sistema endofítico radicular levou à melhoria no crescimento e desenvolvimento vegetal de protocormos, fato apoiado por análise de MEV.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G. V. S. *et al.* Plant-endophytic bacteria interactions associated with root and leaf microbiomes of *Cattleya walkeriana* and their effect on plant growth. **Scientia Horticulturae**, v. 309, p. 1–15, 2023.
- AUNG, W. T. *et al.* Effects of different natural extracts and plant growth regulators on plant regeneration and callus induction from pseudobulbs explants through *in vitro* seed germination of endangered orchid *Bulbophyllum auricomum* Lindl. **Journal of Bio-Environment Control**, v. 31, n. 2, p. 133–141, 2022.
- CALEVO, J.; DUFFY, K. J. Interactions among mycorrhizal fungi enhance the early development of a Mediterranean orchid. **Mycorrhiza**, v. 33, n. 4, p. 229–240, 2023.
- CHEN, S. *et al.* Endophytic microbiota comparison of *Dendrobium huoshanense* root and stem in different growth years. **Planta Medica**, v. 86, n. 13/14, p. 967–975, 2020.
- HARTMAN, K. *et al.* A symbiotic footprint in the plant root microbiome. **Environmental microbiome**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2023.
- MASOUDI JOZCHAL, Z. *et al.* *In vitro* asymbiotic germination of mature seed of medicinal orchid (*Orchis simia* Lam.). **Journal of Plant Molecular Breeding**, v. 10, n. 2, p. 19–30, 2022.
- MISHRA, I. *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Role, Applications, and Biotechnology. **Biotechnology in Environmental Remediation**, p. 89–113, 2023.
- MUTUM, R. D. *et al.* *In vitro* conservation and propagation of endangered ethno-medicinal orchids from the Northeast Region of India. **Medicinal Plants: Biodiversity, Biotechnology and Conservation**, p. 541–579, 2023.
- MUTUM, R. D. *et al.* *In vitro* conservation and propagation of endangered ethno-medicinal orchids from the Northeast Region of India. **Medicinal Plants: Biodiversity, Biotechnology and Conservation**, p. 541–579, 2023.
- NADAL, M. C. *et al.* Endophytic Bacteria Can Replace the Need for Synthetic Auxin during *In vitro* rooting of *Pyrus communis*. **Agronomy**, v. 12, n. 5, p. 1–17, 2022.
- NISHIOKA, T.; TAMAKI, H. Improved cultivation and isolation of diverse endophytic bacteria inhabiting *Dendrobium* roots by using simply modified agar media. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, p. e02238-22, 2022.
- OROZCO-MOSQUEDA, M. C. *et al.* Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. **Agronomy**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2021.
- PÉREZ-ESCOBAR, O. A. *et al.* The origin and speciation of orchids. **New Phytologist**, v. 242, n. 2, p. 700–716, 2024.
- PETROLI, R. *et al.* Mycorrhizal communities of *Vanilla planifolia* in an introduction area

(La Réunion) under varying cultivation practices. **Plants**, v. 6, n. 3, p. 683–696, 2024.

PRADHAN, N. *et al.* Seed viability testing for research and conservation of epiphytic and terrestrial orchids. **Botanical studies**, v. 63, n. 1, p. 1–14, 2022.

RAI, M. K. *et al.* Encapsulation technology: an assessment of its role in in vitro conservation of medicinal and threatened plant species. **Agricultural biotechnology**, p. 103–128, 2022.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A. *et al.* In vitro conservation and regeneration of *Laelia anceps* Lindl. **South African Journal of Botany**, v. 121, p. 219–223, 2019.

SANTOS, I. S.; SILVA, M. J. Anatomy and Histochemistry of the Vegetative System of *Brachystele guayanensis* (Lindl.) Schltr. **Plants**, v. 12, n. 14, p. 1–16, 2023.

VAN DEN BERG, C. *Cattleya* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB11343>>. Acesso em: 16 ago. 2022

WU, W. *et al.* Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 1–13, 2021.

YAO, N. *et al.* Isolation of *Tulasnella* spp. from Cultivated *Paphiopedilum* Orchids and Screening of Germination-Enhancing Fungi. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 6, p. 1–15, 2023.