

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**CRESCIMENTO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE *Shomburgkia crispa* Lindl. e *Cattleya walkeriana* Gardner EM SISTEMAS MODIFICADOS DE MICROPROPAGAÇÃO**

JÉSSICA CELESTE MÔNICO RAMOS

DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL  
2021

**CRESCIMENTO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE  
*Shomburgkia crista* Lindl. e *Cattleya walkeriana* Gardner EM  
SISTEMAS MODIFICADOS DE MICROPROPAGAÇÃO**

JÉSSICA CELESTE MÔNICO RAMOS  
Bacharel em Biotecnologia

Orientador: PROF. DR. JOSÉ CARLOS SORGATO

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Dourados  
Mato Grosso do Sul  
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R175c Ramos, Jéssica Celeste Mônico  
CRESCIMENTO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE *Shomburgkia crispa*  
Lindl. e *Cattleya walkeriana* Gardner EM SISTEMAS MODIFICADOS DE  
MICROPROPAGAÇÃO [recurso eletrônico] / Jéssica Celeste Mônico Ramos. -- 2021.  
Arquivo em formato pdf.  
  
Orientador: José Carlos Sorgato.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.  
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>  
  
1. Orchidaceae. 2. Espécie nativa. 3. LEDs. 4. Polpa de banana. I. Sorgato, José Carlos. II.  
Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

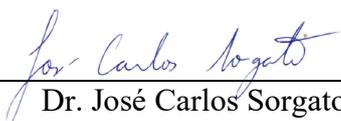
**CRESCIMENTO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE  
*Shomburgkia crisper* Lindl. e *Cattleya walkeriana* Gardner EM SISTEMAS  
MODIFICADOS DE MICROPROPAGAÇÃO**

por

Jéssica Celeste Mônico Ramos

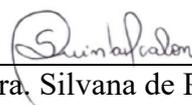
Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
MESTRE EM AGRONOMIA

Aprovada em:



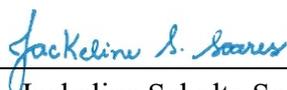
---

Dr. José Carlos Sorgato  
Orientador – UFGD/FCA



---

Dra. Silvana de Paula Quintão Scalon  
UFGD/FCA



---

Dra. Jackeline Schultz Soares  
UFGD/FCA

## AGRADECIMENTOS

*Ao Senhor Deus, pela dádiva da vida, por me conceder saúde e sabedoria para seguir em frente. Por abençoar a mim e minha família e ser a minha força em todos os momentos.*

*Ao meu orientador Dr. José Carlos Sorgato, exemplo de profissional e fonte de inspiração, que nunca mediu esforços para ajudar o próximo e pela brilhante orientação ao longo de toda a minha jornada. Muito obrigada.*

*À Dra. Jackeline Schultz Soares, pelo incentivo e dedicação, além de todo o apoio técnico e científico que me foi dado.*

*Ao meu amigo e companheiro de laboratório Dr. Luan Marlon Ribeiro, por toda a ajuda e ensinamentos compartilhados nessa caminhada.*

*Ao Laboratório de Cultivo in vitro de Flores e Plantas Ornamentais da Universidade Federal da Grande Dourados pela disponibilidade da estrutura necessária para a execução do projeto.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o período da realização desse trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização do curso.*

*Aos meus pais, Marineide Mônico Ramos e Cláudio Ramos e minha irmã Thais Mônico Ramos, por acreditarem em mim e me apoiarem em todos os meus sonhos. Sem vocês nada seria possível. Amor eterno.*

*Ao meu companheiro Flávio Maurer Oserow, pelo carinho, suporte e incentivo em todos os momentos dessa caminhada.*

*Ao pesquisador professor Dr. Renato F. Galdiano Júnior que doou parte do material de estudo deste trabalho.*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CAPÍTULO I - PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> DE <i>S. crisper</i> Lindl. UTILIZANDO DOIS SISTEMAS DE VEDAÇÃO SOB CONDIÇÕES DE LUZ.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO II - CRESCIMENTO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> DE <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO, SISTEMA DE VEDAÇÃO E IRRADIÂNCIA.....	37
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

**CRESCIMENTO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE  
*Shomburgkia crispera* Lindl. e *Cattleya walkeriana* Gardner EM SISTEMAS  
MODIFICADOS DE MICROPROPAGAÇÃO**

**RESUMO GERAL**

A produção de orquídeas nativas é um dos fatores que podem contribuir para a diminuição do extrativismo. Buscou-se com esse trabalho contribuir com a valorização e preservação da flora nativa de orquídeas, através de técnicas de cultivo *in vitro* e aclimatização em viveiro telado. Para alcançar o objetivo proposto foram realizados dois experimentos independentes: I- com o intuito de avaliar a influência de dois sistemas de vedação e oito fontes de luz no crescimento *in vitro* e estabelecimento *ex vitro* de *Shomburgkia crispera* Lindl. Para início do período experimental plantas com 120 dias de cultivo *in vitro* foram subcultivadas em meio de cultura MS, sendo inoculadas quatro plantas por frasco de cultivo. A seguir, metade dos frascos foram fechados em sistema de vedação convencional (SVC) e outra metade em sistema de vedação com trocas gasosas (SVTG). As culturas então foram acondicionadas sob as fontes de luz: LED 100% branca; LED 100% azul; LED 100% vermelha; LED 50% branca + 25% vermelha + 25% azul; LED 50% vermelha + 50% azul; LED 25% vermelha + 75% azul; LED 75% vermelha + 25% azul e como controle lâmpada fluorescente branca. Após o período experimental (cultivo *in vitro* = 120 dias e cultivo *ex vitro* = 180 dias), as plantas foram avaliadas quanto ao número de folhas, número de raízes, altura da planta, diâmetro do pseudobulbo, número de brotos, comprimento da maior raiz, comprimento da maior folha e massa fresca. A utilização do sistema de vedação com trocas gasosas em conjunto com fontes de luz na combinação dos comprimentos de onda azul e vermelho, em diferentes proporções, favorece o cultivo *in vitro* de *S. crispera*. Para o estabelecimento *ex vitro*, plantas cultivadas *in vitro* em sistema que permite trocas gasosas juntamente o com LED 50% branco + 25% vermelho + 25% azul, influencia positivamente a aclimatização das plantas; II - realizado com o intuito de avaliar o efeito da formulação do meio de cultura, do sistema de vedação dos frascos e da irradiância proporcionada por lâmpadas LEDs 3000K no crescimento *in vitro*, na sobrevivência e no estabelecimento *ex vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner. Como meio de cultura foram utilizados os meios: MS (controle); MS suplementado com 150 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana; MS com 300 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana; MS com 150 g L<sup>-1</sup> de casca de banana; e MS com 300 g L<sup>-1</sup> de casca de banana. Após inoculação das plantas em ambiente asséptico, metade dos frascos foram vedados em SVC e outra metade em SVTG, e alocados sob duas irradiâncias fornecidas por lâmpadas LEDs de 3000K: 86  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ou 128  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As características avaliadas foram as mesmas do experimento I, incluindo o número de pseudobulbos. A utilização do meio acrescido de polpa de banana em até 150 g L<sup>-1</sup> em conjunto com a irradiância de 128  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e SVC proporcionaram os maiores valores para o crescimento *in vitro* das plantas. Já para o cultivo *ex vitro*, o meio MS, juntamente com a irradiância 86  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionaram a maior sobrevivência e estabelecimento de plantas dessa espécie. Com os resultados obtidos em ambos experimentos, verificou-se que a suplementação do meio de cultura com polpa da banana, diferentes sistemas de vedação dos frascos e condições de luz podem beneficiar a produção, contribuindo com a valorização e preservação das espécies estudadas.

**Palavras-chave:** Orchidaceae; Espécie nativa; LEDs; Polpa de banana

***IN VITRO* GROWTH AND *EX VITRO* ESTABLISHMENT OF *Shomburgkia*  
*crispa* Lindl. and *Cattleya walkeriana* Gardner IN MODIFIED  
MICROPROPAGATION SYSTEMS**

**ABSTRACT**

The production of native orchids is one of the factors that can contribute to the reduction of extractivism. This work sought to contribute to the enhancement and preservation of the native flora of orchids, through *in vitro* cultivation techniques and acclimatization in a screened nursery. To achieve the proposed objective, two independent experiments were carried out: I- with the aim of evaluating the influence of two sealing systems and eight light sources on *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Shomburgkia crispa* Lindl. For the beginning of the experimental period, plants with 120 days of *in vitro* culture were subcultured in MS culture medium, with four plants per culture flask being inoculated. Then, half of the bottles were closed in a conventional sealing system (SVC) and the other half in a gas exchange sealing system (SVTG). The cultures were then placed under the light sources: 100% white LED; 100% blue LED; 100% red LED; LED 50% white + 25% red + 25% blue; 50% red LED + 50% blue LED; LED 25% red + 75% blue; 75% red LED + 25% blue LED and as a white fluorescent lamp control. After the experimental period (*in vitro* cultivation = 120 days and *ex vitro* cultivation = 180 days), the plants were evaluated for the number of leaves, number of roots, plant height, diameter of the pseudobulb, number of shoots, length of the largest root, length of the largest leaf and fresh mass. The use of the gas exchange sealing system in conjunction with light sources in the combination of blue and red wavelengths, in different proportions, favors the *in vitro* cultivation of *S. crispa*. For *ex vitro* establishment, plants grown *in vitro* in a system that allows gas exchange together with the LED 50% white + 25% red + 25% blue, positively influences the acclimatization of the plants; II - carried out in order to evaluate the effect of the formulation of the culture medium, the sealing system of the flasks and the irradiance provided by 3000K LED lamps on *in vitro* growth, survival and *ex vitro* establishment of *Cattleya walkeriana* Gardner. As culture medium, the following media were used: MS (control); MS supplemented with 150 g L<sup>-1</sup> of banana pulp; MS with 300 g L<sup>-1</sup> of banana pulp; MS with 150 g L<sup>-1</sup> of banana peel; and MS with 300 g L<sup>-1</sup> of banana peel. After inoculation of the plants in an aseptic environment, half of the flasks were sealed in SVC and the other half in SVTG, and placed under two irradiances provided by 3000K LED lamps: 86  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  or 128  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The characteristics evaluated were the same as in experiment I, including the number of pseudobulbs. The use of the medium plus banana pulp in up to 150 g L<sup>-1</sup> together with the irradiance of 128  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and SVC provided the highest values for the *in vitro* growth of the plants. For *ex vitro* cultivation, the MS medium, together with the irradiance 86  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , provided the greatest survival and establishment of plants of this species. With the results obtained in both experiments, it was verified that the supplementation of the culture medium with banana pulp, different sealing systems of the flasks and light conditions can benefit the production, contributing to the valorization and preservation of the studied species.

**Keywords:** Orchidaceae; Native species; LEDs; Banana pulp

## INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae originou-se na Malásia há milhares de anos atrás, durante o período cretáceo, quando grande parte das famílias das angiospermas tornava-se diferenciadas (GARAY, 1972). Essa família, atualmente compreende cerca de 899 gêneros e 27.801 espécies, sendo a segunda maior família de plantas com flores (THE PLANT LIST, 2021). Entretanto, no Brasil são descritos 214 gêneros, 2.450 espécies, das quais, 1.539 são endêmicas do país (BARROS et al., 2021).

A capacidade de combinações genéticas, beleza, diversidade de cor, durabilidade e exuberância de suas flores, faz com que as orquídeas se destaquem no setor de plantas ornamentais, sendo estas características desejáveis e procuradas pelo mercado consumidor (TEIXEIRA da SILVA et al., 2017a; ZAHARA et al., 2017), além de serem utilizadas na produção de flores de corte, plantas envasadas e como folhagens (HUNHOFF et al., 2016). De certa forma, esses atributos tem abrilhantado o mercado ornamental a cada ano, movimentando cerca de 8,6 bilhões no decorrer de 2019 e resultando num aumento de 7% a mais que o ano anterior (JUNQUEIRA e PEETZ, 2018; ENFLOR, 2019).

Além do apelo ornamental, bem como, o valor comercial na floricultura, atribuem as plantas dessa família botânica um importante papel como elemento florístico de diversos ecossistemas (SORGATO, 2013). Ainda, algumas dessas espécies tais como as do gênero *Dendrobium*, por exemplo, são utilizadas na área medicinal em algumas partes do mundo, espécies como a *Vanilla planifolia* Andrews são usadas como aromatizantes de alimento como é o caso da baunilha, dentre outras espécies que são destinadas para a produção de cosméticos e na composição de alguns perfumes (FARIA, 2010; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2017b; BELOTTO et al., 2017; DÍEZ et al., 2017; PAUDEL et al., 2020).

Associar a produção em escala comercial com o potencial da diversidade nativa, pode acarretar em uma oportunidade inovadora para os viveiros, uma vez que, esse fato incentiva a cadeia produtiva da floricultura. Além disso, as perdas da biodiversidade, a extração ilegal e irracional da natureza, podem ser minimizadas através da reintrodução de orquídeas nativas no mercado (GALE et al., 2018; JUNQUEIRA e PEETZ, 2018). Além da diminuição do extrativismo, outras vantagens de se produzir plantas nativas entram em questão, tal como, a comercialização, divulgação, valorização e preservação da biodiversidade (STUMPF et al., 2015). Diante disso, o cultivo *in vitro* de espécies

nativas é mais uma vez considerado uma importante estratégia para fins de conservação e preservação dessas espécies.

As orquídeas nativas brasileiras, além de possuírem um elevado potencial ornamental, também podem apresentar importância farmacológica e medicinal (SOARES, 2018). Um estudo fitoquímico realizado em *Schomburgkia crispa* Lindl. possibilitou isolar um novo produto natural denominado ácido crispóico que apresenta um potencial anticarcinogênico (BELLOTO et al., 2017).

A espécie *S. crispa* está entre as orquídeas nativas que podem apresentar grande potencial ornamental (SORGATO et al., 2021). Sua morfologia apresenta, pseudobulbos bifoliados com comprimento de 8 à 10 cm, o comprimento das folhas são de 24 à 26 cm e com largura de 5 à 7 cm. Suas inflorescências possuem, em média, de 95 a 110 cm, com flores, pétalas e sépalas na cor castanho com margens amarelas e labelo na cor rosa claro (SORGATO et al., 2021) (Figura 1). É uma planta de grande porte, com hábito epifítico, caracteriza um crescimento simpodial, com rizoma racemoso e robusto, apresentando raízes grossas e cobertas por tecido velame (BARROS et al., 2021).



FIGURA 1. Plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. e seus aspectos florais e morfológicos. Foto: Sorgato, J. C. 2019.

*S. crispera* pode ser encontrada em matas ciliares e secas do bioma Cerrado brasileiro, inclusive no estado do Mato Grosso do Sul (OSTETTO, 2015; BARROS et al., 2018). No entanto, em janeiro de 2017, a espécie foi incluída no apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção - CITES (CITES, 2017), onde se enquadram as espécies não necessariamente ameaçadas de extinção, mas cujo comércio deve ser controlado a fim de evitar usos incompatíveis com sua sobrevivência. Porém, a ameaça à biodiversidade, como o extrativismo e o comércio ilegal dentro das fronteiras nacionais não são garantidas pelas normas da CITES, uma vez que, as normas só se aplicam em transações internacionais.

O gênero *Cattleya* Lindl. é considerado um dos mais importantes da família Orchidaceae, juntamente com *Phalaenopsis* e *Dendrobium* integram o grupo de espécies mais comercializadas no Brasil (PINHEIRO, 2012; FREITAS, 2019). A espécie *Cattleya walkeriana* Gardner está entre as mais primitivas do gênero *Cattleya*, atualmente encontra-se vulnerável de acordo com o grau de ameaça da Lista Vermelha proposta pelo Centro Nacional de Conservação da Flora - CNCFlora (PINHEIRO, 2012; FORZZA et al., 2013), no entanto, essa espécie não é considerada em vias de extinção, uma vez que, desde 2003 houve uma redução de sua população em cerca de 30% (CNCFlora, 2013), vale salientar que até o momento esses dados ainda não foram atualizados.

As plantas da espécie *C. walkeriana* são endêmicas do país e ocorrem em estados como Tocantins, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Apresentam hábito epifítico e são provenientes de matas sombreadas, podendo se desenvolver até mesmo sobre rochas (ZANENGA-GODOY e COSTA, 2003; BARROS et al., 2021; FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO, 2021). Suas folhas são obovadas, de ápice arredondado, base obtusa, paralelinérveas com apenas a nervura central aparente, seus estômatos são do tipo anomocítico (SILVA et al., 2014) (Figura 2).

Apresentam epiderme uniestratificada em ambas as faces da lâmina foliar, ocorrendo estômatos na face abaxial e deposição de cera epicuticular em crostas, escamas, flocos, plaquetas e o mesofilo apresenta parênquima clorofílico homogêneo (ZANENGA-GODOY e COSTA, 2003; SILVA et al., 2014). As sépalas são protetoras da parte floral interna diferindo entre uma sépala dorsal e duas sépalas laterais. As três pétalas constituintes não são fundidas entre si e caracterizam diferenças morfológicas mais visíveis: sendo duas pétalas laterais similares entre si, e a terceira, diferenciada em labelo, onde esta tem como finalidade servir de atrativo para agentes polinizantes (ARAÚJO,

2017). Os pseudobulbos são fusiformes e formados por três entrenós, sendo que a parte apical ocupa em torno de 64% da altura total da porção caulinar. Suas raízes são longas, relativamente grossas e por vezes ramificadas (SILVA e MILANEZE-GUTIERRE, 2004).



FIGURA 2. Plantas de *Cattleya walkeriana* Gardner e seus aspectos florais e morfológicos. Foto: Araújo, R. 2017.

As sementes de orquídeas apresentam endospermas extremamente reduzidos e não possuem o cotilédone, essas condições comprometem a nutrição do embrião durante o processo germinativo. Em vista disso, é necessário a associação com fungos micorrízicos específicos para completar o seu desenvolvimento (FERREIRA et al., 2010), o que torna a germinação natural a partir de suas sementes um processo lento e inviável (SOARES et al., 2012). Assim, a germinação assimbiótica é uma das técnicas mais utilizadas, com capacidade de promover elevados percentuais de germinação, é considerada uma alternativa promissora e viável para produção de orquídeas (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015). Esse fato gera um rendimento muito superior quando comparado ao observado na natureza, com cerca de 2% a 3% de germinação, isso porque, a germinação só ocorre se houver a associação simbiótica com fungos micorrízicos, que por ventura, ocorre em baixa frequência (ARAÚJO, et al. 2009).

Diversos fatores ambientais influenciam o metabolismo, crescimento e desenvolvimento das plantas. E para garantir o sucesso da propagação *in vitro*, é essencial a ação de alguns desses fatores, dentre eles destacam-se o meio de cultura, a condição de

luz e o sistema de vedação (TEIXEIRA da SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2016; SOARES et al., 2018; DA CUNHA et al., 2019).

Um dos meios mais utilizados no cultivo *in vitro* é o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), no entanto, sua formulação tem sido modificada por pesquisadores ao longo do tempo. Dessa forma, a suplementação dos meios de cultura com polpa de banana consegue suprir a ausência de minerais que não se encontram em produtos comerciais como os fertilizantes, assim como vitaminas e outros compostos orgânicos (FAVETTA et al., 2014). Além disso, alguns autores apontam a adição de banana ao meio de cultivo como intensificadora do crescimento da parte aérea e estimuladora de enraizamento de plântulas de orquídeas obtidas através de explante *in vitro*.

As substâncias oferecidas pela polpa de banana como, potássio, fósforo e magnésio podem promover diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, dependendo diretamente do material genético e da concentração da polpa de banana utilizada (TORRES et al., 2001; GEORGE et al., 2008; FERREIRA et al., 2010; FARIA et al., 2012; SEON et al., 2018). Entretanto, pesquisas referentes à adição da casca da banana ao meio de cultura, que pode ser uma alternativa viável para micropropagação de mudas, ainda não foram descritas na literatura científica.

Outro fator que está diretamente ligado ao desenvolvimento da planta é a luz que está intimamente ligada em vários processos metabólicos dos vegetais, promovendo o crescimento da planta, a fotoestimulação da biossíntese de compostos essenciais, alterações estruturais necessárias para obtenção de maior rusticidade e consequentemente uma melhor adaptação ao ambiente externo (LARCHER 2000). Sendo assim, como forma de otimizar as técnicas de propagação de plantas cultivadas *in vitro*, diferentes comprimentos de onda, fotoperíodos e irradiância vem sendo estudados (TSUTSUMI et al., 2011; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015).

As fontes de luz comumente utilizadas em salas de crescimento, são as lâmpadas fluorescentes brancas de amplo espectro (350 – 750 nm) e irradiância em torno de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (KÄMPF, 2005; CID e TEIXEIRA, 2010). No entanto, essa fonte de energia propaga baixa irradiância e picos de comprimento de onda pouco efetivos que atuam no crescimento e desenvolvimento das plantas (REZENDE et al., 2008). Com isso, os diodos emissores de luz (LED), tem como objetivo potencializar o cultivo de plantas *in vitro*.

Com a utilização do LED como fonte de luz, é possível controlar cada comprimento de onda separadamente em uma faixa extremamente estreita com cerca de 40 nm de precisão para cada largura de banda (LOCONSOLE et al., 2019). Por meio

dessa tecnologia é possível reduzir o consumo de energia nas salas de crescimento em até 70% quando comparadas com as fontes de luz tradicionais (SINGH et al., 2015), assim, as lâmpadas LED operam a uma temperatura mais baixa, gerando menos um impacto no ambiente de cultivo (LOCONSOLE et al., 2019).

As luzes LED mais comumente utilizadas na micropropagação de diversas espécies de plantas são: luz branca (W, 420 nm), vermelha (R, 660 nm), azul (B, 460 nm) e uma combinação de LEDs azul e vermelho (B:R, 1:1), contudo, vale ressaltar que todos os LEDs citados acima, dependendo da espécie em questão produzem diferentes efeitos na morfologia, fisiologia e morfogênese das plantas (RAMÍREZ-MOSQUEDA et al., 2017).

O sistema de vedação pode influenciar a germinação, o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* da planta. Isso porque, o microambiente criado dentro dos frascos pode ser definido de acordo com o tamanho e tipo de frasco e do sistema de vedação utilizado no cultivo (CALVETE et al., 2002). No entanto, há uma formulação do meio de cultura para cada espécie de orquídea, uma vez que, para espécies nativas ainda há uma necessidade de ajustes em sua composição, a fim de suprir a carência nutricional das plantas (FREITAS, 2019; GALDIANO JÚNIOR et al., 2013).

Outra condição importante necessária para garantir o êxito do cultivo *in vitro* é o ajuste da planta à condição *ex vitro*, durante a aclimatização. As condições *in vitro* dependendo do sistema de vedação dos frascos utilizados podem necessitar de uma fonte de carboidrato no meio de cultura. Assim, a sobrevivência e o crescimento e estabelecimento das plantas, após a transferência para casa de vegetação, pode ser afetada negativamente por deficiências fisiológicas e anatômicas decorrentes do cultivo *in vitro* (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2017a).

A aclimatização é um período de transição onde as plantas necessitam ajustar sua fisiologia das condições *in vitro* para ambientes *ex vitro*, sendo este determinante para o sucesso ou não do cultivo *in vitro*. Na aclimatização, as plantas são suscetíveis à variações de umidade, evapotranspiração, alta intensidade de luz, infecções por microrganismos e dificuldade de absorção de nutrientes, uma vez que, algumas estruturas ainda não se desenvolveram completamente. Para reduzir o estresse das plantas e aumentar a porcentagem de sobrevivência, há dois fatores importantes a serem considerados, que são a formulação do meio de cultivo e o microclima do ambiente de cultivo (NASUTION et al., 2020).

Dessa forma, os protocolos de propagação devem ser estudados, uma vez que, os dados da literatura ainda não são consistentes para espécies nativas. Assim, utilização de banana, diferentes sistemas de vedação e as condições de luz podem influenciar a propagação *in vitro* das espécies estudadas.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho contribuir com a valorização e preservação das espécies de *Schomburgkia crispa* Lindl. e *Cattleya walkeriana* Gardner, mediante técnicas de cultivo *in vitro* e estabelecimento *ex vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; MIYATA, L. Y.; CASTRO, E. M.; ROCHA, H. S. Qualidade de luz na biometria e anatomia de plântulas *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2506-2511, 2009.

ARAÚJO, R. **Orquídeas *Dendrobium***. ed. São Paulo: Europa, 2017. 79 p.

BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N., PESSOA, E. M.; FORSTER, W. MENINI NETO, L.; FURTADO, S. G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C. O.; GUIMARÃES, L. R. S. Orchidaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2021. Disponível em: [www.floradobrasil.jbrj.gov.br/](http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/). Acesso em: 2 fev. 2021.

BARROS, F.; HALL, C. F.; PAIVA NETO, V. B.; BATISTA, J. A. N. Check-list das Orchidaceae do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, v. 73, p. 287-296, 2018.

BELLOTO, C. A.; SOUZA, G. K.; PERIN, P. C.; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O.; CHIAVELLI, L. U. R.; GARCIA, F. P.; KAPLUM, V.; RODRIGUES, J. H. S.; SCARIOT, D. B.; DELVECCHIO, R.; MACHADO-FERREIRA, E.; AGUIAR, R. S.; SOARES, C. A. G.; NAKAMURA, C. V.; POMINI, A. M. Crispoic acid, a new compound from *Laelia marginata* (Orchidaceae), and biological evaluations against parasites, human cancer cell lines and Zika vírus. **Natural Product Research**, Londres, v. 31, n. 1, p. 1-6, 2017.

CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. Revista **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. **Explante, meio nutritivo, luz e temperatura**. In: CID, L. P. B. ed. Cultivo *in vitro* de plantas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 15-43, 2010.

CITES - Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. **Apêndice II**. 2017. Acesso em: 20 jan. 2020.

CNCFLORA. Centro Nacional de Conservação da Flora. Versão 3.1. **Publicado na internet**. Disponível em: [www.cncflora.jbrj.gov.br/](http://www.cncflora.jbrj.gov.br/). Acesso em: 17 fev. 2021.

DA CUNHA, S. H. B.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; ROCHA, T. T.; PINTO, J. E. B. P. Influência da qualidade de luz no crescimento e acúmulo de voláteis de *Mentha spicata* cultivada *in vitro*. **Scientia Plena**, v. 15, p. 090-201, 2019.

DÍEZ, M. C., MORENO, F.; GANTIVA, E. Effects of light intensity on the morphology and CAM photosynthesis of *Vanilla planifolia* Andrews. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 70, n. 1, p. 8023-8033, 2017.

ENFLOR. Mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais segue na contramão da crise. In: ENCONTRO NACIONAL DE FLORISTAS, PRODUTORES, ATACADISTAS E EMPRESA DE ACESSÓRIOS. Holambra, **Release economic**, 2019.

GALE, S. W.; FISCHER, G. A.; CRIBB, P. J.; FAY, M. F. Orchid conservation: bridging the gap between Science and practice. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 186, n. 4, p. 425-434, 2018.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture. **The Background**, v. 1, n. 3, p. 501, 2008.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de orquídeas**. Londrina: Mecenas, 2010. 208 p.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. Londrina: Mecenas, 2012. 124 p.

FAVETTA, V.; COLOMBO, R. C.; FARIA, R. T. Cultivo *in vitro* de *Vanda tricolor* Lindl. em meios de cultura simplificados. *Revista Ciências Agrárias*, v. 57, n. 2, p. 114-117, 2014.

FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; FARIA, R. T.; RIBEIRO, J. P. N.; CASALI, C. A. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron e V. P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Feira de Santana, v. 24, n. 3, p. 636-639, 2010.

FORZZA, R. C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R. F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R. B.; VERSIEUX, L. **Orchidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: [www.floradobrasil.jbrj.gov.br/](http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/). Acesso em: 18 fev. 2021.

FREITAS, K. G.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. Crescimento *in vitro* de *Cattleya nobilior* rchb.f.: meios de cultura, sistema de micropropagação e irradiância. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, e. 67131, 2021.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; CASSANO, A. O.; LEMOS, E. M. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violaceae* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazônica**, v. 43, n. 2, p. 127-134, 2013.

GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, Boston, v. 53, p. 202-215, 1972.

HUNHOFF, V. L.; SILVA, C. A.; LAGE, L. A.; KRAUSE, W.; PALÚ, E. G. Biologia, morfologia floral e potencial ornamental de *Cyrtopodium saintlegerianum* (Orchidaceae). **Revista AgroAmbiente**, v. 10, n. 4, p. 358–363, 2016.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Sustainability in Brazilian floriculture: introductory notes to a systemic approach. **Ornamental Horticulture**, v. 24, n. 2, p. 155-162, 2018.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. ed. 2. Guaíba: Agrolivros, 2005. 254 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LOCONSOLE, D.; COCETTA, G.; SANTORO, P.; FERRANTE, A. Optimization of LED Lighting and Quality Evaluation of Romaine Lettuce Grown in An Innovative Indoor Cultivation System. **Sustainability**, v. 11, p. 841, 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASUTION, L. Z.; HASIBUAN, M.; MANURUN, E. D. Adaptability of *Dendrobium* orchid plants grown on tissues in planting media and their position during the acclimatization process. **Earth and Environmental Science**, v. 454, 012166, 2020.

OSTETTO, S. **Orquídeas de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: Alvorada, 2015. 141 p.

PAUDEL, M. R.; BHATTARAI, H. D.; PANT, B. Traditionally used medicinal *Dendrobium*: a promising source of active anticancer constituents. Orchids Phytochemistry, **Biology and Horticulture: Fundamentals and Applications**, p. 1-26, 2020.

PINHEIRO, C. L. **Ecofisiologia do estresse luminoso em espécies de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae)**. Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo. 2012.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; LUNA-SÁNCHEZ, I. J. Light quality affects growth and development of *in vitro* plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 288-293, 2017.

REZENDE, R. K. S.; PAIVA, L.V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 821-827, 2008.

SEON, K. M.; KIM, D. H.; KANG, K. W. Highly competent *in vitro* propagation of *Thrixspermum japonicum* (Miq.) Rchb.f., a rare epiphytic orchid. **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, v. 54, p. 302-308, 2018.

SINGH, D.; BASU, C.; MEINHARDT-WOLLWEBER, M.; ROTH, B. LEDs para iluminação de estufa com eficiência energética. **Renovar. Sustentar. Energy**, ed. 49, p. 139-147, 2015.

SILVA, C. I.; GUTIERRE-MILANEZE, M. A. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, p. 91-100, 2004.

SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. Crescimento *in vitro* e anatomia foliar de *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) cultivada em sistema de compatibilidade natural. **Ceres**, v. 61 n. 6, 2014.

SILVA, A. B.; REIS, C. O.; CAZETTA, J. O.; CARLIN, S. D.; LANDGRAF, P. R. C.; REIS, M. C. Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the *in vitro* growth of orchids. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 3, p. 619-626, 2016.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; ROSA, C. B. C. J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, v. 24, n. 3, p. 226-233, 2012.

SOARES, J. S. **Técnicas de cultivo *in vitro* como alternativa para conservação de *Schomburgkia crista* Lindl. (Orchidaceae) e sua reintrodução em ambiente natural.** Tese (Doutorado) - recursos naturais - Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, 2018.

SORGATO, J. C. **Aclimatização de *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree.** Dissertação (Mestrado) – produção vegetal – Universidade Federal da Grande Dourados, 2013.

SORGATO, J. C.; MUDOLON, E. D.; GUIMARÃES, F. F.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. Fontes de luz na germinação e estabelecimento inicial *in vitro* de *Schomburgkia crista* Lindl. uma espécie do Cerrado brasileiro. **Ciência Rural**, v. 51, n. 3, 2021.

STUMPF, E. R. T.; SILVA, P. S.; ROMAGNOLI, I. D.; FISCHER, S. Z.; MARIOT, M. P. Espécies nativas que podem substituir as exóticas no paisagismo. **Ornamental Horticulture**, v. 21, n. 2, p. 165-172, 2015.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 10, p. 1685-1706, 2015.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; SONGJUN, Z. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 110-124, 2017a.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; NG, T. B. The medicinal and pharmaceutical importance of *Dendrobium* species. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2227-2239, 2017b.

THE PLANT LIST. **A working list of all plant species.** Disponível em: [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org). Acesso em: 16 fev. 2021.

TSUTSUMI, C.; MIYOSHI, K.; YUKAWA, T.; KATO, M. Responses of seed germination and protocorm formation to light intensity and temperature in epiphytic and terrestrial *Liparis* (Orchidaceae). **Botany**, v. 89, n. 12, p. 841-848, 2011.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas.** Brasília: Embrapa, p. 20 (Circular Técnica), 2001.

ZAHARA, M.; DATTA, A.; BOONKORKAEN, P.; MISHRA, A. The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of

*Phalaenopsis* hybrid 'Pink'. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Foliar anatomy of four species of genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) of the Brazilian Central Planalt. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17 n. 1, 2003.

**CAPÍTULO I - PRODUÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *S. crispa* Lindl.  
UTILIZANDO DOIS SISTEMAS DE VEDAÇÃO SOB CONDIÇÕES DE LUZ**

**RESUMO**

A extração de orquídeas nativas constitui um fator relevante para a diminuição das populações do Bioma Cerrado, tornando-se necessário estabelecimento de práticas visando sua produção. Objetivou-se avaliar as fontes de luz e o sistema de vedação no crescimento *in vitro* e *ex vitro* da orquídea *Shomburgkia crispa* Lindl. nativa do Mato Grosso do Sul. Para início do período experimental, plantas com 120 dias de cultivo *in vitro* foram subcultivadas em meio de cultura MS. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x8 (dois sistemas de vedação; oito condições de luz), com cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída de um frasco, contendo quatro plântulas, sendo metade dos frascos fechados em sistema de vedação convencional (SVC) e outra metade em sistema de vedação com trocas gasosas (SVTG). Também foram avaliadas as fontes de luz (FL): FL1 - lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha; FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25% azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul. Após 120 de cultivo *in vitro* e após 180 dias de cultivo *ex vitro*, as plantas foram avaliadas quanto ao número de folhas, número de raízes, altura da planta, diâmetro do pseudobulbo, número de brotos, comprimento da maior raiz, comprimento da maior folha e massa fresca total. Para o crescimento *in vitro*, a utilização do SVTG em conjunto com fontes de luz na combinação dos comprimentos de onda azul e vermelho, em diferentes proporções, favoreceu o cultivo de *S. crispa*. Para o crescimento *ex vitro* dessa espécie, o cultivo *in vitro* em SVTG em conjunto com FL4, influenciou positivamente a aclimatização das plantas.

**Palavras-chave:** Fontes de luz; Orchidaceae; Espécie nativa

***IN VITRO* AND *EX VITRO* PRODUCTION OF *S. crispa* Lindl. USING TWO SEALING SYSTEMS UNDER LIGHT CONDITIONS**

**ABSTRACT**

The extraction of native orchids is a relevant factor for the reduction of populations in the Cerrado Biome, making it necessary to establish practices aimed at their production. The objective was to evaluate the light sources and the sealing system in the *in vitro* and *ex vitro* growth of the orchid *Shomburgkia crispa* Lindl. native to Mato Grosso do Sul. For the beginning of the experimental period, plants with 120 days of *in vitro* cultivation were subcultured in MS culture medium. The experimental design used was completely randomized in a 2x8 factorial scheme (two sealing systems; eight light conditions), with five replications. Each experimental unit consisted of a flask, containing four seedlings, half of the flasks closed in a conventional sealing system (SVC) and the other half in a gas exchange sealing system (SVTG). The light sources (FL) were also evaluated: FL1 - 100% white LED lamp; FL2- 100% blue LED lamp; FL3- 100% red LED lamp; FL4- LED lamp 50% white + 25% red + 25% blue; FL5- LED lamp 50% red + 50% blue; FL6- LED lamp 25% red + 75% blue; FL7- LED lamp 75% red + 25% blue. After 120 *in vitro* cultivation and after 180 days of *ex vitro* cultivation, the plants were evaluated for number of leaves, number of roots, plant height, diameter of the pseudobulb, number of shoots, length of the largest root, length of the largest leaf and total fresh mass. For *in vitro* growth, the use of SVTG in conjunction with light sources in the combination of blue and red wavelengths, in different proportions, favored the cultivation of *S. crispa*. For the *ex vitro* growth of this species, the *in vitro* cultivation in SVTG together with FL4, positively influenced the acclimatization of the plants.

**Keywords:** Light sources; Orchidaceae; Native species

## 1. INTRODUÇÃO

Orchidaceae é composta por um amplo número de gêneros e espécies sendo o segundo maior grupo entre as Angiospermas, distribuídas em todos os continentes, com maior concentração e diversidade nas regiões tropicais e subtropicais (BARROS et al., 2021b). No Brasil, são encontradas cerca de 2.772 espécies de orquídeas, sendo que 1.553 são endêmicas (FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO, 2021). Essas plantas destacam-se no setor de flores e plantas ornamentais, devido às combinações genéticas e exuberância de suas flores, além do apelo para fins alimentícios e farmacológicos (FARIA, 2010; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015; BELLOTO et al., 2017).

A *Schomburgkia crispa* Lindl. é uma espécie de hábito epifítico e encontrada tanto em florestas de galeria quanto em matas secas do Cerrado, inclusive no estado de Mato Grosso do Sul (OSTETTO, 2015; BARROS et al., 2021a). Morfologicamente, apresenta pseudobulbos bifoliados com comprimento de 8 à 10 cm, comprimento das folhas de 24 a 26 cm e largura de 5 a 7 cm. Suas inflorescências possuem, em média, de 95 a 110 cm, com flores, pétalas e sépalas castanho com margens amarelas e labelo na cor lilás (SORGATO et al., 2021b) (Figura 1). Em janeiro de 2017, a espécie foi incluída no apêndice II da CITES (CITES, 2017), onde se enquadram as espécies não necessariamente ameaçadas de extinção, mas cujo comércio deve ser controlado a fim de evitar usos incompatíveis com sua sobrevivência.



FIGURA 1. Plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. e seus aspectos florais e morfológicos. Foto: Sorgato, J. C. 2019.

Como alternativa para uma multiplicação rápida e eficiente de orquídeas, visando a pesquisa e a produção em escala comercial, bem como a conservação das espécies, utiliza-se técnicas de cultivo *in vitro* (CARDOSO, 2014; SORGATO et al., 2020; RIBEIRO et al., 2019; SOARES et al., 2020). Dentre as técnicas, destaca-se a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas, uma vez que, esse tipo de sementeira apresenta elevados percentuais de germinação quando comparada a germinação em condições naturais, a qual ocorre somente na presença de fungos micorrízicos (FARIA et al., 2012; SOARES et al., 2020). Nesse sentido, a produção de orquídeas por esse método é importante, pois possibilita um grande número de mudas em pequeno espaço físico, pouco tempo de cultivo com elevada qualidade sanitária (FARIA et al., 2012; CARDOSO, 2014a; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2017a).

Diversos fatores influenciam o crescimento e desenvolvimento do cultivo *in vitro*, dentre eles destaca-se o meio de cultivo, o sistema de vedação e a luz. Os meios de cultura devem suprir as necessidades das plantas quanto à nutrição mineral. Assim, pode haver mudanças nas formulações para atender às exigências de cada espécie cultivada *in vitro* (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013; SILVA et al., 2015).

Ainda, o sistema de vedação convencional propicia, dentro dos frascos de cultivo *in vitro*, alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas, fatores que colaboram para desordens anatômicas e metabólicas das plantas submetidas a esse sistema (SILVA et al., 2016). Diante disso, diferentes estratégias podem ser usadas na vedação, tais como a ventilação natural dos frascos (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

A tecnologia do diodo emissor de luz (LED – light-emitting diode) oferece inúmeras possibilidades na iluminação hortícola, devido à sua capacidade de misturar e separar diversos espectros de luz, permitindo ajustes de irradiância adequada aos fotorreceptores das plantas, além de reduzir o consumo de energia em salas de crescimento e gerar menos impacto ao ambiente (SINGH et al., 2015; LOCONSOLE et al., 2019). Além desses benefícios é possível regular parâmetros de plantas cultivadas *in vitro* como variações anatômicas, morfológicas e atributos fisiológicos como alongamento, formação de brotos axilares, rizogênese, anatomia foliar e habilidades fotossintéticas (GUPTA e JATOTHU, 2013).

Os protocolos de cultivo *in vitro* também podem influenciar a sobrevivência e o estabelecimento *ex vitro*. Assim, para o sucesso desse cultivo é importante garantir o

ajuste da planta à condição *ex vitro*, durante a aclimatização, uma vez que, essas plantas precisam completar seu autotrofismo após a transferência (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2017b).

Entretanto, ainda são poucos os estudos científicos sobre o sistema de vedação e a utilização de lâmpadas LEDs, como fonte de energia luminosa, no cultivo *in vitro* e sua influência na aclimatização de espécies nativas, tais como *S. crispa*. Dessa forma, objetivou-se avaliar o sistema de vedação e as fontes de luz no crescimento *in vitro* e *ex vitro* da orquídea *S. crispa* nativa do Mato Grosso do Sul.

## 2. MATERIAL E METODOS

### Condições gerais

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* de Flores e Plantas Ornamentais, da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

Como material de estudo, foram utilizados frutos maduros de *Shomburgkia crispa*, oriundos da polinização manual e provenientes de matrizes com mais de dez anos, cultivadas no Orquidário da Faculdade de Ciências Agrárias (22°11'53.2"S; 54°56'02.3"W). O orquidário é coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, propiciando irradiância de  $235 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sob condições médias de temperatura e umidade relativa de  $22,6 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $73,9 \pm 10\%$ , respectivamente. A irrigação foi realizada por microaspersores tipo bailarina, posicionados a um metro acima das plantas, totalizando uma lâmina de água de  $1 \text{ mm dia}^{-1}$ .

### Cultivo *in vitro* – 120 dias

Foi pesada uma amostra de 0,005 g de sementes e realizado teste de tetrazólio segundo metodologia de Soares et al. (2014). Após a confirmação da viabilidade, outra amostra de 0,005g de sementes foi levada para ambiente asséptico e desinfestada conforme metodologia descrita por Soares et al. (2020), para a obtenção da solução de sementes. Para a semeadura *in vitro*, inoculou-se 1,0 mL da suspensão de sementes desinfestadas por frasco de cultivo. Foram utilizados 60 mL de meio de cultura Murashige e Skoog (1962), na metade da concentração de sais (MS ½) por frasco com capacidade

para 600 mL. Em seguida, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ( $25\pm 2$  °C; 16 h) e irradiância de  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  propiciada por duas lâmpadas fluorescentes brancas (6.500K), permanecendo nessas condições por até 120 dias, sendo realizados três subcultivos.

Após esse período as plântulas foram padronizadas quanto ao tamanho (1,5 cm) e subcultivadas para início do período experimental. Foi utilizado o meio de cultura MS solidificado com  $7,0 \text{ g L}^{-1}$  de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e acrescido com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose. O pH do meio foi aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se KOH (0,1M) antes da esterilização em autoclave ( $121$  °C e 1,1 atm de pressão), por 20 minutos e, distribuídos 60 mL do meio em frascos com capacidade para 600 mL, sendo inoculadas em ambiente asséptico quatro plântulas por frasco de cultivo. Na sequência, metade dos frascos foi vedada hermeticamente com filme de policloreto de vinila (PVC) (sistema de vedação convencional – SVC) e a outra metade com PVC com filtro de algodão (sistema de vedação permitindo trocas gasosas - SVTG).

As culturas, então, foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ( $25\pm 2$ °C; 16h), sob as seguintes fontes de luz: FL1 - lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha; FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25%azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul e como controle FL8- lâmpada fluorescente branca (Figura 2).

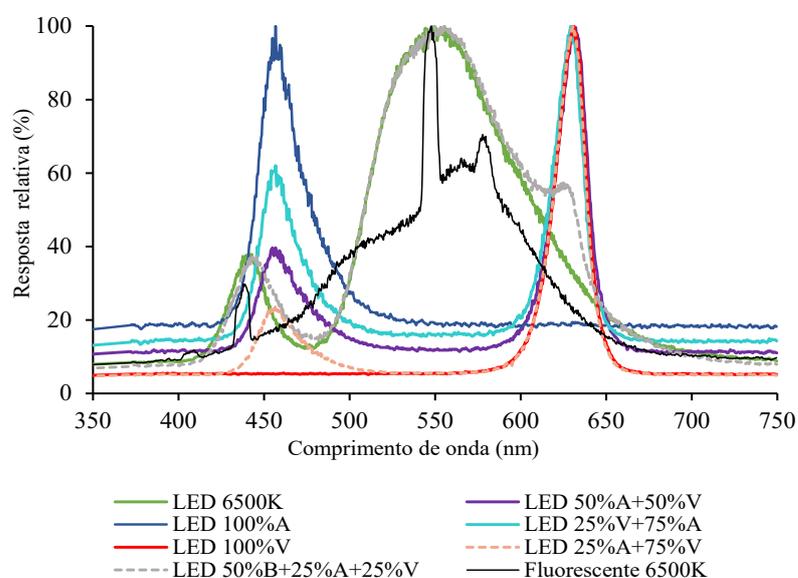


FIGURA 2. Distribuição espectral de energia relacionada aos LEDs e a lâmpada fluorescente. UFGD, Dourados-MS. 2021.

As medidas de distribuição espectral foram realizadas no espectrômetro portátil Ocean Optics (Modelo MMO com fibra ótica), a temperatura ambiente com tempo de integração de 10 ms.

Após 120 dias de cultivo, os frascos foram retirados da sala de crescimento, abertos e as plântulas removidas e lavadas em água corrente até total remoção do meio de cultivo, sendo avaliadas, com auxílio de paquímetro digital e balança de precisão, quanto às seguintes características: sobrevivência (%SOB), número de folhas (NF), número de raízes (NR), altura da planta (AP) (mm), comprimento da maior folha (CF) (mm), comprimento da maior raiz (CR) (mm) e massa fresca (MFT) (g). Após as avaliações, as plântulas foram fotografadas com câmera acoplada em mini estúdio fotográfico.

### **Cultivo *ex vitro* – 180 dias**

Para a avaliação do crescimento *ex vitro*, as plantas foram transferidas para recipientes descartáveis de polipropileno transparente com capacidade para 1000 mL (20 x 10 x 5 cm), providos de furos na tampa, para trocas gasosas, e na base para drenagem do substrato, sendo  $\frac{1}{3}$  de seu volume preenchido com esfagno rosa (Agrolink, Holambra-SP) + fibra de coco (Golden-Mix Chips, Amafibra) (1:1, v:v<sup>-1</sup>).

Após o transplantio, foram acondicionadas em viveiro telado, permanecendo por 180 dias nas mesmas condições citadas para plantas matrizes, sendo que nos primeiros 15 dias os recipientes permaneceram com as tampas fechadas a fim de minimizar o estresse proporcionado pela mudança de ambiente (*in vitro* para *ex vitro*), e após esse período os mesmos foram abertos. A irrigação durante o período experimental foi realizada por micro aspersores tipo bailarina, posicionados a um metro acima das plantas, totalizando uma lâmina de água de 1 mm dia<sup>-1</sup>.

Foram realizadas adubações, via foliar, a cada 15 dias, com 2,0 mL L<sup>-1</sup> de NPK 10-10-10, acrescido dos micronutrientes: 0,025% de magnésio, 0,02% de boro, 0,05% de cobre, 0,10% de ferro, 0,05% de manganês, 0,0005% de molibdênio e 0,05% de zinco, com teor máximo de cloro de 0,025%. Aos zero, 30 e 60 dias as plantas foram desinfestadas, preventivamente, com O-S-dimetil-N-acetil-fosforamidotioato (4 mg L<sup>-1</sup>) e Mancozeb (4 mg L<sup>-1</sup>). Tanto para a adubação foliar, quanto para a desinfestação, foi utilizado pulverizador costal com capacidade para 5 L.

Após esse período, as plantas foram retiradas dos recipientes e lavadas em água corrente até total remoção do substrato. Em seguida, foram avaliadas quanto às mesmas características iniciais (NF, AP, NR, CR, CF, MFT e %SOB).

Com intuito de investigar a hipótese de aumento no crescimento das plantas durante a fase *ex vitro*, de acordo com os tratamentos a que foram inicialmente expostas, foram calculados seus incrementos (I) em relação aos valores iniciais por meio da expressão  $I = (VF - VI)$ , onde VI é o valor da característica antes da planta ser aclimatizada e VF é o valor da mesma variável após o período *ex vitro*, sendo seus valores expressos em porcentagem e submetidos à análise de variância.

### **Desenho experimental e análises estatísticas**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x8 (dois sistemas de vedação; oito condições de luz), com cinco repetições sendo que cada unidade experimental foi constituída de um frasco, contendo quatro plântulas. Os dados de sistema de vedação foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de F e os dados de condição de luz pelo Teste Scott-Knott, ao nível de 5 % de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3 Universidade Federal de Lavras, MG) (FERREIRA, 2011).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Crescimento *in vitro* – 120 dias**

Houve efeito isolado das fontes de luz e do sistema de vedação sobre número de folhas (NF) e número de raízes (NR). Foi observado efeito significativo da interação entre fontes de luz x sistema de vedação para as características altura de planta (AP), comprimento da maior folha (CF), comprimento da maior raiz (CR), massa fresca total (MFT) e porcentagem de sobrevivência (%SOB) aos quatro meses de cultivo *in vitro* (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo da análise de variância do número de folhas (NF), número de raízes (NR), altura de planta (AP mm), comprimento da maior folha (CF mm),

comprimento da maior raiz (CR mm), massa fresca total (MFT) (g) e porcentagem de sobrevivência (%SOB) de *Schomburgkia crisper* Lindl. em diferentes fontes de luz e sistema de vedação aos 4 meses de cultivo. UFGD, Dourados-MS, 2021.

F. V.	GL	.....Quadrado médio .....						
		NF	NR	AP	CF	CR	MFT	%SOB
Luz	7	297,06*	30,50*	394,66*	253,54*	801,23*	0,25ns	52,04*
Vedação	1	346,69*	56,33*	1969,15*	2454,88*	1291,90*	0,84*	52,04*
L x V	7	66,59ns	12,57ns	871,02*	782,83*	1180,22*	0,63*	52,04*
Erro	165	49,99	8,34	165,69	117,45	197,86	0,12	0,11
Total	191	11783,25	1826,31	40327,31	30566,82	50801,41	28,08	800,63
Média Geral		12,81	7,09	37,88	26,56	38,79	0,64	99,48
C.V. (%)		24,26	18,69	16,64	20,19	17,65	14,47	0,18

\*, ns; significativo e não significativo, pelo teste de F a 5% de probabilidade.

GL.: grau de liberdade. F.V: fator de variação. L: Luz. V: vedação.

Para o efeito isolado das fontes de luz sobre a variável NF, plantas de *S. crisper* quando cultivadas em FL7, apresentaram maior número de folhas (18,67), porém sem diferença significativa de FL8 e FL6 com médias de 16,17 e 14,46 folhas, respectivamente (Figura 3). Quanto ao sistema de vedação, as plantas quando cultivadas sob o SVC apresentaram o maior NF com 14,16 folhas. O maior NR (8,71) ocorreu quando as plantas foram submetidas à lâmpada LED 100% branca, apresentando média de 8,71 raízes, porém sem diferença significativa de FL8 e FL7 com 7,88 e 8,33 respectivamente. O NR foi maior nas plantas cultivadas em sistema de vedação convencional com médias de 7,64 raízes (Figura 3).

Neste trabalho *S. crisper* apresentou aumento tanto no número de folhas quanto no número de raízes quando cultivada sob lâmpadas que contem em sua composição o comprimento de onda vermelho em até 75%. Hung et al. (2016) relatam que o comprimento de onda presente na luz vermelha é responsável por promover o crescimento foliar, alterações anatômicas e acúmulo de carboidratos do material vegetal. No entanto, outros autores ressaltam que, cada espécie cultivada reage de uma maneira diferente à condição de luz fornecida e isso afeta diretamente o crescimento e desenvolvimento da planta (KURILCIK et al., 2008; TAIZ et al., 2017).

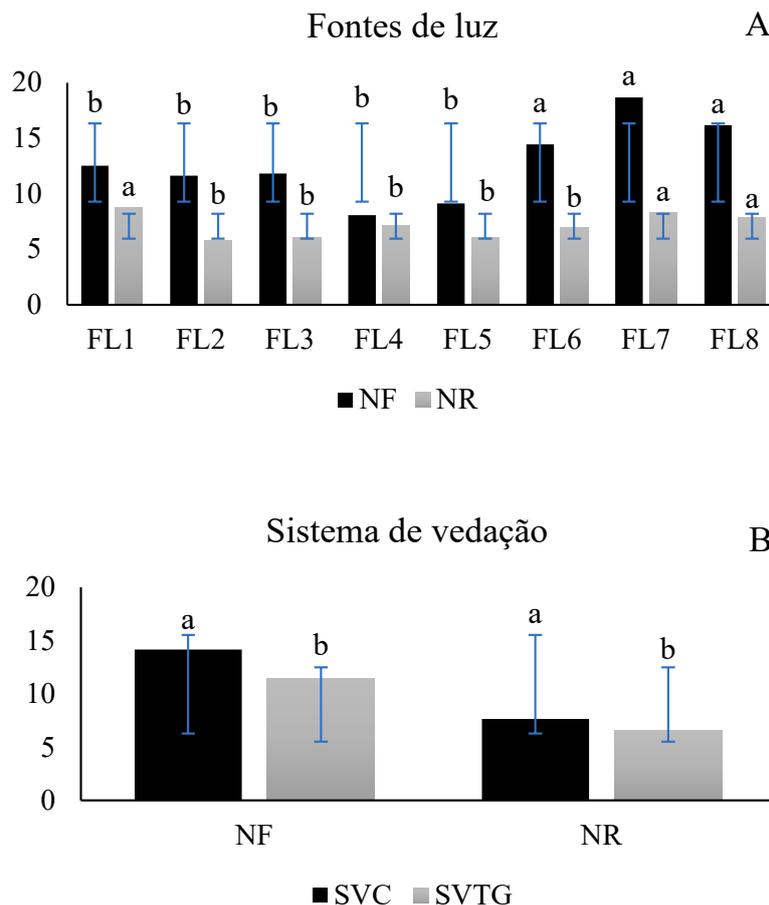


FIGURA 3. Número de folhas (NF) e número de raízes (NR), de *Schomburgkia crispata* Lindl. em função: A) das diferentes fontes de luz e B) do sistema de vedação após 4 meses de cultivo *in vitro*. FL1- lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha; FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25% azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul e como controle FL8- lâmpada fluorescente branca; SVC = sistema de vedação convencional; SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas. Letras iguais são diferentes entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) (A) e teste F ( $p < 0,05$ ) (B).

Tanto o maior NR quanto o NF foram observados quando foi utilizado o SVC, uma vez que, as condições estabelecidas por esse sistema estão relacionadas com o perfilhamento das plantas, influenciado pelo maior número de brotações (RIBEIRO et al., 2019). Resultado semelhante foi observado no trabalho de Freitas (2019), para a espécie *Cattleya nobilior* Rchb.f. cultivada *in vitro*, onde apresentou maior número de folhas e massa fresca de plantas cultivadas sob sistema convencional, devido ao perfilhamento destas. Esse sistema interfere nas trocas gasosas, visto que a vedação hermética dos frascos resulta num aumento do CO<sub>2</sub> e gás etileno, e isso pode ocasionar alterações

fisiológicas das plantas, crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos vegetais (SILVA et al., 2014; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2017a).

Para a interação entre as fontes de luz e os sistemas de vedação, as plantas cultivadas em SVTG e submetidas à FL6 apresentaram maior AP (54,37 mm) sem diferença significativa da FL7 (47,01 mm). As plantas de *S. crispata* apresentaram maior CF (40,51 mm) quando cultivadas em FL6 com a utilização do SVTG, no entanto sem diferença significativa para FL5 e FL7 com (32,54) e (35,85) respectivamente. Com relação ao CR (57,14 mm) as maiores médias foram observadas quando as plantas foram cultivadas sob a FL4 utilizando o SVC (Quadro 2).

QUADRO 2. Altura de planta (AP mm), comprimento da maior folha (CF mm) e comprimento da maior raiz (CR mm), de *Schomburgkia crispata* Lindl. em função do sistema de vedação (SVC = sistema de vedação convencional; SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas) e diferentes fontes de luz após 4 meses de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2021.

Frasco	AP		CF		CR	
	SVC	SVTG	SVC	SVTG	SVC	SVTG
FL1	29,48 bB	40,88 bA	19,63 bA	28,46 bA	34,35 bA	44,82 aA
FL2	35,93 bA	38,64 bA	23,89 bA	28,83 bA	28,38 bA	30,84 bA
FL3	33,57 bB	40,67 bA	18,91 bB	28,06 bA	31,78 bA	31,48 bA
FL4	50,45 aA	30,12 bB	39,58 aA	20,40 bB	57,14 aA	32,13 bB
FL5	28,88 bB	42,95 bA	19,73 bB	32,54 aA	27,93 bB	50,38 aA
FL6	34,62 bB	54,37 aA	21,83 bB	40,51 aA	39,02 bB	52,48 aA
FL7	35,70 bB	47,01 aA	22,23 bB	35,85 aA	37,17 bA	47,64 aA
FL8	28,83 bA	34,05 bA	18,03 bA	26,42 bA	33,77 bA	41,27 aA
Média Geral	34,68	41,09	22,98	30,13	36,19	41,38
C.V. (%)	16,64		20,19		17,65	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro das variáveis, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott e teste F respectivamente ( $p \geq 0,05$ ). SVC: sistema de vedação convencional; SVTG: sistema de vedação com trocas gasosas. FL1 - lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha; FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25%azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul e como controle FL8- lâmpada fluorescente branca.

Os maiores valores de MF (0,999 g) foram observados quando as plantas foram cultivadas sob FL1 utilizando o SVTG, embora sem diferença significativa para o tratamento FL6 (0,939 g). Quanto à porcentagem de sobrevivência todos os tratamentos demonstraram resultados satisfatórios com 100% de sobrevivência, no entanto a FL5 sob SVTG que apresentou 91,67% de plantas vivas (Quadro 3).

QUADRO 3. Massa fresca total (MFT) (g) e porcentagem de sobrevivência (%SOB) de *Schomburgkia crispa* Lindl. em função do sistema de vedação (SVC = sistema de vedação convencional; SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas) e diferentes fontes de luz após 4 meses de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2021.

Frasco	MFT		%SOB	
	SVC	SVTG	SVC	SVTG
FL1	0,488 bB	0,999 aA	100,00 aA	100,00 aA
FL2	0,381 bA	0,586 bA	100,00 aA	100,00 aA
FL3	0,733 aA	0,584 bA	100,00 aA	100,00 aA
FL4	0,960 aA	0,431 bB	100,00 aA	100,00 aA
FL5	0,404 bA	0,681 bA	100,00 aA	91,67 bB
FL6	0,630 bB	0,939 aA	100,00 aA	100,00 aA
FL7	0,491 bA	0,704 bA	100,00 aA	100,00 aA
FL8	0,498 bA	0,718 bA	100,00 aA	100,00 aA
Média Geral	0,573	0,705	100,00	98,96
C.V. (%)	14,47		0,18	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro das variáveis, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott e teste F respectivamente ( $p \geq 0,05$ ). SVC: sistema de vedação convencional; SVTG: sistema de vedação com trocas gasosas. FL1- lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha; FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25%azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul e como controle FL8- lâmpada fluorescente branca.

Ao observar os resultados encontrados nessa pesquisa, de maneira geral o SVTG e a fonte de luz FL6 foram benéficos para a sobrevivência e o crescimento *in vitro* de *S. crispa*.

Este fato pode estar relacionado com a utilização do SVTG, uma vez que, esse sistema permite trocas gasosas entre o meio interno e o externo do frasco, o que resulta numa diminuição do acúmulo de gás etileno e CO<sub>2</sub>, contribuindo para o crescimento da planta durante o cultivo *in vitro* (SILVA et al., 2016).

Além disso, de acordo com Silva et al. (2014), as condições de trocas gasosas no cultivo *in vitro* de plantas permitem um cultivo aproximado do fotoautotrófico, promovendo mudanças nos tecidos favorecendo o crescimento dos órgãos vegetais.

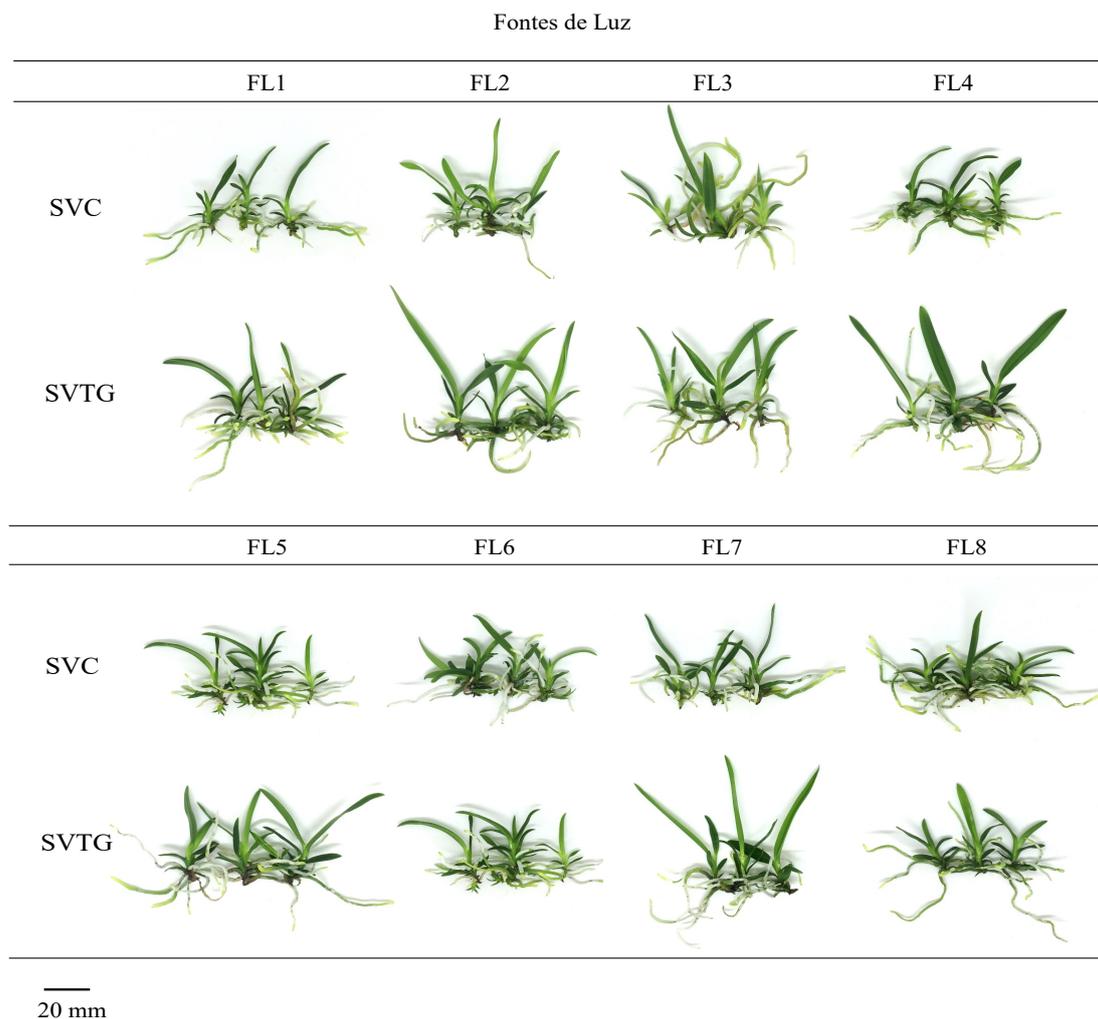
Quanto às fontes de luz os melhores resultados observados nas combinações entre azul e vermelho podem estar relacionados, à capacidade desses comprimentos de onda desenvolverem melhor excitação dos fotorreceptores (fitocromos, fototropinas e criptocromos) aumentando a atividade fotossintética (DOU et al., 2017). Ainda, a maior

proporção do comprimento de onda azul em relação ao vermelho (3:1), absorvida por fototropina e criptocromos, pode estar associada à expansão foliar, uma vez que a fototropina está relacionada a esta função (MACEDO et al. 2011; CUNHA et al., 2019).

Taiz et al. (2017) relatam que a qualidade de luz fornecida ao material vegetal é considerada importante pois possui a função de regular a morfogênese e o crescimento da planta. Contudo, a luz branca é uma mistura de baixas intensidades de luzes vermelhas e azuis e outros comprimentos de onda de luz de baixa eficiência (CUNHA et al., 2019), isso pode estar relacionado com os maiores valores serem observados nos tratamentos de luz branca e nas combinações de azul e vermelho.

Os resultados encontrados nesse trabalho evidenciam que a condição de luz da sala de cultivo para as espécies de Orchidaceae são, além de espécie específicas, também relacionadas à fase de desenvolvimento do vegetal, uma vez que, os resultados encontrados na literatura divergem de acordo com o estágio das plântulas utilizadas (FREITAS, 2019; SORGATO et al, 2021a).

A variação nos aspectos morfológicos das plantas em função dos sistemas de vedação e das irradiâncias pode ser visualizada na Figura 4. Como pode ser observado visualmente, que as plantas cultivadas em SVC aparentam ser menores do que aquelas cultivadas sob o SVTG, as quais apresentam maior comprimento, além de folhas e raízes mais desenvolvidas.



**FIGURA 4.** Plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl., com 120 dias de cultivo *in vitro* em função das fontes de luz e sistema de vedação. FL1- lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha; FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25%azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul e como controle FL8- lâmpada fluorescente branca. SVC = sistema de vedação convencional; SVTG = sistema de vedação com troca gasosa.

### Crescimento *ex vitro* - 6 meses

Para os 180 dias de cultivo *ex vitro* de *S. crispa*, houve interação entre as condições de luz e o sistema de vedação previamente utilizadas no cultivo *in vitro* ( $p < 0,05$ ) para todas as características avaliadas (Quadro 6).

QUADRO 6. Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência (%SOB) número de folhas (NF), número de raízes (NR), altura de planta (AP mm), comprimento da maior folha (CF mm), comprimento da maior raiz (CR mm) e massa fresca total (MFT) (g) de *Schomburgkia crispera* Lindl. em diferentes fontes de luz e sistema de vedação após 180 dias de cultivo *ex vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2021.

F.V.	GL	.....Quadrado médio .....						
		%SOB	NF	NR	AP	CF	CR	MFT
L	7	10327,65*	30,59*	29,23*	2485,98*	1002,09*	1510,63*	1,038*
V	1	29997,00*	109,51*	48,00*	9530,76*	8489,79*	5511,05*	3,08*
L x V	7	22738,90*	91,55*	79,37*	4479,38*	3469,33*	3421,42*	2,19*
Erro	165	0,64	3,94	3,87	146,99	101,48	161,33	0,13
Total	191	261576,9	1675,12	1532,67	89204,66	59241,32	70552,09	49,89
Média Geral		73,96	3,57	3,58	28,42	21,57	23,92	0,5
C.V. (%)		1,08	22,28	22,2	26,38	27,9	29,79	11,01

\*, ns; significativo e não significativo, pelo teste de F a 5% de probabilidade.

GL.: grau de liberdade. F.V: fator de variação. L: Luz. V: vedação.

Quanto à %SOB os melhores resultados foram observados quando as plantas foram previamente cultivadas sob sistema SVTG sob as fontes de luz FL1, FL3, FL4, FL5, FL6, FL8 proporcionando 100% de sobrevivência (Quadro 7).

QUADRO 7. Incrementos (%) porcentagem de sobrevivência (%SOB), de *Schomburgkia crispera* Lindl. em função do sistema de vedação (SVC = sistema de vedação convencional; SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas) e diferentes fontes de luz após 6 meses de cultivo *ex vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2021.

Frasco	%SOB	
	SVC	SVTG
FL1	100,00 aA	100,00 aA
FL2	100,00 aA	8,33 cB
FL3	66,67 bB	100,00 aA
FL4	58,33 cB	100,00 aA
FL5	100,00 aA	100,00 aA
FL6	0,00 dB	100,00 aA
FL7	66,67 bB	83,33 bA
FL8	0,00 dB	100,00 aA
M. G.	61,46	86,46
C.V. (%)	1,08	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro das variáveis, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott e teste F respectivamente ( $p \geq 0,05$ ). SVC: sistema de vedação convencional; SVTG: sistema de vedação com trocas gasosas. FL1 - lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha;

FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25%azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul e como controle FL8- lâmpada fluorescente branca.

Ao final do período experimental *ex vitro*, os maiores valores de AP foram encontrados quando foi previamente utilizado o SVTG em conjunto com a fonte de luz FL4 apresentando 62,48% de incremento. Para o NF, foram observados incrementos superiores em SVTG sob LED branca (FL1) apresentando 6,17%, diferindo somente de FL2 (0,17%) e FL7 (1,75%). Com relação ao NR foi observada a maior porcentagem de incremento (6,50%) quando as plantas foram previamente submetidas à SVC + FL2. (Quadro 8).

QUADRO 8. Incrementos (%) em altura de planta (AP mm), de número de folhas (NF) e número de raízes (NR), de *Schomburgkia crisper* Lindl. em função do sistema de vedação (SVC = sistema de vedação convencional; SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas) e diferentes fontes de luz após 6 meses de cultivo *ex vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2021.

Frasco	AP		NF		NR	
	SVC	SVTG	SVC	SVTG	SVC	SVTG
FL1	36,73 aA	27,77 cA	5,25 aA	6,17 aA	4,83 bA	5,83 aA
FL2	38,69 aA	2,28 dB	5,41 aA	0,17 bB	6,50 aA	0,33 cB
FL3	14,03 cB	43,96 bA	2,42 cB	5,25 aA	3,08 cB	3,74 aA
FL4	17,47 cB	62,48 aA	1,00 dB	6,08 aA	2,67 cB	5,25 aA
FL5	38,15 aB	49,12 bA	5,08 aA	4,25 aA	4,92 bA	4,92 aA
FL6	0,00 dB	39,43 bA	0,00 dB	5,42 aA	0,00 dB	5,83 aA
FL7	25,94 bA	30,61 cA	3,33 bA	1,75 bA	2,67 cA	2,25 bA
FL8	0,00 dB	28,10 cA	0,00 dB	5,50 aA	0,00 dB	4,50 aA
M. G.	21,4	35,47	2,81	4,32	3,08	4,08
C.V. (%)	26,38		22,28		22,20	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro das variáveis, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott e teste F respectivamente ( $p \geq 0,05$ ). SVC: sistema de vedação convencional; SVTG: sistema de vedação com trocas gasosas. FL1- lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha; FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25%azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul e como controle FL8- lâmpada fluorescente branca.

Para CF os maiores resultados *ex vitro* foram constatados com o cultivo prévio sob SVTG + FL4 (49,74%). Com relação ao CR os maiores valores foram observados após o cultivo *in vitro* sob SVTG sob FL4 com 45,23%, sem diferença significativa de FL3 (35,22%), FL5 (38,78%) e FL6 (39,21%) no mesmo sistema de vedação. Para a MFT

os maiores resultados foram verificados com a utilização de SVTG + FL4 (1,11%), sem diferença significativa para FL6, no mesmo sistema de vedação (1,06%) (Quadro 9).

QUADRO 9. Incrementos (%) da maior folha (CF), do comprimento da maior raiz (CR) e da massa fresca total (MFT) de *Schomburgkia crispa* Lindl. em função do sistema de vedação (SVC = sistema de vedação convencional; SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas) e diferentes fontes de luz após 6 meses de cultivo *ex vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2021.

Frasco	CF		CR		MFT	
	SVC	SVTG	SVC	SVTG	SVC	SVTG
FL1	29,87 aA	22,42 cA	41,03 aA	27,90 bB	0,90 aA	0,73 bA
FL2	30,35 aA	0,70 dB	33,87 aA	1,67 dB	0,85 aA	0,02 cB
FL3	11,33 cB	38,90 bA	14,99 cB	35,22 aA	0,17 cB	0,64 bA
FL4	7,78 cB	49,74 aA	17,68 cB	45,23 aA	0,28 cB	1,11 aA
FL5	23,80 aB	34,00 bA	25,56 bB	38,72 aA	0,55 bA	0,75 bA
FL6	0,00 dB	36,32 bA	0,00 dB	39,21 aA	0,00 cB	1,06 aA
FL7	16,25 bA	19,81 cA	15,37 cA	17,71 cA	0,26 cA	0,19 cA
FL8	0,00 dB	23,89 cA	0,00 dB	28,58 bA	0,00 cB	0,54 bA
M. G.	14,92	28,22	18,56	29,28	0,38	0,63
C.V. (%)	27,90		29,79		11,01	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro das variáveis, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott e teste F respectivamente ( $p \geq 0,05$ ). SVC: sistema de vedação convencional; SVTG: sistema de vedação com trocas gasosas. FL1 - lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha; FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25%azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul e como controle FL8- lâmpada fluorescente branca.

Os resultados para o crescimento e estabelecimento *ex vitro* de *S. crispa*, de maneira geral, demonstraram que quando previamente utilizado o SVTG e a fonte de luz FL4 todas características obtiveram o melhor desempenho.

Essas características de crescimento podem estar relacionadas com a maior aeração que o SVTG permite. Esses resultados corroboram com os de Silva et al. (2014) e com os de Ribeiro et al. (2019) onde plantas de *Cattleya walkeriana* Gardner e Denphal, respectivamente, quando cultivadas com tampas que permitiam trocas gasosas apresentaram, quando transferidas para ambiente *ex vitro*, atributos de crescimento superiores àquelas cultivadas em ambiente hermético.

Além disso, os resultados deste trabalho sugerem que a utilização do SVTG em conjunto com a utilização da mistura de luz LED branca + azul e vermelho, podem ter proporcionado condições que favoreceram o crescimento *ex vitro* de *S. crispa*, uma vez que esses tratamentos podem ter influenciado a fisiologia da planta para que esta iniciasse

sua rustificação ainda no cultivo *in vitro*, resultando no melhor desempenho no cultivo *ex vitro*. Silva et al. (2016) explicam que os benefícios do cultivo em SVTG, são decorrentes da diminuição da umidade *in vitro* e aumento da aeração, proporcionando posterior rusticidade para as plantas quando transferidas para a condição *ex vitro*.

Lazzarini et al. (2017), relatam ainda que, nas plantas, a absorção de luz azul e vermelha emitidas por lâmpadas LED, está em torno de 90% da luz emitida, indicando que o desenvolvimento das plantas e a sua fisiologia são fortemente influenciados por esses comprimentos de onda específicos. Assim, tanto a luz vermelha, quanto a luz azul podem ser efetivas na indução de respostas fotomorfogênicas tal como ocorreu nas plantas de *S. crispa*.

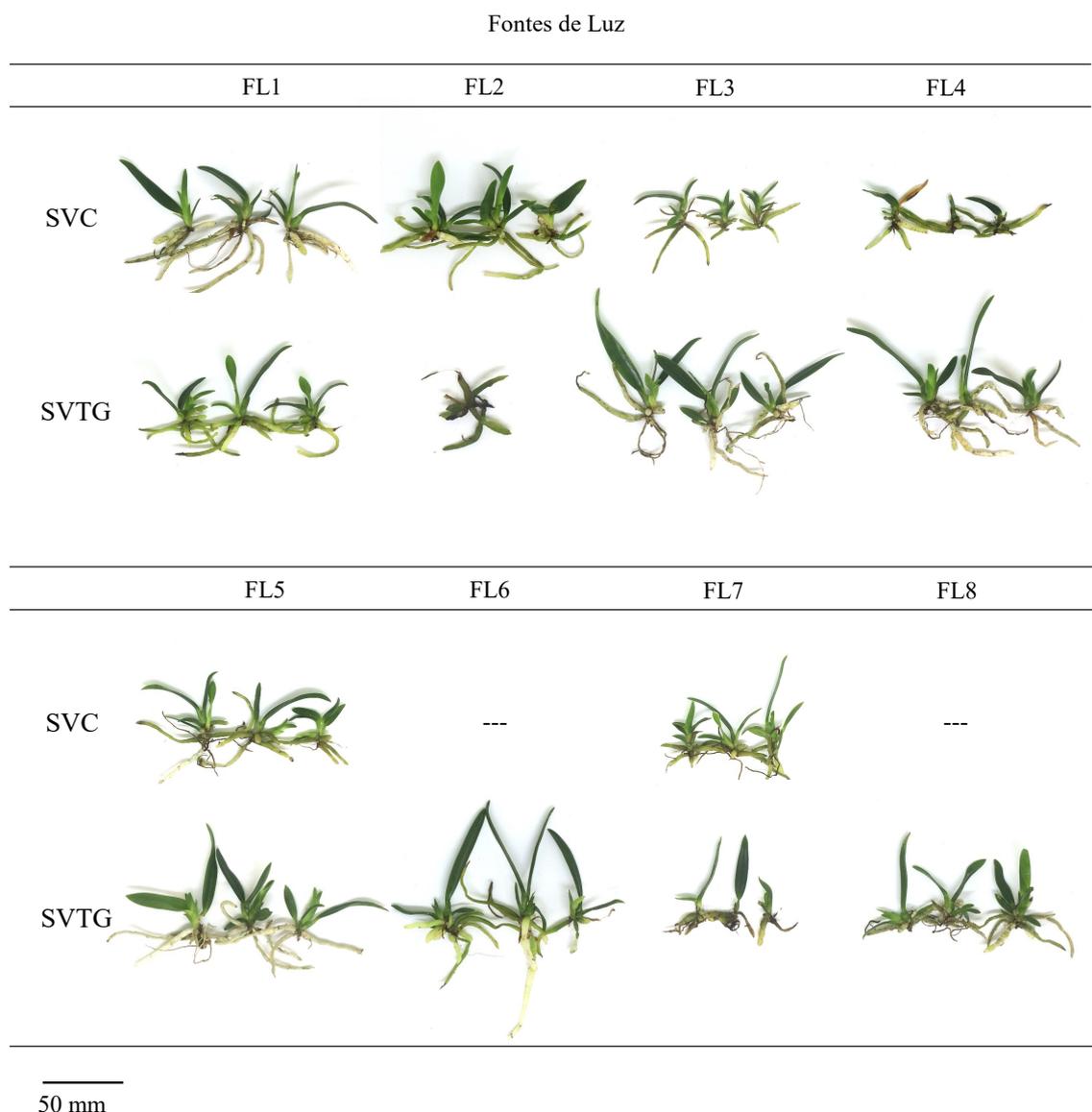
Além disso, as plantas necessitam de amplo espectro luminoso para otimizar os processos fotossintéticos, e essa necessidade varia com a espécie vegetal. Para *S. crispa*, os maiores resultados encontrados, demonstram que além da utilização dos LEDs azul e vermelho, a adição de LED branco contribuiu para o crescimento *ex vitro* das plantas. O LED branco (460 – 560nm) apresenta em seu espectro uma maior proporção de azul e verde e menor relação vermelho e vermelho extremo quando comparado as lâmpadas fluorescentes (FRASZCZAK et al., 2014). A utilização desse LED nos cultivos pode aumentar o crescimento das plantas, uma vez que, permite que a luz penetre melhor nas folhas, do que as luzes monocromáticas azul e vermelha, como observado para *Lactuca sativa* hidropônica (LIN et al., 2013).

As pesquisas com LED evidenciam que os vegetais necessitam de amplo espectro luminoso para otimizar os processos fotossintéticos, sendo que essa necessidade pode variar de acordo com a espécie cultivada. Com base nos resultados obtidos para *S. crispa*, pode se observar que a combinação dos comprimentos de onda azul e vermelho foram benéficos para o cultivo *in vitro*, porém para o crescimento e estabelecimento *ex vitro* dessas plantas é necessário o cultivo em LED branco associado ao vermelho e azul. Sendo assim, é necessário um incentivo maior nos estudos com as espécies ornamentais e a utilização de LEDs, uma vez que, a utilização dessa tecnologia tem promovido benefícios em vários aspectos fisiológicos das plantas cultivadas.

Esta afirmativa é ainda mais importante em estudos com espécies nativas, pois as novas tecnologias utilizadas na produção de flores e plantas ornamentais requerem o aprimoramento das técnicas e melhores condições de cultivo *in vitro*, que são ferramentas biotecnológicas essenciais na produção e propagação de plantas, uma vez que, busca-se na horticultura ornamental a obtenção de mudas de melhor qualidade e produção em larga

escala em menor tempo, visando tanto a comercialização, quanto a conservação dessas espécies.

Ao observar a Figura 4, pode-se notar que as condições de cultivo *in vitro* foram limitantes para o crescimento das plantas durante o período *ex vitro*. De maneira geral, o SVTG apresentou os maiores resultados em quase todos os parâmetros avaliados, permitindo inferir que esse sistema de vedação pode ser o apropriado para o cultivo dessa espécie.



**FIGURA 5.** Plantas de *Schomburgkia crispata* Lindl., com 180 dias de cultivo *ex vitro* em função das fontes de luz e sistema de vedação. FL1- lâmpada LED 100% branca; FL2- lâmpada LED 100% azul; FL3- lâmpada LED 100% vermelha; FL4- lâmpada LED 50% branca + 25% vermelha + 25%azul; FL5- lâmpada LED 50% vermelha + 50% azul; FL6- lâmpada LED 25% vermelha + 75% azul; FL7- lâmpada LED 75% vermelha + 25% azul e como controle FL8-

lâmpada fluorescente branca. SVC = sistema de vedação convencional; SVTG = sistema de vedação com troca gasosa.

#### 4. CONCLUSÃO

Para o crescimento *in vitro*, a utilização do sistema que permite trocas gasosas em conjunto com fontes de luz na combinação dos comprimentos de onda azul e vermelho, em diferentes proporções, favorece o cultivo de *Shomburgkia crispa*.

Para o crescimento *ex vitro* dessa espécie, o prévio cultivo *in vitro* em sistema que permite trocas gasosas em conjunto com LED 50% branco + 25% vermelho + 25% azul, influencia positivamente a aclimatização das plantas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, F.; HALL, C. F.; PAIVA NETO, V. B.; BATISTA, J. A. N. Check-list das Orchidaceae do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, v. 73, p. 287-296, 2021a.

BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W. MENINI NETO, L.; FURTADO, S. G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C. O.; GUIMARÃES, L. R. S. Orchidaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2021b. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>. Acesso em: 22 jan. 2021.

BELLOTO, C. A.; SOUZA, G. K.; PERIN, P. C.; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O.; CHIAVELLI, L. U. R.; GARCIA, F. P.; KAPLUM, V.; RODRIGUES, J. H. S.; SCARIOT, D. B.; DELVECCHIO, R.; MACHADO-FERREIRA, E.; AGUIAR, R. S.; SOARES, C. A. G.; NAKAMURA, C. V.; POMINI, A. M. Crispoic acid, a new compound from *Laelia marginata* (Orchidaceae), and biological evaluations against parasites, human cancer cell lines and Zika virus, **Natural Product Research**, Londres, v. 31, n. 1, p.1-6, 2017.

CARDOSO, J. C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 383-384, 2014.

CITES – **Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora**. Apêndice II, 2017. Acesso em: 20 Fev. 2019.

CUNHA, S. H. B.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; ROCHA, T. T.; PINTO, J. E. B. P. Influência da qualidade de luz no crescimento e acúmulo de voláteis de *Mentha spicata* cultivada *in vitro*. **Scientia Plena**, v. 15, p. 090-201, 2019.

DOU, H.; NIU, G.; GU, M.; MASABNI, J. Effects of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. **Horticulture**, v. 3, n. 2, p. 36, 2017.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de orquídeas**. Londrina: Mecenias, 2010. 208 p.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenias, 2012. 124 p.

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

FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: [www.floradobrasil.jbrj.gov.br/](http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/). Acesso em: 18 fev. 2021.

FRASZCZAK, B.; GOLEZ, A.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R.; JANOWSKA. Growth rate of sweet basil and lemon balm plants grown under fluorescent lamps and led modules. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 13, n. 2, p. 3-13, 2014.

FREITAS, K. G.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. Crescimento *in vitro* de *Cattleya nobilior* rchb.f.: meios de cultura, sistema de micropropagação e irradiância. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, e. 67131, 2021.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVAN, C.; CASSANO, A. O.; LEMOS, E. G. M. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violaceae* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 127-134, 2013.

GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, p. 211-220, 2013.

HUNG, C. D.; HONG, C. H.; KIM, S. K.; LEE, K. H.; PARK, J. Y.; NAM, M. W.; CHOI, D. H.; LEE, H. I. LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 6, p. 152, 2016.

KURILCIK, A.; CANOVA, M. R.; DAPKUNIENE, S.; ZILINSKAITE, S.; KURILCIK, G.; TAMULAITIS, G.; DUCHOVSKIS, P.; ZUKAUSKAS, A. Cultura *in vitro* de mudas de *criântemso* usando diodos emissores de luz. **Central European Journal of Biology**, v.3, p. 161-167, 2008.

LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; COELHO, A. D.; MEDEIROS, A. P. R.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; SOARES, J. D. R. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas – Revisão. **Scientia Agraria**, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017.

LIN, K. H.; HUANG, M. Y.; HUANG, W. D.; HSU, M. H.; YANG, Z. W.; YANG, C. M. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86-91, 2013.

LOCONSOLE, D.; COCETTA, G.; SANTORO, P.; FERRANTE, A. Optimization of LED Lighting and Quality Evaluation of Romaine Lettuce Grown in An Innovative Indoor Cultivation System. **Sustainability**, v. 11, p. 841, 2019.

MACEDO, A. F.; Leal-Costa, M. V.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S.; ESQUIBEL, M. A. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 43-50, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OSTETTO, S. **Orquídeas de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: Alvorada, 2015. 141 p.

- RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SCALON, S. P. Q.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, I. S. Influência da luz, ventilação natural e tamanho do frasco no crescimento e desenvolvimento de Denphal (Orchidaceae). **Ciências Agrárias**, v. 14, n. 3, 2019.
- SANTOS, G. C.; CARDOSO, F. P.; MARTINS, A. D.; PASQUAL, M.; OSSANI, P. C.; QUEIROZ, J. M.; REZENDE, R. A. L. S.; DÓRIA, J. Effect of light and sucrose on photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of *Physalis angulate*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 4, p. 1353-1367, 2020.
- SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya Walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, v. 61, n. 6, p. 883-890, 2014.
- SILVA, J. A.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant cell reports**, v. 34, p. 1685-1706, 2015.
- SILVA, A. B.; REIS, C. O.; CAZETTA, J. O.; CARLIN, S. D.; LANDGRAF, P. R. C.; REIS, M. C. Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the *in vitro* growth of orchids. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 3, p. 619-626, 2016.
- SINGH, D.; BASU, C.; MEINHARDT, M. W.; ROTH, B. LEDs for energy efficient greenhouse lighting. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 139-147, 2015.
- SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; TATARA, M. B.; SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2275-2284, 2014.
- SOARES, J. S.; SORGATO, J. C.; RIBEIRO, L. M. Protocol for asymbiotic germination and initial protocorm development of Brazilian Cerrado native orchids. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.
- SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; DAMIANI, C. R.; RIBEIRO, L. M. Effects of light, agar, activated charcoal, and culture medium on the germination and early development of *Dendrobium* seedlings. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 4, p. 557-564, 2020.
- SORGATO, J. C.; MUDOLON, E. D.; GUIMARÃES, F. F.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. Fontes de luz na germinação e estabelecimento inicial *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl. uma espécie do Cerrado brasileiro. **Ciência Rural**, v. 51, n. 3, 2021a.
- SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M.; CABRAL, A. G. Ornamental potential of *Schomburgkia crispa* Lindl. **Ornamental Horticulture**, v. 27, n. 2, p. 155-161, 2021b.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2017. 918 p.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A. T.; CARDOSO, J. C.; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S. *Dendrobium* micropropagation: a review. **Plant cell reports**, v. 34, p. 671-704, 2015.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; SONGJUN, Z. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 110-124, 2017a.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; NG, T. B. The medicinal and pharmaceutical importance of *Dendrobium* species. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2227-2239, 2017b.

## CAPÍTULO II - CRESCIMENTO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Cattleya walkeriana* Gardner EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO, SISTEMA DE VEDAÇÃO E IRRADIÂNCIA

### RESUMO

Objetivou-se avaliar a influência dos meios de cultivo, irradiância e sistema de vedação no crescimento *in vitro* e *ex vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner. Foi utilizado como meio de cultura o meio MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e geleificado com 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico. Este meio foi utilizado como controle e, para os demais tratamentos os meios foram suplementados da seguinte forma: 2) MS suplementado com 150 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana= P150; 3) MS com 300 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana = P300; 4) MS com 150 g L<sup>-1</sup> de casca de banana= C150; e 5) MS com 300 g L<sup>-1</sup> de casca de banana = C300. As irradiâncias foram fornecidas por lâmpadas LEDs de 3000K: 86 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Irradiância 1) e 128 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Irradiância 2) e os sistemas de vedação convencional (SVC) e de vedação com trocas gasosas (SVTG). Aos 120 (*in vitro*) e 180 dias (*ex vitro*), a partir do período experimental, foram avaliadas quanto ao número de pseudobulbo, número de folhas, número de raízes, altura da planta, diâmetro do pseudobulbo, comprimento da maior raiz, comprimento da maior folha, massa fresca e sobrevivência. Houve interação significativa para todas as características analisadas. A interação dupla MC x SV apresentou significância para AP, CF e CR. A interação MC x I x SV foi significativa para as características NP, NF, NR, DP, MFT e %SOB de *C. walkeriana* cultivadas *in vitro*. Para o cultivo *ex vitro*, houve interação significativa entre MC x I x SV para todas as características de *C. walkeriana* avaliados. A utilização do meio acrescido de polpa de banana em até 150 g L<sup>-1</sup> em conjunto com a Irradiância – 2 e SVC proporcionaram os maiores valores para o crescimento *in vitro* das plantas. Já para o cultivo *ex vitro*, o cultivo prévio em meio MS, Irradiância – 1 e SVC, proporcionaram a maior sobrevivência e estabelecimento de plantas dessa espécie.

**Palavras-chave:** LEDs, Orchidaceae, Aclimatização.

**GROWTH AND ESTABLISHMENT *IN VITRO* AND *EX VITRO* OF *Cattleya walkeriana* Gardner IN FUNCTION OF THE CULTIVATION MEDIUM, SEALING SYSTEM AND IRRADIANCE**

**ABSTRACT**

The objective was to evaluate the influence of culture media, irradiance and sealing system on *in vitro* and *ex vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner. The MS medium was used as culture medium, supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and gelled with 7.0 g L<sup>-1</sup> of bacteriological agar. This medium was used as a control and, for the other treatments, the media were supplemented as follows: 2) DM supplemented with 150 g L<sup>-1</sup> of banana pulp = P150; 3) MS with 300 g L<sup>-1</sup> of banana pulp = P300; 4) DM with 150 g L<sup>-1</sup> of banana peel = C150; and 5) MS with 300 g L<sup>-1</sup> of banana peel = C300. The irradiances were provided by 3000K LED lamps: 86  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Irradiance 1) and 128  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Irradiance 2) and the conventional sealing (SVC) and gas exchange sealing systems (SVTG). At 120 (*in vitro*) and 180 days (*ex vitro*), from the experimental period, they were evaluated for the number of pseudobulbs, number of leaves, number of roots, plant height, diameter of the pseudobulb, length of the largest root, length of the largest leaf, fresh mass and survival. There was significant interaction for all the characteristics analyzed. The double MC x SV interaction showed significance for AP, CF and CR. The interaction MC x I x SV was significant for the characteristics NP, NF, NR, DP, MFT and % SOB of *C. walkeriana* cultivated *in vitro*. For *ex vitro* cultivation, there was a significant interaction between MC x I x SV for all the characteristics of *C. walkeriana* evaluated. The use of the medium plus banana pulp in up to 150 g L<sup>-1</sup> together with Irradiance - 2 and SVC provided the highest values for *in vitro* growth of plants. As for *ex vitro* cultivation, previous cultivation in MS medium, Irradiance - 1 and SVC, provided the greatest survival and establishment of plants of this species.

**Keywords:** LEDs, Orchidaceae, Acclimatization

## 1. INTRODUÇÃO

O comércio de flores e plantas ornamentais representa um dos segmentos mais promissores do agronegócio brasileiro (JUNQUEIRA e PEETZ, 2018). Dentre essas plantas destacam-se as orquídeas, visadas por produtores, colecionadores e orquidófilos, apreciadas em virtude de suas características tais como: tamanho, variedade, número, tamanho da inflorescência, coloração e durabilidade de suas flores, sendo extraídas da natureza, muitas vezes por meio de coletas ilegais (PASQUAL et al., 2011; MACEDO et al., 2014; HUNHOFF et al., 2016).

Atualmente essa família abrange cerca de 899 gêneros e 27.801 espécies com nomes aceitos (THE PLANT LIST, 2021), sendo a segunda maior família de plantas com flores (GARAY, 1972). No Brasil, são encontradas cerca de 2.772 espécies de orquídeas, sendo que 1.553 são endêmicas do país (BARROS et al., 2021).

Por ser uma orquídea de elevado potencial ornamental e valor econômico a *Cattleya walkeriana* Gardner sofre muita exploração sendo uma das mais visadas. É nativa do Cerrado brasileiro (FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO, 2021), e pode ser encontrada também na Mata Atlântica com ocorrência nos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Tocantins (SAWAMURA, 2016). Essa espécie possui hábito epifítico, sendo considerada uma espécie de pequeno porte (17 cm aproximadamente). Suas flores são exuberantes e surgem em grupo de até quatro por pseudobulbo, variando entre 5 cm a 13 cm de diâmetro (ARAÚJO, 2017) (Figura 1).



FIGURA 1: Flor de *Cattleya walkeriana* Gardner. Foto: Ribeiro, L. M. 2018.

A extração de orquídeas nativas constitui um dos principais fatores para a diminuição de suas populações nos Biomas (GALDIANO JÚNIOR et al., 2012). A espécie *C. walkeriana* encontra-se vulnerável de acordo com o grau de ameaça da Lista Vermelha proposta pelo Centro Nacional de Conservação da Flora, uma vez que, desde 2003 houve uma redução de sua população em cerca de 30% (CNCFlora, 2013). Vale salientar que até o momento esses dados ainda não foram atualizados.

Nesse sentido o cultivo *in vitro* se torna uma alternativa biotecnológica que possibilita a propagação tanto para fins de conservação de espécies ameaçadas quanto para produção comercial (FARIA et al., 2012; CARDOSO, 2014; TEIXEIRA da SILVA et al., 2017). Para garantir o sucesso dessa técnica, alguns fatores devem ser levados em consideração destacando-se o meio de cultivo, o sistema de vedação e a condição de luz (TEIXEIRA da SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2016a; RIBEIRO et al., 2019; LEMES et al., 2020; SOARES et al., 2020; SORGATO et al., 2021).

A formulação do meio de cultura é fundamental para o desenvolvimento vegetal, pois tem a função de disponibilizar todos os componentes necessários tais como: vitaminas, minerais, reguladores de crescimento entre outros, podendo ser composta por variadas combinações de acordo com as necessidades da espécie em questão (SILVA et al., 2017; LEMES et al., 2020; SOARES et al., 2020; SORGATO et al., 2020). Alguns autores relatam que a adição de banana na propagação *in vitro* pode ser uma forma de suplemento vitamínico, fonte de potássio e estimulador do enraizamento (GEORGE et al. 2008; FERREIRA et al. 2010; SU et al., 2012).

A luz também atua em diversos processos metabólicos dos vegetais. Dessa forma, podem ser utilizados diferentes comprimentos de onda, irradiâncias e fotoperíodos em vários estudos, como forma de otimizar o processo de propagação de plantas cultivadas *in vitro* além do seu estabelecimento *ex vitro* (TSUTSUMI et al., 2011; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015). No entanto, os efeitos da qualidade espectral e dos níveis de irradiância no crescimento e desenvolvimento das plantas ainda são pouco estudados, principalmente para espécies nativas (SORGATO et al., 2021).

Outro fator que pode influenciar é o sistema de vedação dos frascos, que atua diretamente tanto no cultivo *in vitro* quanto no estabelecimento *ex vitro* de orquídeas, uma vez que, influencia diretamente sua fisiologia, assim como o desempenho final do material vegetal propagado. Quando essas plantas são transferidas da sala de crescimento para as condições *ex vitro* necessitam completar o seu autotrofismo, elevando suas taxas metabólicas para realização da fotossíntese e respiração. Desse modo, a fase de

aclimatização denota um dos maiores desafios para o cultivo *in vitro*, sendo uma das etapas mais complexas para o estabelecimento de uma nova planta, com mudanças em seu metabolismo (TEIXEIRA da SILVA et al., 2017; FARIA et al., 2018).

O sucesso do cultivo *in vitro* também está associado à escolha da formulação do meio de cultura, uma vez que, é espécie específico e dependente de ajustes em sua composição, além da fonte de luz utilizada (SOARES et al., 2020). As lâmpadas LED 3000K, por exemplo, podem ser indicadas como um substituto potencial das lâmpadas fluorescentes e LEDs 6500K, que são comumente utilizadas em salas de crescimento em laboratórios de cultivo *in vitro* (SORGATO et al., 2021).

A hipótese deste trabalho é que o meio de cultivo quando suplementado com banana, em conjunto com a vedação que permite trocas gasosas e a condição de luz com maior irradiância podem beneficiar a propagação dessa espécie. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o efeito da formulação do meio de cultura, do sistema de vedação dos frascos e da irradiância proporcionada por lâmpadas LEDs 3000K sobre o crescimento *in vitro*, a sobrevivência e estabelecimento *ex vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de novembro de 2019 a setembro de 2020, foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* de Flores e Plantas Ornamentais, da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), um estudo com frutos maduros de *Cattleya walkeriana* Gardner, doadas pelo pesquisador Dr. Renato F. Galdiano Júnior.

Para o preparo do material vegetal a ser estudado neste trabalho, em novembro de 2018, os frutos foram abertos em ambiente asséptico e as sementes acondicionadas em dessecador com sílica gel ( $25\pm 2$  °C; 75% UR) por 14 dias. Após esse período, uma amostra de 0,005 g de sementes de cada espécie foi avaliada quanto à viabilidade pelo teste de tetrazólio (SOARES et al., 2014), sendo descartada após a confirmação da viabilidade.

Com confirmação da viabilidade, outra amostra de 0,005g de sementes foi levada para ambiente asséptico e desinfestada conforme metodologia descrita por Soares et al. (2020), para a obtenção da solução de sementes. Para a semeadura *in vitro*, inoculou-se 1,0 mL da suspensão de sementes desinfestadas por frasco de cultivo. Foram utilizados 60 mL de meio de cultura Murashige e Skoog (1962), na metade da concentração de sais

(MS ½) por frasco com capacidade para 600 mL. Em seguida, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ( $25\pm 2$  °C; 16 h) e irradiância de  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  propiciada por duas lâmpadas fluorescentes brancas (6.500K), permanecendo nessas condições por até 360 dias, sendo realizado três subcultivos.

### **Crescimento *in vitro* – 120 dias**

Após esse período as plântulas foram padronizadas quanto ao tamanho (1,5 cm) e subcultivadas para início do período experimental. Foi utilizado como meio de cultura o meio MS (MURASHIGE & SKOOG 1962), suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e geleificado com  $7,0 \text{ g L}^{-1}$  de ágar bacteriológico (Himedia<sup>®</sup>, Índia). Este meio foi utilizado como controle = MS (1) e, para os demais tratamentos os meios foram suplementados da seguinte forma: 2) MS suplementado com  $150 \text{ g L}^{-1}$  de polpa de banana = P150; 3) MS com  $300 \text{ g L}^{-1}$  de polpa de banana = P300; 4) MS com  $150 \text{ g L}^{-1}$  de casca de banana = C150; e 5) MS com  $300 \text{ g L}^{-1}$  de casca de banana = C300, utilizando frutos em estágio de senescência. O pH do meio foi aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se KOH (0,1M) antes da esterilização em autoclave ( $121 \text{ °C}$  e  $1,1 \text{ atm}$  de pressão), por 20 minutos e, distribuídos 60 mL do meio em frascos com capacidade para 600 mL, sendo inoculadas em ambiente asséptico quatro plântulas por frasco de cultivo. Na sequência, metade dos frascos foi vedada hermeticamente com filme de policloreto de vinila (PVC) (sistema de vedação convencional – SVC) e a outra metade com PVC com filtro de algodão (sistema de vedação permitindo trocas gasosas - SVTG).

As culturas, então, foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ( $25\pm 2$ °C; 16h), sob duas irradiâncias (I) fornecidas por lâmpadas LEDs de 3000K:  $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Irradiância - 1) ou  $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Irradiância - 2) (Figura 2). As medidas de distribuição espectral foram realizadas no espectrômetro portátil Ocean Optics (Modelo MMO com fibra ótica), a temperatura ambiente com tempo de integração de 10 ms.

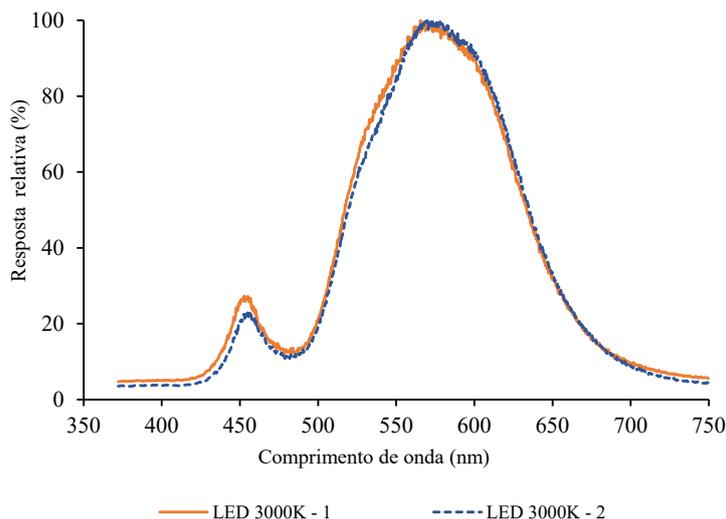


FIGURA 2. Distribuição espectral de energia relacionada aos LEDs e a lâmpada fluorescente. UFGD, Dourados-MS. 2021.

Após 120 dias de cultivo, os frascos foram retirados da sala de crescimento, abertos e as plântulas removidas e lavadas em água corrente até total remoção do meio de cultivo, sendo avaliadas, com auxílio de paquímetro digital e balança de precisão, quanto aos seguintes parâmetros: sobrevivência (%SOB), número de pseudobulbos (NP), número de folhas (NF), número de raízes (NR), altura da planta (AP), comprimento da maior folha (CF) (mm), comprimento da maior raiz (CR) (mm), diâmetro do pseudobulbo (DP) e massa fresca total (MFT) (g). (Após as avaliações, os tratamentos foram fotografados com câmera acoplada em mini estúdio fotográfico.

### **Crescimento *ex vitro* – 180 dias**

Após avaliações iniciais as plantas foram transferidas para recipientes descartáveis de polipropileno transparente com capacidade para 1.000 mL (20 x 10 x 5 cm), providos de furos na tampa, para trocas gasosas, e na base para drenagem do substrato, sendo  $\frac{1}{3}$  de seu volume preenchido com esfagno rosa (Agrolink, Holambra-SP) + fibra de coco (Golden-Mix Chips, Amafibra) (1:1, v:v<sup>-1</sup>). Após o transplântio, os recipientes foram acondicionados em viveiro telado, permanecendo por 180 dias cultivadas em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, propiciando irradiância de  $235 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sob condições médias de temperatura e umidade relativa de  $22,6 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $73,9 \pm 10\%$ , respectivamente. Nos primeiros 15 dias os recipientes

permaneceram com as tampas fechadas afim de minimizar o estresse proporcionado pela troca de ambiente (*in vitro* para *ex vitro*) e após esse período os mesmos foram abertos. A irrigação foi realizada por microaspersores tipo bailarina, posicionados a um metro acima das plantas, totalizando uma lâmina de água de 1 mm dia<sup>-1</sup>.

Foram realizadas adubações, via foliar, a cada 15 dias, com 2,0 mL L<sup>-1</sup> de NPK 10-10-10, acrescido dos micronutrientes: 0,025% de magnésio, 0,02% de boro, 0,05% de cobre, 0,10% de ferro, 0,05% de manganês, 0,0005% de molibdênio e 0,05% de zinco, com teor máximo de cloro de 0,025%. Aos zero, 30 e 60 dias as plantas foram desinfestadas, preventivamente, com O-S-dimetil-N-acetil-fosforamidotoato (4 mg L<sup>-1</sup>) e Mancozeb (4 mg L<sup>-1</sup>). Tanto para a adubação foliar, quanto para a desinfestação, foi utilizado pulverizador costal com capacidade para 5 L.

Após esse período, as plantas foram retiradas dos recipientes e lavadas em água corrente até total remoção do substrato. Em seguida avaliadas quanto às mesmas características iniciais (SOB, NP, NF, NR, AP, CF, CR, DP e MFT) para avaliação do crescimento *ex vitro*.

A partir da hipótese do aumento no crescimento das plantas durante a fase *ex vitro*, de acordo com os tratamentos a que foram inicialmente expostas, foram calculados seus incrementos (I) em relação aos valores iniciais por meio da expressão  $I = (VF - VI)$ , onde VI é o valor da variável antes da planta ser aclimatizada e VF é o valor da mesma variável após o período *ex vitro*, sendo seus valores expressos em porcentagem e submetidos à análise de variância, conforme Ribeiro et al. (2019).

Tanto para o cultivo *in vitro* quanto *ex vitro*, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2x2 (cinco meios de cultura; duas irradiâncias; dois sistemas de vedação), com cinco repetições (frasco) sendo que cada unidade experimental foi constituída de um frasco contendo quatro plântulas. Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo comparadas as irradiâncias e as vedações comparadas pelo teste F e os meios de cultura pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), com auxílio do programa SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3 Universidade Federal de Lavras, MG) (FERREIRA, 2011).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Cultivo *in vitro*

Houve interação significativa entre os tratamentos para todas as características analisadas. A interação dupla MC x SV apresentou significância para AP, CF e CR. A interação tripla MC x I x SV foi significativa para os parâmetros NP, NF, NR, DP, MFT e %SOB de *Cattleya walkeriana* Gardner ( $p < 0,05$ ) (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo da análise de variância de número de pseudobulbos (NP), número de folhas (NF), número de raízes (NR), altura de plantas (AP), comprimento da maior folha (CF), comprimento da maior raiz (CR), diâmetro de pseudobulbos (DP), massa fresca (MFT) e porcentagem de sobrevivência (%SOB). UFGD, Dourados – MS, 2021.

F. V.	GL	.....Quadrado médio .....								
		NP	NF	NR	AP	CF	CR	DP	MFT	%SOB
MC	4	46,28*	471,30*	272,33*	569,90*	174,80*	1221,71*	5,84*	4,63*	8274,63*
I	1	131,03*	1250,54*	418,00*	60,72 <sup>ns</sup>	19,18 <sup>ns</sup>	403,81*	0,33 <sup>ns</sup>	6,50*	1174,77 <sup>ns</sup>
SV	1	181,25*	1242,35*	148,62*	103,37 <sup>ns</sup>	584,29*	121,99 <sup>ns</sup>	3,33*	12,26*	19152,07*
MC x I	4	18,55*	67,87 <sup>ns</sup>	74,21*	59,26 <sup>ns</sup>	16,49 <sup>ns</sup>	67,67 <sup>ns</sup>	1,91*	2,62*	575,07 <sup>ns</sup>
MC x SV	4	30,56*	191,23*	177,23*	559,12*	319,19*	981,15*	4,53*	4,01*	4010,68*
I x SV	1	59,55*	426,13*	57,87 <sup>ns</sup>	88,64 <sup>ns</sup>	4,87 <sup>ns</sup>	218,12 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	3,69*	0,31 <sup>ns</sup>
MC x I x SV	4	32,60*	186,04*	140,51*	107,99 <sup>ns</sup>	81,71 <sup>ns</sup>	84,34 <sup>ns</sup>	3,47*	2,48*	2090,45*
Total	99	1315,35	10808,7	4535	10950,4	6296,53	17075,6	111,96	101,82	162300
M. G.		3,07	9,25	6,87	16,27	11,89	19,42	1,68	0,695	76,99
C.V. (%)		30,04	35,01	26,93	32,41	32,33	30,04	19,02	17,87	33,09

\*: significativo; <sup>ns</sup>: não significativo, pelo teste de F a 5% de probabilidade.

F.V.: fator de variância; G.L.: grau de liberdade; M.G.: média geral. I = irradiância; MC = meio de cultivo; SV = sistema de vedação.

Com relação à interação entre os meios de cultivo e os sistemas de vedação, verificou-se maior AP (24,94 mm) e CR (37,87 mm), quando as plantas de *C. walkeriana* foram submetidas ao MS + SVC, embora sem diferença significativa para P150 + SVC (23,81 mm e 31,51 mm respectivamente). Para CF, os maiores valores foram encontrados quando se utilizou o meio C150 + SVTG (17,88 mm), não diferindo significativamente de P300 + SVTG (16,91 mm) e MS + SVTG (16,56 mm) (Figura 3).

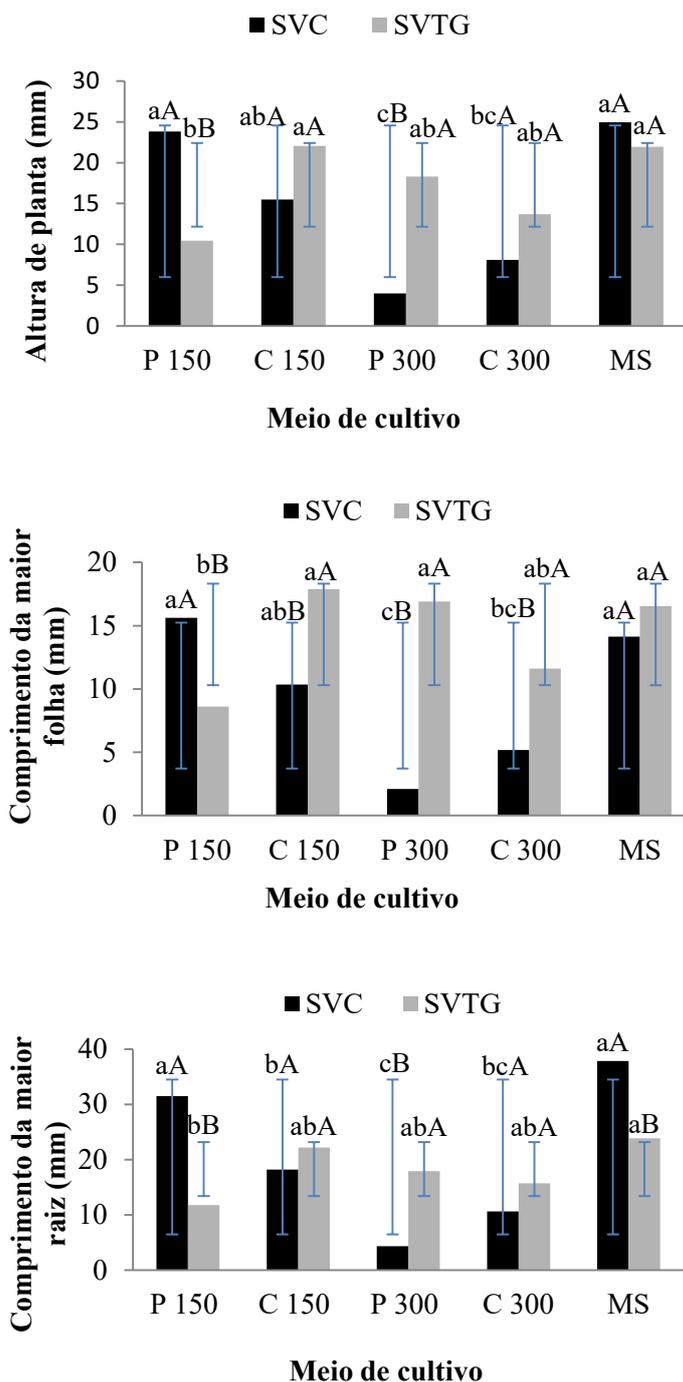


FIGURA 3. Altura de planta (mm) (A), comprimento da maior folha (mm) (B) e comprimento da maior raiz (mm) (C) de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo e sistema de vedação estudados, UFGD, Dourados-MS, 2020. P150 =150g de polpa de banana; P300= 300g de polpa de banana; C150= 150g de casca de banana; C300= 300g de casca de banana; MS= Murashige & Skoog (1962); SVTG= sistema de vedação com trocas gasosas; SVC= sistema de vedação convencional. Letras minúsculas comparam o mesmo sistema de vedação nos diferentes meios de cultura; letras maiúsculas comparam diferentes sistemas de vedação no mesmo meio de cultura. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey e teste T respectivamente ( $p < 0,05$ ).

Com relação à interação MC x I x SV, a utilização do meio de cultura MS + SVC e sob I - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), proporcionou os maiores resultados para NF (22,93), embora sem diferença significativa para P150 + Irradiância - 2 + SVC (Quadro 2).

QUADRO 2. Número de folhas de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados, UFGD, Dourados-MS, 2021.

Meios	NF			
	SVC		SVTG	
	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2
P150	21,85 aAa	22,93 abAa	3,94 aBa	13,74 aAa
C150	2,65 bBa	17,60 bcAa	5,04 aAa	5,24 bAa
P300	1,73 bAa	6,11 cAa	3,14 aAa	4,95 bAa
C300	2,32 bBa	13,20 bcAa	3,57 aAa	5,25 bAb
MS	7,29 bBa	32,01 aAa	5,55 aAa	6,79 bAb
M. G.	7,17	18,37	4,25	7,19
C.V. (%)	35,01			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma vedação e na mesma irradiância. Letras maiúsculas, na linha, comparam a irradiância dentro do mesmo meio de cultura e tipo de vedação. Letras em itálico, na linha, comparam o tipo de vedação no mesmo meio de cultura e irradiância (Teste F e Tukey  $p < 0,05$ ). P150 = 150g de polpa de banana; P300 = 300g de polpa de banana; C150 = 150g de casca de banana; C300 = 300g de casca de banana; MS = Murashige & Skoog (1962); SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas; SVC = sistema de vedação convencional; I - 1 = Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); I - 2 = Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Para NP e NR, os maiores valores foram encontrados em MS +  $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + SVC apresentando médias de 13,02 pseudobulbos e 25,95 de raízes respectivamente (Quadro 3).

QUADRO 3. Número de pseudobulbos e número de raízes de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados, UFGD, Dourados-MS, 2021.

Meios	NP				NR			
	SVC		SVTG		SVC		SVTG	
	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2
P150	7,75 aAa	5,88 bAa	1,15 aAb	3,38 aAa	14,95 aAa	12,29 bAa	4,70 aBb	12,78 aAa
C150	0,79 bBa	4,96 bAa	1,52 aAa	1,25 aAb	2,01 bAa	6,43 bcAa	5,89 aAa	4,80 bAa
P300	0,47 bBa	2,60 bAa	1,15 aAa	1,69 aAa	1,21 bAa	1,23 cAa	3,50 aAa	4,87 bAa
C300	0,81 bBa	5,20 bAa	1,24 aAa	2,15 aAa	1,85 bBa	8,60 bAa	3,89 aAa	7,20 abAa
MS	2,68 bBa	13,02 aAa	1,69 aAa	2,00 aAb	6,43 bBa	25,95 aAa	3,87 aAa	5,05 bAb
M. G.	2,50	6,33	1,35	2,09	5,29	10,90	4,37	6,94
C.V. (%)	30,04				26,93			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma vedação e na mesma irradiância. Letras maiúsculas, na linha, comparam a irradiância dentro do mesmo meio de cultura

e tipo de vedação. Letras em itálico, na linha, comparam o tipo de vedação no mesmo meio de cultura e irradiância (Teste F e Tukey  $p < 0,05$ ). P150 = 150g de polpa de banana; P300 = 300g de polpa de banana; C150 = 150g de casca de banana; C300 = 300g de casca de banana; MS = Murashige & Skoog (1962); SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas; SVC = sistema de vedação convencional; I - 1 = Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); I - 2 = Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Para o DP, os maiores resultados foram observados com a utilização do meio de cultivo P150 + Irradiância - 1 + SVC (3,12 mm), não diferindo significativamente dos resultados encontrados para MS + Irradiância - 1 + SVC. Quanto à MFT das plantas, os maiores valores foram observados no cultivo em meio MS + Irradiância - 2 + SVC (3,83 g), em relação a todos os tratamentos estudados (Quadro 4).

QUADRO 4. Diâmetro de pseudobulbos E massa fresca total de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados, UFGD, Dourados-MS, 2021.

Meios	DP				MFT			
	SVC		SVTG		SVC		SVTG	
	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2
P150	3,12 aAa	1,50 abBa	1,70 abAb	1,27 bcAa	2,06 aAa	1,69 bAa	0,17 aAb	0,56 aAb
C150	0,63 bBb	1,66 abAa	2,56 aAa	0,76 cBa	0,20 bAa	0,78 bcAa	0,45 aAa	0,32 aAa
P300	0,34 bAb	0,53 bAb	2,07 abAa	2,16 abAa	0,08 bAa	0,15 cAa	0,24 aAa	0,21 aAa
C300	0,87 bAa	1,02 bAb	1,10 bBa	2,17 abAa	0,08 bBa	1,02 bcAa	0,27 aAa	0,46 aAa
MS	2,84 aAa	2,46 aAa	2,14 abAa	2,69 aAa	0,57 bBa	3,83 aAa	0,27 aAa	0,49 aAb
M.G.	1,56	1,43	1,91	1,81	0,60	1,49	0,28	0,41
C.V. (%)	19,02				17,87			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma vedação e na mesma irradiância. Letras maiúsculas, na linha, comparam a irradiância dentro do mesmo meio de cultura e tipo de vedação. Letras em itálico, na linha, comparam o tipo de vedação no mesmo meio de cultura e irradiância (Teste F e Tukey  $p < 0,05$ ). P150 = 150g de polpa de banana; P300 = 300g de polpa de banana; C150 = 150g de casca de banana; C300 = 300g de casca de banana; MS = Murashige & Skoog (1962); SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas; SVC = sistema de vedação convencional; I - 1 = Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); I - 2 = Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

A maior %SOB foi observada nas plantas cultivadas em meio P150 (100%) independente da irradiância e sistema de vedação utilizados. Os maiores valores também foram observados nos tratamentos C150 + SVTG + Irradiância - 1 (100%), P300 + SVTG + Irradiância - 2 (100%) e MS + SVC + Irradiância - 1 (100%) (Quadro 5).

QUADRO 5. Porcentagem de sobrevivência de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados, UFGD, Dourados-MS, 2021.

Meios	%SOB			
	SVC		SVTG	
	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2
P150	100,00 aAa	100,00 aAa	100,00 aAa	100,00 aAa
C150	38,33 bBb	88,17 abAa	100,00 aAa	80,00 aAa
P300	20,00 bAb	20,00 cAb	80,00 aAa	100,00 aAa
C300	40,00 bAa	40,00 bcAb	60,00 aAa	95,00 aAa
MS	100,00 aAa	85,00 abAa	97,28 aAa	96,00 aAa
M.G.	59,67	66,63	87,46	94,2
C.V. (%)	33,09			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma vedação e na mesma irradiância. Letras maiúsculas, na linha, comparam a irradiância dentro do mesmo meio de cultura e tipo de vedação. Letras em itálico, na linha, comparam o tipo de vedação no mesmo meio de cultura e irradiância (Teste F e Tukey  $p < 0,05$ ). P150 = 150g de polpa de banana; P300 = 300g de polpa de banana; C150 = 150g de casca de banana; C300 = 300g de casca de banana; MS = Murashige & Skoog (1962); SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas; SVC = sistema de vedação convencional; I - 1 = Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); I - 2 = Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

De maneira geral os maiores valores foram encontrados quando utilizados os meios MS ou P150 + Irradiância - 2 + SVC.

Os resultados observados com a adição de polpa de banana, independente do sistema de vedação ou irradiância utilizados, corroboram com o trabalho de Silva et al., (2016b), estudando a espécie de orquídea *Epidendrum nocturnum* onde encontraram que o meio acrescido com 100 g de banana proporcionou maior porcentagem de sobrevivência no cultivo *in vitro* dessa espécie. Uma explicação para esse fato pode ser decorrente da composição da polpa da banana, que é rica em auxinas, citocininas e giberelinas, além de potássio, vitaminas e aminoácidos (DOLCE et al., 2020). Dessa forma, o fornecimento desses componentes podem ter contribuído para a sobrevivência das plantas no sistema *in vitro*. Por outro lado, no meio MS já suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  o aumento das concentrações de polpa de banana, pode ter proporcionado um excesso de fontes de carbono, o que pode explicar as menores taxas de sobrevivência em meios suplementados com mais de  $150 \text{ g L}^{-1}$  de banana cultivados sob SVC.

Neste trabalho as variáveis NF, NP, NR e MFT foram influenciadas positivamente pela utilização MS ou P150 + Irradiância - 2 + SVC, apenas a variável DP apresentou os

maiores resultados com os mesmos meios, mesmo sistema de vedação, porém com a Irradiância - 1.

Corroborando com os resultados desse trabalho, Freitas (2019) observou que a utilização de 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana acarretou na maior produção de folhas em plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f. A formulação dos meios de cultivo pode influenciar diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*. Para plântulas de *C. walkeriana*, a formulação do meio MS acrescido ou não de 150g L<sup>-1</sup> de polpa de banana propiciou crescimento *in vitro*. Esses resultados podem ser atribuídos à composição da polpa da banana, que dispõe de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento como suplementação ao meio de cultura, otimizando o aumento no NF, NP, NR e MF de plântulas cultivadas *in vitro* (ARDITTI e ERNST, 1992; STANCATO et al., 2008; PASCOAL et al., 2009; FERREIRA et al., 2010; FAVETTA et al., 2014; SILVA et al., 2016b).

Quanto ao sistema de vedação, no presente estudo a vedação convencional proporcionou os maiores valores para as variáveis NF, NP, NR, DP e MFT nas plantas de *C. walkeriana* cultivadas *in vitro*. Esses resultados corroboram com os de Ribeiro et al. (2019), que avaliando a influência do sistema de vedação no crescimento e desenvolvimento de Denphal, também observaram maior número de folhas e de pseudobulbos utilizando o sistema de vedação convencional. Esses maiores valores podem estar relacionados com o ambiente interno dos frascos, já que, a vedação total dos frascos de cultivo proporciona um aumento da umidade relativa do ar, o que resulta em um maior acúmulo de água pelos tecidos vegetais (SILVA et al., 2014). Além disso, o sistema de vedação empregado interfere nas trocas gasosas, uma vez que a vedação hermética dos frascos ocasiona um aumento no CO<sub>2</sub> e gás etileno, podendo resultar em mudanças fisiológicas nas plantas, diferenciação e crescimento dos tecidos, além da indução e diferenciação de órgãos (SILVA et al., 2014; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2017).

Com relação à luz, a Irradiância - 2 influenciou positivamente o crescimento das plantas cultivadas *in vitro*, proporcionando os maiores valores para as variáveis NF, NR, NP e MFT. As salas de crescimento utilizam, geralmente, lâmpadas fluorescentes para o cultivo *in vitro*. Estas vêm sendo gradualmente substituídas por lâmpadas LEDs que apresentam vantagens quando comparadas às lâmpadas fluorescentes, tais como: menores variações fisiológicas e morfológicas em embriões, elevada eficiência no processo de geração de luz e baixa emissão de calor, demandando menos energia na sala de

crescimento e para com o sistema de refrigeração, além de um longo período de vida útil (GUPTA e JATOTHU, 2013; HANUS-FAJERSKA & WOJCIECHOWSKA, 2017). Neste trabalho, a utilização de lâmpada LED 3000K, com irradiância de  $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Irradiância 2), mesmo tendo semelhança no comprimento de onda (Figura 2), apresentou maiores resultados do que o LED 3000K com irradiância de  $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Irradiância 1). Este fato demonstra que a utilização da maior irradiância contribuiu para o desenvolvimento dessas plântulas. Taiz et al. (2017), descrevem que a qualidade e a quantidade de luz disponibilizada ao material propagado são importantes para a regulação de várias vias bioquímicas que controlam desde o crescimento até a morfogênese, fato que foi observado neste trabalho.

Além disso, a condição de luz utilizada no cultivo *in vitro* também pode fomentar na promoção do crescimento foliar, bem como, o acúmulo de carboidratos e alterações anatômicas (HUNG et al., 2016). Dessa forma, esses fatores podem ter contribuído diretamente no incremento da massa fresca das plantas de *C. walkeriana*.

Os resultados desse trabalho podem estar relacionados também com o perfilhamento dessas plantas quando cultivadas sob vedação hermética dos frascos (Figura 4), o que ocorreu com *Cattleya nobilior* e *Denphal* nos trabalhos de Freitas (2019) e Ribeiro et al. (2019), respectivamente. Esse sistema de vedação permite, conforme já dito anteriormente, um aumento de gás etileno em conjunto com as elevadas concentrações de  $\text{CO}_2$ , o que neste trabalho, pode ter contribuído com o aumento das variáveis em número e, conseqüentemente da massa fresca. Na figura 4, pode-se observar visualmente que as plantas quando cultivadas sob irradiância de  $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em sistema convencional perfilharam. Já as plantas cultivadas em sistema que permite trocas gasosas encontram-se maiores em comprimento e diâmetro das estruturas, e aparentemente com características adequadas para o cultivo *ex vitro*, tais como pseudobulbos, folhas e raízes mais desenvolvidos.

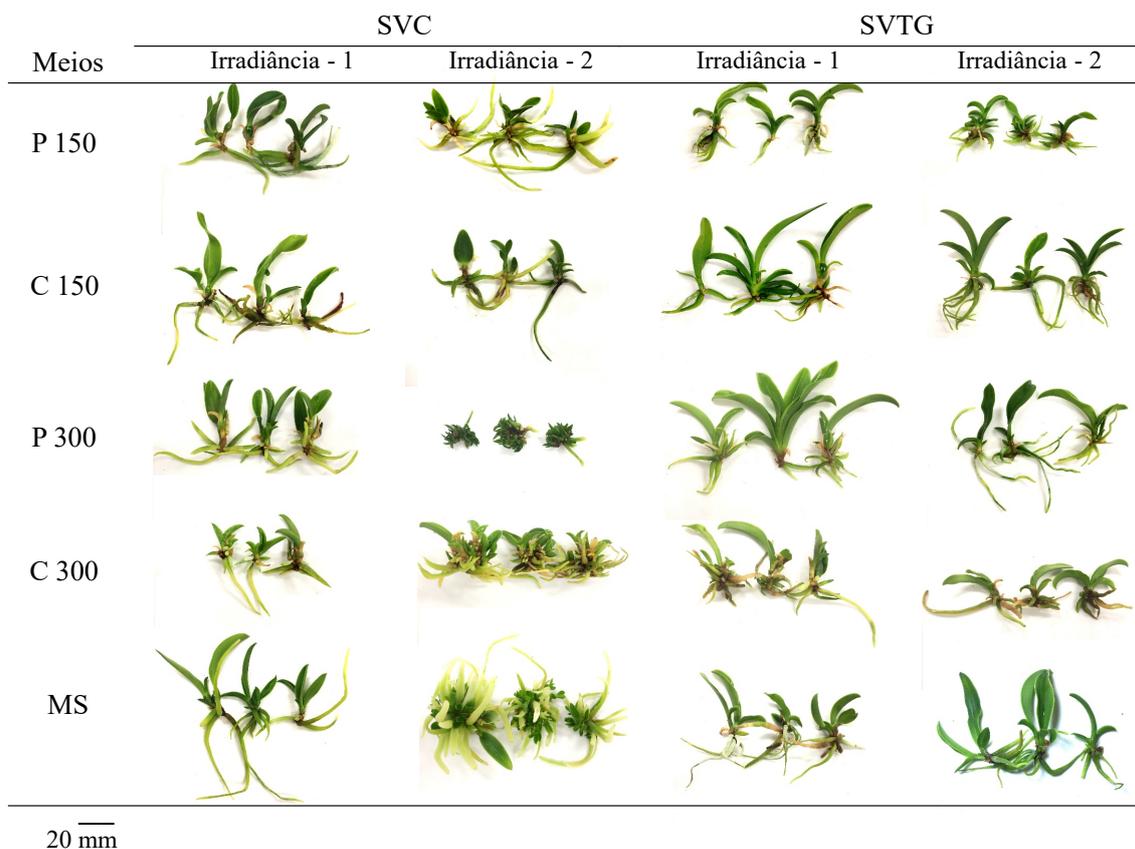


FIGURA 4. Plantas de *Cattleya walkeriana* Gardner., com 180 dias de cultivo *ex vitro* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados. P150 =150g de polpa de banana; P300= 300g de polpa de banana; C150= 150g de casca de banana; C300= 300g de casca de banana; MS= Murashige & Skoog (1962); SVTG= sistema de vedação com trocas gasosas; SVC= sistema de vedação convencional; Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

#### Cultivo *ex vitro* – 180 dias

Aos 180 dias após o início do cultivo *ex vitro*, houve interação significativa do cultivo *in vitro* para todas as características avaliadas *ex vitro*. A interação MC x I x SV do cultivo *in vitro* foi significativa para todos as características de *Cattleya walkeriana* Gardner avaliados ( $p < 0,05$ ) (Quadro 7).

QUADRO 7. Resumo da análise de variância de porcentagem de sobrevivência (%SOB), número de pseudobulbos (NP), número de folhas (NF), número de raízes (NR), altura de plantas (AP), comprimento da maior folha (CF), comprimento da maior raiz (CR), diâmetro de pseudobulbos (DP) e massa fresca (MF). UFGD, Dourados – MS, 2021

F. V.	GL	.....Quadrado médio .....									
		%SOB	NP	NF	NR	AP	CF	CR	DP	MFT	
MC	5	8482,26*	1681,66*	603,11*	108,04*	71830,86*	77321,75*	4725,74*	220110,48*	204194,02*	
I	1	2601,00*	662,50*	753,90*	102,40*	250491,24*	272323,25*	9873,60*	275634,45*	1073633,76*	
SV	1	5136,30*	400,68 <sup>ns</sup>	753,90*	102,40*	78480,10*	219145,70*	5881,05*	185472,34*	444596,90*	
MC x I	3	4680,73*	1775,87*	1005,18*	136,53*	150275,70*	142615,44*	15158,16*	368642,34*	407312,42*	
MC x SV	3	2513,58*	1657,88*	1005,18*	136,53*	213556,07*	200258,65*	16982,53*	449938,28*	246398,04*	
I x SV	1	1009,84*	338,96 <sup>ns</sup>	753,90*	135,05*	200643,97*	285275,63*	19502,12*	532303,03*	671329,51*	
MC x I x SV	5	6710,1*	3320,92*	603,11*	108,04*	140347,09*	154261,94*	9516,15*	276742,98*	131135,96*	
Total	99	120837,4	47978,86	16340,61	2239,86	2817713	3203844,1	217007,87	6135883,9	6938456,9	
M. G.		43,89	10,96	2,75	1,16	87,1	107,27	25,92	104,32	118,87	
C.V. (%)		14,77	48,04	34,33	2,96	27,61	33,15	30,51	21,26	47,13	

\*: significativo; <sup>ns</sup>: não significativo, pelo teste de F a 5% de probabilidade.

F.V.: fator de variância; G.L.: grau de liberdade; M.G.: média geral. I = irradiância; MC = meio de cultivo; SV = sistema de vedação.

Ao final do período experimental verificou-se maior porcentagem de sobrevivência quando as plantas foram previamente cultivadas *in vitro* sob SVC juntamente com meio MS + Irradiância - 1 (100%) ou no mesmo sistema de vedação com meio C300 + Irradiância - 2 (100%) (Quadro 8).

QUADRO 8. Incrementos (%) de sobrevivência de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados, UFGD, Dourados-MS, 2021.

Meios	%SOB			
	SVC		SVTG	
	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2
P150	66,67 <i>bAb</i>	72,00 <i>bAa</i>	95,00 <i>aAa</i>	16,00 <i>cBb</i>
C150	20,00 <i>cAa</i>	28,0 <i>cAa</i>	10,00 <i>cAa</i>	10,00 <i>cAb</i>
P300	60,00 <i>bAa</i>	0,00 <i>dBb</i>	10,00 <i>cAb</i>	16,00 <i>cAa</i>
C300	50,00 <i>bBa</i>	100,00 <i>aAa</i>	33,80 <i>bAb</i>	40,00 <i>bAb</i>
MS	100,0 <i>aAa</i>	13,89 <i>cdBb</i>	56,67 <i>bBb</i>	92,00 <i>aAa</i>
Média Geral	59,33	42,78	39,33	34,8
C.V. (%)	14,77			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma vedação e na mesma irradiância. Letras maiúsculas, na linha, comparam a irradiância dentro do mesmo meio de cultura e tipo de vedação. Letras em itálico, na linha, comparam o tipo de vedação no mesmo meio de cultura e irradiância (Teste F e Tukey  $p < 0,05$ ). P150 = 150g de polpa de banana; P300 = 300g de polpa de banana; C150 = 150g de casca de banana; C300 = 300g de casca de banana; MS = Murashige & Skoog (1962); SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas; SVC = sistema de

vedação convencional; I - 1 = Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); I - 2 = Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Com relação à porcentagem de incremento, para NP (63,75%) e NF (54,91%) os maiores valores foram observados quando as plantas de *C. walkeriana* foram previamente cultivadas em meio MS, combinado com Irradiância - 1 e sistema de vedação SVC (Quadro 9).

QUADRO 9. Incrementos (%) de número de pseudobulbos e número de folhas de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados, UFGD, Dourados-MS, 2021.

Meio	NP				NF			
	SVC		SVTG		SVC		SVTG	
	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2
P150	0,00 bBb	22,73 aAa	59,66 aAa	0,00 bBb	0,00 Bba	0,00 bBa	0,00 bBa	0,00 bBa
C150	3,13 bAa	0,00 bBa	0,00 cBa	11,43 bAa	0,00 bBa	0,00 bBa	0,00 bBa	0,00 bBa
P300	0,00 bAa	0,00 bAa	0,00 cAa	0,00 bAa	0,00 bBa	0,00 bBa	0,00 bBa	0,00 bBa
C300	0,00 bAa	0,00 bAb	9,94 bBa	44,17 aAa	0,00 bBa	0,00 bBa	0,00 bBa	0,00 bBa
MS	63,75 aAa	0,00 bBb	8,83 bAb	5,56 bAa	54,91 aAa	0,00 bBa	0,00 bBb	0,00 bBa
M. G.	14,18	4,55	15,69	12,23	11,00	0,00	0,00	0,00
C.V. (%)	48,04				34,33			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma vedação e na mesma irradiância. Letras maiúsculas, na linha, comparam a irradiância dentro do mesmo meio de cultura e tipo de vedação. Letras em itálico, na linha, comparam o tipo de vedação no mesmo meio de cultura e irradiância (Teste F e Tukey  $p < 0,05$ ). P150 = 150g de polpa de banana; P300 = 300g de polpa de banana; C150 = 150g de casca de banana; C300 = 300g de casca de banana; MS = Murashige & Skoog (1962); SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas; SVC = sistema de vedação convencional; I - 1 = Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); I - 2 = Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Quanto ao NR (21,74%), as melhores médias foram encontradas quando as plantas de *C. walkeriana* foram previamente cultivadas em meio MS, combinado com Irradiância - 1 e SVC. A AP, CF e CR das plantas cultivadas em P300 + Irradiância - 1 + SVC, apresentaram maior porcentagem de incremento (745,0%, 779,44% e 195,56%, respectivamente) (Quadro 10 e 11).

QUADRO 10. Incrementos (%) de número de raízes e altura de planta de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados, UFGD, Dourados-MS, 2021.

Meios	NR				AP			
	SVC		SVTG		SVC		SVTG	
	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2
P150	0,00 bAa	0,00 bAa	0,00 bAa	0,00 bAa	7,05 cBb	15,25 aAa	228,85 aAa	46,58 bBa
C150	0,00 bAa	0,00 bAa	0,00 bAa	0,00 bAa	52,43 cBa	22,97 aAa	63,54 bAa	0,00 bBa
P300	0,00 bAa	0,00 bAa	0,00 bAa	0,00 bAa	745,0 aAa	0,00 aBa	0,00 bAb	17,03 bAa
C300	0,00 bAa	0,00 bAa	0,00 bBa	0,00 bBa	178,90 bAa	46,66 aBb	31,30 bBb	199,13 aAa
MS	21,74 aAa	0,00 bBb	0,00 bBb	1,50 aAa	66,37 cAa	16,43 aAa	37,48 bAa	6,37 bAa
M. G.	4,35	0,00	0,00	0,3	209,95	20,26	72,23	53,82
C.V. (%)	2,96				27,61			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma vedação e na mesma irradiância. Letras maiúsculas, na linha, comparam a irradiância dentro do mesmo meio de cultura e tipo de vedação. Letras em itálico, na linha, comparam o tipo de vedação no mesmo meio de cultura e irradiância (Teste F e Tukey  $p < 0,05$ ). P150 = 150g de polpa de banana; P300 = 300g de polpa de banana; C150 = 150g de casca de banana; C300 = 300g de casca de banana; MS = Murashige & Skoog (1962); SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas; SVC = sistema de vedação convencional; I - 1 = Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); I - 2 = Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

QUADRO 11. Incrementos (%) de comprimento da maior folha e comprimento da maior raiz de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados, UFGD, Dourados-MS, 2021.

Meios	CF				CR			
	SVC		SVTG		SVC		SVTG	
	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2
P150	17,50 cA	0,00 bA	164,65 aA	59,93 bB	0,00 cAb	0,00 bAa	71,14 aAa	0,00 bBa
C150	102,53 cAa	102,45 aA	57,72 abAa	0,00 bB	0,00 cBa	18,33 abAa	0,00 bBa	29,05 aAa
P300	779,44 aA	0,00 bB	0,00 bA	46,39 bA	195,56 aAa	0,00 bBa	0,00 bAa	0,00 bAa
C300	329,84 bA	100,73 aB	27,44 bB	175,77 aA	76,37 bAa	30,13 aBa	11,85 bBb	39,48 aAa
MS	69,10 cA	39,26 abA	73,80 abA	26,33 bA	15,55 cAa	0,00 bAb	0,00 bBa	42,90 aAa
M.G.	259,68	48,5	59,23	61,68	57,50	19,38	14,23	22,29
C.V. (%)	33,15				30,51			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma vedação e na mesma irradiância. Letras maiúsculas, na linha, comparam a irradiância dentro do mesmo meio de cultura e tipo de vedação. Letras em itálico, na linha, comparam o tipo de vedação no mesmo meio de cultura e irradiância (Teste F e Tukey  $p < 0,05$ ). P150 = 150g de polpa de banana; P300 = 300g de polpa de banana; C150 = 150g de casca de banana; C300 = 300g de casca de banana; MS = Murashige & Skoog (1962); SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas; SVC = sistema de vedação convencional; I - 1 = Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); I - 2 = Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

De maneira semelhante, o DP e MFT apresentaram maior porcentagem de incremento com a utilização do meio de cultura P300 + Irradiância - 1 + SVC (DP =

1128% e MFT = 888,62%), no entanto, a porcentagem de incremento em massa fresca não diferiu significativamente do meio P150 + Irradiância - 1 + SVC (743,96%) (Quadro 12).

QUADRO 12. Incrementos (%) de diâmetro de pseudobulbo, massa fresca total e porcentagem de sobrevivência de *Cattleya walkeriana* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância, UFGD, Dourados-MS, 2021.

Meios	DP				MFT			
	SVC		SVTG		SVC		SVTG	
	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2	I - 1	I - 2
P150	0,00 cAb	23,15 aAb	139,67 aBa	265,85 aAa	743,96 aAa	0,00 aBa	277,48 aAb	0,00 aBa
C150	137,90 aAa	0,00 aBa	0,00 bAa	0,00 cAa	30,77 bAa	0,00 aAa	0,00 cAa	86,74 aAa
P300	1128,85 aAa	0,00 aBb	0,00 bBb	96,73 bAa	888,62 aAa	0,00 aBa	0,00 cAb	26,45 aAa
C300	55,48 bcAa	49,90 Aaa	63,61 abAa	25,44 bcAa	140,47 bAa	0,00 aAa	46,25 aAa	18,63 aAa
MS	42 cAa	36,58 aAa	15,91 bAa	20,54 bcAa	51,70 bAa	0,00 aAa	91,90 aAa	20,75 aAa
M. G.	272,85	21,93	43,84	81,71	371,10	0,00	83,13	30,51
C.V. (%)	21,26				47,13			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma vedação e na mesma irradiância. Letras maiúsculas, na linha, comparam a irradiância dentro do mesmo meio de cultura e tipo de vedação. Letras em itálico, na linha, comparam o tipo de vedação no mesmo meio de cultura e irradiância (Teste F e Tukey  $p < 0,05$ ). P150 = 150g de polpa de banana; P300 = 300g de polpa de banana; C150 = 150g de casca de banana; C300 = 300g de casca de banana; MS = Murashige & Skoog (1962); SVTG = sistema de vedação com trocas gasosas; SVC = sistema de vedação convencional; I - 1 = Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); I - 2 = Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

De maneira geral, no cultivo *ex vitro*, os maiores valores de sobrevivência foram encontrados quando as plantas de *C. walkeriana* foram cultivadas *in vitro* utilizando os meios MS ou C300 + Irradiância - 1 + SVC. Alguns estudos relatam que, de acordo com a variação da condição de luz dentro das salas de crescimento, é possível estimular o crescimento *in vitro* de diversas espécies. Dessa forma, a utilização de diferentes LEDs pode influenciar diretamente no aumento da sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização (BRAGA et al., 2009; FERREIRA et al., 2017).

Para a maioria das variáveis (NP, NF, NR, AP, CF e CR), os maiores valores foram observados quando as plantas foram cultivadas em meio MS ou P300 sob mesma irradiância e sistema de vedação da sobrevivência.

Os resultados para AP concordam com os encontrados por Araújo et al. (2006) que, relatam que plantas de *Cattleya loddigesii* 'Grande' x *Cattleya* 'Alba' apresentaram maior altura quando cultivadas em meio Knudson suplementado com  $100 \text{ g L}^{-1}$  de polpa de banana. Segundo esses autores, isso pode estar relacionado com a capacidade da

banana de influenciar o desenvolvimento da parte aérea no cultivo *in vitro* de orquídeas, assim como na emissão de brotos adventícios, como pode ser observado nas variáveis avaliadas nesse trabalho. Torres et al. (2001) e Ferreira et al. (2010), salientam ainda que a banana é utilizada no cultivo *in vitro* de orquídeas pois sua formulação é rica em potássio, atuando como um estimulador de enraizamento, no crescimento e/ou espessamento das raízes, fato que pode ser notado na variável CR.

Corroborando com essa afirmação, Vieira et al. (2009), observaram que o meio contendo polpa de banana apresentou melhor desenvolvimento radicular para um híbrido de *Cattleya*. Ainda, de acordo com Arditti e Ernst (1993), a polpa de banana pode intensificar o crescimento da parte aérea (número de estruturas, diâmetro e altura) de plantas obtidas a partir de explantes *in vitro*. Esse fato pode explicar a maior porcentagem de incremento no diâmetro de pseudobulbos das plantas.

Com relação ao sistema de vedação, os maiores valores foram proporcionados com a utilização do SVC. Esses resultados ratificam os de Ribeiro et al. (2019) que observaram maior incremento para diâmetro de pseudobulbos e comprimento da maior raiz quando plantas de *Denphal* foram subcultivadas em ambiente hermético. Esse aumento pode ser explicado, segundo Teixeira da Silva et al. (2017), pela transferência das plantas para o ambiente *ex vitro*, que permite que as mesmas concluam o seu autotrofismo, visto que, a capacidade de gerenciar a água e responder à atividade durante e após o cultivo *in vitro* são fatores que determinam o desempenho final do material vegetal propagado.

Nesse trabalho, assim como o de Ribeiro et al., (2019) as plantas quando cultivadas *in vitro* em sistema convencional aumentaram sua taxa de crescimento na fase *ex vitro*, enquanto plantas oriundas do sistema que permite trocas gasosas, as quais já haviam iniciado sua rustificação durante o cultivo *in vitro*, apenas mantiveram essa taxa. Esse fato pode ter contribuído diretamente nas variáveis de incremento de *C. walkeriana* nesse trabalho.

Quanto à luz, a Irradiância - 1 influenciou positivamente todas as variáveis avaliadas, exceto MFT que obteve os maiores valores sob a influência da Irradiância - 2. Ao observar a Figura 2, verifica-se que mesmo as fontes de luz possuindo comprimentos de onda semelhantes, o pré-cultivo sob a menor irradiância ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) proporcionou os melhores resultados para o cultivo *ex vitro* dessa espécie. É importante salientar que as respostas das plantas a irradiância da luz estão fortemente associadas à espécie (HUNG et al., 2016; TAIZ et al., 2017). Sendo assim, a qualidade de luz, o

fotoperíodo e a densidade de fluxo de fótons são fatores que estão diretamente relacionados com o desenvolvimento da morfogênese das plantas quando cultivadas *in vitro* (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015; TAIZ et al., 2017), favorecendo uma taxa de transporte de elétrons adequado para menor dissipação energética. Dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho, sugerem que a Irradiância - 1 utilizada no cultivo *in vitro*, foi a mais apropriada para essa espécie, uma vez que, pode ter contribuído para a rustificação de maneira antecipada e melhor desempenho das plantas *ex vitro* como pode ser observado na Figura 5.

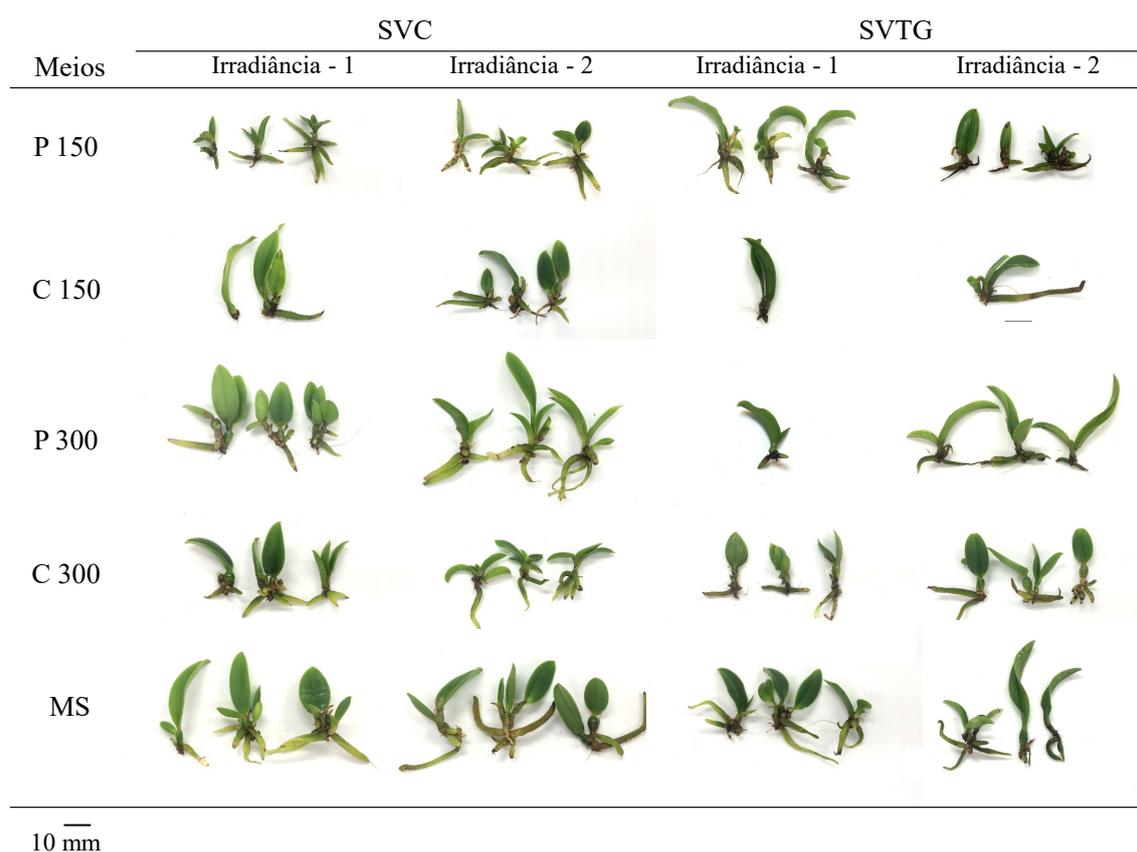


FIGURA 5. Plantas de *Cattleya walkeriana* Gardner., com 180 dias de cultivo *ex vitro* em função do meio de cultivo, sistema de vedação e irradiância estudados. P150 =150g de polpa de banana; P300= 300g de polpa de banana; C150= 150g de casca de banana; C300= 300g de casca de banana; MS= Murashige & Skoog (1962); SVTG= sistema de vedação com trocas gasosas; SVC= sistema de vedação convencional; Irradiância - 1 ( $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); Irradiância - 2 ( $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização de até  $150 \text{ g L}^{-1}$  de polpa de banana como suplemento no meio de cultura, em conjunto com cultivo sob  $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e sistema de vedação convencional pode ser indicado para o crescimento *in vitro* de *C. walkeriana*.

Para o cultivo *ex vitro*, o meio MS juntamente com a irradiância  $86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e sistema de vedação convencional acarretaram na maior sobrevivência e estabelecimento de plantas de *C. walkeriana* oriundas de cultivo *in vitro*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. G., PASQUAL, M., PEREIRA, A. R., ROCHA, H. S. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orquidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 2, n. 2, p. 53-106, 2006.

ARAÚJO, R. **Orquídeas Walkeriana**, São Paulo: Editora Europa, 2017. 79 p.

ARDITTI, J. ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. "A Wiley - Interscience publication", 1992. 680 p.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley, 1993. 682 p.

BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S. G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C. O.; GUIMARÃES, L. R. S. **Orchidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: [www.floradobrasil.jbrj.gov.br/](http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/). Acesso em: 22 jan. 2021.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; DIGNART, S. L.; BIAGINOTTI, G.; PORTO, J. M. P. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 502-508, 2009.

CARDOSO, J. C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 383-384, 2014.

CNCFLORA. Centro Nacional de Conservação da Flora. **Publicado na internet**, v. 3.1, 2013. Disponível em: [www.cncflora.jbrj.gov.br/](http://www.cncflora.jbrj.gov.br/). Acesso em: 17 fev. 2021.

DOLCE, N. R.; MEDINA, R. D.; TERADA, G.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; FLACHSLAND, E. A. *In Vitro* Propagation and Germplasm Conservation of Wild Orchids from South America. In: KHASIM, S.; HEGDE, S.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.; THAMMASIRI, K. ed. *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges*. Singapore: Springer, 2020.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**, 2012. 124 p.

FARIA, R. T.; STEGANI, V.; BERTONCELLI, D. J.; ALVES, G. A. C.; ASSIS, A. M. Substrates for the cultivation of epiphytic orchids. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 39, n. 6, p. 2851-2866, 2018.

FAVETTA, V.; COLOMBO, R. C.; FARIA, R. T. Cultivo *in vitro* de *Vanda tricolor* Lindl. em meios de cultura simplificados. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 57, p. 114-117, 2014.

FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; FARIA, R. T.; RIBEIRO, J. P. N.; CASALI, C. A. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron e *V. P. Castro* (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 636-639, 2010.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, L. T.; SILVA, M. M. A.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite surgacane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell Tiss. Organ Culture**, v. 128, p. 211-221, 2017.
- FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2021. Disponível em: [www.floradobrasil.jbrj.gov.br/](http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/). Acesso em: 25 fev. 2021.
- FREITAS, K. G.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. Crescimento *in vitro* de *Cattleya nobilior* rchb.f.: meios de cultura, sistema de micropropagação e irradiância. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, e. 67131, 2021.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 801-807, 2012.
- GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, Boston, v. 53, p. 202-215, 1972.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture. **The Background**, v. 1, n. 3, p. 501, 2008.
- GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 211-220, 2013.
- HANUS-FAJERSKA, E.; WOJCIECHOWSKA, R. Impact of Light-emitting diodes (LEDs) on propagation of orchids in tissue culture. In: GUPTA, S. D. Light emitting diodes for agriculture. Singapore: **Springer**, v. 12, p. 305-320, 2017.
- HUNG, C. D.; HONG, C. H.; KIM, S. K.; LEE, K. H.; PARK, J. Y.; NAM, M. W.; CHOI, D. H.; LEE, H. I. LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 6, p. 104, 2016.
- HUNHOFF, V. L.; SILVA, C. A.; LAGE, L. A.; KRAUSE, W.; PALÚ, E. G. Biologia, morfologia floral e potencial ornamental de *Cyrtopodium saintlegerianum* (Orchidaceae). **Revista AgroAmbiente**, v. 10, n. 4, p.358-363, 2016.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Sustainability in Brazilian floriculture: introductory notes to a systemic approach. **Ornamental Horticulture**, v. 24, n. 2, p. 155-162, 2018.
- LEMES, C. S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; NUNES, D. P.; RIBEIRO, L. M. Initial *in vitro* establishment of the native Cerrado Orchid *Miltonia flavescens*. **Floram**, v. 27, n. 4, ed. 20, p. 180-221, 2020.
- MACEDO, M. C.; ROSA, D. B. C. J.; SOARES, J. S.; TATARA, M. B.; HOFMMANN, N. T. K.; ROSA, Y. B. C. J. Armazenamento de sementes e aclimatização de *Brassavola tuberculata* Hook. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 2883-2894, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PASCOAL, M.; FIGUEIREDO, M. A.; REZENDE, J. C.; ARAÚJO, A. G.; SANTOS, F. C.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, K. P. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídeas. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 211-216, 2009.

PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G.; SANTOS, R. R. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 324-329, 2011.

RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SCALON, S. P. Q.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, I. S. Influência da luz, ventilação natural e tamanho do frasco no crescimento e desenvolvimento de denphal (Orchidaceae). Revista Brasileira de **Ciências Agrárias**, v. 14, n. 3, ed. 5957, 2019.

SAWAMURA, L. H. **Influência de vitaminas no desenvolvimento de *Cattleyas***. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2016.

SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya Walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, v. 61, n. 6, p. 883-890, 2014.

SILVA, A. B.; REIS, C. O.; CAZETTA, J. O.; CARLIN, S. D.; LANDGRAF, P. R. C.; REIS, M. C. Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the *in vitro* growth of orchids. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 3, p. 619-626, 2016a.

SILVA, C. S.; ARAÚJO, L. G.; SOUSA, K. C. I.; CARVALHO, J. C. B.; GONÇALVES, L. A.; CARNEIRO, L. L. *In vitro culture of Epidendrum nocturnum* (Orchidaceae) occurring in the Cerrado in Central-West region. **Rodriguésia**, v. 67, n. 4, 2016b.

SILVA, C. S.; ARAÚJO, L. G.; SOUSA, K. C. I.; SILVA, D. M.; SIBOV, S. T.; FARIA, P. R. Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado. **Horticultura Ornamental**, v. 23, n. 1, p. 96-100, 2017.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; TATARA, M. B.; SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 2275-2284, 2014.

SOARES, J. S.; SORGATO, J. C.; RIBEIRO, L. M. Protocol for asymbiotic germination and initial protocorm development of Brazilian Cerrado native orchids. **Rodriguésia**, v. 71, ed. 05, 2020.

SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; DAMIANI, C. R.; RIBEIRO, L. M.; Effects of light, agar, activated charcoal, and culture medium on the germination and early development of *Dendrobium* seedlings. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 4, p. 557-564, 2020.

SORGATO, J. C.; MUDOLON, E. D.; GUIMARÃES, F. F.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. Fontes de luz na germinação e estabelecimento inicial *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl. uma espécie do Cerrado brasileiro. **Ciência Rural**, v. 51, n. 3, 2021.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. The pulps of fruits in the growth of epiphytic orchids. Campinas. **Bragantia**, v. 67, n. 1, 2008.

SU, M. J.; SCHINITZER, J. A.; FARIA, R. T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica**, v. 40, n. 1, p. 28-34, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia Vegetal**, ed. 6, 2017. 918 p.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 10, p. 1685-1706, 2015.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; SONGJUN, Z. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 110-124, 2017.

**THE PLANT LIST: A WORKING LIST OF ALL PLANT SPECIES.** 2019. Disponível em: [www.theplantlist.org/](http://www.theplantlist.org/). Acesso em: 15 fev. 2021.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas.** Brasília: Embrapa, (Circular Técnica), 2001. 20 p.

TSUTSUMI, C.; MIYOSHI, K.; YUKAWA, T.; KATO, M. Responses of seed germination and protocorm formation to light intensity and temperature in epiphytic and terrestrial *Liparis* (Orchidaceae). **Botany**, v. 89, n. 12, p. 841-848, 2011.

VIEIRA, J. G. Z.; UNEMOTO, L. K.; YAMAKAMI, J. K.; NAGASHIMA, G. T.; FARIA, R. T.; AGUIAR, R. S. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, v. 37, p. 48-52, 2009.