

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**TECNOLOGIA LED E DIFERENTES MEIOS DE
CULTURA NA GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E
CRESCIMENTO INICIAL *in vitro* DE *Ionopsis
utricularioides* (Sw.) Lindl.**

RUDIMARA FERREIRA GRAFEN

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2019

**TECNOLOGIA LED E DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA
GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E CRESCIMENTO INICIAL *in*
vitro DE *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl.**

RUDIMARA FERREIRA GRAFEN

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ CARLOS SORGATO

Área de concentração - Agronomia

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Universidade Federal da Grande
Dourados, como parte das exigências do
Curso de Graduação em Engenharia
Agrônômica.

Dourados
Mato Grosso Sul
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G736t Grafen, Rudimara Ferreira

Tecnologia LED e diferentes meios de cultura na germinação assimbiótica e crescimento inicial in vitro de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. [recurso eletrônico] / Rudimara Ferreira Grafen. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: José Carlos Sorgato.

TCC (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Diodo emissor de luz. 2. Orchidaceae. 3. Meio de cultivo. 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.

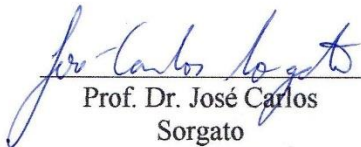
**TECNOLOGIA LED E DIFERENTES MEIOS DE
CULTURA NA GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E
CRESCIMENTO INICIAL *in vitro* DE *Ionopsis
utricularioides* (Sw.) Lindl.**

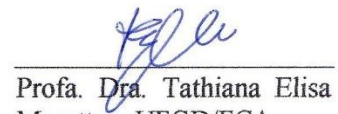
por

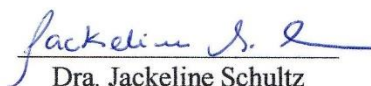
RUDIMARA FERREIRA GRAFEN

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de ENGENHEIRA AGRÔNOMA


Aprovado em:


Prof. Dr. José Carlos
Sorgato
Orientador – UFGD/FCA


Profa. Dra. Tathiana Elisa
Masetto – UFGD/FCA


Dra. Jackeline Schultz
Soares – UFGD/FCA


Msc. Luan Marlon Ribeiro
– UFGD/FCA


Biotechnologista Jessica
Celeste Mônico Ramos

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, por ter me dado a oportunidade de viver, sabedoria e coragem de enfrentar as dificuldades.

A minha mãe Jane, pela compreensão, apoio e por tudo que fez por mim até hoje. Sem ela, eu não teria chegado até aqui, porque não mediu esforços para fazer com que eu tivesse a oportunidade de ter uma formação superior.

A Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados pela disponibilidade da estrutura necessária para execução do trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Dr. José Carlos Sorgato, por ter aceitado ser meu orientador, pelos ensinamentos, amizade, companheirismo, paciência durante esse período.

A técnica de laboratório Jackeline Schultz Soares, por sua ajuda, apoio e preocupação.

Aos meus familiares e amigos pela ajuda e apoio em todos os momentos.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Local e período	13
3.2 Coleta e desinfestação dos frutos	13
3.3 Teste de viabilidade das sementes	13
3.4 Procedimentos para semeadura assimbiótica	14
3.5 Tratamentos experimentais	15
3.6 Procedimentos para avaliação da semeadura assimbiótica	15
3.7 Procedimentos para avaliação do crescimento e desenvolvimento inicial... ..	15
3.8 Delineamento experimental	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÃO	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

GRAFEN, R. F. **Tecnologia LED e diferentes meios de cultura na germinação assimbiótica e crescimento inicial *in vitro* de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl.** 2019. 26 f. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Agronomia), Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

RESUMO

O trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito das condições de luz proporcionada por LEDs e comparar a eficiência de meios de cultivo, sobre a germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. Foram utilizados, para germinação de sementes de *I. utricularioides*, os meios de cultivo MS, MS ½, K, VW e meios modificados pela substituição dos macronutrientes da formulação original do VW pelas formulações comerciais de N-P-K: 09-45-15 (PF) ou 20-20-20 (PM) ou 30-10-10 (PC). Após a inoculação, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados, e submetidas as seguintes condições: fluorescente branca (6.500K) - controle; LED 100% amarela (3.000K); LED 100% branca (6.500K); LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul. Aos 45 e 90 dias após a semeadura foi avaliada a germinação e o crescimento inicial. Aos 45 dias a maior porcentagem de germinação foi observada com a utilização do meio VW e a grande maioria dos propágulos ainda se encontravam em estágio 1. Quando foi utilizado o meio K + LED 100% amarela (3.000K) foi observada a formação de plântulas no estágio 2. Aos 90 dias os maiores valores para porcentagem de propágulos clorofilados foram observados nos meios MS, MS ½ e VW, independente da condição de luz utilizada. Os maiores valores para propágulos em estágio 4 foram verificados no meio VW + LED 100% amarela (3.000K) e VW + CL4 LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul. A *I. utricularioides* germina e se desenvolve melhor quando cultivada *in vitro* com a utilização de meios de cultivo que possuam menores concentrações de sais. A fonte de luz LED 100% amarela (3.000K) pode ser utilizada em salas de crescimento no cultivo *in vitro* dessa orquídea.

Palavras-chave: diodo emissor de luz, Orchidaceae, meios de cultivo.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of light conditions provided by LEDs and to compare the efficiency of culture media on the *in vitro* germination and initial growth of *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. For germination of *I. utricularioides* seeds, the culture media MS, ½ MS, K, VW were used, and media modified by replacing the original formulation VW macronutrients in commercial formulations for NPK: 09-45-15 (PF), or 20-20-20 (PM) or 30-10-10 (PC). After inoculation, the cultures were conditioned in growth room with controlled temperature and photoperiod, and subjected to the following conditions: white fluorescent (6.500K) - control; 100% yellow LED (3.000K); 100% white LED (6.500K); 50% white LED (6.500K) + 25% red + 25% blue. At 45 and 90 days after sowing, germination and initial growth were evaluated. At 45 days the highest percentage of germination was observed with the use of VW medium and most of the propagules were still in stage 1. When the medium K + LED 100% yellow (3.000K) was used the formation of seedlings at stadium 2. At 90 days the highest values for percentage of chlorophyll propagules were observed in MS, ½ MS and VW media, regardless of the light condition used. The highest values for stage 4 propagules were found in VW + 100% yellow (3.000K) LED and VW + CL4 50% white (6,500K) + 25% red + 25% blue. The *I. utricularioides* germinates and develops best when grown *in vitro* using culture media that have lower salt concentrations. The 100% yellow (3.000K) LED light source can be used in growing rooms for *in vitro* cultivation of this orchid.

Keywords: light emitting diode, Orchidaceae, culture media.

1. INTRODUÇÃO

A *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. é uma espécie de orquídea nativa do bioma Cerrado, amplamente distribuída e encontrada no Brasil, nas regiões Norte (Pará, Amazonas, Acre e Rondônia), Nordeste (Maranhão, Pernambuco e Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná e Santa Catarina) (BARROS et al., 2019). Na Serra do Japi/SP, a espécie é considerada rara, entretanto é comum em áreas de floresta mesófila estacional semidecídua e matas de galeria em regiões adjacentes às áreas de cerrado do interior do estado de São Paulo, por exemplo, nos municípios de São Carlos, Itirapina, Jaboticabal e Bauru (PANSARIN, 2008).

A atividade extrativista de orquídeas nativas é uma realidade. Este fato contribui para torná-las vulneráveis, aumentando seu risco de extinção e por esse motivo a propagação da espécie pode ser realizada através de técnicas de cultivo *in vitro*, sendo a germinação assimbiótica de sementes a mais utilizada quando se deseja produzir grande número de plantas com variabilidade genética, em tempo relativamente curto e com alta qualidade fitossanitária, pois apresenta elevados percentuais de germinação quando comparada à germinação sob condições naturais (LORENZI & SOUZA, 2008; FARIA et al., 2010; ABRÃO et al., 2014; CARDOSO, 2014).

No cultivo *in vitro*, a formulação, a consistência e o enriquecimento do meio de cultivo, que variam de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie, juntamente com a composição espectral da luz e irradiância são fatores que podem influenciar na germinação e no crescimento inicial. Esses podem ser específicos nas diferentes etapas da germinação, crescimento e desenvolvimento do material cultivado *in vitro* (STEWART & KANE, 2006; TEMJENSANGBA & DEB, 2006; PAUL et al., 2012; TAIZ et al., 2017; SILVA et al. 2015; SORGATO et al., 2015). De modo geral, os meios de cultivo como MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), KC (KNUDSON, 1946) e VW (VACIN & WENT, 1949) são os mais utilizados na germinação assimbiótica e no cultivo *in vitro* de orquídeas (SUZUKI et al., 2010; FARIA et al., 2012; SILVA et al., 2015).

O diodo emissor de luz (LED) é uma tecnologia que oferece muitas possibilidades na iluminação hortícola, devido à sua capacidade de separar e misturar diferentes espectros de luz, além de permitir ajustes de irradiância adequada aos fotorreceptores das plantas (SINGH et al., 2015). Permitindo através dessas propriedades, regular parâmetros de plantas cultivadas *in vitro* como variações morfológicas,

anatômicas e atributos fisiológicos como o alongamento, a formação de brotos axilares, a indução de embriões somáticos, a rizogênese, a anatomia foliar e habilidades fotossintéticas (GUPTA & JATOTHU, 2013). Contudo, ainda são poucos os estudos científicos sobre a utilização das lâmpadas LEDs, como fonte de energia luminosa, no cultivo *in vitro* e *ex vitro* de orquídeas.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito das condições de luz proporcionadas por LEDs e a eficiência de diferentes meios de cultura sobre a germinação e o crescimento inicial *in vitro* de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A família Orchidaceae originou-se na Malásia, há milhões de anos, quando a maioria das famílias das angiospermas tornavam-se diferenciadas (GARAY, 1972). É considerada a maior família dentre as Angiospermas, possui cerca de 848 gêneros, aproximadamente 10.490 espécies (BARROS et al., 2020). No Brasil, Barros et al. (2020) listam 217 gêneros e 2.443 espécies, das quais 1.571 são endêmicas do país.

O gênero *Ionopsis* possui seis espécies amplamente distribuídas ao longo da América e também nas ilhas de Galápagos (ALRICH & HIGGINS, 2008). A Lista de Espécies da Flora do Brasil considera que existem três espécies do gênero no Brasil (BARROS et al., 2019). No bioma Cerrado, e no Distrito Federal, está representada por apenas uma espécie, *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. (BARROS et al., 2019).

A orquídea *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. é uma epífita e caracterizada como uma planta pequena, com pseudobulbos reduzidos, que medem apenas 1 cm de altura e as folhas com cerca de 10 cm são lineares de consistência coriácea. A inflorescência é paniculada bem maior que a planta, as flores de cerca de 1,5 cm de diâmetro têm formato de coração e podem ser róseas, brancas ou lilases, com sépalas e pétalas bem reduzidas e labelo grande. Embora pequenas, elas surgem reunidas em hastes florais de até 30 cm de comprimento durante a primavera, chamando bastante atenção (OSTETTO, 2015).



FIGURA 1: *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. Aspecto morfológico da flor. Foto: Edson Moroni

A propagação de orquídeas pode ser realizada assexuadamente através de brotações laterais formadas a partir dos pseudobulbos e por divisão de touceiras ou de forma sexuada, sendo esta a mais utilizada quando se deseja produzir grande número de

plantas em tempo relativamente curto e com alta qualidade fitossanitária (LORENZI & SOUZA, 2008; FARIA et al., 2010; CARDOSO, 2014).

A multiplicação rápida e eficiente de orquídeas tanto para a pesquisa, visando à preservação das espécies ameaçadas ou não de extinção, quanto para a produção em escala comercial, pode ser realizada através de técnicas de cultivo *in vitro* (CARDOSO, 2014; SORGATO et al., 2014). Dentre as técnicas, a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas se destaca, pois, esse tipo de semeadura apresenta elevados percentuais de germinação quando comparada à germinação sob condições naturais, a qual é dependente de fungos micorrízicos, constituindo, dessa maneira, uma alternativa viável para propagação dessas plantas (FARIA et al., 2012; ABRÃO et al., 2014).

A escolha apropriada do meio de cultivo para semeadura *in vitro* é um dos principais fatores para o sucesso do cultivo assimbiótico, uma vez que as respostas germinativas variam de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie, que podem ser específicas nas diferentes etapas de germinação, crescimento e desenvolvimento (STEWART & KANE, 2006; TEMJENSANGBA & DEB, 2006; PAUL et al., 2012; SILVA et al., 2015).

Outro fator importante para a germinação das sementes é a luz (SILVA et al., 2015). A germinação de sementes de orquídeas apresenta diferentes respostas à luz (ARDITTI & ERNST, 1894, SILVA et al., 2015). Assim, a luz emitida por diodo vem sendo utilizado como uma alternativa para sistemas de iluminação convencionais e tem sido demonstrado através de pesquisas que podem ser utilizados como fonte de luz artificial para a cultura de tecidos de plantas, obtendo resultados satisfatórios (YEH e CHUNG, 2009). Através das propriedades espectrais dos LEDs (Light-Emitting Diode) é possível regular parâmetros de plantas cultivadas *in vitro*, como variações morfológicas, anatômicas e atributos fisiológicos como o alongamento, a formação de brotos axilares, a indução de embriões somáticos, a rizogênese, a anatomia foliar, e habilidades fotossintéticas (GUPTA & JATOTHU, 2013).

O LED é um dispositivo semicondutor composto basicamente por silício, que emite luz de estreito espectro quando energizado (BOURGET, 2008). Destacam-se como fontes de luz por possuírem longo período de vida útil (50.000h), comprimento de onda específico, massa e volume pequenos, além da alta eficiência no processo de geração de luz (60%) com baixa produção de calor, contribuindo para a aquisição de um sistema de resfriamento menos potente e conseqüentemente, consumindo menos energia na sala de crescimento (YEH & CHUNG, 2009; ROCHA et al., 2013).

As novas tecnologias utilizadas na produção de flores e plantas ornamentais requerem o aprimoramento das técnicas e melhores condições de cultivo *in vitro*, pois são ferramentas biotecnológicas valiosas 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 e quanto a conservação das espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e período

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), durante o período de julho de 2018 a dezembro de 2018.

3.2 Coleta e desinfestação dos frutos

Como material vegetal utilizou-se sementes provenientes de frutos da orquídea *I. utricularioides*, destacados com auxílio de uma tesoura de poda manual das matrizes e posteriormente levados para o laboratório de cultivo *in vitro* da FCA/UFGD, onde foram desinfestados com solução de álcool etílico 70% e abertos com auxílio de bisturi, sendo as sementes homogeneizadas, avaliadas quanto à viabilidade pelo teste tetrazólio e posteriormente acondicionadas em dessecador com sílica gel (25 ± 2 °C; 75% UR) por 14 dias.

3.3 Teste de viabilidade das sementes

Após esse período, realizou-se o teste de tetrazólio, seguindo metodologia proposta por Soares et al. (2014), segundo a qual, três porções de sementes, de 5 mg cada, colocadas em tubos de ensaio e cada uma delas receberam 3 mL de solução aquosa de cloreto de trifênil tetrazólio (0,5%). As suspensões de sementes foram acondicionadas no escuro, em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após 24 horas, as suspensões de tetrazólio receberam acréscimo de 7 mL de água destilada estéril e agitadas, sendo pipetado 1 mL para identificação e contagem de sementes potencialmente viáveis em placas de acrílico (2,0 cm x 2,0 cm x 0,5 cm), quadriculadas (0,5 cm x 0,5 cm), com o auxílio de microscópio estereoscópico binocular, sendo esse procedimento realizado três vezes. Consideraram-se como viáveis as sementes com embriões totalmente coloridos de rosa carmim claro, enquanto as sementes com embriões incolores, parcialmente corados ou desprovidas de embrião foram consideradas inviáveis. Para cada amostra foram realizadas três leituras, sendo posteriormente calculada a média entre elas, e identificadas as sementes viáveis ou inviáveis (Figura 2).

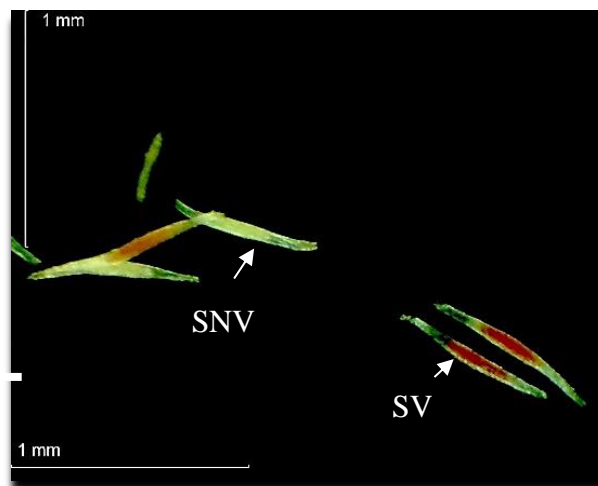


FIGURA 2. Detalhe das sementes viáveis (SV) e não viáveis (SNV) de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl., após o teste de viabilidade. Barra de escala = 1 mm. UFGD, Dourados-MS, 2019. Foto: Luan M. Ribeiro.

3.4 Procedimentos para semeadura assimbiótica

Como meio de cultura para germinação das sementes, foram utilizados os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962); MS $\frac{1}{2}$ (MS na metade de concentração de sais); K (KNUDSON C, 1946); VW (VACIN & WENT, 1949) e meios simplificados pela adição de macronutrientes (3 g L^{-1}) com as formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10, acrescidos dos micronutrientes do meio VW. Todos os meios de cultivo foram solidificados com $6,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico (Himedia[®], Índia) e suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose. O pH dos meios foi aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se KOH (0,1M) e na sequência distribuído em frascos de polipropileno com tampa rosqueável com capacidade de 60 mL, sendo que cada frasco recebeu 20 mL do referido meio de cultivo. Posteriormente, os frascos foram esterilizados em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após o resfriamento os frascos foram transferidos para sala de crescimento.

Em seguida, foram pesados 10 mg de sementes de *I. utricularioides* e as sementes foram levadas para ambiente asséptico e desinfestadas, onde, permaneceram imersas na solução de hipoclorito de sódio a 0,8% (15 mL) por cinco minutos (5'). Posteriormente, a suspensão de sementes foi diluída para 50 mL com água destilada e em seguida recebeu tríplice lavagem (40 mL por lavagem). Após este procedimento o volume da suspensão foi completado para 50 mL com água destilada para a semeadura *in vitro*. A semeadura foi realizada com o auxílio de um pipetador automático inoculando-se 1000 μL da suspensão de sementes por frasco.

3.5 Tratamentos experimentais

Após a inoculação, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (25 ± 2 °C; 16h) e submetidas as seguintes condições de luz descritas na Tabela 1:

TABELA 1. Condições de luz para a germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Condição de luz (CL)	Sigla
Fluorescente branca (6.500K) - controle	CL1
LED 100% amarela (3.000K)	CL2
LED 100% branca (6.500K)	CL3
LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul	CL4

3.6 Procedimentos para avaliação da semeadura assimbiótica

Aos 45 e 90 dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação. Os materiais contidos nos frascos foram lavados com 3 mL de água destilada estéril e acondicionados em placas de acrílico (2,0 cm x 2,0 cm x 0,5 cm), quadriculadas (0,5 cm x 0,5 cm) e, com auxílio de microscópio estereoscópico binocular foram contados o número de sementes não germinadas (NSNG) e o número de propágulos clorofilados (PC). A porcentagem de germinação foi calculada pela seguinte expressão: $\%G = [PC / (NSNG + PC)] \times 100$. Após a contagem, os tratamentos foram fotografados com câmera acoplada ao microscópio estereoscópico, com auxílio do programa computacional AxionVision versão 3.1 (Zeiss®).

3.7 Procedimentos para avaliação do crescimento inicial

As avaliações de crescimento inicial, foram realizadas aos 45 e 90 dias após a semeadura, seguindo metodologia descrita por Suzuki et al. (2009), onde foram consideradas as seguintes classes morfológicas descritas na Figura 3:

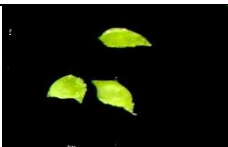



	Estádios de desenvolvimento	Sigla
	Estádio 1 - Protocormo intumescido clorofilado	P1
	Estádio 2 - Plântula com formação da primeira folha	P2
	Estádio 3 - Plântula com duas folhas	P3
	Estádio 4 - Plântula com folhas e uma ou mais raízes	P4

FIGURA 3. Estádios de desenvolvimento de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. UFGD, Dourados-MS, 2019. Foto: Luan M. Ribeiro.

Também foi contabilizado o número de propágulos não clorofilados (PNC). Após as avaliações, os tratamentos foram fotografados com câmera acoplada ao microscópico estereoscópico, com auxílio do programa computacional AxionVision versão 3.1 (Zeiss®).

3.8 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 4 x 7 (quatro condições de luz e sete meios de cultura), com dez repetições, tanto aos 45 quanto aos 90 dias de cultivo. Os resultados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$ e, a seguir, submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey até 5% de probabilidade com auxílio do software estatístico SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, MG).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

45 dias

Houve efeito isolado dos meios de cultura sobre a germinação. Efeito significativo da interação entre luz x meio de cultivo foi observado para as variáveis %P2, %PC e %PNC. Nenhum dos fatores influenciaram a %P1 aos 45 dias após a semeadura (Tabela 2).

TABELA 2. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) e do crescimento inicial *in vitro*: protocormo estágio 1 (%P1), plântula em estágio 2 (%P2), propágulo clorofilado (%PC) e propágulo não clorofilado (%PNC) de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. em diferentes condições de luz e meios de cultivo aos 45 dias após a semeadura. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Fator de variação	GLQuadrado médio				
		%G	%P1	%P2	%PC	%PNC
Luz	3	10,46 ^{ns}	162,67 ^{ns}	94,11 [*]	46,78 ^{ns}	265,52 ^{ns}
Meio	6	7019,67 [*]	171,01 ^{ns}	94,11 [*]	20452,65 [*]	18578,29 [*]
Luz x Meio	18	101,91 ^{ns}	223,28 ^{ns}	94,11 [*]	572,83 [*]	675,27 [*]
Erro	54	66,46	127,09	5,65	38,98	161,80
Total	83	47599,67	12598,68	2857,43	135327,58	133248,43
Média		38,85	97,61	1,06	59,80	39,01
C.V. (%)		12,64	10,14	18,49	6,96	24,10

^{*}, ^{ns}; significativo e não significativo, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
GL.: grau de liberdade.

A maior %G foi observada com a utilização do meio VW (90%), valor este 56 pontos percentuais maior do que o meio MS ½ que apresentou %G = 40%, enquanto os meios de cultura PC, PF e PM apresentaram a menor eficiência para a germinação *in vitro* dessa orquídea (20%, 23% e 23%, respectivamente) (Tabela 3).

TABELA 3. Porcentagem de germinação (%G) de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. em função dos meios de cultivo aos 45 dias após semeadura. UFGD, Dourados- MS, 2019.

Meios de cultivo	%G						
	PC	PF	PM	K	MS	MS 1/2	VW
	20 c	23 c	23 c	36 b	39 b	40 b	90 a
Média	39						
C.V. (%)	12,64						

Letras minúsculas, na linha, comparam os meios de cultura (Tukey $p < 0,05$). Formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10; K= Knudson C (1946); MS= Murashige & Skoog (1962); MS ½= (MS na metade de concentração de sais); VW= Vacin & Went (1949).

Godo et al. (2011), em sua revisão relataram que a luz é um fator ambiental importante que pode afetar diretamente o desenvolvimento das plantas. Para a germinação de sementes de orquídeas, o efeito das condições de luminosidade não é generalizado, uma vez que as respostas germinativas podem ser determinadas pela espécie, dependendo ou não do seu hábito de crescimento (KAUTH et al., 2008). Esses resultados corroboram com Soares (2018) que, estudando a germinação de *Schomburgkia crispa* Lindl. em diferentes meios de cultivo e condições de luminosidade, observou que não houve influência da luminosidade sobre esse a germinação, evidenciando que as sementes dessas espécies são, nas condições avaliadas, fotoblásticas neutras (TAIZ et al., 2017).

Observando as respostas germinativas dessa espécie pode-se destacar que a escolha do meio de cultivo é importante para o sucesso da germinação de sementes de orquídeas, uma vez que a formulação adequada para cada espécie está ligada diretamente aos nutrientes fornecidos às plantas e à sua influência na germinação (SUZUKI et al., 2009).

As maiores médias de %PC (100%) foram observadas nos tratamentos PF + CL2; K + CL1; K + CL3 e MS ½ + CL2. Já as menores médias foram encontradas em PC e PM, apresentando os maiores valores de mortalidade (%PNC), independente da luz utilizada. De maneira geral, no meio VW houve a menor mortalidade de protocormos (Tabela 4).

Ao analisar a composição química dos diferentes fertilizantes comerciais adicionados aos meios de cultivo PC, PF e PM, pode-se observar que os maiores valores de %PC foram encontrados em PF (Tabela 4). Esses resultados permitem inferir que o N (nitrogênio) em elevadas concentrações, pode ter influenciado na mortalidade dos protocormos.

TABELA 4. Porcentagem de protocormos clorofilados (%PC) e não clorofilados (%PNC) de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. em diferentes condições de luz e meios de cultivo aos 45 dias após semeadura. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Meio	%PC			
	CL1	CL2	CL3	CL4
PC	0,00 dA	0,00 cA	0,00 eA	0,00 dA
PF	95,83 aA	100,00 aA	62,03 dB	50,62 cC
PM	0,00 dA	0,00 cA	4,76 eA	0,00 dA
K	100,00 aA	58,91 bB	100,00 aA	93,86 Aa
MS	63,71 cA	67,41 bA	76,08 cA	68,44 bA
MS ½	75,23 bB	100,00 aA	91,41 bA	94,19 aA
VW	94,30 aA	94,96 aA	85,64 bA	97,05 aA
C.V. (%)	6,96			
Meio	%PNC			
PC	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
PF	4,17 dB	0,00 cB	37,97 bA	49,38 bA
PM	100,00 aA	100,00 aA	95,24 aA	100,00 aA
K	0,00 dB	41,09 bA	0,00 cB	6,14 cB
MS	36,29 cA	32,59 bA	23,92 bA	31,56 bA
MS ½	24,77 cA	0,00 cA	8,59 cA	5,81 cA
VW	5,70 dA	5,04 cA	14,36 cA	2,95 cA
C.V. (%)	24,10			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultivo na mesma condição de luz.

Letras maiúsculas, na linha, comparam a condição de luz do mesmo meio de cultura (Tukey $p < 0,05$). Formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10; K= Knudson C (1946); MS= Murashige & Skoog (1962); MS ½= (MS na metade de concentração de sais); VW= Vacin & Went (1949); CL1= Fluorescente branca (6.500K); CL2= LED 100% amarela (3.000K); CL3= LED 100% branca (6.500K); CL4= LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul.

O N é um dos elementos mais limitantes no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo o seu papel amplamente reconhecido (Rodrigues et al., 2011). Há relatos na literatura de que, quando o N é fornecido somente na forma de sais inorgânicos de amônio, as células *in vitro* apresentam sintomas de toxidez (Ribeiro et al., 2002). Além disso, o acúmulo do íon amônio pode ser prejudicial à fisiologia do vegetal, podendo levar a morte e por este motivo necessita ser assimilado rapidamente em sua forma orgânica (TAIZ et al., 2017).

Embora sem significância, a %P1 de *I. utricularioides* apresentou média geral de 97,62%. Aos 45 dias de cultivo *in vitro* a grande maioria dos propágulos ainda se encontravam em estágio 1 (protocormo intumescido clorofilado), sendo que praticamente todos os meios de cultura e condições de luminosidade testados propiciaram valores elevados dos protocormos nesse estágio de crescimento. Entretanto, apenas quando foi

utilizado o meio K + CL2 foi observada a formação de plântulas no estágio 2 (%P2), sendo este 29,64% do total do tratamento.

TABELA 5. Porcentagens de propágulos em estágio 2 (%P2) de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. em diferentes condições de luz e meios de cultivo aos 45 dias após a semeadura. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Meio	%P2			
	CL1	CL2	CL3	CL4
PC	0,00 aA	0,00 bA	0,00 aA	0,00 aA
PF	0,00 aA	0,00 bA	0,00 aA	0,00 aA
PM	0,00 aA	0,00 bA	0,00 aA	0,00 aA
K	0,00 aB	29,64 aA	0,00 aB	0,00 aB
MS	0,00 aA	0,00 bA	0,00 aA	0,00 aA
MS ½	0,00 aA	0,00 bA	0,00 aA	0,00 aA
VW	0,00 aA	0,00 bA	0,00 aA	0,00 aA
Média	0,00	4,23	0,00	0,00
C.V. (%)	18,49			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma condição de luz.

Letras maiúsculas, na linha, comparam a condição de luz do mesmo meio de cultura (Tukey $p < 0,05$). Formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10; K= Knudson C (1946); MS= Murashige & Skoog (1962); MS ½= (MS na metade de concentração de sais); VW= Vacin & Went (1949); CL1= Fluorescente branca (6.500K); CL2= LED 100% amarela (3.000K); CL3= LED 100% branca (6.500K); CL4= LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul.

Essas observações permitem inferir que, embora a %G de *I. utricularioides* tenha sido maior no meio VW, a utilização de meio K, em sala de crescimento com LED 100% amarela (3.000K) pode ser a condição mais apropriada para a germinação *in vitro* dessa espécie, já que promoveu o desenvolvimento dos protocormos formados, o que pode resultar em maior crescimento em menor período de tempo.

90 dias

Aos 90 dias de cultivo *in vitro*, houve efeito significativo ($p < 0,05$) da interação das condições de luz x meios de cultivo para as variáveis %P1, %P2, %P4 e %PC. Para %P3 e %PNC foi constatado efeito isolado dos meios de cultivo (Tabela 6).

TABELA 6. Resumo da análise de variância do crescimento inicial *in vitro*: protocormo estágio 1 (%P1), plântula em estágio 2 (%P2), plântula em estágio 3 (%P3), plântula em estágio 4 (%P4), propágulo clorofilado (%PC) e propágulo não clorofilado (%PNC) de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. em diferentes condições de luz e meios de cultivo aos 90 dias após a semeadura. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Fator de variação	GLQuadrado médio					
		%P1	%P2	%P3	%P4	%PC	%PNC
Luz	3	772,16*	333,94*	67,39 ^{ns}	430,81*	365,65 ^{ns}	365,65 ^{ns}
Meio	6	11313,30*	2380,11*	1267,10*	1349,86*	19584,16*	19584,16*
Luz x Meio	18	301,67*	119,84*	80,67 ^{ns}	230,41*	113,46*	113,46 ^{ns}
Erro	54	100,56	47,78	45,10	56,74	134,25	134,25
Total	83	81121,84	20106,8	11721,1	16624,3	128367,6	128367,7
Média		67,86	14,58	8,89	8,66	57,31	42,68
C.V. (%)		9,74	26,17	31,43	34,19	10,60	22,85

*, ^{ns}; significativo e não significativo, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

GL.: grau de liberdade.

De maneira geral, os maiores valores para %PC foram observados nos meios VW, MS ½ e MS, independente da condição de luz utilizada. A condição de luminosidade influenciou apenas as plântulas cultivadas em meio K, apresentando %PC de 88,63 e 78,75% nas lâmpadas CL3 e CL4, respectivamente (Tabela 7).

TABELA 7. Porcentagem de protocormos clorofilados (%PC) de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. em diferentes condições de luz e meios de cultivo aos 90 dias após semeadura. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Meio	%PC			
	CL1	CL2	CL3	CL4
PC	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA
PF	66,11 bA	64,07 bA	81,19 aA	74,71 bA
PM	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA
K	63,19 bB	66,61 bB	88,63 aA	78,75 bA
MS	54,23 bA	71,68 bA	71,91 aA	76,88 bA
MS ½	95,24 aA	87,45 aA	86,99 aA	97,62 aA
VW	87,80 aA	97,64 aA	96,86 aA	97,27 aA
Média	52,37	55,35	60,80	60,75
C.V. (%)	6,96			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma condição de luz.

Letras maiúsculas, na linha, comparam a condição de luz do mesmo meio de cultura (Tukey $p < 0,05$). Formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10; K= Knudson C (1946); MS= Murashige & Skoog (1962); MS ½= (MS na metade de concentração de sais); VW= Vacin & Went (1949); CL1= Fluorescente branca (6.500K); CL2= LED 100% amarela (3.000K); CL3= LED 100% branca (6.500K); CL4= LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul.

Novamente entre os meios de cultivos formulados com formulações comerciais, somente PF apresentou protocormos clorofilados aos 90 dias de cultivo,

reiterando a hipótese de que elevadas concentrações de nitrogênio podem ter sido tóxicas, prejudicando o desenvolvimento *in vitro* de *I. utricularioides*.

Os meios VW e MS ½ proporcionaram os menores valores em %PNC, apresentando mortalidade de 5,11 e 8,18%, respectivamente (Tabela 8).

TABELA 8. Porcentagem de protocormos não clorofilados (%PNC) de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. em meios de cultivo aos 90 dias após sementeira. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Meio de cultivo	%PNC						
	PC	PF	PM	K	MS	MS ½	VW
	100,00 a	28,48 b	100,00 a	25,70 b	31,32 b	8,18 c	5,11 c
Média	42,68						
C.V. (%)	24,10						

Letras minúsculas, na linha, comparam os meios de cultura (Tukey $p < 0,05$). Formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10); K= Knudson C (1946); MS= Murashige & Skoog (1962); MS ½= (MS na metade de concentração de sais); VW= Vacin & Went (1949).

O meio PF apresentou as maiores médias para % de P1, independente da condição de luz utilizada. A média de PF + CL1 (100%) não diferiu estatisticamente da apresentada por VW (84,16%) na mesma condição de luminosidade (Tabela 9).

TABELA 9. Porcentagem de propágulos em estágio 1 (%P1) no crescimento inicial de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. em diferentes condições de luz e meios de cultivo aos 90 dias após a sementeira. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Meio	%P1			
	CL1	CL2	CL3	CL4
PC	0,00 eA	0,00 cA	0,00 dA	0,00 dA
PF	100,00 aA	96,97 aA	95,83 aA	94,41 aA
PM	0,00 eA	0,00 cA	0,00 dA	0,00 dA
K	70,59 bcA	45,79 bB	60,09 bAB	48,56 bB
MS	51,03 cdA	44,14 bA	49,23 bA	39,68 bA
MS ½	27,36 dAB	35,88 bA	23,56 cAB	11,79 cB
VW	84,16 abA	25,32 bC	50,92 bB	44,80 bBC
Média	76,16	64,01	68,52	62,75
C.V. (%)	9,74			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma condição de luz.

Letras maiúsculas, na linha, comparam a condição de luz do mesmo meio de cultura (Tukey $p < 0,05$). Formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10; K= Knudson C (1946); MS= Murashige & Skoog (1962); MS ½= (MS na metade de concentração de sais); VW= Vacin & Went (1949); CL1= Fluorescente branca (6.500K); CL2= LED 100% amarela (3.000K); CL3= LED 100% branca (6.500K); CL4= LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul.

Os resultados permitem inferir que os meios de cultivo alternativos com formulações comerciais de N-P-K, não contribuíram com o desenvolvimento dos

protocormos, uma vez que, quase todos ainda se encontravam na fase P1 aos 90 dias de cultivo.

As maiores médias para %P2 foram observadas no meio MS ½ + CL3 (45,54%) sem diferença significativa para MS ½ + CL2 (33,36%) e MS + CL3 (33,18%) e no meio MS + CL4 (42,37%) sem diferença significativa para MS + CL3 e MS ½ + CL4 (28,23%) (Tabela 10).

TABELA 10. Porcentagem de propágulos em estágio 2 (P2) no crescimento inicial de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. aos 90 dias após a semeadura em função das condições de luz e dos meios de cultivo. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Meio	%P2			
	CL1	CL2	CL3	CL4
PC	0,00 bA	0,00 cA	0,00 Da	0,00 cA
PF	0,00 bB	3,03 cA	4,16 cdA	5,59 cA
PM	0,00 bA	0,00 cA	0,00 dA	0,00 cA
K	15,09 abA	11,97 bcA	21,20 bcA	15,11 bcA
MS	8,11 bB	33,99 aA	33,18 abA	42,37 aA
MS 1/2	30,42 aB	33,36 aAB	45,54 aA	28,23 abB
VW	10,04 bB	23,12 abAB	26,42 bA	17,21 bcAB
Média	9,09	15,07	18,64	15,50
C.V. (%)	26,17			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma condição de luz.

Letras maiúsculas, na linha, comparam a condição de luz do mesmo meio de cultura (Tukey $p < 0,05$). Formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10; K= Knudson C (1946); MS= Murashige & Skoog (1962); MS ½= (MS na metade de concentração de sais); VW= Vacin & Went (1949); CL1= Fluorescente branca (6.500K); CL2= LED 100% amarela (3.000K); CL3= LED 100% branca (6.500K); CL4= LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul.

Para os propágulos em estágio 3, os maiores resultados foram observados com a utilização dos meios de cultivo MS e MS ½ (23,15 e 22,14% respectivamente) (Tabela 11).

TABELA 11. Porcentagens de propágulos em estágio 3 (%P3) de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. em meios de cultivo aos 90 dias após a semeadura. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Meio de cultivo	%P3						
	PC	PF	PM	K	MS	MS 1/2	VW
	0,00 c	0,00 c	0,00 c	11,41 b	23,15 a	22,14 a	5,58 bc
Média	8,89						
C.V. (%)	31,43						

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As maiores médias para % P4 foram observadas no meio VW + CL2 (46,27%), não diferindo significativamente do mesmo meio de cultura na luz CL4 (31,50%) (Tabela 12).

TABELA 12. Porcentagem de propágulos em estágio 4 (P4) no crescimento inicial de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. aos 90 dias após a semeadura em função das condições de luz e dos meios de cultivo. UFGD, Dourados-MS, 2019.

Meio	%P4			
	CL1	CL2	CL3	CL4
PC	0,00 bA	0,00 cA	0,00 aA	0,00 bA
PF	0,00 bA	0,00 cA	0,00 aA	0,00 bA
PM	0,00 bA	0,00 cA	0,00 aA	0,00 bA
K	1,42 bB	26,80 bA	10,94 aAB	26,77 aA
MS	0,00 bA	3,17 cA	2,47 aA	0,00 bA
MS 1/2	21,35 aAB	9,88 bcB	13,65 aB	30,41 aA
VW	2,51 bC	46,27 aA	15,41 aBC	31,50 aAB
Média	3,61	12,30	6,08	12,67
C.V. (%)	34,19			

Letras minúsculas na coluna comparam os meios de cultura na mesma condição de luz.

Letras maiúsculas, na linha, comparam a condição de luz do mesmo meio de cultura (Tukey $p < 0,05$). Formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10; K= Knudson (1946); MS= Murashige & Skoog (1962); MS 1/2= (MS na metade de concentração de sais); VW= Vacin & Went (1949); CL1= Fluorescente branca (6.500K); CL2= LED 100% amarela (3.000K); CL3= LED 100% branca (6.500K); CL4= LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul.

Na natureza, *I. utricularioides* tem hábito epifítico e ocorre em ambientes de Cerrado, o que pode explicar o requerimento de menor teor de nutrientes. De acordo com Stewart (1989), as espécies de orquídeas podem ser divididas em dois grupos conforme suas necessidades nutricionais: o primeiro grupo é composto por espécies que germinam em meios de cultura com menor concentração de nutrientes, como o VW, já o segundo grupo é composto por espécies de orquídeas que germinam melhor em meios com maior concentração de macronutrientes.

Os resultados observados neste trabalho tanto para germinação quanto para crescimento inicial sugerem que *I. utricularioides*, pertença ao primeiro grupo, necessitando de meios de cultura com menor fornecimento de nutrientes para o cultivo *in vitro*, como pode ser observado na Figura 4.

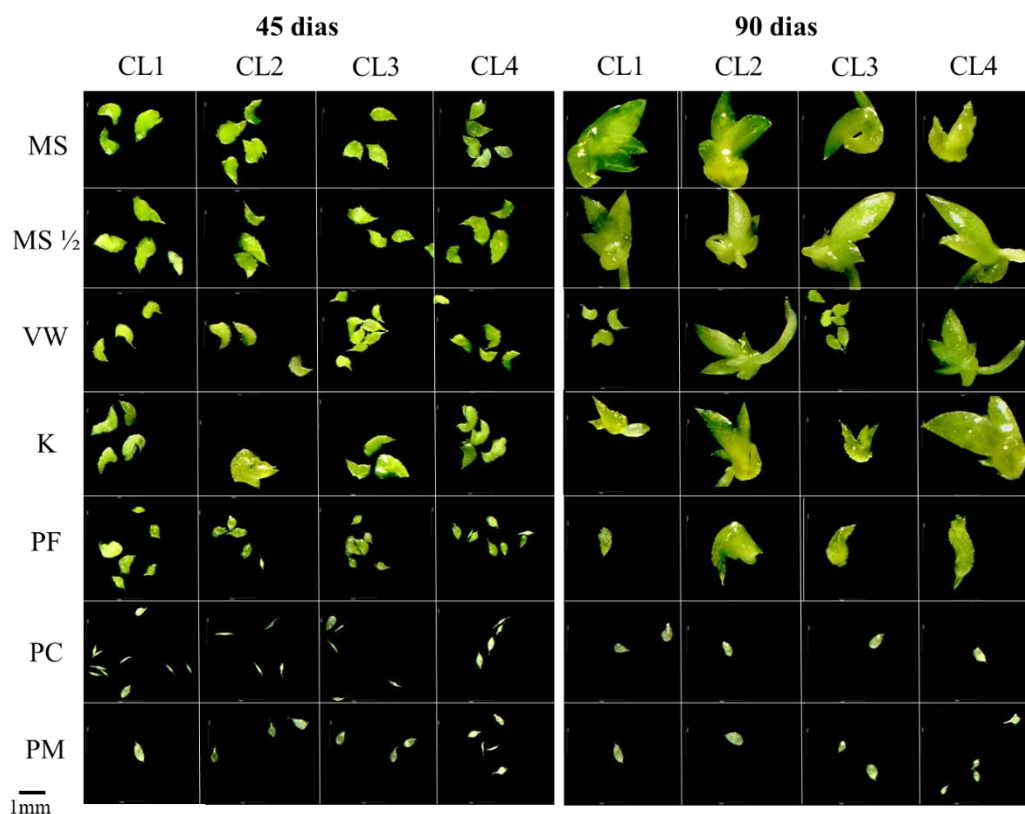


Figura 5. Propágulos de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. aos 45 e 90 dias após a semeadura em função das condições de luz e meios de cultura. Formulações comerciais de N-P-K: PF) 09-45-15 ou PM) 20-20-20 ou PC) 30-10-10; K= Knudson C (1946); MS= Murashige & Skoog (1962); MS 1/2= (MS na metade de concentração de sais); VW= Vacin & Went (1949); CL1= Fluorescente branca (6.500K); CL2= LED 100% amarela (3.000K); CL3= LED 100% branca (6.500K); CL4= LED 50% branca (6.500K) + 25% vermelha + 25% azul.

CONCLUSÃO

- 1- A luz não é um fator limitante para a germinação de *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl.
- 2- A espécie estudada germina e se desenvolve melhor quando cultivada *in vitro* com a utilização de meios de cultivo que possuam menores concentrações de sais.
- 3- A fonte de luz LED 100% amarela (3.000K) pode ser utilizada em salas de crescimento no cultivo *in vitro* de *I. utricularioides*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRÃO, M. C. R.; JORGE, J.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya lodigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.12, n.3, p.141-147, 2014.
- ALRICH, P.; HIGGINS, W. **The Marie Selby Botanical Gardens Illustrated Dictionary of Orchid Genera**. Cornell University Press, London, 2008.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology og germinating orchid seeds. *In*: ARDITTI, J. **Orchid biology: reviews and perspectives III**. New York: Cornell University Press, 1984. p. 1772-222.
- 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. 2020. Orchidaceae. *In*: Lista de Espécies da flora do Brasil. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>.
- BOURGET, C. M. An introduction to light-emitting diode. **HortScience**, v. 43, n.7, p.1944-1946. 2008.
- 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.
- DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, v.26, n.1/2, p.155-158, 2005.
- 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, 2012.124p.
- GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, Boston, v.53, n. 1, p. 202-215, 1972.
- GODO, T., FUJIWARA, K., GUAN, K., MIYOSHI, K. Effects of wavelength of LED-light on *in vitro* asymbiotic germination and seedling growth of *Bletilla ochracea* Schltr. (Orchidaceae). **Plant Biotechnology**, Japan, v. 28, n. 4, p. 397–400, 2011.
- GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v.7, n. 3, p.211-220, 2013.
- KERBAUY, G. B. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. *In*: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua. 2011. 383p.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 15, n. 1, p. 214-217, 1946.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p.151.

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.

PANSARIN, E. R.; PANSARIN, L. M. A família Orchidaceae na Serra do Japi, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 99-111, 2008.

PAUL, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Na effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a 6 threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

RIBEIRO, L. S.; PASQUAL, M.; REZENDE MACIEL, A. L.; SOUSA A. E.; CHAGAS, E. A. Fontes de nitrogênio na micropropagação de *Coffea arabica*. **Scientia Agraria**, v. 3, p. 107-112, 2002.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTAROL, W. B.; SANTOS, U. L. Diodos emissores de luz e concentrações (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy. **Horticultura Argentina**, v. 32, p. 14-19, 2013.

RODRIGUES, F. A.; SOARES, J. D. R.; DOS SANTOS, D. N.; PASQUAL, M. KNO₃ e NH₄NO₃ no cultivo *in vitro* de orquídea (*Cattleya loddigesii* 'TIPO'). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 7, n. 2, p. 61-65, 2011.

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.

SINGH, D.; BASU, C.; MEINHARDT-WOLLWEBER, M.; 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.

SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R.; RAMOS, W. B.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Ácido naftalenoacético no enraizamento *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzgerald. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, p.72-79, 2014.

SORGATO, J. C.; ROSA, Y. B. C. J.; SOARES, J. S.; LEMES, C. S. R.; SOUSA, G. G. D. Light in intermediate acclimatization of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree. **Ciência Rural**, v.45, n. 2, p.231-237, 2015.

STEWART, J. Orchid propagation by tissue culture techniques – past, present and future. In: H. W. Pritchard (ed.). **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press: Cambridge, 1989. p. 147-183.

STEWART, S. L.; KANE, M. E.; Asymbiotic seed germination *in vitro* seedling development of *Habenaria macrocerattis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.86, p.147-158, 2006.

STOUTAMIRE, W. P. Seeds and seedling of native orchids. **Michigan Botanist**, v.3, p.104-119, 1964.

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

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NACABASHI, M.; FERREIRA, W. M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V. P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, São Paulo-SP, v. 36, n. 4, p. 657-666, 2009.

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

TEMJENSANGBA; DEB, C. R. Effect of different factors on non-symbiotic seed germination, formation of protocorm-like bodies and plantlet morphology of *Cleisostoma racemiferum* (Lindl.) Garav. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, p.223-228, 2009.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, Chicago-USA, v. 110, n. 4, p. 605-617, 1949.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs: energy efficient lighting sources and their potential in door plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p.1-6, 2009.