



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Dourados  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais

---

**TÉCNICAS DE CULTIVO *in vitro* COMO ALTERNATIVA PARA A  
CONSERVAÇÃO DE *Schomburgkia crisper Lindl.* (ORCHIDACEAE) E  
SUA REINTRODUÇÃO EM AMBIENTE NATURAL**

Acadêmica: Jackeline Schultz Soares

Dourados - MS  
Fevereiro de 2018





Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Dourados  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais

---

**TÉCNICAS DE CULTIVO *in vitro* COMO ALTERNATIVA PARA A  
CONSERVAÇÃO DE *Schomburgkia crispa* Lindl. (ORCHIDACEAE) E  
SUA REINTRODUÇÃO EM AMBIENTE NATURAL**

Acadêmica: Jackeline Schultz Soares

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Etenaldo Felipe Santiago

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yara B. C. J. Rosa (*in memoriam*)

“Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Recursos Naturais”.

Dourados - MS

Fevereiro de 2018



S654t Soares, Jackeline Schultz  
Técnicas de cultivo *in vitro* como alternativa para a  
conservação de *Schomburgkia crispera* Lindl.(Orchidaceae) e sua  
reintrodução em ambiente natural / Jackeline Schultz Soares.  
Dourados, MS: UEMS, 2018.  
101p. ; 30cm.  
Tese (Doutorado) – Recursos Naturais – Universidade  
Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de  
Dourados, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Etenaldo Felipe Santiago.  
1. Orchidaceae. 2. Semeadura assimbiótica. 3. Cerrado. I.  
Título.

CDD 23.ed. 584.15

**JACKELINE SCHULTZ SOARES**

**TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* COMO  
ALTERNATIVA PARA CONSERVAÇÃO DE:  
*Schomburgkia crista* Lindl. (Orchidaceae) E SUA  
REINTRODUÇÃO EM AMBIENTE NATURAL**


Este exemplar compreende a redação final da tese de doutorado defendida por Jackeline Schultz Soares.

Dourados/MS, 23 de fevereiro de 2018.

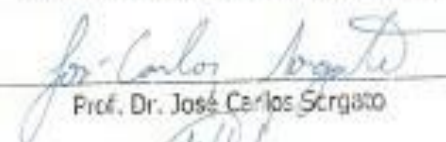
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Etenaldo Felipe Santiago – Presidente



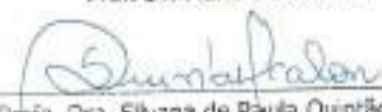
Profa. Dra. Glaucia Almeida de Moraes



Prof. Dr. José Carlos Scragato



Prof. Dr. Mario Wito Comar



Profa. Dra. Silvana de Paula Quintão Scalon

“E peço isto: que o vosso amor cresça mais e mais em ciência e em todo o conhecimento”

Filipenses 1:9

A Deus,

À minha família,

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yara Brito Chaim Jardim Rosa (*in memoriam*), por ter me acompanhado desde o início, me ensinando com maestria o ofício da pesquisa científica,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida, restaurar meus sonhos, me dar coragem de enfrentar as dificuldades e oportunidade de alcançar minhas conquistas. Toda honra e glória a Ele.

Ao meu orientador, Dr. Etenaldo Felipe Santiago, pelos ensinamentos, exemplo, ajuda, paciência, amizade, confiança e credibilidade em mim depositada.

A minha coorientadora, Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa (*in memoriam*), pelos ensinamentos, amizade e apoio durante toda minha vida acadêmica, minha gratidão eterna.

A técnica de laboratório Nilda Tiyoko Kobayashi Hoffmann, por toda ajuda, exemplo e dedicação.

A Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) e a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pela disponibilidade da estrutura necessária para execução do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Universidade Estadual de Mato Grosso Sul, pela oportunidade de realização do curso.

A todos os colegas do PGRN, GERV e GEHORTI pela ajuda, paciência e amizade, em especial a Tiziana Azario de Medeiros, Arlene Sobrinho Ventura, Taline Baganha Stefanelo Catelan e Ana Paula Lemke.

A Mariana Palachini de Oliveira por todo o auxílio, amizade e companheirismo, essenciais para a conclusão desse projeto. Meus sinceros agradecimentos.

A José Carlos Sorgato, pela grande ajuda, paciência, companheirismo e amizade ao longo de todos esses anos, obrigada por tudo.

A Luiz Eduardo Simon, Luan Marlon Ribeiro, Daniela Espanguer Graciano, Michele Nóbrega e Montcharles Pontes por todo auxílio referente às análises e imagens.

A minha família, meus pais Carmen Dulsi Schultz e Adelsom Soares Filho e minha irmã Janaína Schultz Soares, pela compreensão, ajuda e apoio em mim depositado em todos os momentos.

A todos que me apoiaram durante o período do curso, principalmente a Gelci Kunzel de Vargas, pelo suporte incondicional desde o processo seletivo. Meu muito obrigada.

A banca examinadora pelas valiosas sugestões e correções e a todos que colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

## SUMÁRIO

Resumo Geral.....	viii
Abstract.....	ix
<b>CAPÍTULO 1: Considerações Gerais</b>	
Importância ecológica e reintrodução de Orchidaceae.....	1
Aspectos Gerais de Orchidaceae .....	3
<i>Schomburgkia crisper Lindley</i> .....	5
Germinação assimbiótica de Orchidaceae.....	6
Aclimatização <i>ex vitro</i> de Orchidaceae.....	7
Termografia no infravermelho e fluorescência da clorofila- <i>a</i> como métodos avaliativos de estresse em plantas.....	8
Objetivo Geral .....	10
Referências.....	11
<b>CAPÍTULO 2: Protocolo para a semeadura <i>in vitro</i> de <i>Schomburgkia crisper Lindl.</i></b>	
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Material e métodos.....	22
Resultados e Discussão .....	26
Conclusão.....	38
Referências.....	40
<b>CAPÍTULO 3: Substratos para a aclimatização de <i>Schomburgkia crisper Lindl. oriunda de semeadura <i>in vitro</i>.</i></b>	
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e métodos.....	50
Resultados e Discussão.....	52
Conclusão.....	61
Referências.....	62



**CAPÍTULO 4: Reintrodução de *Schomburgkia crisper* Lindl. oriunda de  
semeadura *in vitro* em fragmento de Cerrado.**

Resumo.....	68
Abstract.....	69
Introdução.....	70
Material e métodos.....	72
Resultados e Discussão.....	75
Conclusão.....	85
Referências.....	86
<b>Considerações Finais.....</b>	<b>90</b>

## RESUMO

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica valiosa na obtenção de plantas para a pesquisa visando a preservação das espécies. Sua utilização é importante, uma vez que possibilita a obtenção de um grande número de plantas em tempo relativamente curto e com alta qualidade fitossanitária. Assim, este trabalho foi desenvolvido objetivando a conservação da espécie *Schomburgkia crispa* Lindl. no Bioma Cerrado por meio do cultivo *in vitro* e posterior reintrodução no habitat. Foram realizados cinco experimentos nos quais se avaliou a germinação assimbiótica das sementes, a aclimatização *ex vitro* e a reintrodução de plantas jovens dessa espécie ao habitat. Com base nos resultados de germinação, recomenda-se que a semeadura assimbiótica de *S. crispa* seja realizada com suspensão de sementes embebidas por cinco minutos em hipoclorito de sódio e com a realização de tríplice lavagem, no meio de cultura MS ½ suplementado com 6,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e solidificado com 4,0; 6,0 ou 8,0 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico. Quanto à aclimatização *ex vitro* das plantas propagadas, recomenda-se que o substrato utilizado seja a fibra de coco. Resultados observados permitem inferir que as mudas produzidas por meio de germinação assimbiótica podem ser reintroduzidas no habitat, independente do substrato utilizado, tornando essa técnica viável para aplicação com outras espécies.

**Palavras-chave-** Orchidaceae, espécie nativa, conservação, cultivo *in vitro*, reintrodução.

## ABSTRACT

*In vitro* cultivation is a valuable biotechnological tool in obtaining plants for research aiming to preserve species. Its use is important, since it allows to obtain a large number of plants in a relatively short time and with high phytosanitary quality. Thus, this work was developed aiming at the conservation of *Schomburgkia crispa* Lindl. in the Cerrado Biome through *in vitro* cultivation and subsequent reintroduction into the habitat. Five experiments were carried out in which seed germination, *ex vitro* conditioning and the reintroduction of this species to the habitat were evaluated. Based on the germination results obtained, it is recommended that the ascetic seeding of *S. crispa* be carried out with suspension of seeds soaked for five minutes in sodium hypochlorite and with the accomplishment of triple washing in the culture medium MS ½ supplemented with 6.0 g L<sup>-1</sup> activated carbon and solidified with 4.0; 6.0 or 8.0 g L<sup>-1</sup> of bacterial agar. For the *ex vitro* acclimatization of propagated plants, the coconut fiber substrate is recommended. The observed results allow to infer, also, that the seedlings produced by asymbiotic germination can be reintroduced in the habitat, independent of the substrate used, making this technique viable application with other species.

**Keywords-** Orchidaceae, native species, conservation, *in vitro* cultivation, reintroduction.

# **CAPÍTULO I: CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## **Importância ecológica e reintrodução de Orchidaceae**

Parte da diversidade florística em florestas tropicais úmidas advém de espécies epífitas, que perfazem 10% de todas as plantas vasculares que influenciam positivamente nos processos ecológicos e na manutenção do fluxo de energia e de matéria em ecossistemas (Petean, 2009). A importância ecológica do epifitismo nas comunidades florestais consiste na manutenção da diversidade biológica e no equilíbrio dinâmico interativo nos distintos ecossistemas, uma vez que espécies epifíticas proporcionam recursos alimentares (frutos, néctar, pólen, água) e microambientes especializados para a fauna do dossel que abriga alta diversidade de organismos e de interações tróficas (OLIVEIRA, 2004; CESTARI, 2009).

Plantas epífitas, como algumas orquídeas, possuem a capacidade de elaborar quantidades consideráveis de biomassa suspensa em ambientes notoriamente restritivos considerando a fisiologia do estresse, associada à retenção de água e detritos, conferindo aos epífitos vasculares um importante papel no fluxo de energia e de matéria da floresta tropical úmida (CARDELÚS & MACK, 2010). Os elementos minerais são incorporados às epífitas à medida que elas crescem e são removidos quando elas morrem e se decompõem. Através da captura, armazenamento e liberação de minerais, as epífitas contribuem com a ciclagem de nutrientes de um determinado ecossistema (OLIVEIRA, 2004).

As epífitas também funcionam como bioindicadores do estágio sucessional da floresta, tendo em vista que comunidades em fases secundárias apresentam menor diversidade epifítica do que comunidades em equilíbrio dinâmico (RAMALHO & PIMENTA, 2010). Em função das características fisiológicas as epífitas podem ser utilizadas em estudos de processos ecológicos que indiquem padrões de interferência antrópica ou distúrbios de ordem natural no ambiente (VAN DEN BERG, 1996).

Dentre as ferramentas para conservação de espécies, a reintrodução pode restaurar populações nativas que se encontram em declínio ou ainda restabelecê-las em áreas que já fizeram parte de sua distribuição, conforme conceito estabelecido pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 1998).

A reintrodução constitui uma ferramenta importante para aumentar o conhecimento da biologia, ecologia ou requisitos de gerenciamento das espécies estudadas. Esta técnica se torna de extrema importância, principalmente para aquelas espécies cujo número de populações naturais é baixo, tornando a compreensão das principais interações ecológicas, como polinizadores ou preferências de habitat, difícil de ser obtida a partir dos indivíduos restantes na natureza. Reintroduções, particularmente usando espécies importantes, como orquídeas, também podem envolver a comunidade e aumentar a conscientização pública para a conservação de espécies ameaçadas e a restauração ambiental (REITER et al., 2016).

Um programa de reintrodução coloca indivíduos retirados do ambiente natural, ou criados em cativeiro, dentro de uma área de sua ocorrência histórica onde essa espécie não mais existe ou está em declínio. A utilidade desse programa é a criação de novas populações e a melhora do *status* de conservação de outras, por meio do incremento em número de indivíduos ou de diversidade genética (FAHSELT, 2007; ARMSTRONG e SEDDON, 2008).

A formação de bancos de germoplasma com manutenção da variabilidade genética pode contribuir para a restauração das populações naturais. Assim, a germinação *in vitro* de espécies nativas da família Orchidaceae apresenta-se como uma importante ferramenta para a produção de plantas a serem utilizadas em programas de reintrodução de espécies em áreas naturais (SCHNEIDERS et al., 2012).

Apesar da importância ecológica das técnicas de reintrodução, o acompanhamento da sobrevivência e do desenvolvimento de Orchidaceae reintroduzidas pode ser um processo complexo, exigindo considerável investimento econômico e logístico, já que, em condições naturais, as plantas apresentam crescimento lento, levando um longo período até atingirem a maturidade (SCHMIDT & ZOTZ, 2002). Ainda, as peculiaridades de cada espécie, do ambiente e das técnicas empregadas na reintrodução, fazem com que cada iniciativa seja reconhecida como um experimento individual (KAYE, 2009).

Esforços combinados de conservação *ex situ* em instituições públicas e programas de reintrodução de espécies ameaçadas podem se tornar importantes ferramentas de conservação de espécies ameaçadas (WEEKLEY et al., 2008; WENDELBERGER et al., 2008; YAM, 2008). A Estratégia Global para a Conservação de Plantas 2011-2020 (EGCP, 2011) salienta que as coleções *ex situ* necessitam ser utilizadas como uma ferramenta ativa,

por meio de programas de reintrodução, caso contrário, correm o risco de ser quase coleções de museus.

### **Aspectos gerais de Orchidaceae**

Orchidaceae possui flores hermafroditas, raramente unissexuais, frequentemente zigomorfas, quase sempre simétricas, trímeras, com três sépalas e três pétalas, sendo uma oposta ao estame fértil, morfologicamente modificada, constituindo o labelo. O androceu é constituído de um, raro dois ou três, estames férteis; o filete é adnado ao estilete, formando o ginostêmio; o estigma fica, geralmente, na face ventral do ginostêmio, é trilobado, sendo um dos lobos parcialmente estéril, formando o rostelo, uma estrutura mais ou menos membranácea que separa a antera do estigma; a antera, na maioria dos casos, é representada por um “capuz” que geralmente cai no processo de retirada do pólen; o pólen na maioria das espécies é unido em políneas, em número de 2, 4, 6 ou 8; o ovário é ínfero, em regra unilocular, com placentação parietal. Os frutos são capsulares e quase secos, raramente carnosos; as sementes são numerosas, minúsculas, com embrião rudimentar, desprovidas de endosperma (RODRIGUES, 2011).

Originou-se na Malásia, há milhões de anos atrás, durante o período cretáceo, quando a maioria das famílias das angiospermas tornavam-se diferenciadas (GARAY, 1972). Há cerca de 3.000 anos, nos tempos do rei Salomão, já se tinha um grande apreço pelas orquídeas. O sábio chinês Confúcio (551 a.C.), em seus relatos, menciona a planta como “o perfume dos reis”. Teofrasto, aluno de Aristóteles (370 a.C.), escreveu sobre ela em suas publicações, referindo-se ao grupo de plantas como “Orchis” (do grego, testículos) em alusão à forma do par de pseudobulbos subterrâneos de certas espécies que ocorrem às margens do Mediterrâneo. Outros estudiosos, no ano 100, descreveram duas orquídeas entre 600 plantas medicinais. Por este motivo, eram tidas como úteis na promoção do aumento da fertilidade e virilidade, uma crença que se espalhou por toda Europa até meados do século XVIII. No século XV, livros e folhetos relacionados com orquídeas foram redigidos e no século XVII foram descritas, pela primeira vez, as orquídeas tropicais da Ásia (BLOSSFELD, 1991).

Atualmente, é uma das duas maiores e mais diversificadas famílias dentre as Angiospermas, ficando atrás apenas de Compositae (CHASE et al., 2015; THE PLANT LIST, 2018), com cerca de 850 gêneros e 26.567 espécies, sem contar o número de

híbridos artificiais, conforme a World Orchid Checklist (GOVAERTS et al., 2011). Apresenta alta variabilidade genética, com indivíduos que podem variar de alguns centímetros a metros de comprimento, com flores vistas apenas com o auxílio de lupa, flores grandes e coloridas e até mesmo inflorescências com mais de um metro de comprimento (CARDOSO & ISRAEL, 2005). Todas essas características podem ser reunidas em uma família por conta da estrutura floral conservada (SUTTLEWORTH et al., 1994; APW, 2013).

Suas espécies são distribuídas em praticamente todos os continentes, com maior concentração e diversidade nas regiões tropicais e subtropicais, sendo encontradas desde as proximidades do pólo ártico até o pólo antártico, uma vez que são organismos extremamente especializados que ocupam diversos habitats e apresentam várias adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas (STOUTAMIRE, 1964; DRESSLER, 2005; SILVA et al., 2006; KERBAUY, 2011). No Brasil, Barros et al. (2018) listam, no projeto Flora do Brasil 2020, 2.494 espécies nativas, distribuídas em 221 gêneros, das quais 1.604 são endêmicas do país.

No Bioma Cerrado, a família é a terceira mais representativa da biodiversidade vegetal (BATISTA et al., 2005; MENDONÇA et al., 2008), possuindo espécies com potencial econômico e ornamental pouco explorados. Conforme Barros et al. (2018), neste domínio fitogeográfico são listadas 701 espécies distribuídas em 126 gêneros, com 88 espécies ocorrendo no estado de Mato Grosso do Sul. A maioria das espécies desse bioma possui adaptações para longos períodos de estiagem, sendo resistentes à desidratação e baixa umidade relativa do ar. Algumas, que ocorrem em áreas submetidas a queimadas regulares, possuem floração induzida pelo efeito do fogo (OLIVEIRA et al., 1996).

Segundo Zotz & Andrade (2002), Barros & Kerbauy (2004) e Suzuki (2005), as espécies de orquídeas são excelentes bioindicadores ambientais, pois são sensíveis às interferências antrópicas, em virtude da ocupação de nichos especializados. São as primeiras plantas a serem afetadas pela degradação ambiental e as últimas a se instalarem nas áreas em restauração (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2010, SCHUSTER et al., 2010).

Além da especificidade de polinizadores, as orquídeas ainda dependem da heterogeneidade ambiental proporcionada pela diversidade do estrato arbóreo (HUSTON, 1994), pois apresentam ciclo de vida altamente especializado, sementes com pouca ou nenhuma reserva nutricional e germinação de sementes dependente da associação com

fungos micorrízicos, o que, somado à coleta indiscriminada na natureza, resulta na vulnerabilidade da família, que está entre as mais seriamente ameaçadas de extinção (FERREIRA & SUZUKI 2008).

### ***Schomburgkia crispa* Lindley**

O gênero *Schomburgkia* foi incluído em *Laelia* (PRIDGEON et al., 2005). Porém, as relações filogenéticas dentro do gênero *Laelia* permaneceram mal resolvidas, em parte pela ampla distribuição das espécies, divergindo quanto aos dados moleculares e morfológicos nas relações internas, fazendo com que essa inclusão não seja aceita por diversos taxonomistas (VAN DEN BERG et al., 2009; CHASE et al., 2015). Barros et al. (2018) citam, na Lista de espécies da Flora do Brasil 2020, *Schomburgkia crispa* como um sinônimo de *Laelia marginata*, sendo o último o nome aceito para a espécie. Porém, quando discorre sobre a distribuição da espécie, relata que esta ocorre apenas na região norte do Brasil, não condizendo com a distribuição descrita na literatura para *S. crispa*. Nos apêndices da *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES), um órgão internacional que regula o comércio de espécies nativas, nada consta sobre *L. marginata*, no entanto, o apêndice II regulariza o comércio de *S. crispa* (CITES, 2017).

Peraza-Flores et al. (2016), estudando a filogenia da aliança entre os dois gêneros, relatam resultados que confirmam a existência de dois clados distintos. *Laelia*, que seria endêmico do México, em elevações médias a altas e *Schomburgkia*, um táxon mais amplamente distribuído. Quando esses autores comparam as características dos dois gêneros, consideram como *Schomburgkia* todas as espécies da América do Sul que foram incluídas como pertencentes ao gênero *Laelia*. Com base nesses resultados, optou-se por utilizar, durante o trabalho, o nome *Schomburgkia crispa* Lindl.

Assim, *Schomburgkia crispa* Lindl. é uma espécie de hábito epifítico e encontrada tanto em florestas de galeria quanto em matas secas do cerrado (MENDONÇA et al., 2008; OSTETTO, 2015), inclusive no estado de Mato Grosso do Sul, nas formações florestais hidromórficas do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema (TORRES et al., 2007). Morfológicamente, apresenta pseudobulbos bifoliados com comprimento de 8 a 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 com pétalas e sépalas castanho com



margens amarelas (BARROS et al., 2018). 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.

Pouco se sabe sobre o potencial das orquídeas nativas brasileiras para aplicação terapêutica. Porém, além da importância ecológica, *S. crispera* apresenta ainda propriedades medicinais e farmacológicas. Belloto et al. (2017), realizando um estudo fitoquímico da espécie em questão, relataram o isolamento de um novo produto natural, denominado ácido crispóico, além de seis outros compostos químicos já conhecidos, comprovando suas atividades contra células cancerígenas.

### **Germinação assimbiótica de Orchidaceae**

Após a fecundação das flores, as orquídeas formam frutos capsulares deiscentes trilobulares, onde podem estar alojadas de 20 a 4 milhões de sementes diminutas, com pouco ou nenhum endosperma. O tamanho das sementes pode variar de 0,05 a 6 mm, uma diferença de aproximadamente 120 vezes da maior para a menor; com peso também variável, de 0,31 a 24 µg, dependendo da espécie (ARDITTI & GHANI, 2000). Apesar da grande quantidade de sementes por cápsula, em ambiente natural apenas 2 a 3% das sementes germinam, pois não possuem reservas nutritivas necessárias para iniciar o processo germinativo (CORRIE & TANDON, 1993; YAMAZAKI & MIYOSHI, 2006). Assim, em ambiente natural torna-se necessária associação simbiótica com fungos micorrízicos, a qual é iniciada antes da germinação das sementes (YAM & ARDITTI, 2009).

Nesse sentido, a semeadura *in vitro* de orquídeas é uma ferramenta extremamente útil em estudos de bioprospecção visando a conservação das espécies nativas por meio da manutenção de bancos de germoplasma, já que possibilita alta porcentagem de germinação sem que as sementes precisem de nenhuma relação simbiótica. Além disso, essas espécies apresentam crescimento lento e, conseqüentemente, a produção de novas mudas é bastante demorada e, ainda, necessitam de longo período para atingir o estágio reprodutivo. Portanto, sob o ponto de vista preservacionista, a utilização desse tipo de cultivo é importante, uma vez que possibilita a obtenção de um grande número de plantas em tempo

relativamente curto e com alta qualidade fitossanitária, contribuindo para a diminuição do risco de extinção (FERREIRA & SUZUKI, 2008).

Como a exigência de mudas para suprir o mercado de plantas ornamentais é elevada, a utilização de técnicas de semeadura *in vitro* para diversas espécies de orquídeas, principalmente as pertencentes aos gêneros de maior comercialização, como *Cattleya* Lindl. (YAM & ARDITTI, 2009; SCHNEIDERS et al., 2012), *Dendrobium* Sw. (FARIA et al., 2004), *Cymbidium* Sw. (HOSSAIN et al., 2009), *Vanda* (JOHNSON & KANE, 2007), dentre outras, já tem seus protocolos estabelecidos. No entanto, informações sobre métodos de germinação assimiótica, cultivo *in vitro* e protocolos de multiplicação para espécies de orquídeas do Cerrado ainda são pouco desenvolvidos, evidenciando a necessidade de trabalhos na área de germinação, multiplicação, conservação e melhoramento genético para tais espécies (CARNEIRO, 2014).

### **Aclimatização *ex vitro* de Orchidaceae**

Com as técnicas de cultivo *in vitro* de orquídeas pode-se produzir grandes quantidades de plantas durante todo ano sem a influência das variações climáticas (ROCHA, 2009). Um dos maiores obstáculos para a aplicação prática dessa técnica é a dificuldade de sucesso na transferência de mudas da condição *in vitro* para *ex vitro*, devido à grande diferença entre as duas condições ambientais (HAZARIKA, 2006; DEB & IMCHEN, 2010; CHANDRA et al., 2010). O cultivo *ex vitro* também é parte importante de um protocolo de multiplicação, uma vez que muitas plantas podem não sobreviver à transferência para condições heterotróficas. A elevada mortalidade de mudas demonstra a carência de informações sobre esta etapa do cultivo (LEMES, 2015).

A aclimatização é definida como a adaptação climática de um organismo, especialmente uma planta, que é transferido para um novo ambiente, sendo este processo realizado de forma artificial (FARIA, 2012). Esta etapa é bastante crítica e delicada para a planta, devido aos fatores como estresse hídrico, taxas fotossintéticas, absorção de nutrientes e fitossanidade (DEB & IMCHEN, 2010), uma vez que as plantas quando cultivadas *in vitro* apresentam uma série de deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, baixa eficiência do sistema radicular, reduzida competência vascular, pequena ou não funcionalidade dos estômatos e má formação da cutícula, sendo estes fatores responsáveis pela baixa sobrevivência das plantas quando expostas a ambiente

*ex vitro* com elevada demanda evaporativa (HAZARIKA, 2006; CHANDRA et al., 2010; FARIA, 2012).

O substrato empregado na fase de aclimatização pode influenciar as respostas das plantas mediante suas características físicas, químicas e biológicas (FACHINELLO et al., 1995). A escolha de um substrato precisa envolver sua disponibilidade regional, a garantia de sua aquisição permanente, a conservação dos recursos naturais e seu custo (ALVES et al., 2012). Assim, o emprego de um substrato adequado é de grande relevância, permitindo o crescimento ideal das raízes, o que é fundamental para se obter uma planta de boa qualidade, taxas de sobrevivência maiores e melhor ajuste das plantas ao mecanismo autotrófico (KÄMPF et al., 2006).

### **Termografia no infravermelho e fluorescência da clorofila-*a* como métodos avaliativos de estresse em plantas**

Determinadas condições naturais ou impostas pelo meio podem expor as plantas ao estresse, que significa um desvio nas condições ótimas para a vida, induzindo mudanças nos níveis funcionais dos organismos, as quais podem ser reversíveis, acionando respostas de ajuste fisiológico, ou permanentes, quando as respostas vegetais não são suficientes para contornar a situação (LARCHER, 2006; KERBAUY, 2012; TAIZ & ZEIGER, 2013).

Estes transtornos ocasionados aos vegetais podem ser detectados a nível fisiológico, antes mesmo de modificações morfológicas serem expressas, isto é possível por meio da utilização de métodos capazes de detectar estresse vegetal (RAMÍREZ et al., 2016), sendo nesse trabalho empregados dois desses métodos: a termografia no infravermelho e a fluorescência da clorofila-*a*.

A temperatura das plantas é reconhecida como um indicador da sua condição hídrica e, portanto, como ferramenta potencial para a caracterização das plantas sob as mais diversas condições de cultivo. Assim, imagens termográficas também são utilizadas na pesquisa para a avaliação de estresse devido ao excesso de sais, déficit hídrico, entre outros. Suas aplicações têm como princípio os mecanismos de abertura e fechamento estomáticos, a primeira linha de defesa das plantas contra a perda de água, que regulam a temperatura foliar. Conseqüentemente, as imagens termográficas das folhas se correlacionam ao estado hídrico da planta, ao grau de abertura estomática e à taxa de transpiração. Em condições experimentais é possível observar diferenças entre a

temperatura foliar das plantas em função dos substratos e do regime hídrico ao qual estão submetidas (de SOUSA, 2014).

A fluorescência da clorofila-*a* (FChl-*a*) é outro método utilizado para detecção de estresse em plantas, consistindo numa importante ferramenta na avaliação da energia dissipada em forma de fluorescência, captando informações relevantes sobre o funcionamento do fotossistema II em estudos tanto agrícolas quanto ecológicos e ambientais (GOTTARDINI et al., 2014).

A análise dos parâmetros da FChl-*a* tem sido muito utilizada no estudo da fotossíntese, principalmente por ser um método não invasivo, que permite a análise qualitativa e quantitativa da absorção e aproveitamento da energia luminosa através do FSII sem destruir a amostra testada (KALAJI et al., 2016). Esta técnica tem permitido um aumento no conhecimento dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos que ocorrem na membrana dos tilacóides dos cloroplastos, além de possibilitar o estudo de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência da energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons (BAKER, 2008; SCHOCK et al., 2014).

Quanto aos trabalhos com Orchidaceae, principalmente oriundos de germinação *in vitro*, da aclimatização *ex vitro* ou de reintrodução em ambientes naturais, o emprego de técnicas não destrutivas, que possam dar informações quanto ao status fisiológico das plantas, são de grande importância. Desse modo, a utilização das técnicas de fluorescência da clorofila-*a* e da termografia no infravermelho se apresentam como ferramentas úteis para estudos com espécies dessa família botânica ou de outros grupos com interesse em programas conservacionistas.

No âmbito da conservação, o objetivo 15, listado nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030, trata da conservação da vida terrestre e visa proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da terra e deter a perda de biodiversidade. Em suas metas, este objetivo destaca que, até 2020, é necessário promover a implementação da gestão sustentável de todos os tipos de florestas, deter o desmatamento, restaurar florestas degradadas e aumentar substancialmente o florestamento e o reflorestamento globalmente (ONUBR, 2018). Dessa forma, trabalhos que visem conservação de espécies de Orchidaceae em ambiente natural são de extrema importância, principalmente para que o Brasil consiga cumprir essa agenda.

## **OBJETIVO GERAL**

Objetiva-se com este trabalho contribuir para a conservação de *Schomburkia crispa* Lindl. no Cerrado por meio de técnicas de cultivo *in vitro* e sua reintrodução no ambiente natural.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; ANDRADE, L. A.; GONÇASVES, G. S.; SILVA, J. M. Produção de mudas de Angico em diferentes tamanhos de recipientes e composição de substratos. **Revista Verde**, Mossoró-RN, v. 7, n. 2, p. 39-44, 2012.
- APW (Angiosperm Phylogeny Website). **Asparagales: Orchidaceae**. 2013. Disponível em: <[www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/)>. Acesso em 16 de Dez. 2017.
- ARDITTI, J.; GHANI, A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, Lancaster, v. 145, n. 110, p. 367–421, 2000.
- ARMSTRONG, D. P.; SEDDON, P. J. Directions in reintroduction biology. **Trends in Ecology & Evolution**, Londres, v. 23, p.20-25, 2008.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, Essex, v. 59, n. 1, p. 89-113, 2008.
- BARROS, F. DE.; KERBAUY, G. B. **Orquidologia sul-americana**: uma compilação científica. 1.ed. São Paulo-SP, Secretaria do Meio Ambiente, 2004. 192 p.
- BARROS, F. DE; 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. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 03 Jan. 2018.
- BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. B.; PELIZZARO, K. F. Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guará, DF, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo-SP, v. 19, n. 2, p. 221-232, 2005.
- 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.
- BLOSSFELD, A. **Orquídeas**. 1.ed. São Paulo-SP: Editora Europa, 1991. 70p.
- CARDELÚS, C. L.; MACK, M. C. The nutrient status of epiphytes and their host trees along an elevational gradient in Costa Rica. **Plant Ecology**, Florida-USA, v. 207, n. 1, p. 25-37, 2010.
- CARDOSO, J. C.; ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. **Horticultura Brasileira**, Brasília-DF, v. 23, n. 2, p. 169-173, 2005.

CARNEIRO, L. L. **Pré-melhoramento genético, floração *in vitro* e criopreservação de orquídeas nativas do Cerrado**. 2015. 91p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2014.

CESTARI, C. Epiphyte plants use by birds in Brazil. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.13, p. 689-712, 2009.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, India, v. 32, n. 1, p. 1199-1205, 2010.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN J. V.; PRIDGEON A. M.; SALAZAR G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 177, n. 1, p. 151-174, 2015.

CITES - CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA. **Apêndice II**. 2017. Disponível em: <[http://checklist.cites.org/#/en/search/output\\_layout=alphabetical&level\\_of\\_listing=0&show\\_synonyms=1&show\\_author=1&show\\_english=1&show\\_spanish=1&show\\_french=1&scientific\\_name=&page=1&per\\_page=20](http://checklist.cites.org/#/en/search/output_layout=alphabetical&level_of_listing=0&show_synonyms=1&show_author=1&show_english=1&show_spanish=1&show_french=1&scientific_name=&page=1&per_page=20)>. Acesso em: 20 Dez. 2017.

CORRIE, S.; TANDON, P. Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. Through high frequency conversion of encapsulated protocorms under *in vitro* and *in vivo* conditions. **Indian Journal of Experimental Biology**, Índia, v. 31, n.1, p. 61-64, 1993.

DEB, C. R.; IMCHEN, T. An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, Pakistan, v. 9, n. 1, p. 79-83, 2010.

DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, Sarasota-FL, v. 26, n. 1,2, p. 155-158, 2005.

EGCP. Estratégia Global para a Conservação de Plantas. **Boletim informativo do subcomitê para a conservação de plantas da UICN**. 2011. Disponível em: <[http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/our\\_work/plants/](http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/our_work/plants/)>. Acesso em 10 Dez. 2017.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN. E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 1.ed. Pelotas-RS: Editora da UFPel, 1995. 178p.

FALK, D. A.; MILLAR, C. I.; OLWELL, M. Guidelines for developing a rare plant reintroduction plan. In: FALK, D. A.; MILLAR, C. I.; OLWELL, M. **Restoring diversity: strategies for reintroduction of endangered plants**. 1.ed. Washington: Island Press. 1996. p. 453-490.

FAHSEL, D. Is transplanting an effective means of preserving vegetation? **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 85, p. 1007-1017, 2007.

- FARIA, R. T. DE. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenaz, 2012. 124p.
- FARIA, R. T. DE; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. DO V. R.; MÜLLER, C. *In vitro Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 22, n. 4, p. 780–783, 2004.
- FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M. I. B.; BASEIA, I. G.; LICHSTON, J. E. (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. 1.ed. Natal: Imagem Gráfica, 2008. p. 67-68.
- GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, Boston, v.53, n. 1, p. 202-215, 1972.
- GOTTARDINI, E.; CRISTOFORI, A.; CRISTOFOLINI, F.; NALI, C.; PELLEGRINI, E.; BUSSOTTI, F.; FERRETTI, M. Chlorophyll-related indicators are linked to visible ozone symptoms: evidence from a field study on native *Viburnum lantana* L. plants in northern Italy. **Ecological Indicators**, Coimbra, v.39, n. 1, p.65–74, 2014.
- GOVAERTS, R.; KRATOCHVIL, K.; GERLANCH, G.; CARR, G.; ALRICH, P.; PRIDGEON, A. M.; CAMPACCI, M. A.; HOLLAND BAPTISTA, D.; CRIBB, P.; GEORGE, A.; KREUZ, K.; WOOD, J. J. World checklist of Orchidaceae. **Kewscience**, London, 2011. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/monocots/>>. Acesso em: 08 Jan. 2018.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Reino Unido, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.
- HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; PATHAK, P. Cost effective protocol for *in vitro* mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. a medicinally important orchid. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 9, n. 6, p. 444–453, 2009.
- HUSTON, M. A. **Biological Diversity**. New York: Cambridge University Press, 1994. 708 p.
- IUCN - Guidelines for Re-introductions. **IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 1998. 10 p.
- JOHNSON, T. R.; KANE, M. E. Asymbiotic germination of ornamental *Vanda*: *in vitro* germination and development of three hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 251–261, 2007.
- KALAJI, H. M.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I. A.; LADLE, R. J. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, Europa, v.38, n. 102, p. 1-11, 2016.



KÄMPF, A. N.; TAKANE, R. J.; SIQUEIRA, P. T. V. **Floricultura: técnicas de preparo de substratos**. Brasília: LK Editora e Comunicação, 2006. 132 p.

KAYE, T. N. Toward successful reintroductions: the combined importance of species traits, site quality, and restoration technique. In: GUEST, M. K. A.; KAUFFMANN, M.; HANSEN-WINTER, B. **Proceedings of the 22nd California Native Plant Society Conference: Current Threat to California's Native Flora, Strategies and Solutions**. Sacramento: California Native Plant Society, 2009. p. 99-106.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431 p.

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. p.245-383.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. 3.ed. São Carlos: Rima. 2006. 531 p.

LEMES, C. S. R. **Germinação, desenvolvimento e aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl. (Orchidaceae)**. 2015. 55p. Tese (Doutorado em produção vegetal) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2015.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 422-442.

OLIVEIRA, R. R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. **Acta Botanica Brasilica**, Rio de Janeiro-RJ, v. 18, n. 4, p. 793-799, 2004.

OLIVEIRA, R. S.; BATISTA, J. A. N.; PROENÇA, C. E. B.; BIANCHETTI, L. Efeito do fogo na floração de espécies de Orchidaceae em Cerrado. In: MIRANDA, H. S.; DIAS, B. F. S.; SAITO, C. H. **Impacto de queimadas em área de cerrado e restinga**. Brasília: Universidade de Brasília, 1996. p. 61-67.

ONUBR – NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL. A Agenda 2030. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>>. Acesso em 05 de fev. 2018.

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

PEDROSO-DE-MORAES, C.; DOMINGUES, E.; PREZZI, L. E.; SOUZA-LEAL, T.; ZAMBON, R. L.; BRESCANSIN, R. L.; RAMOS, P. A. B. Florística e fitossociologia da família Orchidaceae no Centro de Educação Ambiental “Francisco Mendes”, município de Mogi Guaçu, SP, Brasil. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2010.

PERAZA-FLORES, L.N.; CARNEVALI, G.; VAN DEN BERG, C. A molecular phylogeny of the *Laelia alliance* (Orchidaceae) and a reassessment of *Laelia* and *Schomburgkia*. **Taxon**, Dúbravská, v. 65, n. 6, p. 1249-1262, 2016.

PETEAN, M. **As epífitas vasculares em uma área de Floresta Ombrófila Densa em Antonina, PR**. 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Ciências Agrárias, Curitiba-PR, 2009.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F.N. **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press. 2005. p. 664.

RAMALHO, A. M. Z.; PIMENTA, H. C. D. Valoração econômica do dano ambiental ocasionado pela extração ilegal da orquídea *Cattleya granulosa* no Parque Natural Dom Nivaldo Monte, Natal/RN. **Holos**, Natal-RN, v. 26, n. 1, p. 62-82, 2010.

RAMIREZ, D. A.; YACTAYO, W.; RENS, L. R.; ROLANDO, J. L.; PALACIOS, S.; DE MENDIBURU, F.; MARES, V. Defining biological thresholds associated to plant water status for monitoring water restriction effects: Stomatal conductance and photosynthesis recovery as key indicators in potato. **Agricultural Water Management**, Peru, v. 177, n. 1, p. 369-378, 2016.

REITER, N.; WHITFIELD, J.; POLLARD, G.; BEDGGOOD, W.; ARGALL, A.; DIXON, K.; DAVIS, B.; SWARTS, N. Orchid re-introductions: an evaluation of success and ecological considerations using key comparative studies from Australia. **Plant Ecology**, Australia, v. 217, n. 1, p. 81-95, 2016.

ROCHA, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2009. p. 121-152.

RODRIGUES, V.T. Orchidaceae Juss. Aspectos morfológicos e taxômicos. Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo – SP, 2011. 19p.

SCHMIDT, G.; ZOTZ, G. Inherently slow growth in two Caribbean epiphyte species - a demographic approach. **Journal of Vegetation Science**, Suíça, v.13, n. 4, p. 527-534, 2002.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.

SCHOCK, A. A.; RAMM, A.; MARTINAZZO, E. G.; SILVA, D. M.; BACARIN, M. A. Crescimento e fotossíntese de plantas de pinhão-mansão cultivadas em diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 3-9, 2014.

SCHUSTER, H.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; SOUZA-LEAL, T.; CALLEGARI-CORREIA, E.; PREZZI, L.; DOMINGUES, E.; CANASSA, F. Diversidade de

Orchidaceae da fazenda Cantagalo, município de Mogi-Mirim, São Paulo. **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v. 8, n. 3, p. 242-245, 2010.

SILVA, I. V. da.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A.; EUCLYDES, R. M. A. Estratégias anatômicas foliares de treze espécies de Orchidaceae ocorrentes em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 20, n. 3, p. 741-750, 2006.

de SOUSA, C. A. F. Fenotipagem de plantas: uma nova abordagem para um velho problema. **Embrapa Agroenergia** – Comunicado Técnico (INFOTECA-E), Brasília – DF, 2014. 9p.

STOUTAMIRE, W. P. Seeds and seedling of native orchids. **Michigan Botanist**, Michigan, v. 3, n. 4, p. 104-19, 1964.

SUTTLEWORTH, F. C.; ZIM, H.S.; DILLON, G. W. **Orquídeas: Guia dos orquidófilos**. Editora Expressão e Cultura. 1994. 158 p.

SUZUKI, R. M. S.O.S. Orquídeas: a coleta indiscriminada já leva espécies à extinção. **Revista Terra da Gente**, São Paulo-SP, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

THE PLANT LIST. 2018. Disponível em: <[www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org)>. Acesso em 05 Jan. 2018.

TORRES, F. C. L.; PEREIRA, Z. V.; SCIAMARELLI, A.; RECH, A. R.; ROLIM, T. P.; GOMES, M. E. S.; LOBTCHENKO, G. Orchidaceae da floresta paludícula no Parque Estadual das Várzea do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul. In: 58º Congresso Nacional de Botânica, 2007, São Paulo-SP. **Resumos...** São Paulo-SP: 58º Congresso Nacional de Botânica. São Paulo: Ibt-SP, 2007.

VAN DEN BERG, C. **Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* Lindl.** 2009. 84p. (Orchidaceae - Laeliinae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Campinas, Ciências Biológicas, Campinas – SP, 1996.

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L.; WHITTEN, W. M.; SOTO-ARENAS, M. A.; CHASE, M. W. A phylogenetic study of *Laeliinae* (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, n. 1, p. 417-430, 2009.

WEEKLEY, C. W.; GORDON, D. R.; MAGUIRE, J.; MASCHINSKI, J.; MENGES, E. S.; PENCE, V. C.; PETERSON, C. L. Saving Florida's rarest plants. **The Palmetto**, Florida, v. 25, n. 2, p. 8-13, 2008.

WENDELBERGER, K. S.; FELLOWS, M. Q. N.; MASCHINSKI, J. Rescue and restoration: experimental translocation of *Amorpha herbacea* Walter var. *crenulata*

(Rybd.) Isley into a novel urban habitat. **Restoration Ecology**, Paraná, v. 16, n. 4, p. 542-552, 2008.

YAM, T. W. Conservation and re-introduction of the tiger orchid and other native orchids of Singapore. In: SOORAE, P. S. **Global re-introduction perspectives: re-introduction case-studies from around the globe**. Abu Dhabi, IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group. 2008. p. 261-265.

YAM, T. W.; ARDITTI, J. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 3, n. 1, p. 1-56, 2009.

ZOTZ, G.; ANDRADE, J. L. La ecología y la fisiología de las epifitas y las hemiepifitas. In: GUARIGUATA, M.; CATAN, G. **Ecología y conservación de bosques neotropicales**, San José: Editorial Libro Universitario Regional. 2002. p. 271-296.

## **CAPÍTULO 2 - PROTOCOLO PARA A GERMINAÇÃO *in vitro* DE *Schomburgkia crispa* LINDL.**

### **RESUMO**

A germinação assimbiótica de orquídeas nativas é uma técnica importante para a propagação visando a conservação, resultando em elevados percentuais de germinação quando comparada à germinação sob condições naturais e preservando a variabilidade genética. Entretanto, os protocolos para essa técnica variam em função da espécie a ser produzida, tornando assim necessária a adequação do procedimento para cada uma delas. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar um protocolo para germinação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl. Foram realizados três experimentos no Laboratório de cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), nos quais avaliou-se a germinação em quatro diferentes meios de cultura, utilizando métodos de desinfestação de sementes, condições de luminosidade, concentrações de ágar e de carvão ativado. A germinação, aos 45 dias após a semeadura *in vitro*, foi maior quando utilizada a desinfestação das sementes em solução de hipoclorito de sódio por cinco minutos, seguida de tríplice lavagem e inoculação nos meios MS e MS ½. Observou-se também que a luz não influenciou a germinação. As sementes germinaram menos em meios de cultura VW não suplementados com carvão ativado, em todas as concentrações de ágar utilizadas. Foi estabelecido um protocolo para a germinação de *S. crispa*, o qual recomenda a semeadura assimbiótica a partir suspensão de sementes embebidas por cinco minutos em hipoclorito de sódio e com a realização da tríplice lavagem e semeadura em meio de cultura MS ½ suplementado com 6,0 g L<sup>-1</sup> carvão ativado e solidificado com 4,0; 6,0 ou 8,0 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico.

**Palavras-chave-** Orchidaceae, agente desinfestante, irradiância, agente geleificante, carvão ativado.

## CHAPTER 2 - *Schomburgkia crisper* LINDL. *in vitro* GERMINATION PROTOCOL

### ABSTRACT

Asymbiotic germination of native orchids is an important technique for propagation and conservation, resulting in high germination percentages when compared to germination in natural conditions and preserving genetic variability. However, the protocols for this technique are variable depending on the species being produced, thus making it necessary to adapt the procedure to species. Thus, this work was developed with the objective of determining a protocol of *Schomburgkia crisper* Lindl. asymbiotic germination. Three experiments were conducted at the Laboratory of *in vitro* culture of the Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) - Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), in which we evaluated *in vitro* germination in four different culture media using seeds disinfection methods, luminosity conditions, agar and activated charcoal concentrations. The germination, at 45 days after *in vitro* sowing was higher when the seeds were disinfested in sodium hypochlorite solution for five minutes, followed by triple rising and inoculation in MS and MS ½ media. It was also observed that light didn't influence the species germination. Also, the seeds germinated less in VW culture media not supplemented with activated charcoal at all agar concentrations used. Based on the results, a reproducible germination protocol was established for the species studied. Thus, it is recommended that the *in vitro* sowing of *S. crisper* be carried out with suspension of seeds disinfested for five minutes in sodium hypochlorite and with the accomplishment of the triple rising, in the culture media MS ½ supplemented with 6.0 g L<sup>-1</sup> activated charcoal and solidified with 4.0; 6.0 or 8.0 g L<sup>-1</sup> of bacterial agar.

**Keywords-** Orchidaceae, native species, *in vitro* cultivation, culture media, disinfecting agent, irradiance, gelling agent, activated carbon.

## INTRODUÇÃO

A Família Orchidaceae abrange 70% do número total de epífitas vasculares típicas de florestas tropicais e subtropicais úmidas (SOLTIS et al., 2005; PRIDGEON et al., 2009) e tem sido apontada como uma das famílias botânicas mais representativas da composição florística do Cerrado como um todo, constituindo 703 espécies distribuídas em 123 gêneros, sendo que no Mato Grosso do Sul são encontradas 88 espécies compondo 40 gêneros (BARROS et al., 2018). *Schomburgkia crisper* Lindl. é uma epífita encontrada tanto em florestas de galeria quanto em matas secas do cerrado (MENDONÇA et al., 2008).

Além da especificidade de polinizadores, as espécies de orquídeas dependem da heterogeneidade ambiental proporcionada pela diversidade do estrato arbóreo (HUSTON, 1994), pois têm o ciclo de vida altamente especializado, sementes com pouca ou nenhuma reserva e a germinação dependente da associação com fungos micorrízicos, o que, somado à coleta indiscriminada na natureza, resulta na vulnerabilidade da família, que vem sendo relatada desde 2008 entre as mais seriamente ameaçadas de extinção (FERREIRA & SUZUKI 2008).

A semeadura *in vitro* de orquídeas constitui técnica relevante do ponto de vista comercial e ecológico (MARTINI et al., 2001), já que as plantas produzidas desse modo podem ser utilizadas tanto para a comercialização quanto em programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental, devido à variabilidade genética proporcionada pelo método. Porém, o sucesso na tecnologia e aplicação desses métodos é dependente da melhor compreensão dos requerimentos nutricionais do material propagado (SCHNEIDERS et al., 2012).

Embora a semeadura seja muito utilizada e difundida entre os pesquisadores e produtores de orquídeas, o conhecimento disponível a respeito da composição nutricional dos meios de cultivo e dos protocolos de semeadura que favoreçam a germinação e minimizem a contaminação das culturas ainda é restrito a algumas espécies, principalmente as de interesse comercial (CARNEIRO, 2014).

O sucesso da germinação *in vitro* também pode ser afetado pela contaminação do material vegetal por fungos e bactérias. De acordo com Faria et al. (2012), a proliferação desses contaminantes pode comprometer a produção de mudas, causando perdas de até 10% do material propagado. O tratamento das sementes com agente desinfestante,

principalmente o hipoclorito de sódio, é uma das formas de evitar contaminações (SILVA et al., 2015a).

Nesse procedimento, uma solução aquosa de hipoclorito de sódio é utilizada sendo as sementes imersas por um determinado período de tempo (CAMPOS, 2002; FARIA et al., 2012). Essa técnica de desinfestação tem sido eficaz na maioria dos casos, porém, algumas espécies de Orchidaceae apresentam sementes mais sensíveis ao hipoclorito de sódio, que pode se tornar tóxico, dependendo da concentração e do tempo de exposição utilizados, o que pode ocasionar baixa porcentagem de germinação em meio de cultivo (CHU & MUDGE, 1994; ODDIE et al., 1994; SORGATO, 2016).

Outras características que influenciam nas respostas germinativas incluem a formulação, a consistência e o enriquecimento do meio de cultura; as condições de luz, como a distribuição espectral e a irradiância, fatores estes que variam de acordo com as necessidades de cada espécie, podendo ser específicas nas diferentes etapas do desenvolvimento do material vegetal (STEWART & KANE, 2006; TEMJENSANGBA & DEB, 2006; PAUL et al., 2012; SILVA et al., 2015a).

Para Orchidaceae, de modo geral, os meios nutritivos MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), VW (VACIN & WENT, 1949) e KC (KNUDSON, 1946) são utilizados com maior frequência na germinação e estabelecimento *in vitro* de diferentes espécies (SUZUKI et al., 2010; FARIA et al., 2012; SILVA et al., 2015a; SILVA et al., 2015b). A consistência do meio de cultivo, assim como a escolha deste, também deve ser levada em consideração, já que a concentração do agente geleificante, geralmente o ágar, interfere na difusão dos nutrientes para a semente (FARIA et al., 2012). Outros componentes também podem ser adicionados ao meio de cultivo, de acordo com a necessidade de cada espécie, como por exemplo o carvão ativado. O enriquecimento do meio com carvão ativado é justificado por seus efeitos benéficos na germinação de sementes de orquídeas, pois uma de suas propriedades é a adsorção de substâncias inibidoras que são liberadas pelos tecidos vivos e pelo meio de cultura (FARIA et al., 2012; SOARES et al., 2012), além de promover o escurecimento do meio de cultura, auxiliando no enraizamento das plântulas (THOMAS, 2008).

A luz também influencia no cultivo *in vitro*, atuando nos processos de germinação, fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo. Diferentes comprimentos de onda, fotoperíodo e irradiância têm sido estudados por alguns autores, como forma de aumentar a germinação e melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*.



Apesar destes estudos, ainda há pouca informação sobre o efeito da luz na germinação de orquídeas (ARDITTI & ERNST, 1984; TSUTSUMI et al., 2011; SILVA et al., 2015a; ZENG et al., 2015).

Assim, objetivou-se determinar um protocolo para a germinação *in vitro* de *Schomburgkia crispera*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), durante o período de março de 2015 a março de 2016.

Frutos de *Schomburgkia crispera* Lindl. foram destacados de plantas matrizes do Orquidário da Faculdade de Ciências Agrárias – FCA/UFGD, provenientes do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema (PEVRI – MS), com auxílio de uma tesoura de poda manual e desinfestados com solução de álcool etílico 70%. Em seguida, foram abertos com auxílio de um bisturi e as sementes retiradas, homogeneizadas e acondicionadas em dessecador com sílica gel ( $25 \pm 2$  °C; 75% UR) por 14 dias. Após a dessecação, as sementes foram armazenadas sob refrigeração com temperatura de  $4 \pm 2$  °C. Antes da semeadura, foi realizado o teste de tetrazólio para a avaliação da viabilidade das sementes da espécie, segundo metodologia de Soares et al. (2014), no qual, três porções de sementes, de 5 mg cada, foram colocadas em tubos de ensaio e cada uma delas recebeu 3 mL de solução aquosa de cloreto de trifênil tetrazólio (0,5%). As suspensões de sementes foram acondicionadas em ambiente desprovido de luz, em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Após 24 horas, as suspensões de tetrazólio foram acrescidas de 7 mL de água destilada estéril e agitadas, sendo pipetado 1 mL para identificação e contagem de sementes potencialmente viáveis em câmara de Peters, com o auxílio de microscópio estereoscópico. Foram consideradas como viáveis as sementes com embriões totalmente coloridos de carmim, enquanto que 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, obtendo os valores médios de sementes viáveis.

Como meios assimbióticos para semeadura foram utilizados o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962); MS ½ (MS na metade da concentração de sais); K (KNUDSON, 1946) e

VW (VACIN e WENT, 1949) suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH dos meios foi aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se HCl (0,1M) ou KOH (0,1M) e na sequência foram distribuídos em frascos de cultivo. Posteriormente, os frascos foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Ao alcançar temperatura ambiente, os frascos foram transferidos para ambiente estéril.

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultivo utilizados para a germinação assimbiótica de sementes de *Schomburgkia crisper* Lindl. Dourados/UEMS, 2018.

Nutrientes	Murashige & Skoog (MS)	Murashige & Skoog (MS ½)	Knudson (K)	Vacin & Went (VW)
	mM	mM	mM	mM
Amônio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	20,62	10,31	3,79	3,79
Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	39,43	19,72	4,24	5,20
Fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	1,25	0,625	1,84	2,48
Potássio (K)	20,06	10,03	1,84	7,04
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	1,50	0,75	4,84	4,80
Cálcio (Ca <sup>++</sup> )	3,01	1,505	4,24	0,65
Magnésio (Mg)	1,50	0,75	1,02	1,02
Cloro (Cl <sup>-</sup> )	6,03	3,015	-	-
Sacarose	87,72	87,72	87,72	87,72
Nitrogênio total	60,05	30,02	8,03	8,99

Para que os objetivos propostos fossem alcançados, foram executados três experimentos independentes:

**1. Meios de cultura, tipos de suspensão e tempo de embebição das sementes no agente desinfestante para a germinação *in vitro* de *Schomburgkia crisper* Lindl.**

Foram pesadas quatro amostras de 0,05 g de sementes de *S. crisper*. As amostras foram levadas para ambiente asséptico e desinfestadas com 15 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%. Duas amostras permaneceram imersas na solução de hipoclorito de sódio por 5 minutos e duas por 15 minutos. Após os períodos estabelecidos, as suspensões de sementes foram diluídas para 50 mL com água destilada estéril. Uma amostra de cada tempo de desinfestação foi utilizada imediatamente para a semeadura *in vitro*, a outra recebeu tríplice lavagem com água destilada estéril (40 mL por lavagem) e, após este procedimento, o volume dessa suspensão foi completado para 50 mL com água

destilada estéril para a semeadura *in vitro*. Na sequência, inocularam-se, com auxílio de um pipetador manual automático, 1000 µL da suspensão de sementes por frasco de cultivo.

Após a inoculação, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ( $25 \pm 2$  °C; 16 h) e irradiância luminosa de  $18,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  propiciada por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 20W. Quarenta e cinco dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação das sementes. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 2 x 2 x 4 (dois tempos de desinfestação, dois tipos de suspensões – com ou sem tríplice lavagem - e quatro meios de cultura), com quatro repetições constituídas de um frasco de cultivo. Os resultados da porcentagem de germinação foram transformados para  $\sqrt{(x + 1)}$  e, a seguir, submetidos à análise de variância. As médias relativas aos tempos de desinfestação e aos tipos de suspensões foram comparadas pelo teste t de Student e, aquelas relativas aos meios de cultura, pelo teste de Tukey até 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, MG).

## **2. Condições de luminosidade e meios de cultura na germinação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl.**

Baseado nos resultados do experimento anterior, foram pesados 0,1 g de sementes da espécie *S. crispa*. A amostra foi levada para ambiente asséptico e desinfestada com 30 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, permanecendo imersa nessa solução por cinco minutos. Após este período, a suspensão de semente foi diluída para 100 mL com água destilada estéril, recebendo em seguida tríplice lavagem com água destilada estéril (80 mL por lavagem) e, após este procedimento, o volume dessas suspensões foi completado para 100 mL com água destilada estéril 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.

Após a inoculação, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ( $25 \pm 2$  °C; 16 h), permanecendo sob as seguintes condições de luminosidade: 1- lâmpada fluorescente branca ( $18,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  - irradiância fornecida por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W cada) 2- lâmpada fluorescente

branca + lâmpada fluorescente vermelha ( $14,85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  – irradiância fornecida por uma lâmpada fluorescente branca de 20 W e uma lâmpada fluorescente vermelha de 30 W Gro-lux®); 3- lâmpada fluorescente vermelha ( $9,45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  – irradiância produzida duas lâmpadas fluorescentes vermelhas de 30 W Gro-lux®) e 4- escuro ( $0,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Quarenta e cinco dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema de parcela subdividida, sendo alocadas na parcela as quatro condições de luminosidade e na sub-parcela os quatro meios de cultura, com quatro repetições constituídas de um frasco de cultivo. Os resultados da porcentagem de germinação foram transformados para  $\sqrt{(x + 1)}$  e, a seguir, foram submetidos à análise de variância sendo comparados pelo teste de Tukey até 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, MG).

### **3. Meios de cultura, ágar e carvão ativado na germinação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl.**

Foi pesada uma amostra de 0,35g de sementes de *S. crispa*. A amostra foi levada para ambiente asséptico e desinfestada com 105 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, permanecendo imersa na solução de hipoclorito de sódio por cinco minutos, conforme experimento 1. Após este período, a suspensão de sementes foi diluída para 350 mL com água destilada estéril recebendo em seguida tríplice lavagem com água destilada estéril (280 mL por lavagem) e, após este procedimento, o volume da suspensão foi completado para 350 mL com água destilada estéril para a semeadura *in vitro*. A semeadura foi realizada com o auxílio de um pipetador automático inoculando-se 1000  $\mu\text{L}$  da suspensão de sementes por frasco.

Após a inoculação, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 16 h), permanecendo sob lâmpada fluorescente branca ( $18,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  - irradiância fornecida por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W cada), conforme resultados do experimento 2. Quarenta e cinco dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação da espécie pesquisada.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 4 x 5 x 5 (quatro meios de cultura - MS, MS ½, K ou VW, cinco concentrações de ágar - 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 ou 8,0 g L<sup>-1</sup> e cinco concentrações de carvão ativado - 0; 1,5; 3,0; 4,5 ou 6,0 g L<sup>-1</sup>), com três repetições constituídas de um frasco de cultivo. Os resultados da porcentagem de germinação foram transformados para  $\sqrt{(x + 1)}$  e, a seguir, foram submetidos à análise de variância sendo os fatores qualitativos comparados pelo teste de Tukey até 5% e os quantitativos por regressão, com auxílio do programa SAEG – Sistema para Análises Estatísticas (RIBEIRO JUNIOR, 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Meios de cultura, tempo de embebição no agente desinfestante e tipos de suspensão de sementes na germinação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl.

Houve efeito isolado e conjunto do tempo de desinfestação, do tipo de lavagem da suspensão de sementes e dos meios de cultura utilizados, exceto para a interação entre o tempo de embebição e meio de cultura (TE X MC), sobre a porcentagem de germinação ( $p < 0,01$ ) das sementes de *Schomburgkia crispa* Lindl. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) de *Schomburgkia crispa* Lindl. UEMS, Dourados-MS, 2018.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios
		%G
Tempo de embebição (TE)	1	30,04**
Tipo de suspensão (TS)	1	759,76**
Meio de cultura (MC)	3	4,00**
TE X TS	1	20,10**
TE X MC	3	0,36 <sup>ns</sup>
TS X MC	3	1,69**
TE X TS X MC	3	1,92**
Erro	48	0,20**
C.V.(%)		7,44
Média Geral		49,1%

\*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo pelo teste F

A maior porcentagem de germinação das sementes foi observada quando embebidas por cinco minutos em hipoclorito de sódio (NaClO) seguida de tríplice lavagem

e semeadas em meio de cultura Murashige & Skoog (%G = 99,7%) na metade da concentração de sais (MS ½), resultado este que não apresentou diferença estatística dos encontrados nos meios Vacin e Went (VW) (%G = 99%) e Murashige e Skoog (MS) (%G = 96,3%), nas mesmas condições de semeadura. Já os menores valores de %G de sementes semeadas nessas condições foram observados em meio Knudson (K) (%G = 58,1%).

Sementes embebidas em NaClO durante cinco minutos, mas que não receberam a tríplice lavagem, apresentaram diminuição na %G de 84,6% no meio MS ½ (%G = 15,1%), 85,1% no meio MS (%G = 11,2%), 76,2% no meio VW (%G = 22,8%) e 47,7% no meio K (%G = 10,4%). Quando as sementes foram embebidas por quinze minutos, também sem a prática da tríplice lavagem, tiveram diminuição na %G de 93,8% no meio MS ½ (%G = 1,2%), 96,8% no meio MS (%G = 0,0), 86,9% no meio VW (%G = 2,5%) e 86,5% no meio K (%G = 0,6%) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Porcentagem de germinação (%G) de *Schomburgkia Crispa* Lindl. observada em função dos meios de cultura (K= Knudson; MS= Murashige e Skoog; VW= Vacin e Went), tempo de embebição (TE) e tipo de suspensão de sementes (CL= com lavagem e SL= sem lavagem). UEMS, Dourados-MS, 2018.

Meios de cultura	%G			
	.....TE = 5'.....		.....TE = 15'.....	
	CL	SL	CL	SL
K	58,1 bA <sup>b</sup>	10,4 bB <sup>a</sup>	87,1 cA <sup>a</sup>	0,6 aB <sup>b</sup>
MS	96,3 aA <sup>a</sup>	11,2 bB <sup>a</sup>	96,8 aA <sup>a</sup>	0,0 aB <sup>b</sup>
MS ½	99,7 aA <sup>a</sup>	15,1 bB <sup>a</sup>	95,0 abA <sup>a</sup>	1,2 aB <sup>b</sup>
VW	99,0 aA <sup>a</sup>	22,8 aB <sup>a</sup>	89,4 bcA <sup>b</sup>	2,5 aB <sup>b</sup>

Letras minúsculas comparam médias nas colunas (Tukey p<0,05); Letras maiúsculas, nas linhas, comparam tipo de suspensão (CL e SL) no mesmo tempo de embebição (Tukey p<0,05); Letras sobrescritas, nas linhas, comparam tempo de embebição (5 e 15 minutos) no mesmo tipo de suspensão de sementes (Tukey p<0,05).

A germinação *in vitro* pode ser influenciada também pelo agente desinfestante utilizado na semeadura. O NaClO é um alcalóide que atua inativando microrganismos aeróbicos e esporos de fungos, que são responsáveis pela maior parte das contaminações. Sua ação é decorrente da perda de Cl<sup>-</sup>, que ativa a oxidação de íons que captura moléculas de oxigênio (ALVAREZ-PARDO et al., 2006). A redução na %G das sementes quando não foi realizada a prática da tríplice lavagem, pode estar relacionada ao hipoclorito de sódio, que, segundo Chu & Mudge (1994), pode ser tóxico para germinação de sementes, dependendo da concentração e do tempo de exposição utilizados. Esses resultados corroboram com Alvarez-Pardo et al. (2006), que relatam a necessidade de várias lavagens com água esterilizada, após a embebição em solução de hipoclorito de sódio, para a desinfestação de sementes de orquídeas. Os autores ainda salientam que este procedimento

é demorado, principalmente quando uma grande quantidade de sementes é utilizada, porém os resultados deste trabalho mostram que a utilização de três lavagens com água destilada estéril aumentou significativamente a germinação de *S. crispa*, demonstrando que o procedimento é essencial para a semeadura *in vitro* da espécie.

Em relação ao tempo de embebição na solução desinfestante, as sementes que permaneceram por cinco minutos na solução apresentaram, de maneira geral, porcentagem de germinação 5% maior (%G = 51,6%) do que as que permaneceram por quinze minutos (%G = 46,6%), independente da realização da tríplice lavagem.

Quando se observa o tipo de suspensão dentro dos tempos de embebição, percebe-se que a utilização da tríplice lavagem possibilitou, de maneira geral, 82,15% a porcentagem de germinação das sementes. Quando se utilizou a tríplice lavagem, a %G média foi de 90,15% comparada a 7,98% quando as lavagens não foram realizadas.

Os maiores valores de %G, de modo geral, foram observados no meio de cultura MS ½ (%G = 52,75%). Quando se utilizou a tríplice lavagem, a média de %G no meio MS ½ (%G = 97,35%) superou em 0,8% a %G no meio MS (%G = 96,55%), em 3,15% a %G no meio VW (%G = 94,2%) e em 24,75% a %G no meio K (%G = 72,6%).

De acordo com a literatura, os meios que propiciaram maior número de sementes germinadas de *Cattleya loddigesii* Lindl., *Epidendrum fulgens* Brong., *Miltonia flavescens* Lindl. e *Alatiglossum fuscopetalum* (Hoehne) Bapstista foram MS e MS ½ (ABRÃO et al., 2014; VOGES et al., 2014; LEMES, 2015; FERREIRA et al., 2017) e para *Cyrtopodium punctatum* Lindl. e *Cattleya bicolor* Lindl foi VW (DUTRA et al., 2009; SUZUKI et al., 2010).

*Cattleya bicolor* apresentou 48,5% de germinação em meio K, que promoveu os menores valores entre os meios estudados, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho (Tabela 1). Tanto o meio VW quanto o meio K proporcionaram as piores médias para a germinação de *Alatiglossum fuscopetalum* (Hoehne) Baptista (FERREIRA et al., 2017).

Observa-se, com esses resultados, que a escolha do meio de cultivo está diretamente ligada à espécie cultivada, já que cada uma germina e se desenvolve melhor em meios de cultura com balanço nutricional diferenciado, que é proporcionado pelas diferentes formulações de cada um deles (SUZUKI et al., 2009).

Considerando a pobreza nutricional naturalmente expressa nas sementes da maioria das espécies de orquídeas (RODRIGUES, 2005), a contribuição do meio de cultura como

fornecedor de nutrientes para a germinação e o protocormo em desenvolvimento torna-se fundamental. Uma vez que os meios K, MS e VW constituem fonte inorgânica de macro e micronutrientes, parece sensato afirmar que as diferenças de %G estejam correlacionadas às diferentes concentrações nutricionais, com destaque para as maiores concentrações dos compostos nitrogenados, além dos maiores teores de potássio e magnésio (RODRIGUES, 2005; STEWART e KANE, 2006).

A redução da %G também pode estar relacionada com o potencial hidrogeniônico (pH). Para a germinação de sementes de orquídeas, o pH recomendado por FARIA et al. (2012) está entre 5,6 e 5,8. Ao analisar a solução de hipoclorito de sódio utilizada na semeadura, quando não houve tríplice lavagem, observou-se pH de 10,8; provavelmente a exposição das sementes ao pH elevado nessa condição, juntamente com a alta concentração salina dos meios com maiores teores nutricionais, podem ter desencadeado reações químicas que dificultaram a germinação de sementes.

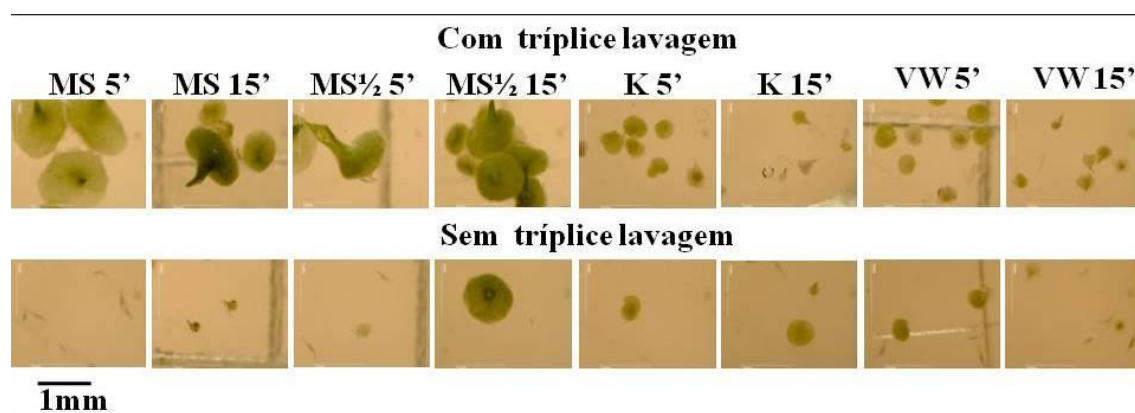
Nos meios com maiores concentrações de valores de amônio e nitrato, sem a realização da tríplice lavagem, provavelmente ocorreu uma reação entre as moléculas de amônia e nitrato presentes com o NaClO que, além de elevar o pH do meio, proporciona liberação de OH<sup>-</sup> e O<sub>2</sub>, que são extremamente reativas e podem causar oxidação das moléculas do meio (ATKINS & JONES, 2012).

Assim, ressalta-se a importância da tríplice lavagem, pois com a utilização desta prática, além de influenciar na porcentagem de germinação, os propágulos, avaliados visualmente e fotografados com auxílio de microscópio estereoscópico, apresentaram-se mais desenvolvidos aos 45 dias após a semeadura, podendo ser encontrados, segundo Suzuki et al. (2009), em estágio 2 (plântula com formação da primeira folha). Quando não foi realizada a tríplice lavagem da solução de sementes, aos 45 dias após a semeadura, a maioria dos protocormos encontraram-se em estágio 1 (protocormo intumescido clorofilado) e diversas sementes não germinadas (Figura 1).

O tempo para a desinfestação de sementes na semeadura *in vitro* de orquídeas pode variar conforme o agente desinfestante e a concentração utilizada. Segundo Arditti & Ernst (1992), a aplicação de solução de hipoclorito de sódio de 5 a 30 minutos, permite uma desinfestação por completo das sementes, resolvendo assim o problema da contaminação. No presente trabalho, não foi observada contaminação em nenhum tratamento durante o período experimental, comprovando a efetividade do hipoclorito de sódio como agente desinfestante na semeadura *in vitro* de *S. crispera*. Rodrigues et al. (2012) evidenciam a



eficiência do emprego de NaClO na desinfecção de sementes, além de ressaltar que esse produto é acessível e de baixo custo.



**Figura 1.** Protocormos de *Schomburgkia crispa* Lindl. aos 45 dias após a germinação. UEMS, Dourados-MS, 2018. Foto: Soares, J. S.

## 2. Condições de luminosidade e meios de cultura na germinação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl.

A luminosidade não influenciou a germinação *in vitro* de *S. crispa*, evidenciando que as sementes dessa espécie são, nas condições avaliadas, fotoblásticas neutras (TAIZ & ZEIGER, 2013), que apresentaram %G média de 93,4% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) de *Schomburgkia crispa* Lindl. UEMS, Dourados-MS, 2018.

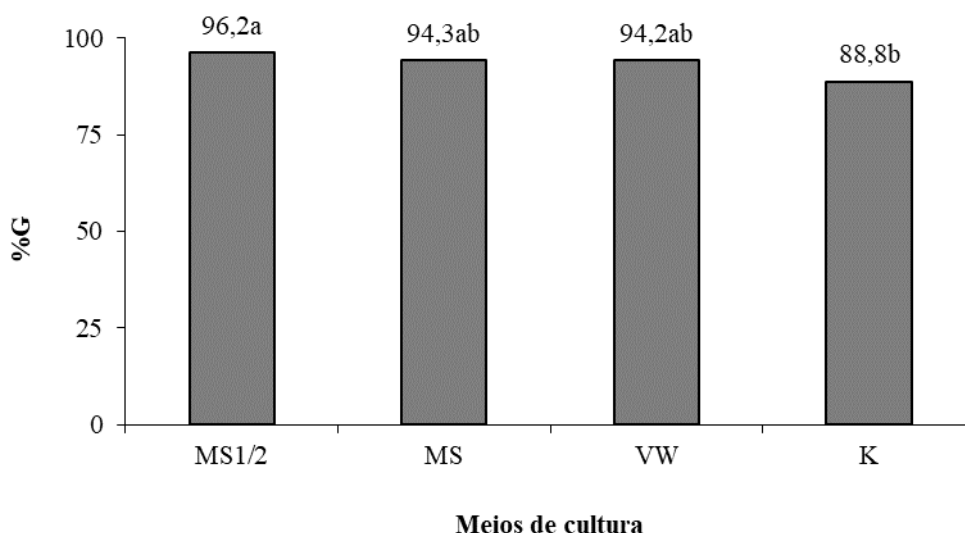
Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios
		% G
Luminosidade	3	91,85 <sup>ns</sup>
Meio de cultura	3	164,45*
Luminosidade x Meio de cultura	9	52,87 <sup>ns</sup>
Erro	48	57,97
C.V.(%)		8,1
Média Geral		93,4%

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

Esses resultados podem ser atribuídos ao fato das orquídeas epífitas serem capazes de explorar ambientes com baixa luminosidade, escassez de água e minerais (BENZING et al., 1982). Corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho para *S. crispa*, algumas pesquisas relatam que a germinação de espécies epífitas como *Odontoglossum gloriosum* Lind. & Rchb. f. (PEDROZA-MANRIQUE & MICAN-GUTIÉRREZ, 2006),

*Cyrtopodium punctatum* Lindl. (DUTRA et al., 2009), *Ansellia africana* Lindl. (VASUDEVAN & VAN STADEN, 2010), *Liparis fujisanensis* Maek (TSUTSUMI et al., 2011), *Dendrobium nobile* Lindl. e *Dendrobium anosmum* Lindl. (SORGATO, 2016) foi satisfatória, independentemente das condições de luz.

Quanto à utilização de diferentes meios de cultura, a maior porcentagem de germinação (%G = 96,2%) ocorreu quando a espécie foi semeada no meio MS ½, sendo maior 1,9% em relação ao meio MS e 2% em relação ao meio VW, embora sem diferença estatística, mas sendo superior à porcentagem de germinação em meio K (%G = 88,8%) (Figura 2).

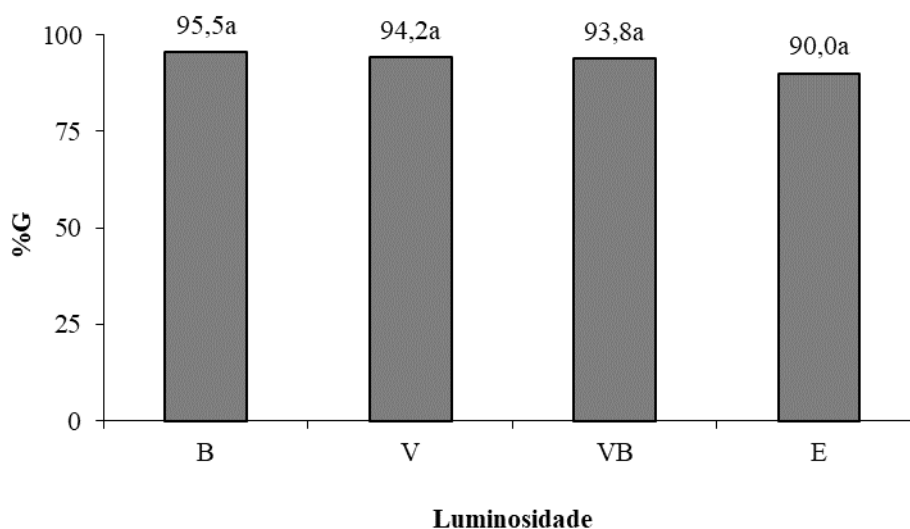


**Figura 2.** Porcentagem de germinação de sementes de *Schomburgkia crisper* Lindl. em função dos meios de cultura utilizados. Dourados – MS, UEMS, 2018. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey  $p < 0,05$ ).

A escolha do meio de cultivo é extremamente importante para o sucesso da germinação de sementes de orquídeas, já que o meio mais adequado para cada espécie está ligado diretamente aos nutrientes fornecidos às plantas e a sua influência na germinação (SUZUKI et al., 2009). Segundo Stewart (1989), as espécies de orquídeas podem ser divididas em dois grupos distintos segundo suas necessidades nutricionais básicas. Um grupo é composto por espécies que germinam em meios de cultura com menor concentração de nutrientes, tais como o K e o VW, e outro com as que germinam melhor em meios com maior quantidade de nutrientes, como o MS, tanto completo, quanto na metade de sua concentração (MS ½).

Os resultados aqui apresentados sugerem que *S. crisper*, pertença ao segundo grupo, necessitando de meios de cultivo com maior fornecimento de nutrientes, uma vez que, embora tenha apresentado altas taxas de germinação em meio VW, os menores valores de %G foram observados em meio K e os maiores nos meios MS ½ e MS, respectivamente (Figura 2).

Embora sem diferença estatística, os maiores valores de %G de *S. crisper* foram observados quando a germinação ocorreu sob luz branca (%G = 95,5%), sendo 1,3% maiores do que quando a germinação ocorreu sob luz vermelha, 1,7% maiores do que quando a germinação ocorreu sob as luzes vermelha e branca e 5,5% maiores do que quando a germinação ocorreu no escuro (Figura 3).

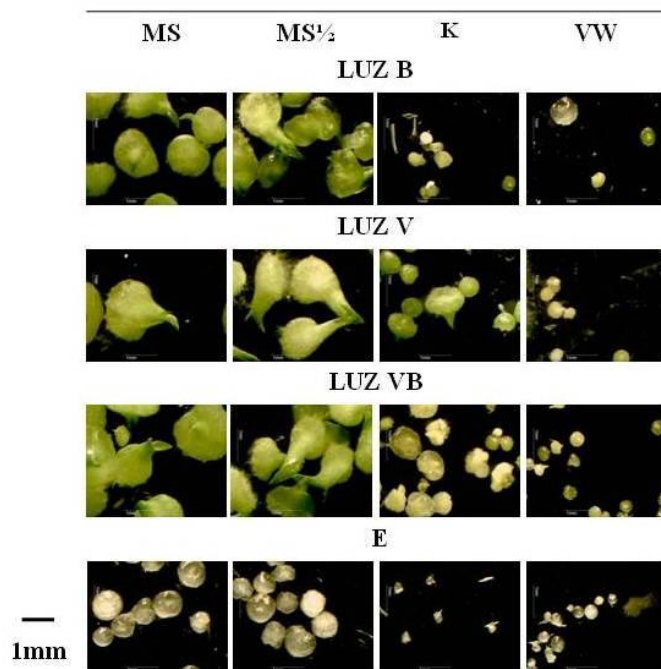


**Figura 3.** Porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Schomburgkia crisper* Lindl. em função das condições de luminosidade utilizadas. Luz: **B** = Branca; **V** = vermelha; **VB** = vermelha + branca e **E** = escuro. Dourados – MS, UEMS, 2018. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey  $p < 0,05$ ).

Aos 45 dias após a sementeira, as plântulas e protocormos germinados na presença de luz apresentaram-se maiores e mais desenvolvidos quando foram utilizados os meios MS e MS ½, classificados, segundo Suzuki et al. (2009) em estágio 2 (plântula com formação da primeira folha) e estágio 3 (plântula com duas folhas) (Figura 4).

Na condição de escuro contínuo, embora tenha ocorrido germinação, foram encontrados apenas protocormos em estágio 1 (protocormo intumescido) (Figura 4) e, pode-se notar ainda que estes apresentavam-se esbranquiçados, posto que a diferenciação dos proplastídeos em cloroplastos e a síntese de clorofila são dependentes da luz (TAIZ &

ZEIGER, 2013), tornando a luz essencial para as fases iniciais de crescimento e desenvolvimento da espécie em estudo, a qual não conta com reservas na semente e encontra-se em condições assimbióticas.



**Figura 4.** Sementes, protocormos e plântulas de *Schomburgkia crispa* Lindl. aos 45 dias após a germinação, em diferentes meios de cultura e condições de luminosidade. Luz: **B** = Branca; **V** = vermelha; **VB** = vermelha + branca e **E** = escuro. Dourados – MS, UEMS, 2018. Foto: Soares, J. S.

A fase germinativa é muito importante, pois pode trazer informações para a compreensão do estabelecimento de uma comunidade vegetal e também para a sobrevivência e regeneração natural das espécies (FENNER & THOMPSON, 2005). Em condições naturais, a germinação é restrita a locais com condições específicas e satisfatórias, sendo controlada, principalmente, pela temperatura, luz e água, implicando no surgimento de características germinativas diversificadas entre as espécies (BASKIN & BASKIN 2001; PEARSON et al. 2002).

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).

### 3. Meios de cultura, ágar e carvão ativado na germinação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl.

Houve efeito isolado e conjunto dos três fatores estudados sobre a porcentagem de germinação (%G) das sementes de *S. crispa* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) de *Schomburgkia crispa* Lindl. UEMS, Dourados-MS, 2018.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios
		% G
Meio de cultura (MC)	3	13,14**
Ágar	4	1,60**
Carvão	4	10,37**
MC x Ágar	12	0,99**
MC x Carvão	12	10,25**
Ágar x Carvão	16	0,29 <sup>ns</sup>
MC x Ágar x Carvão	48	0,32*
Erro	200	0,22
C.V.(%)		4,9
Média Geral		95,4%

\*\* significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo pelo teste F

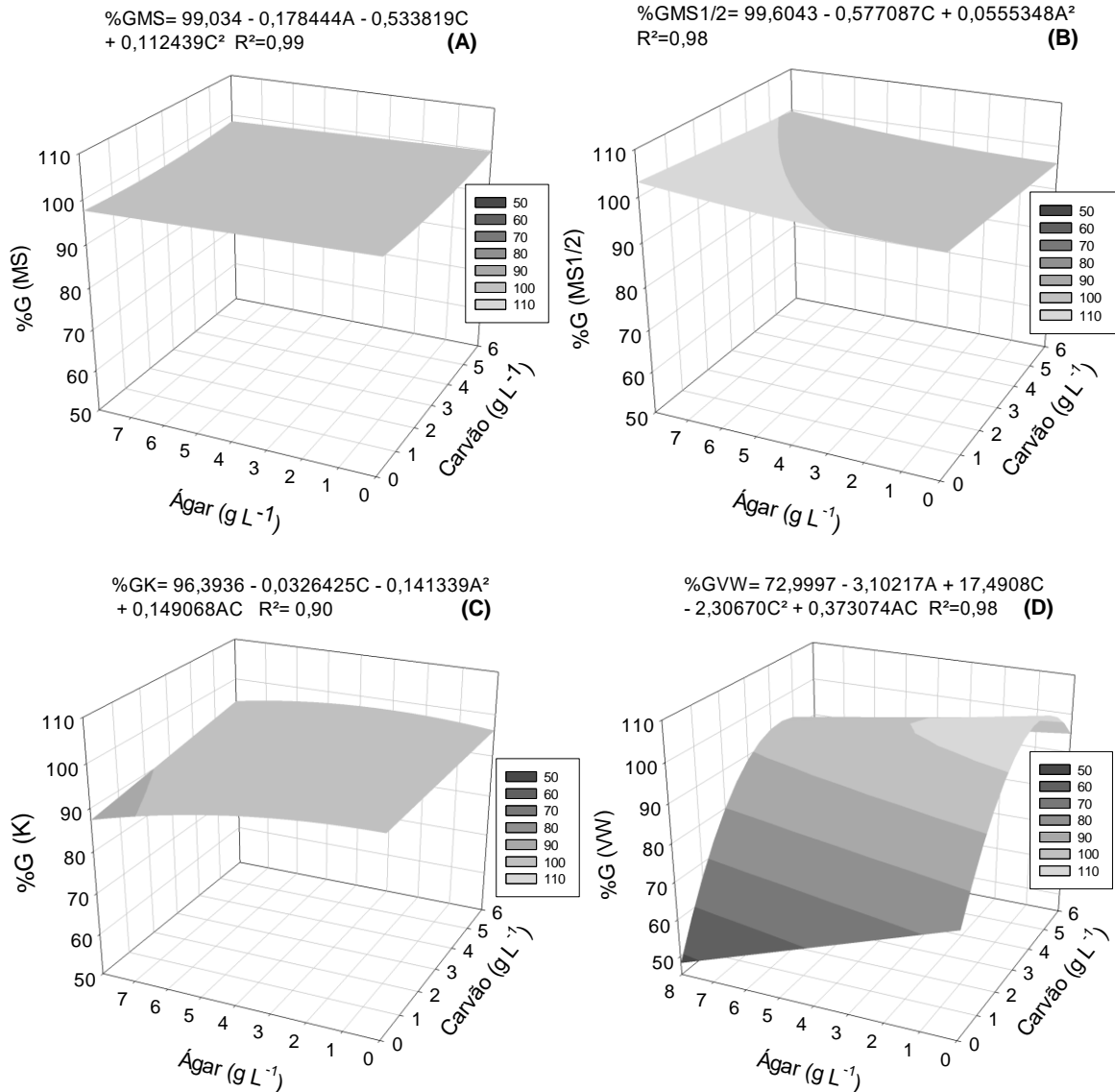
Não houve diferença significativa entre as %G em função dos meios de cultura e as concentrações de ágar e carvão ativado para os meios MS (Figura 4A), MS ½ (Figura 4B) e K (Figura 4C), que diferenciaram estatisticamente apenas do meio VW (Figura 4D). Em todas as concentrações de ágar utilizadas, a menor %G ocorreu na ausência de carvão e no meio de cultura VW, onde apenas 62,5% das sementes germinaram em meio sem adição de ágar; 81,6% em meio suplementado com 2,0 g L<sup>-1</sup> de ágar; 49,8% com 4,0 g L<sup>-1</sup> de ágar; 61,4% com 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e 43% com 8,0 g L<sup>-1</sup> do geleificante (Figura 4). As espécies de orquídea *Dendrobium nobile* e *D. anosmum* apresentaram maiores %G em meio sem ágar ou quando suplementado com 2,0 g L<sup>-1</sup> de ágar (SORGATO, 2016). Ressalta-se que *S. crispa* não apresentou padrão de germinação, apresentando valores satisfatórios em todas as concentrações de ágar utilizadas.

A utilização de até 6,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado nos meios de cultura aumentou a %G de *S. crispa*, corroborando resultados observados para *Epidendrum ibaguense* Lindl (HOSSAIN, 2008). Esses autores salientam que a alta afinidade do carvão ativado em adsorver compostos excessivos e inibidores, além do escurecimento dos meios de cultivo, pode ser responsável pelo sucesso na promoção do processo germinativo.

A germinação assimbiótica de *Brassavola tuberculata* Hook ocorreu apenas em meio de cultura suplementado com carvão ativado (SOARES et al., 2012), o que diverge dos resultados desse trabalho pois, embora as menores %G tenham sido encontradas na ausência de carvão, houve germinação de *S. crista* em todas as composições de meios de cultura utilizados, tanto nesse experimento quanto nos dois anteriores (Tabela 2, Figura 2, Figura 5).

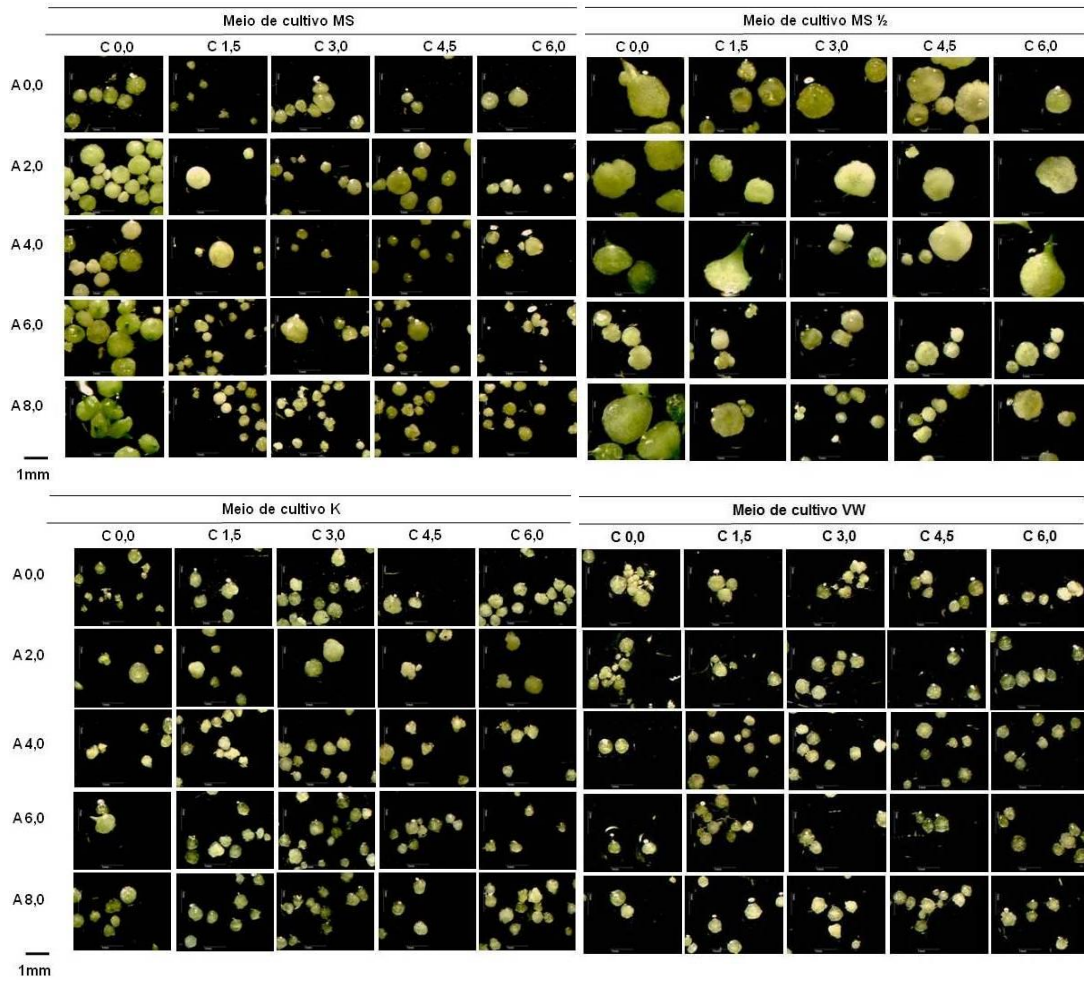
O carvão ativado possui efeitos diversos, podendo atuar na adsorção de vitaminas, íons metálicos e reguladores de crescimento, resultando em efeitos positivos ou negativos para o desenvolvimento, dependendo da espécie. Seus benefícios são atribuídos à presença de uma excelente rede de poros com grande superfície interna, onde muitas substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelo material vegetal podem permanecer adsorvidos (CHAGAS et al., 2005; THOMAS, 2008).

Resultados diversos quanto à utilização de carvão ativado no cultivo *in vitro* de diferentes espécies da família Orchidaceae são encontrados na literatura e devem-se, principalmente, ao genótipo utilizado, à adsorção de algumas substâncias químicas e compostos orgânicos, além de metabólitos tóxicos que podem ser liberados no cultivo *in vitro* (ARAÚJO et al., 2006; GALDIANO JÚNIOR et al., 2012; PRIZÃO et al., 2012; VILLA et al., 2014; SORGATO, 2016).



**Figura 5.** Porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Schomburgkia crisper* nos meios de cultura: (A) MS; (B) MS ½; (C) K e (D) VW, em função das concentrações de ágar e carvão utilizadas. Dourados – MS, UEMS, 2018.

Em relação ao desenvolvimento dos propágulos, é importante salientar que a utilização dos meios MS e MS ½ promoveu o crescimento dos protocormos, que embora não apresentassem diferença quanto ao desenvolvimento, sendo todos observados em estágio 1 (protocormo intumescido clorofilado) conforme classificação de Suzuki et al. (2009), mostraram-se visualmente maiores do que aqueles germinados em meio K ou VW (Figura 6).



**Figura 6.** Protocormos e sementes de *Schomburgkia crisper* Lindl. aos 45 dias após a germinação, nos meios de cultura MS, MS ½, K e VW, com diferentes concentrações de ágar e carvão ativado. Dourados – MS, UEMS, 2018. Foto: Soares, J. S.

Essas observações permitem inferir que os meios MS e MS ½ são mais apropriados para a germinação de *S. crisper*, já que promovem o crescimento dos protocormos formados, o que pode resultar em plântulas maiores e mais vigorosas.



## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, recomenda-se o seguinte Protocolo de germinação para *Schomburgkia crisper* Lindl.:

O fruto de *S. crisper* deve ser destacado de plantas matrizes com auxílio de uma tesoura de poda manual e desinfestado com solução de álcool etílico 70%. Em seguida, deve ser aberto com auxílio de um bisturi e as sementes retiradas, homogeneizadas e acondicionadas em dessecador com sílica gel ( $25\pm 2$  °C; 75% UR) por 14 dias. Após a dessecação, as sementes podem ser utilizadas no cultivo *in vitro*. Antes da sementeira deve ser realizado o teste de tetrazólio da espécie, segundo o qual, três porções de sementes, de 5 mg cada, são colocadas em tubos de ensaio e cada uma delas recebe 3 mL de solução aquosa de cloreto de trifênil tetrazólio (0,5%). As suspensões de sementes são acondicionadas em ambiente desprovido de luz, em temperatura ambiente ( $25\pm 2$  °C). Após 24 horas, as suspensões de tetrazólio são acrescidas de 7 mL de água destilada estéril e agitadas, sendo pipetado 1 mL para identificação e contagem de sementes potencialmente viáveis em câmara de Peters, com o auxílio de microscópio estereoscópico. São consideradas como viáveis as sementes com embriões totalmente coloridos de carmim, enquanto que as sementes com embriões incolores, parcialmente corados ou desprovidas de embrião são consideradas inviáveis. Para cada amostra são realizadas três leituras, sendo posteriormente calculada a média entre elas, obtendo os valores médios de sementes viáveis.

O meio de cultura recomendado para germinação dessa espécie é o meio MS  $\frac{1}{2}$ , podendo ser solidificado com a utilização de 4,0; 6,0 ou 8,0 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico e suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O pH do meio deve ser aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se HCl (0,1M) ou KOH (0,1M) e na sequência distribuído em frascos de cultivo. Posteriormente, os frascos devem ser esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após o resfriamento, os frascos são transferidos para ambiente estéril. Na sequência, em ambiente asséptico, para cada 5 mg de sementes da espécie recomenda-se como agente desinfestante 15 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, permanecendo imersa na solução de hipoclorito por 5 minutos. Após este período, a suspensão de sementes deve ser diluída para 50 mL com água destilada estéril. Em seguida deve ser realizada a tríplice lavagem com água destilada estéril (40 mL por lavagem) e, após este procedimento o volume dessa suspensão precisa

ser completado novamente para 50 mL com água destilada estéril para a semeadura *in vitro*. A semeadura pode ser realizada com auxílio de um pipetador automático. Após a inoculação, recomenda-se que as culturas sejam acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ( $25 \pm 2$  °C; 16 h), permanecendo sob lâmpada fluorescente branca ( $18,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiância) e após quarenta e cinco dias pode ser constatada a germinação das sementes.

## REFERÊNCIAS

ABRÃO, M. C. R.; JORGE, J.; PESCADOR, R.; DE MELO FERREIRA, W.; SUZUKI, R. M. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul-RS, v. 12, n. 3, p. 141-147, 2014.

ALVAREZ-PARDO, V. M.; FERREIRA, A. G.; NUNES, V. F. Seed desinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 24, n. 2, p. 217-220. 2006.

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; ROCHA, H. S. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras-MG, v. 2, n. 2, p. 61-67, 2006.

ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: ARDITTI, J. **Orchid biology: reviews and perspectives III**. New York: Cornell University Press, 1984. p. 177-222.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: Wiley-Interscience Publication. 1992. 682 p.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. 1048 p.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 2001. 627 p.

BARROS, F.; KERBAUY, G. B. **Orquidologia sul-americana: uma compilação científica**. São Paulo-SP, Secretaria do Meio Ambiente, 2004. 192 p.

BENZING, D.H., OTT, D.W. & FRIEDMAN, W.E. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. **American Journal Of Botany**, Saint Louis, v. 69, p. 608-614, 1982.

CAMPOS, D. M. **Orquídea: manual prático de reprodução**. 3 ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.

CITES - CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA. **Apêndice II**. 2017. Disponível em: <[http://checklist.cites.org/#/en/search/output\\_layout=alphabetical&level\\_of\\_listing=0&show\\_synonyms=1&show\\_author=1&show\\_english=1&show\\_spanish=1&show\\_french=1&scientific\\_name=&page=1&per\\_page=20](http://checklist.cites.org/#/en/search/output_layout=alphabetical&level_of_listing=0&show_synonyms=1&show_author=1&show_english=1&show_spanish=1&show_french=1&scientific_name=&page=1&per_page=20)>. Acesso em: 20 de dez. de 2017.

CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; PIO, L. A. S.; DUTRA, L. F.; CAZETTA, J. O. Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de

carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v. 29, N. 6, p. 1125-1131, 2005.

CHU C.; MUDGE, K. W. Effects of pre-chilling and liquid suspension culture on seed germination of the yellow Lady's slippers orchid (*Cypripedium calceolus* var. *puvescens*). **Lindleyana**, Florida-USA, v. 9, n. 1, p.153-159. 1994.

DUTRA, D.; KANE, M.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Florida-USA, v. 96, n. 1, p. 235-243, 2009.

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

FENNER, M.; THOMPSON, K. **The ecology of seeds**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 241 p.

FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M. I. B.; BASEIA, I. G.; LICHSTON, J. E. (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Imagem Gráfica, Natal. 2008. p. 67-68.

FERREIRA, W. M.; VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. C. N.; OLIVEIRA, H. R.; SUZUKI, R. M. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. **Iheringia**, Série Botânica, v. 72, n. 1, p. 57-65, 2017.

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. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 03 Jan. 2018.

GALDIANO JUNIOR, 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**, Santa Maria-RS, v. 42, n. 5, p. 801-807, 2012.

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

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.

HOSSAIN, M. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, African, v. 7, n. 20, p. 3614-3619, 2008.

HUSTON, M. A. **Biological Diversity**. New York: Cambridge University Press, 1994. 708 p.

KAUTH, P. J.; KANE, M. E.; VENDRAME, W. A.; REINHARDT – ADAMS, C. Asymbiotic germination response to photoperiod and nutritional media in six populations of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae): evidence for ecotypic differentiation. **Annals of Botany**, Bethesda-USA, v. 102, n. 5, p.783-793, 2008.

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.

LEMES, C. S. R. **Germinação, desenvolvimento e aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl. (Orchidaceae)**. 2015. 55p. Tese (Doutorado em produção vegetal) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2015.

MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. S. Propagation of orchid *Gongora quinquenervis* by *in vitro* germination. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p.1319-1324, 2001.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 422-442.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

ODDIE, R. L. A.; DIXON, K. W.; MCCOMB, J. A. Influence of substrate on asymbiotic and symbiotic *in vitro* germination and seedling growth of two Australian terrestrial orchids. **Lindleyana**, Florida-USA, v. 9, n. 1, p. 183-189, 1994.

PAUL, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. An 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**, Bethesda-USA, v. 2012, n. 2012, p. 1-12, 2012.

PEARSON, T. R. H.; BURSLEM, D. F. R. P.; MULLINS, C. E.; DALLING, J. W. Germination ecology of neotropical pioneers: interacting effects of environmental conditions and seed size. **Ecology**, Washington-USA, v. 83, n. 10, p. 2798-2807, 2002.

PEDROSO-DE-MORAES, C.; DOMINGUES, E.; PREZZI, L. E.; SOUZA-LEAL, T.; ZAMBON, R. L.; BRESCANSIN, R. L.; RAMOS, P. A. B. Florística e fitossociologia da família Orchidaceae no Centro de Educação Ambiental “Francisco Mendes”, município de Mogi Guaçu, SP, Brasil. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2010.

PEDROZA-MANRIQUE, J.; MICAN-GUTIERREZ, Y. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb. F. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Washington-USA, v. 42, n. 6, p. 543-547, 2006.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. A.; RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum, Epidendroideae** (part two). Oxford: Oxford University Press, v. 5, 2009.

PRIZÃO, E. C.; GONÇALVES, L. D. M.; GUTIERRE, M. A. M.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. D. F. P. D. Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and a orchid double-hybrid '*BLC Pastoral Innocence*'. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá-PR, v. 34, n. 2, p. 157-161, 2012.

RIBEIRO JUNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 301 p.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cell Dev Biol - Plant**, Washington-USA, v. 48, n. 1, p. 67-72, 2012.

RODRIGUES, D. T. **Nutrição e fertilização de orquídeas *in vitro* e em vasos**. 2015. 54p. Dissertação (Mestrado em solos e nutrição de plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2005.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa-MG, v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.

SCHUSTER, H.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; SOUZA-LEAL, T.; CALLEGARI-CORREIA, E.; PREZZI, L.; DOMINGUES, E.; CANASSA, F. Diversidade de Orchidaceae da fazenda Cantagalo, município de Mogi-Mirim, São Paulo. **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v. 8, n. 3, p. 242-245, 2010.

SILVA, J. A. T.; CARDOSO, J. C.; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S. *Dendrobium micropropagation*: a review. **Plant cell reports**, New York, v. 34, n. 5, p. 671-704, 2015a.

SILVA, J. A. T.; 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**, New York, v. 34, n. 10, p. 1685-1706, 2015b.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Paulínia-SP, v. 14, N. 4, p. 617-623, 2012.

SOLTIS DE, P. S. S.; ENDRESS, P. K.; CHASE, M. W. **Phylogeny and Evolution of Angiosperms**. Sinauer Associates, Inc., Sunderland., USA, 2005. 590 p.

SORGATO, J. C. **Protocolo de germinação em meios assimbióticos para *Dendrobium nobile* Lindl. e *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.** 2016. 54p. Tese (Doutorado em produção vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS, 2016.

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 macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, New York, v. 86, n. 2, p. 147-158, 2006.

SUZUKI, R. M. S.O.S. Orquídeas: a coleta indiscriminada já leva espécies à extinção. **Revista Terra da Gente**, São Paulo-SP, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2005.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). *Hoehnea*, São Paulo-SP, v. 37, n. 4, 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. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

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.) Garay. **Indian Journal of Biotechnology**, Nova Deeli, v.5, n. 1, p. 223-228, 2006.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 6, p. 618-631, 2008.

TORRES, F. C. L.; PEREIRA, Z. V.; SCIAMARELLI, A.; RECH, A. R.; ROLIM, T. P.; GOMES, M. E. S.; LOBTCHENKO, G. Orchidaceae da floresta paludícula no Parque Estadual das Várzea do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul. In: 58º Congresso Nacional de Botânica, 2007, São Paulo-SP. **Resumos...** São Paulo-SP: 58º Congresso Nacional de Botânica. São Paulo: Ibt-SP, 2007.

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**, Japan, v. 89, n. 12, p. 841-848, 2011.

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

VASUDEVAN, R.; VAN STADEN, J. *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. **Scientia Horticulturae**, Reino Unido, v. 123, n. 4, p. 496-504, 2010.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SILVA, E. F. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio Knudson com adição de vitaminas do meio MS, benzilaminopurina e carvão ativado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina-PR, v. 35, n. 2, p. 683-694, 2014.

VOGES, J. G.; BENEVENUTO, R. F.; FRITSCHÉ, Y.; GUERRA, M. P. Protocorm development of *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae) in response to different saline formulations and culture conditions. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá-PR, v. 36, n. 3, p. 287-292, 2014.

ZENG, S.; HUANG, W.; WU, K.; ZHANG, J.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DUAN, J. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. **Critical reviews in biotechnology**, p. 1-14, 2015.

ZOTZ, G.; ANDRADE, J. L. La ecología y la fisiología de las epifitas y las hemiepifitas. In: GUARIGUATA, M.; CATAN, G. (ed) **Ecología y conservación de bosques neotropicales**, San José, Editorial Libro Universitario Regional. 2002. p. 271-296.



### CAPÍTULO 3 – SUBSTRATOS NATURAIS PARA A ACLIMATIZAÇÃO DE *Schomburgkia crispa* Lindl. ORIUNDA DE SEMEADURA *in vitro*

#### RESUMO

Um dos fatores limitantes para o sucesso da produção *in vitro* de orquídeas é a fase de aclimatização, por conta da dificuldade de transferir as mudas para a condição *ex vitro*, devido à grande diferença entre as duas condições ambientais. Para minimizar o estresse, o emprego do substrato adequado é fundamental, já que este pode melhorar as condições de ajuste das plantas ao mecanismo autotrófico. Objetivou-se avaliar e comparar a eficiência e viabilidade dos substratos orgânicos paú de buriti, fibra de coco e esfagno para a aclimatização de plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. (Orchidaceae) oriundas de sementeira *in vitro*. As plantas cultivadas *in vitro* foram transplantadas para recipientes de polipropileno com volume de 50 cm<sup>3</sup>, provido de furos para drenagem, sendo utilizados como tratamento os seguintes substratos: 1- paú de buriti (BU); 2- fibra de coco (FC); 3- esfagno (ES); 4- a mistura (1:1 v v<sup>-1</sup>) de paú de buriti e esfagno (BE) ou 5 - a mistura (1:1 v v<sup>-1</sup>) de paú de buriti e fibra de coco (BC), permanecendo por seis meses em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50% (PAR = 235,1 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). No dia do transplântio (dia zero) e aos cinco, 15 e 30 dias após o transplântio, as plantas foram avaliadas por meio de duas técnicas não destrutivas de emissão de radiação: Termografia e Fluorescência da clorofila-*a* (Fchlo-*a*). Aos 17,5 dias foi registrado o período crítico na aclimatização, com mortalidade em todos os substratos. A maior porcentagem de sobrevivência foi observada no substrato FC (83,3%). Considerando as diferenças morfológicas e emissão de radiação em todos os tratamentos, não foi possível a distinção destes pela técnica de fluorescência por imagem, por outro lado, para todos os tratamentos foi evidente a intensificação da emissão de Fchlo-*a* entre Fo e Fm, com maior emissão no limbo e menor emissão na base e região da nervura central, sugerindo que não houve dano no aparato fotossintético. As imagens termográficas das folhas evidenciaram as diferenças térmicas entre as plantas de *S. crispa* e o substrato utilizado, sendo as temperaturas das folhas superiores às dos substratos. Assim recomenda-se a utilização de fibra de coco como substrato para a aclimatização de *S. crispa*.

**Palavras-chave-** Cerrado, Orchidaceae, substratos, cultivo *ex vitro*.

### CHAPTER 3 – NATURAL SUBSTRATES FOR THE ACCLIMATIZATION OF *Schomburgkia crispa* Lindl. FROM *in vitro* SOWING

#### ABSTRACT

One of the limiting factors for the *in vitro* production of orchids is present the acclimatization phase, due to the difficulty of transferring the seedlings to the *ex vitro* condition, because of the great difference between the two environmental conditions. To minimize the stress of this phase, the use of the appropriate substrate is fundamental, as this can improve the conditions of adjustment of the plants to the autotrophic mechanism. Thus, the objective was to evaluate and compare the efficiency and viability of organic residues of buriti, coconut fiber and sphagnum as substrates for the acclimatization of *Schomburgkia crispa* Lindl plants. (Orchidaceae) from *in vitro* sowing. The plants were removed from the culture flasks and planted in a 50 cm<sup>3</sup> volume polypropylene container, provided with drainage holes. The following substrates were used as treatment: 1- buriti palm (BU); 2- coconut fiber (FC); 3- sphagnum (ES); 4- the mixture (1:1 v v<sup>-1</sup>) of buriti palm and sphagnum (BE) or 5- the mixture (1: 1 v v<sup>-1</sup>) of buriti palm and coconut fiber six months in a nursery covered by the overlap of two 50% shading screens (PAR = 235,1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). On the day of transplanting (day zero) and at five, 15 and 30 days after transplanting, the plants were evaluated using two non-destructive radiation emission techniques: Thermography and Fluorescence of Chlorophyll-*a* (Fchlo-*a*). 17.5 days was recorded the critical period in acclimatization, with mortality in all substrates. The highest percentage of survival was observed on the FC substrate (83.3%). Considering the morphological differences and emission in all treatments, it was not possible to distinguish them by fluorescence by image; on the other hand, the increase of the emission of Fchlo-*a* between Fo and Fm, was evident for all treatments, with greater emission in the limbus and less emission in the base and region of the central vein, suggesting that there was no damage in the photosynthetic apparatus. The thermographic images showed the thermal differences between the plants and the substrate used, being the temperatures of the leaves high to those of the substrates. It is recommended to use coconut fiber as a substrate for the acclimatization of *S. crispa*.

**Keywords-** Cerrado, Orchidaceae, substrates, *ex vitro* cultivation.

## INTRODUÇÃO

Orchidaceae tem sido apontada como uma das famílias botânicas mais representativas do Cerrado brasileiro, apresentando 703 espécies distribuídas em 123 gêneros (BARROS et al., 2018). O cultivo e comércio de orquídeas no mundo e no Brasil, foi baseado no extrativismo predatório, sendo ainda representativo, principalmente para as nativas, uma vez que as são apreciadas tanto por colecionadores quanto por comerciantes, que coletam inclusive espécies que se encontram em áreas de preservação. Este fato, aliado ao crescente desenvolvimento urbano e ao avanço das fronteiras agrícolas, implicam no iminente perigo de extinção de diversas espécies (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013).

A espécie epífita *Schomburgkia crispa* Lindl. pode ser encontrada em áreas de florestas de galeria e em matas secas do cerrado (TORRES et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008).

Técnicas de cultivo *in vitro* de espécies nativas são ferramentas extremamente úteis, sendo possível produzir grandes quantidades de plantas durante todo ano sem a influência das variações climáticas (ROCHA, 2009; FARIA et al., 2012). Por outro lado, um dos maiores obstáculos para a aplicação prática dessa técnica consiste na dificuldade de transferir com sucesso mudas da condição *in vitro* para *ex vitro*, devido à grande diferença entre as duas condições ambientais (HAZARIKA, 2006; DEB & IMCHEN, 2010; CHANDRA et al., 2010) configurando condição de estresse.

As respostas expressas por plantas sob estresse são dependentes de seu patrimônio gênico, podendo ter alto ou baixo valor adaptativo (LARCHER, 2006; KERBAUY, 2012; TAIZ & ZEIGER, 2013), no último caso, pouco contribuem para o ajuste das plantas ao meio.

As plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar uma série de deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, baixa eficiência do sistema radicular, reduzida competência vascular, pequena ou não funcionalidade dos estômatos e má formação da cutícula, sendo estes fatores responsáveis pela reduzida sobrevivência das plantas quando expostas a ambiente *ex vitro* com elevada demanda evaporativa (HAZARIKA, 2006; CHANDRA et al., 2010). Estas plantas necessitam ser submetidas à um período denominado aclimatização, que é definido como o ajuste climático de um organismo, especialmente uma planta, que é transferido para um novo ambiente, sendo este processo realizado de forma artificial (BERILLI et al. 2011; FARIA, 2012). Esta etapa é

bastante crítica e delicada para a planta, devido aos fatores como estresse hídrico, fotossíntese, absorção de nutrientes e fitossanidade (DEB & IMCHEN, 2010). Nesta fase autotrófica, a planta expressa modificações estruturais como o aumento do número e da funcionalidade dos estômatos, e a formação de cutículas cerosas, respostas estas associadas à redução do estresse hídrico provocado pela desidratação (JUNGHANS & SOUZA, 2013).

O emprego do substrato adequado é fundamental para minimizar o estresse decorrente da fase de aclimatização, podendo melhorar as condições de ajuste das plantas ao mecanismo autotrófico, influenciando diretamente no sucesso dessa etapa (KÄMPF et al., 2006; FARIA et al., 2010).

No cultivo *ex vitro* de orquídeas é imprescindível a utilização de um bom substrato, sendo muito importante para a seleção deste material a avaliação de aspectos econômicos, físicos, químicos, biológicos e ecológicos. Considerando os componentes biológicos e ecológicos, um substrato ideal deve ser extraído de resíduos agrícolas ou de outro tipo de material, ou ainda ser cultivado, de modo a evitar o extrativismo. Desta forma, é preciso conhecer a natureza e a qualidade dos componentes da formulação de um substrato, a fim de que, suas características estejam adequadas às necessidades da espécie que se pretende produzir (SOUZA, 2000; FARIA et al., 2010).

Os substratos podem ser constituídos de um único material ou pela mistura de dois ou mais elementos (VALENCIA & JARDIM, 2014). Vários são os substratos utilizados no cultivo de orquídeas, podendo ser de origem vegetal, mineral ou até mesmo sintético (ASSIS et al., 2011; DRONK et al., 2012). Um dos substratos comercialmente mais empregados para a aclimatização e cultivo de Orchidaceae é a fibra de coco. Esse material é oriundo do processamento industrial das cascas do coco e se caracteriza por sua porosidade total, capacidade de aeração e retenção de água (FARIA et al., 2010).

O esfagno também é bastante usado na aclimatização e cultivo de orquídeas, por conta da alta capacidade de retenção de água e por possuir textura macia, não causando danos ao sistema radicular das plantas (MACEDO et al., 2011). Por ser um musgo, obtido de turfeiras (KÄMPF, 2006), deve-se certificar que o material seja proveniente de cultivo comercial e não de extrativismo.

A escolha de um substrato precisa envolver sua disponibilidade regional, a garantia de sua aquisição permanente, a conservação dos recursos naturais e seu custo (ALVES et al., 2012). Dentre os diferentes materiais com potencial para ser utilizados como substratos

está o paú de buriti, que é um produto originado do caule decomposto do buriti (*Mauritia flexuosa* L.) (SOUSA et al., 2010). Apresenta-se como uma alternativa, uma vez que é bem distribuído no estado de Mato Grosso do Sul, porém pouco estudado como substrato hortícola, sendo empregado em castanheira-do-gurgueia (*Dipteryx lacunifera* Ducke), helicônia (*Heliconia rostrata* Ruiz & Pav.) e maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg), entre outros (CALVACANTE et al., 2011; BECKMAM-CAVALCANTE et al., 2011; SILVA, 2012), não havendo relatos na literatura científica para cultivo de orquídeas. Esses subprodutos regionais são de grande interesse para a pesquisa, já que sua utilização pode promover a reutilização ou reciclagem dos nutrientes.

Nesse sentido, objetivou-se avaliar e comparar a eficiência e viabilidade dos substratos orgânicos paú de buriti, fibra de coco e esfagno para a aclimatização de plantas de *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae) oriundas de sementeira *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na área de Jardinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) (22°11'S, 54°56'O, altitude 446 m), de setembro a novembro de 2016. O clima é do tipo Am de Köppen (Tropical Monçônico), com temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C e no mais quente superior a 22°C (SOUZA, 2012) e precipitação total anual entre 1.250 e 1.500 mm.

Para o estudo, foram utilizadas plantas de *Schomburgkia crispa* obtidas a partir de germinação assimbiótica de sementes, oriundas de matrizes do Orquidário da Faculdade de Ciências Agrárias – FCA/UFGD, provenientes do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema (PEVRI – MS).

Foram utilizadas 0,1g de sementes da espécie, que foram desinfestadas com 15 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, por 5 minutos, e em seguida receberam tríplice lavagem com água destilada para a realização da sementeira *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi o de Murashige & Skoog (1962), na metade da sua concentração (MS ½), solidificado com a utilização de 4,0 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico e suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. As culturas foram semeadas em março de 2016 e acondicionadas em sala de crescimento com temperatura, luminosidade e fotoperíodo controlados (25°C ±2; 18,9 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 16 h), permanecendo nessas condições por seis meses, quando apresentaram cerca de 2,0 cm e formação de duas raízes.

Decorrido este período, as plantas foram removidas dos meios de cultivo, lavadas com água corrente para total remoção do excesso de meio de cultura e cada indivíduo foi plantado em recipiente de polipropileno com volume de 50 cm<sup>3</sup>, provido de furos para drenagem, sendo utilizados como tratamento os seguintes substratos: 1- paú de buriti (BU); 2- fibra de coco (FC); 3- esfagno (ES); 4- a mistura (1:1 v v<sup>-1</sup>) de paú de buriti e esfagno (BE) e 5 - a mistura (1:1 v v<sup>-1</sup>) de paú de buriti e fibra de coco (BC), permanecendo por seis meses em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, (PAR = 235,1 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), sob condições médias de temperatura de 22,6 ± 5 °C. O sistema de irrigação utilizado durante o período experimental foi constituído de difusores, posicionados um metro acima das plantas, acionados automaticamente por temporizador digital e válvula solenóide. Foram realizadas quatro irrigações diárias, que totalizaram uma lâmina de água de 2 mm dia<sup>-1</sup>.

Os substratos utilizados como tratamentos foram submetidos à fervura e esterilizados em autoclave. A caracterização física de cada substrato utilizado é mostrada na Tabela 1.

**TABELA 1.** Caracterização das propriedades físicas dos substratos utilizados na aclimatização de *Schomburgkia crista* Lindl.. Dourados, UEMS, 2018.

Substrato	Ma (%)	Mi (%)	P total (%)	CMRA (%)	De (Kg m <sup>3</sup> )
Fibra de coco	4,64	13,05	17,7	13,5	680
Esfagno	10,92	71,47	82,4	71,5	280
*Paú de Buriti	35	57	92	57	670

Ma = Macroporosidade, Mi = Microporosidade, P total = Porosidade total, CMRA = Capacidade máxima de retenção de água) e De = densidade do substrato.

\*Valores das propriedades físicas do substrato paú de buriti conforme Brito et al. (2017).

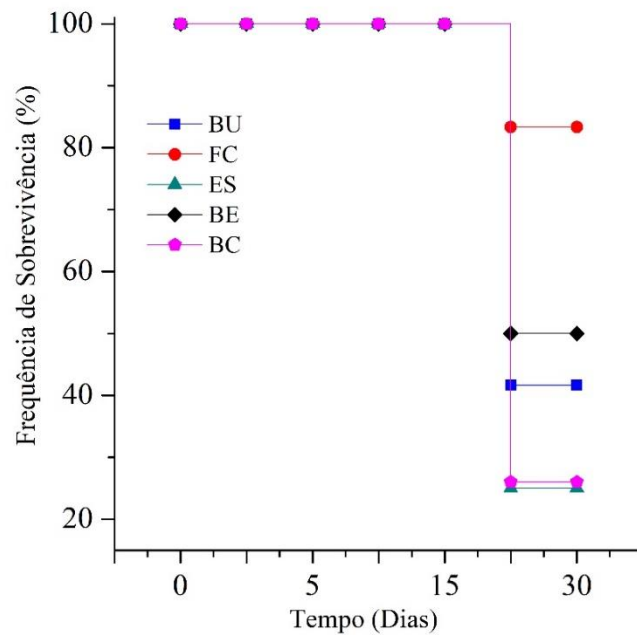
No dia do transplântio (dia zero) e aos cinco, 15 e 30 dias após o transplântio, o estresse causado pela transferência das plantas para o ambiente *ex vitro* (período de aclimatização - PDA) foi avaliado por meio de duas técnicas não destrutivas de emissão de radiação: Termografia, com auxílio de uma câmara termográfica Testo 875 2i e Fluorescência da clorofila-*a* (Fchlo-*a*), com auxílio de um sistema Open FluorCam FC 800-O, com o qual foram obtidas as variáveis instantâneas e a dinâmica de emissão de fluorescência. Além dessas técnicas, as plantas também foram avaliadas quanto à sobrevivência, e os dados referentes a esse parâmetro, foram analisados utilizando-se a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (1958).

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições de três plantas cada. Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância e, havendo diferença significativas, as medianas foram comparadas por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn até o nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas com o auxílio do programa com o auxílio do programa Bioestat (Programa de Análises Estatísticas para as Áreas Biológica e Médica v.5.3. Instituto Mamirauá, AM).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A sobrevivência das plantas de *Schomburkigia crispera* após 30 dias de aclimatização (30 - PDA) está representada na Figura 1. Até os 25 dias houve 100% de sobrevivência em todos os substratos. Aos 17,5 dias verificou-se o período crítico na aclimatização, com mortalidade em todos os tratamentos. O que pode ser atribuído à fase de alarme, pela qual as plantas passam no início da condição de estresse, ocorrendo a perda da estabilidade de estruturas e processos funcionais em células e tecidos, após a qual se pode observar a retomada da estabilidade por meio de processos de reparo, ou dependendo da susceptibilidade do organismo, a estabilidade não é restabelecida levando à morte do indivíduo (LARCHER, 2006).

A maior porcentagem de sobrevivência das plantas foi observada no substrato fibra de coco (FC), seguida do paú de buriti + esfagno (BE) e paú de Buriti (BU), com médias de 83,3%, 50% e 41,6%, respectivamente. Os substratos esfagno (ES) e paú de buriti + fibra de coco (BC), ambos com 25% de sobrevivência, foram aqueles que apresentaram a menor sobrevivência dos indivíduos (Figura 1).



**Figura 1.** Sobrevivência de plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. aos 30 dias de aclimatização, em diferentes tratamentos. BU = Paú de Buriti, FC = Fibra de coco, ES = Esfagno, BE = Paú de Buriti + Esfagno (1:1 v v<sup>-1</sup>) e BC = Paú de Buriti + Fibra de coco (1:1 v v<sup>-1</sup>). Dourados, UEMS, 2018.

Outros estudos envolvendo orquídeas epífitas relatam resultados parecidos com os encontrados neste trabalho. *Brassavola tuberculata* Rchb.f. após 210 dias de aclimatização, apresentou sobrevivência de 74 e 53% nos substratos esfagno e fibra de coco, respectivamente (SOUSA et al., 2015). *Cattleya intermedia* Lindl. aclimatizada com esfagno ou casca de pínus, pelo período de 90 dias, apresentou 53 e 27% de sobrevivência, respectivamente (DORNELES & TREVELIN, 2011). Silva et al. (2006) relatam a sobrevivência de 4% em plantas de *Cattleya tigrina* A. Rich. Ex Beer, quando aclimatadas em fibra de coco por 120 dias. Para plântulas de *Miltonia flavescens* Lindl. Stefanello et al. (2009) registraram sobrevivência entre 5 e 30% após 90 dias de aclimatização em substratos com fibra de coco, Plantmax<sup>®</sup>, casca de pínus, pó de coco (fibra de coco triturada) e mistura entre casca de pínus e pó de coco.

*Sophronitis cernua* Lindl. e *Brassavola flagellaris* Barb. Rodr. aclimatizadas em mistura de fibra de coco e esfagno apresentaram porcentagem de sobrevivência menor que 80% aos 30 dias e, aos 120 dias, a sobrevivência foi menor que 50% (ICHINOSE, 2012). Em contrapartida, plantas de *Cattleya intermedia* provenientes de cultivo *in vitro* e aclimatizadas em substratos com fibra de coco, casca de pinus, brita basáltica e casca de arroz carbonizada apresentaram altas porcentagens de sobrevivência, em todos os substratos



avaliados, variando de 80 a 100%, após cinco meses no ambiente *ex vitro* (SASAMORI et al., 2014).

As folhas das plantas, quando cultivadas *in vitro*, tornam-se modificadas para uma forma de crescimento heterotrófico, deste modo, não são fotossinteticamente competentes quando transferidas para um ambiente sem suprimento de carboidratos, com umidade mais moderada e maior incidência luminosa, que são fatores que caracterizam um ambiente *ex vitro*, resultando em baixa porcentagem de sobrevivência (PASQUAL, 2001). Plântulas cultivadas *in vitro* geralmente apresentam características morfofisiológicas diferentes quando comparadas àquelas que cresceram diretamente no campo ou em casa de vegetação. No ambiente *ex vitro* uma maior taxa de transpiração é exigida às plantas, pois frequentemente plantas cultivadas *in vitro* apresentam pouco desenvolvidas as estruturas que controlam a perda de água e, portanto, são muito mais sensíveis e suscetíveis aos diferentes fatores já citados anteriormente, daí a taxa de sobrevivência *ex vitro* ser relativamente baixa (ROCHA, 2007).

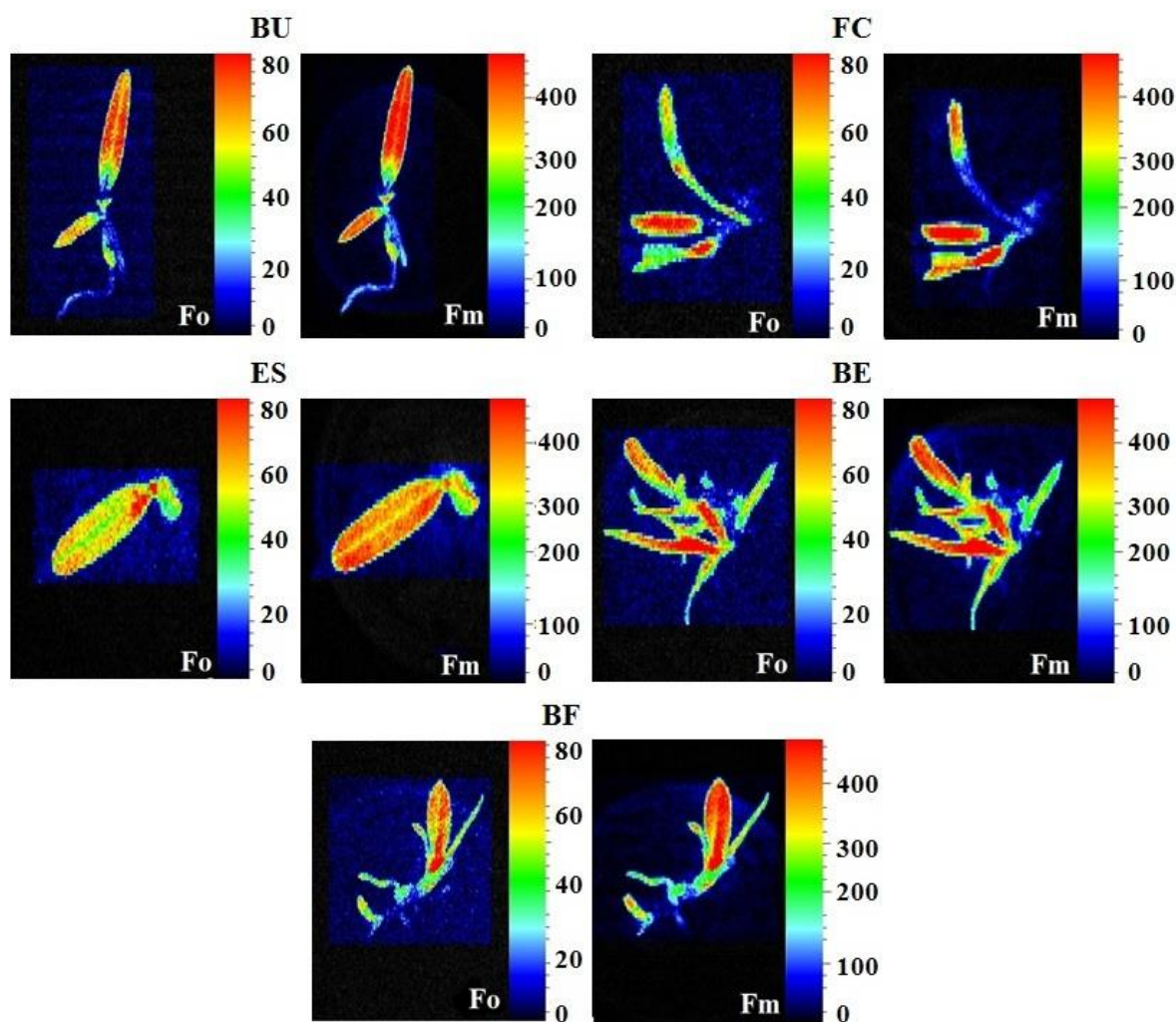
A distribuição da fluorescência da clorofila-*a* (Fchlo-*a*), regular ou não, ao longo do limbo foliar, evidencia as diferenças na intensidade de emissão de fluorescência a partir da indução por energia de excitação, apresentando áreas de maior e menor emissão (interpretadas, respectivamente, com cores quentes no ápice e frias na base da escala de calor). Como esperado, a emissão de Fchlo-*a* nas raízes em relação ao limbo foliar é baixa. Considerando as diferenças morfológicas e emissão em todos os tratamentos, não foi possível a distinção destes pela fluorescência por imagem, por outro lado, para todos os tratamentos foi evidente a intensificação da emissão de Fchlo-*a* entre Fo e Fm, com maior emissão no limbo e menor emissão na base e região da nervura central (Figura 2).

A Fchlo-*a* como forma de avaliar o status fisiológico das plantas aclimatadas, baseia-se no princípio de que diferentes estressores, em última análise, podem interferir no complexo fotossintético do FSII, no qual as clorofilas desempenham papel fundamental. Por meio da Fchlo-*a*, é possível avaliar precocemente o impacto de estresses ambientais, como o que as plantas sofreram ao serem transferidas da condição *in vitro* para a *ex vitro*, antes do aparecimento de sintomas visuais (FERREIRA, 2014).

A aclimatização por si constitui evento gerador de estresse para as plantas, o qual pode ser atenuado ou aumentado dependendo das características físico-químicas do substrato utilizado (SILVA et al., 2006; VILLA et al., 2007). Estudos relatam que temperaturas elevadas e baixa umidade relativa do ar podem interferir nos processos

fotossintéticos de algumas espécies da família Orchidaceae (ALI et al. 2005; POLLET et al., 2010). Assim, segundo Crain & Tremblay (2017), permite-se inferir que diversas orquídeas epífitas possam ser extremamente sensíveis às mudanças climáticas, tornando necessárias análises detalhadas para detectar mudanças fisiológicas nos estádios iniciais.

Alguns estressores são mais efetivos na promoção de danos ao FSII e mais facilmente detectáveis por meio da *Fchlo-a*, como por exemplo, a temperatura (PERBONI et al., 2015), bloqueadores químicos na transferência de elétrons (BAKER, 2008), ou mesmo a luz (SCHOCK et al., 2014). No caso da aclimatização, embora sejam alteradas as condições de radiação e temperatura, estas não foram extremas o suficiente para lesar de maneira expressiva os elementos do complexo FSII nas plantas de *S. crispa* aos 30 dias (30 - PDA).



**Figura 2.** Imagens de fluorescência inicial (Fo) e máxima (Fm) da clorofila - a de plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. aos 30 dias de aclimatização (30 - PDA), em diferentes tratamentos. BU = Paú de Buriti, FC =

Fibra de coco, ES = Esfagno, BE = Paú de Buriti + Esfagno (1:1 v v<sup>-1</sup>) e BC = Paú de Buriti + Fibra de coco (1:1 v v<sup>-1</sup>). Dourados, UEMS, 2018.

Respostas das plantas ao estresse também podem ser verificadas por meio das variáveis instantâneas de emissão de Fchlo-*a*. Para plantas de *S. crispera* aclimatizadas em diferentes substratos constatou-se diferenças em todas as variáveis de Fchlo-*a*, mas somente para o tempo de aclimatização e não entre os diferentes substratos utilizados (Tabela 1).

De modo geral, para Fo, Fm e Fv as maiores medianas foram observadas aos 0 e 5 dias de aclimatização (PDA). Para o substrato BU a menor mediana (0,5) foi observada aos 15 PDA, para FC a menor mediana de eficiência quântica (Fv/Fm) foi observada já aos 5 PDAA. Para ES, BE e BC as menores medianas de Fv/Fm foram observadas aos 5 e 15 PDA. Jeon et al. (2006) relatam diferenças nas características de crescimento e na relação clorofila a/b nas folhas de orquídeas do gênero *Doritaenopsis* durante quatro meses de aclimatização sob diferentes irradiâncias. Já para os parâmetros fotossintéticos, contrastando com esta pesquisa, os autores não observaram diferenças significativas das condições de luz para fluorescência da clorofila (Fv/Fm).

**Tabela 1.** Fluorescência inicial (Fo), máxima (Fm) da clorofila - *a* de plantas de *Schomburgkia crispera* Lindl. ao longo de 30 dias de aclimatização, em diferentes tratamentos. T1 = Paú de Buriti, T2 = Fibra de coco, T3 = Esfagno, T4 = Paú de Buriti + Esfagno (1:1 v v<sup>-1</sup>) e T5 = Paú de Buriti + Fibra de coco (1:1 v v<sup>-1</sup>). Medianas seguidas da mesma letra, em coluna, para cada substrato, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (p<0,05). Dourados, UEMS, 2018.

Substrato	Dias	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm
BU	0	14,3 a	73,95 a	57,0 a	0,8 a
BU	5	12,6 a	49,9 ab	37,5 ab	0,7 ab
BU	15	5,75 b	12,45 b	6,8 b	0,5 b
BU	30	7,2 b	34,8 b	27,65 b	0,75 ab
FC	0	16,4 a	84,85 a	66,45 a	0,8 a
FC	5	11,0 ab	34,15 b	23,15 b	0,65 b
FC	15	9,9 b	45,9 b	36,05 b	0,8 a
FC	30	6,8 b	29,9 b	22,9 b	0,8 a
ES	0	17,4 a	85,85 a	68,2 a	0,8 a
ES	5	14,9 a	56,6 ab	41,5 ab	0,7 ab
ES	15	9,85 b	18,2 b	10,8 b	0,6 b
ES	30	10,0 ab	47,5 b	37,4 b	0,8 a

BE	0	22,65 a	119,15 a	92,1 a	0,8 a
BE	5	15,55 ab	36,3 b	23,55 b	0,6 b
BE	15	9,15 c	37,2 b	28,0 b	0,75 ab
BE	30	9,95 bc	56,5 b	45,8 ab	0,8 a
BC	0	14,8 a	70,25 a	55,85 a	0,8 a
BC	5	11,85 ab	43,35 ab	27,5 ab	0,7 ab
BC	15	5,65 b	10,0 b	3,8 b	0,4 b
BC	30	9,15 b	48,75 ab	39,85 a	0,8 a

Aumentos na emissão inicial de Fo são normalmente associados a danos no FSII (TÓTH et al., 2007; MATHUR et al., 2011) que podem ou não ser reversíveis, este último caso ocorre quando os estressores alteram de forma efetiva a atividade dos componentes do centro de captação de luz (CCL) (YUSUF et al., 2010; NISHIYAMA et al., 2011). De maneira semelhante, reduções de Fm são verificadas como resposta ao estresse. Embora os substratos tenham apresentado diferenças para estas variáveis ao longo do tempo de aclimatização, em todos os substratos se observou reduções em Fo e retomada da eficiência quântica aos 30 PDA, sugerindo respostas de ajuste fisiológico ao longo dos 30 dias de aclimatização para as plantas de *S. crispata*.

Corroborando com os resultados encontrados nessa pesquisa, Ferreira (2014), estudando a aclimatização das orquídeas *Epidendrum secundum*, *Cattleya warneri* e do híbrido primário das espécies *Epidendrum pauciflora* x *Epidendrum osmantha*, observou que, para os dados de fluorescência da clorofila-*a*, após 11 meses de aclimatização *ex vitro*, o rendimento quântico máximo do FSII (Fv/Fm) em todas as espécies apresentou médias entre 0,75 a 0,85, o que indicou, segundo os autores, que o fotossistema II estava funcionando adequadamente.

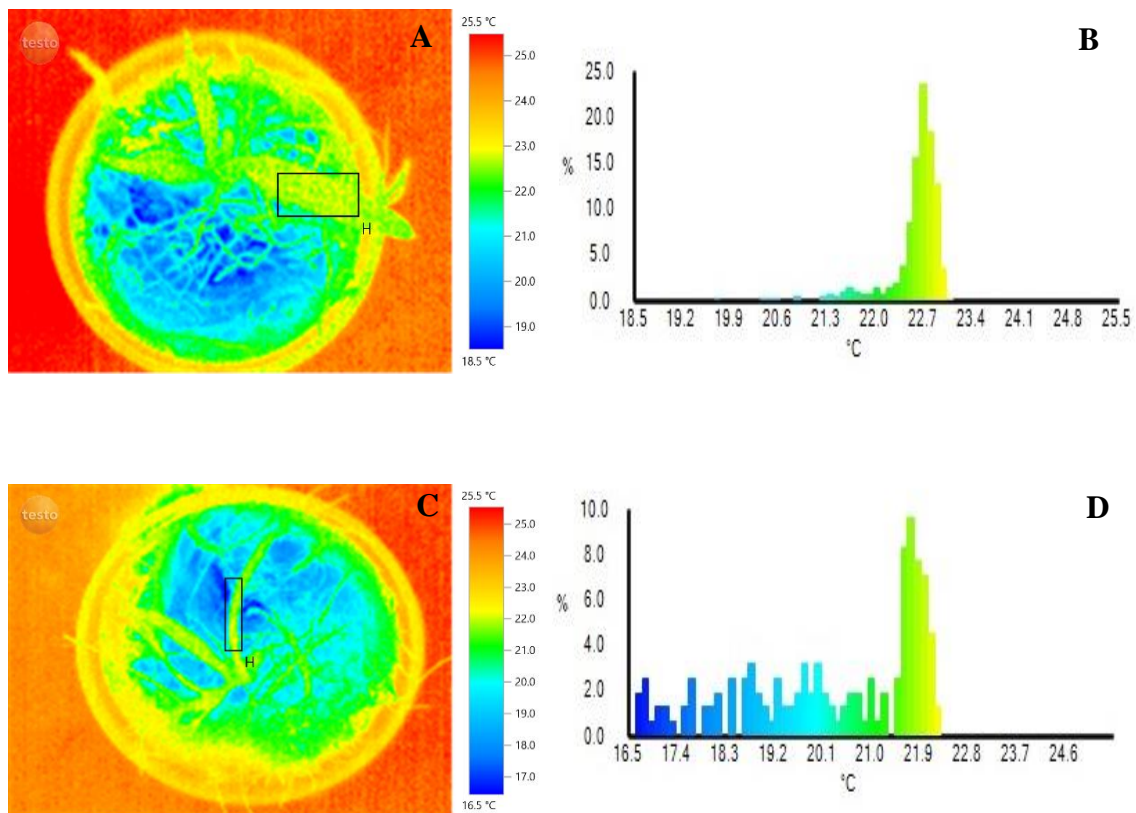
Não houve diferença nas respostas fotossintéticas na aclimatização de mudas produzidas *in vitro* de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior* Jack RM Smith) (Zingiberaceae) sob diferentes substratos e sombreamentos, sendo estas semelhantes às das plantas produzidas mediante cultivo tradicional (controle). Tanto as plantas aclimatizadas quanto as de controle mostraram uma eficiência fotoquímica média do fotossistema II (PSII) entre 0,69 e 0,72 durante o período de avaliação (RODRIGUES et al., 2015).

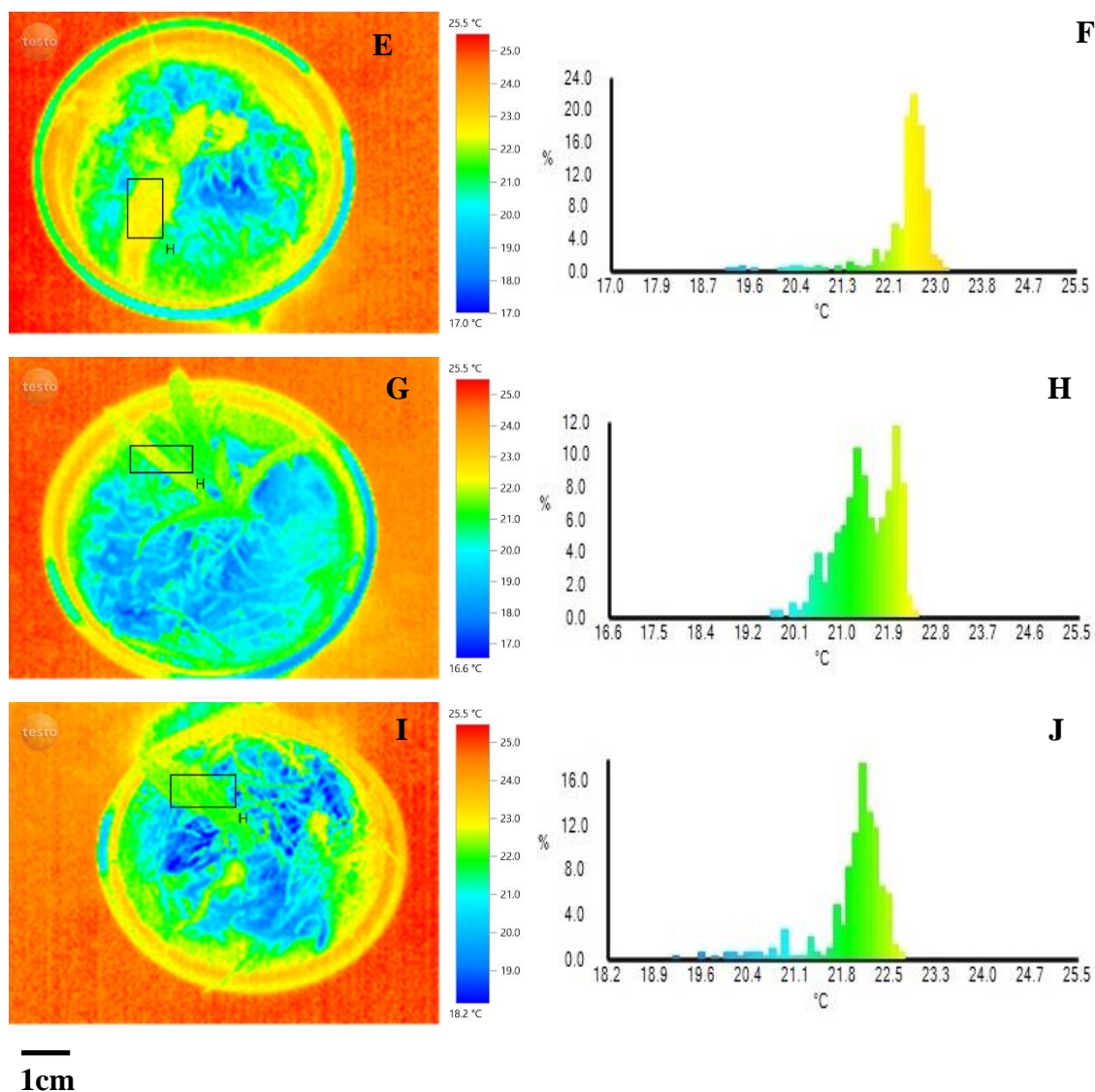
O ajuste fisiológico em resposta a condicionantes ambientais é caracterizado pela ação de mecanismos de reparo que atuam sobre os componentes do FSII revertendo a desestabilização funcional, como por exemplo, as variações no estado reduzido da quinona

a (Q<sub>A</sub>) sob inadequada irradiância (MELIS, 1999; MURATA et al., 2007; BRESTIC et al. 2013), controle sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e síntese de proteínas reguladoras (SAKAMOTO et al., 2003; NISHIYAMA et al., 2006) entre outros.

Assim como a emissão de Fchlo-*a* é tratada como ferramenta para a avaliação do estresse, a temperatura das plantas é reconhecida como um indicador de sua condição hídrica e, portanto, ferramenta potencial para a caracterização de plantas sob diferentes condições de cultivo. Assim, imagens termográficas também são úteis na avaliação de estresse ambiental (MAES & STEPPE, 2012; SARAIVA et al., 2014).

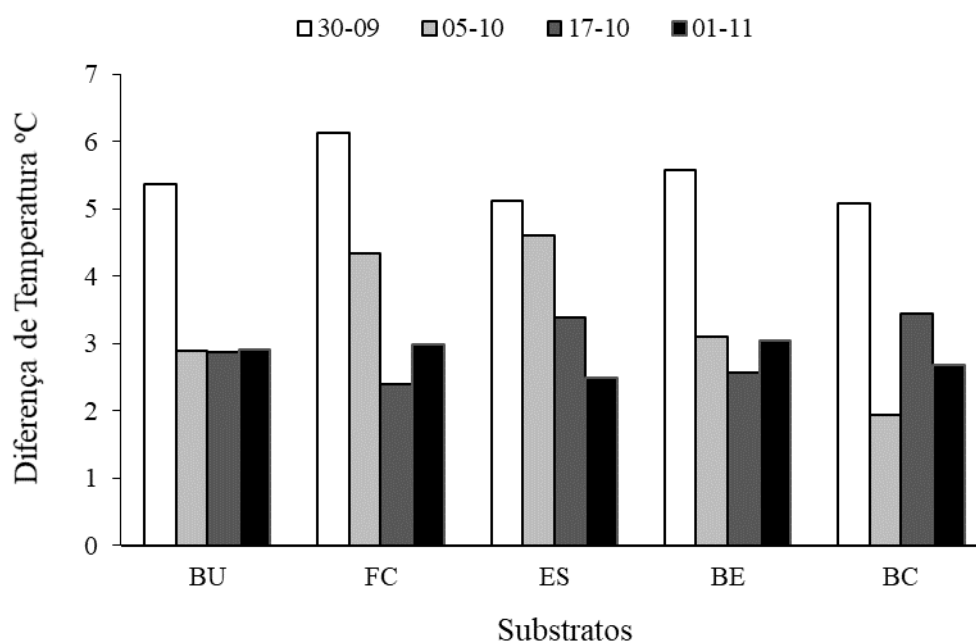
As imagens termográficas das folhas evidenciam as diferenças térmicas entre as plantas de *S. crisper* e o substrato utilizado. As temperaturas das folhas, obtidas por meio das médias entre pontos com diferentes temperaturas, distribuídos ao longo da superfície foliar, em cada período de avaliação, foram superiores às dos substratos (obtidas da mesma forma). As temperaturas máximas para as regiões em destaque do limbo foliar foram em média 22,7 °C, ao passo que para os substratos foi de 18,9 °C, em média (Figura 4 A-J).





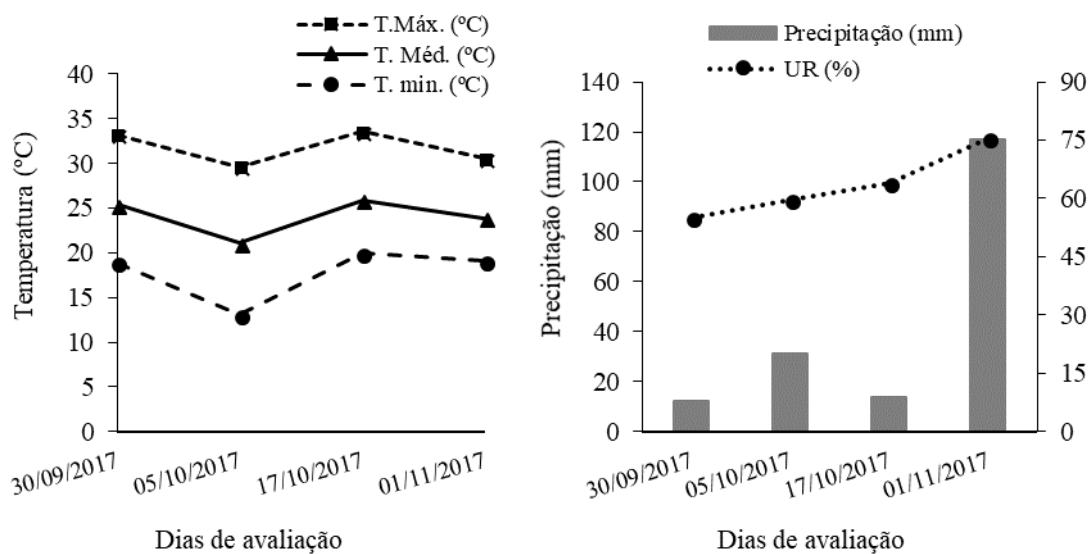
**Figura 4.** Imagens termográficas de plantas de *Schomburgkia crispata* Lindl. aos 30 dias de aclimatização, em diferentes substratos e respectivos histogramas de região representativa do limbo foliar, **A** e **B** = Paú de Buriti, **C** e **D** = Fibra de coco, **E** e **F** = Esfagno, **G** e **H** = Paú de Buriti + Esfagno (1:1 v v<sup>-1</sup>); **I** e **J** = Paú de Buriti + Fibra de coco (1:1 v v<sup>-1</sup>). Dourados, UEMS, 2018.

Observando os resultados de variação térmica entre substratos e folhas, nota-se que as maiores variações ocorreram no dia do transplantio das mudas (0 PDA), quando foram retiradas da condição *in vitro*. Ainda, nessa data, a maior média observada para essa variável foi no substrato fibra de coco (FC = 6,12 °C), seguida pelo Paú de Buriti + Esfagno (BE = 5,58 °C), Paú de Buriti (BU = 5,36 °C), Esfagno (ES = 5,18 °C) e Paú de Buriti + Fibra de coco (FC = 5,08 °C), respectivamente (Figura 5).



**Figura 5.** Diferença de temperatura entre o substrato e as plantas de *Schomburgkia crista* Lindl., durante 30 dias de aclimatização, em diferentes tratamentos. **BU** = Paú de Buriti, **FC** = Fibra de coco, **ES** = Esfagno, **BE** = Paú de Buriti + Esfagno (1:1 v v<sup>-1</sup>) e **BC** = Paú de Buriti + Fibra de coco (1:1 v v<sup>-1</sup>). Dourados, UEMS, 2018.

Ao se observar as médias de temperatura ao longo do período experimental, pode-se notar que não há relação entre a diferença de temperatura entre planta e o substrato com as temperaturas nas datas de avaliação (Figura 6).



**Figura 6.** Dados climáticos da EMBRAPA – CPAO para a cidade de Dourados – MS durante o período de aclimatização de *Schomburgkia crista* Lindl. Dourados, UEMS, 2018.

De maneira geral, a temperatura da planta está relacionada tanto com a temperatura do meio quanto ao seu estado hídrico, fatores estes que influenciam diretamente no grau de abertura estomática, taxas transpiratórias e fotossintética. Mesmo sob condições controladas, é possível observar diferenças entre a temperatura foliar das plantas em função dos substratos e do regime hídrico ao qual estão submetidas (SARAIVA et al., 2014).

O gênero *Cattleya* necessita de umidade relativa de 50 a 90% e temperaturas que variam de 20 a 35 °C para o sucesso da aclimatização e *Vanda* necessita de 40 a 45% de umidade relativa e temperatura de 15 a 28 °C (MEURER et al., 2008). A temperatura média observada durante o período experimental deste trabalho foi de cerca de 25 °C (Figura 6) e, considerando que esta é a temperatura ideal para a aclimatização de espécies da família Orchidaceae em geral (MULLER et al., 2007) pode-se inferir que a temperatura foi adequada para o cultivo *ex vitro* de *S. crispa*.

Se por um lado a temperatura média esteve dentro da faixa adequada ao cultivo de *S. crispa*, a grande variação térmica no início da transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* pode ser considerada um fator adicional para a desestabilização funcional nos primeiros 10 dias de aclimatização. A condição térmica influencia diretamente a atividade enzimática mediadora funcional do complexo fotossintético, bem como a síntese proteica (TAIZ & ZEIGER, 2013), eventos cruciais na transição da condição heterotrófica para autotrófica de orquídeas produzidas *in vitro*, que estão se ajustando ao substrato pobre em nutrientes e à instabilidade ambiental. A capacidade dos indivíduos em se ajustar na aclimatização ou até mesmo a adaptação de cada espécie pode estar diretamente relacionada com suas habilidades para suportar temperaturas extremas (NIU et al., 2014).

## CONCLUSÃO

As técnicas não invasivas para a avaliação do *status* fisiológico pouco contribuíram para avaliar a eficiência dos substratos e a maior sobrevivência das plantas de *S. crispa* foi observada no substrato fibra de coco.



## REFERÊNCIAS

- ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Bethesda-USA, v. 43, n. 3, p. 213–223, 2005.
- ALVES, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; ANDRADE, L. A.; GONÇASVES, G. S.; SILVA, J. M. Produção de mudas de Angico em diferentes tamanhos de recipientes e composição de substratos. **Revista Verde**, Mossoró-RN, v. 7, n. 2, p. 39-44, 2012.
- ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; YAMAMOTO, L. Y.; LONE, A. B.; SOUZA, G. R. B.; FARIA, R. T.; ROBERTO, S. R.; TAKAHASHI, L. S. A. 2011. Cultivo de orquídea em substratos à base de casca de café. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 3, p. 544-549, 2011.
- BARROS, F. DE; 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. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 03 Jan. 2018.
- BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; AMARAL, G. C.; SILVA, A. A.; CAVALCANTE, I. H. I.; LIMA, M. P. D. Alternative substrates for production of *Heliconia psittacorum* L. seedlings under shade and open field conditions. **African Journal of Biotechnology**, African, v. 10, n. 88, p. 15272-15277, 2011.
- BERILLI, S. S.; CARVALHO, A. D.; FREITAS, S. J.; FARIA, D. C.; MARINHO, C. Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimatação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 208-214, 2011.
- BRESTIC, M.; ZIVCAK, M. PSII Fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In: ROUT, G. R.; DAS, A. B. (eds.) *Molecular stress physiology of plants*. Springer, Dordrecht, 2013. p. 87–131.
- BRITO, L. P. S.; BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; AMARAL, G. C.; SILVA, A. A.; AVELINO, R. C. Reutilização de resíduos regionais como substratos na produção de mudas de cultivares de alface a partir de sementes com e sem peletização. **Revista de la Facultad De Agronomía (La Plata)**, La Plata, v. 116, n. 1, p. 51-61, 2017.
- CAVALCANTE, I. H. L.; ROCHA, L. F.; SILVA JUNIOR, G. B.; FALCÃO NETO, R.; SILVA, R. R. S. Seedling production of gurguéia nut (*Dypterix lacunifera* Ducke), seed germination and suitable substrates for seedlings. **International Journal of Plant Production**, Gorgan, v. 5, n. 4, p. 319-322, 2011.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, India, v. 32, n. 1, p. 1199-1205, 2010.

CITES - CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA. **Apêndice II**. 2017. Disponível em: <[http://checklist.cites.org/#/en/search/output\\_layout=alphabetical&level\\_of\\_listing=0&show\\_synonyms=1&show\\_author=1&show\\_english=1&show\\_spanish=1&show\\_french=1&scientific\\_name=&page=1&per\\_page=20](http://checklist.cites.org/#/en/search/output_layout=alphabetical&level_of_listing=0&show_synonyms=1&show_author=1&show_english=1&show_spanish=1&show_french=1&scientific_name=&page=1&per_page=20)>. Acesso em: 20 Dez. 2017.

CRAIN, B. J.; TREMBLAY, R. L. Hot and Bothered: Changes in Microclimate Alter Chlorophyll Fluorescence Measures and Increase Stress Levels in Tropical Epiphytic Orchids. **International Journal of Plant Sciences**, Tennessee, v. 178, n. 7, p. 503-511, 2017.

DEB, C. R.; IMCHEN, T. An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, Pakistan, v. 9, n. 1, p. 79-83, 2010.

DEMATTE, J. B.; DEMATTE, M. E. S. P. Estudos hídricos com substratos vegetais para o cultivo de orquídeas epífitas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 11, p. 803-808, 1996.

DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimação e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia, Série Botânica**, Rio Grande do Sul, v. 66, n. 1, p.167- 174, 2011.

DRONK, A. G.; SILVA, A. P. V.; CUQUEL, F. L.; FARIA, R. T. Desenvolvimento vegetativo de híbrido de orquídea em diferentes substratos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2109-2114, 2012.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M. A.; FIÚZA, J. R. P. C. **Cultivo de orquídeas**. Londrina: Mecenaz, 2010. 2008 p.

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

FERREIRA, L. S. **Cultivo *in vitro* de orquídeas em dois ambientes (sala de crescimento e casa de vegetação): Crescimento e capacidade fotossintética**. 2014. 81p. Dissertação de mestrado (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro). Campos dos Goytacazes. 2014.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T. DE; LEMOS, E. G. M.; Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 583-592, 2013.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Reino Unido, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

ICHINOSE, J. G. S. **Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Sophronitis cernua* Lindl. e *Brassavola flagellaris* Barb. Rodr. (Orchidaceae)**. 2012. 79p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2012.

JEON, M. W.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Photosynthetic pigments, morphology and leaf gas exchange during *ex vitro* acclimatization of micropropagated CAM *Doritaenopsis* plantlets under relative humidity and air temperature. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 1-2, p.183-194, 2006.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2013. 407 p.

KÄMPF, A. N.; TAKANE, R. J.; SIQUEIRA, P. D. **Floricultura**: técnicas de preparo de substratos. Brasília: LK, 2006. 132p.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, Estados Unidos, v. 1958, n. 53, p. 457-81, 1958.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. 3.ed. São Carlos: Rima. 2006. 531 p.

MACEDO, M. C.; ROSA, Y. B. C. J.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JÚNIOR, E. J.; VIEIRA, M. C.; TATARA, M. B. Substratos e intensidades de luz no cultivo de orquídea denfal. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista-BA, v. 29, n. 2, p.168- 173, 2011.

MAES, W. H.; STEPPE, K. Estimating evapotranspiration and drought stress with ground-based thermal remote sensing in agriculture: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 13, p. 4671–4712, 2012.

MATHUR, S.; MEHTA, P.; JAJOO, A.; BHARTI, S. Analysis of elevated temperature induced inhibition of Photosystem II using Chl a fluorescence induction kinetics. **Plant Biology**, Califórnia, v. 13, n. 1, p.1–6, 2011.

MELIS, A. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage? **Trends in Plant Science**, Londres, v. 4, n. 1, p.130–135, 1999.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 422-442.

MEURER, F. M.; BARBOSA, C.; ZONETTI, P. C.; MUNHOZ, R. E. F. Avaliação do uso de bagaço de cana-de-açúcar como substrato no cultivo de mudas de orquídeas. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 3, n. 2, p. 45-50, 2008.

MULLER, T. S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S. Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 252-254, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica Biophysica Acta**, Londres, v. 1767, n. 6, p. 414-421, 2007.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; MURATA, N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**, Estados Unidos, v. 1757, n. 7, p. 742-749, 2006.

NISHIYAMA, Y.; SULEYMAN, I. A.; MURATA, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Physiologia Plantarum**, Escandinava, v. 142, n. 1, p. 35-46, 2011.

NIU, S.; LUO, Y.; LI, D.; CAO, S.; XIA, J.; LI, J.; SMITH, D. M. Plant growth and mortality under climatic extremes: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 98, n. 1, p. 13-19, 2014.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras - MG: UFLA/FAEPE, 2001. 74p.

PERBONI, A. T.; MARTINAZZO, E. G.; SILVA, D. M.; BACARIN, M. A. Baixas temperaturas sobre a fluorescência da clorofila a em plantas de diferentes híbridos de canola. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v. 45, n. 2, p. 215-222, 2015.

POLLET, B.; STEPPE, K.; DAMBRE, P.; VAN LABEKE, M. C.; LEMEURE, R. Seasonal variation of photosynthesis and photosynthetic efficiency in *Phalaenopsis*. **Photosynthetica**, Czech Republic, v. 48, n. 4, p. 580-588, 2010.

ROCHA, E. L. J. **Aclimatização de mudas micropropagadas de helicônia sob diferentes lâminas de irrigação, tipos e volumes de substrato**. 2007. 71p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

ROCHA, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2009. p. 121-152.

RODRIGUES, M.; PAIVA, P. D. D. O.; FREITAS, R. T. D.; MANSUR, T. D. O. F.; PAIVA, R.; BARBOSA, J. P. R. A. D. Growth and photosynthetic responses during *ex vitro* acclimatization of *Etlingera elatior* (Jack) rm smith (torch ginger). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 4, p. 495-504, 2015.

SAKAMOTO, W. Leaf-variegated mutations and their responsible genes in *Arabidopsis thaliana*. **Genes and Genetic Systems**, Mishima, v. 78, n. 1, p.1-9, 2003.

SARAIVA, G. F. R.; ANDRADE, R. S.; SOUZA, G. M. Termografia por infravermelho como ferramenta de diagnóstico precoce de estresse hídrico severo em soja. **Agrarian Academy**, Goiânia-GO, v. 1, n. 2, p. 158-169, 2014.

SASAMORI, M. H.; ENDRES JÚNIOR, D.; DROSTE, A. Sobrevivência e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) micropropagadas e aclimatadas em substratos com fibra de coco. **Pesquisa Botânica**, São Leopoldo, v. 65, n. 1, p. 293-303, 2014.

SCHOCK, A. A., RAMM, A., MARTINAZZO, E. G., SILVA, D. M.; BACARIN, M. A. Crescimento e fotossíntese de plantas de pinhão-manso cultivadas em diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 3-9, 2014.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; HORBACH, A. M.; WALTER, J. M. Aclimação de Mudanças de *Cattleya tigrina* A. Rich. Ex Beer (Orchidaceae) em Sistema Hidropônico. **Caderno de Pesquisa. Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v. 18, n. 1, p. 129-139, 2006.

SILVA, R. R. S. **Substratos e boro para produção de mudas de maracujazeiro amarelo**. 2012. 52p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2012.

SOUSA, G. G.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SOARES, J. S. Aclimação de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília-DF, v. 33, n. 2, p. 208, 2015.

SOUSA, W. C.; BRITO, D. R. S.; AMARAL, F. H. C.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A. Caracterização Química de substratos compostos de Paú de Buriti para cultivo de mudas de espécies arbóreas. In: **VII ENSub**, p.14, 2010, Goiânia, Goiás.

SOUZA, F. R. **Influência da intensidade do tráfego e de sistemas de manejo nas propriedades físicas do solo e nas culturas de soja e girassol**. 2012. 78p. Tese de Doutorado (Faculdade de ciências agrárias – Produção vegetal) Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD. 2012.

SOUZA, F. X. de. **Materiais para formulações de substratos na produção de mudas e no cultivo de plantas envasadas**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 21 p.

STEFANELLO, S.; KARSTEN, J.; MÜLLER, T. S.; TOMCZAK, A. P.; BONETT, L. P.; SCHUELTER, A. R. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v. 33, n. 1, p. 53-59, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TORRES, F. C. L.; PEREIRA, Z. V.; SCIAMARELLI, A.; RECH, A. R.; ROLIM, T. P.; GOMES, M. E. S.; LOBTCHENKO, G. Orchidaceae da floresta paludícola no Parque Estadual das Várzea do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul. In: 58º Congresso Nacional de Botânica, 2007, São Paulo-SP. **Resumos...** São Paulo-SP: 58º Congresso Nacional de Botânica. São Paulo: Ibt-SP, 2007.

TÓTH, S.Z.; SCHANSKER, G.; GARAB, G.; STRASSER, R. J. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: the role of internal alternative electron

donors to photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alemanha, v. 1767, n. 4, p. 295–305, 2007.

VALENCIA, W. H.; JARDIM, M. A. G. Aproveitamento de substratos orgânicos no cultivo de orquídeas nativas da APA Ilha do Combu, Belém, Pará, Brasil. **Ingenierías & Amazonia**, Manaus, v. 7, n. 1, p. 23-30, 2014.

VILLA, F.; PEREIRA, A. R.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G. Influência de substratos alternativos na aclimatização de orquídeas. **Revista Ceres**, Viçosa-MG, v. 54, n. 316, p.501-505, 2007.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE, S.N. B. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic Brassica juncea plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alemanha, v. 1797, n. 1, p. 1428-1438, 2010.

## **CAPÍTULO 4 – REINTRODUÇÃO EM FRAGMENTO DE CERRADO DE *Schomburgkia crispa* Lindl. ORIUNDA DE SEMEADURA ASSIMBIÓTICA**

### **RESUMO**

A germinação assimbiótica de orquídeas nativas é uma técnica importante para a produção de mudas a ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies aos habitats originais, já que possibilita a manutenção da variabilidade genética. Objetivou-se com esse trabalho avaliar as respostas de ajuste dessa espécie em área de restauração ambiental, comparando a eficiência de substratos tradicionais e alternativos como forma de contribuir para seu manejo e reintrodução. Após a aclimatização, plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl., provenientes de sementeira assimbiótica, foram reintroduzidas na área do Bosque da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. Para avaliar o ajuste das plantas à nova condição, foram utilizados três substratos: SS – sem substrato; BU – paú de buriti e FC – fibra de coco. No dia da reintrodução e aos sete, 14 e 21 dias após a reintrodução, o estresse foi avaliado por meio da fluorescência da clorofila-*a* e da termografia no infravermelho. O ambiente de reintrodução foi avaliado quanto às condições de luz e cobertura de copa. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos, constituídos de um substrato, com dez repetições de uma planta cada. Aos 21 dias após a reintrodução, independente do substrato, as plantas apresentaram porcentagem de sobrevivência de 100%. As maiores variações entre a temperatura dos forófitos e a temperatura das plantas transferidas ocorreram no dia da reintrodução das mudas. Os dados de copa e radiação no ambiente sugerem grande heterogeneidade de condições, com formação de micro-habitats. Não houve diferença significativa para eficiência quântica potencial do FSII ( $F_v / F_m$ ). Embora os diferentes substratos não tenham afetado de maneira significativa a sobrevivência das plantas, a temperatura e a eficiência fotoquímica do FSII, por meio das variáveis analisadas foi possível avaliar as respostas de ajuste em virtude da transição da fase de aclimatização de plantas para a condição de ambiente natural.

**Palavras – chave-** Orchidaceae, cultivo *in vitro*, restauração ambiental, enriquecimento vegetal.

## CHAPTER 4 –REINTRODUCTION OF ASYMBIOTIC SOWING *Schomburgkia crispa* Lindl. IN BRAZILIAN SAVANNAH FRAGMENT

### ABSTRACT

The native orchids asymbiotic germination is an important technique for the production of seedlings, which can be used in programs to reintroduce species to the original habitats, because it allows the maintenance of genetic variability. The objective of this work was to evaluate the adjustment responses of this species in the environmental restoration area, comparing the efficiency of traditional and alternative substrates as a way to contribute to its management and reintroduction. After acclimatization, plants of *Schomburgkia crispa* Lindl., from asymbiotic germination, were reintroduced in the Forest area of the State University of Mato Grosso do Sul (UEMS). To evaluate the adjustment of the plants to the new condition, three substrates were used: SS - without substrate; BU - buriti and FC - coconut fiber. On the day of reintroduction and at 7, 14 and 21 days after reintroduction, the stress was evaluated by chlorophyll *a* fluorescence and infrared thermography. The reintroduction environment was evaluated for light conditions and crown coverage. A completely randomized design was used with three treatments, consisting of one substrate, with ten replicates of one plant each. At 21 days after the reintroduction, regardless of the substrate, the plants showed 100% survival percentage. The high variations between the phorophytes temperature and the transferred plants temperature occurred on the day of the reintroduction of the seedlings. The crown and radiation data in the environment suggested a high conditions heterogeneity, with formation of micro-habitats. There was no significant difference for potential quantum efficiency of FSII (Fv/Fm). Although the different substrates didn't affect significantly the plant survival, temperature and photochemical efficiency of PSII, through the analyzed variables it was possible to evaluate the adjustment responses due to the transition of the acclimatization phase of plants, produced by asymbiotic sowing, to the natural environment conditions.

**Key words-** Orchidaceae, *in vitro* cultivation, environmental restoration, vegetal enrichment.



## INTRODUÇÃO

As plantas epífitas que completam o ciclo de vida sem contato com o solo são conhecidas como epífitas verdadeiras ou holoepífitas. Esses indivíduos crescem e se desenvolvem sobre hospedeiros vegetais, geralmente arbóreos, denominados forófitos, sem, contudo, parasitá-los (FONT-QUER, 1953; DUARTE & GANDOLFI, 2017). Dentro de um ecossistema, as epífitas têm papel ecológico fundamental, já que podem fornecer micro-habitats e microclimas distintos, abrigando grande diversidade de seres vivos e oferecendo recursos como flores, frutos e néctar (CESTARI, 2009).

Dentre as famílias de plantas com esse hábito, destaca-se a Orchidaceae, que possui distribuição cosmopolita, sendo mais diversa nos trópicos (JOPPA et al., 2010) e uma das mais representativas da composição florística do Cerrado, sendo composta, neste bioma, por 70 espécies distribuídas em 126 gêneros. No Mato Grosso do Sul são encontradas 88 espécies distribuídas em 40 gêneros (BARROS et al., 2018).

Duncan et al., no ano de 2005, já ressaltavam que, a menos que fossem tomadas medidas que subsidiassem ações de restauração, as orquídeas, mais do que qualquer outra família de plantas, apresentariam espécies nativas implicadas em eventos de extinção. A inserção de espécies epífitas, principalmente orquídeas, em projetos de restauração ecológica não é comum. Plantios de restauração baseiam-se, de início somente em espécies arbóreas, uma vez que seu objetivo é a reconstrução da fitofisionomia (BELLOTTO et al., 2009). Contudo, as áreas em restauração não vêm recebendo epífitas ao longo dos anos por meio da dispersão natural de propágulos. Mesmo as florestas com cerca de 50 anos ainda apresentam apenas metade da riqueza das espécies não-arbóreas dos ecossistemas naturais (GARCIA et al., 2011).

Em alguns ambientes naturais, epífitas sozinhas podem representar cerca de um terço do total de espécies vegetais e, ainda, mais da metade do número de indivíduos. Os autores Nadkarni et al. (2004) relatam em suas observações que as florestas secundárias apresentam apenas pequenas frações da biomassa de espécies epífitas contidas nas primárias.

A fragmentação da paisagem pode implicar no isolamento de populações naturais, dificultando a movimentação de propágulos a longas distâncias e, conseqüentemente, a colonização de epífitas em novas áreas. Diante da importância de formas de vida vegetais não arbóreas em ambientes florestais, sobretudo em paisagens muito fragmentadas, o

enriquecimento de áreas em restauração com epífitas vem se mostrando relevante, pois assim estas podem adquirir a heterogeneidade e os processos ecológicos próximos aos de uma floresta nativa (GARCIA et al., 2011).

A germinação assimbiótica de espécies nativas da família Orchidaceae é um importante instrumento para a produção de mudas que podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies aos habitats originais, pois esta técnica possibilita a formação de banco de germoplasma com manutenção da variabilidade genética, o que pode contribuir para a restauração das populações naturais (SCHNEIDERS et al., 2012). Esta ferramenta implica, além da produção destinada à reintrodução de espécies para a conservação de orquídeas em seu hábitat natural, também a possibilidade de comercialização das plantas propagadas, produzindo avanços na horticultura ornamental (ULISSES & SOARES, 2013), indiretamente contribuindo para a redução do extrativismo.

O investimento em técnicas de reintrodução de plantas juntamente com a proteção do habitat *in situ* e a conservação *ex situ* (SWARTS & DIXON, 2009; REED et al., 2011) são ferramentas valiosas para a preservação das espécies vegetais (GUERRANT, 2013). Esforços da Estratégia Global para Conservação de Plantas 2011-2020, para combate à extinção de espécies vegetais, incluem um objetivo para garantir que 75% dos vegetais ameaçados estejam em coleções *ex situ* (indivíduos vivos, bancos de sementes, cultura de tecidos) e, que destas, 20% estejam disponíveis para programas de recuperação e restauração (EGCP, 2011).

Diferente das espécies nativas arbóreas, cuja literatura apresenta vasto material de referência com técnicas e metodologias consagradas, poucos são os trabalhos sobre reintrodução de orquídeas e, de maneira geral, estes tratam de espécies terrícolas ou pesquisam a associação simbiótica com fungos micorrízicos (YANG et al., 2017; HERRERA et al., 2017). Estudos sobre a reintrodução de orquídeas epífitas oriundas de sementeira assimbiótica em ambiente natural ainda são escassos (RUBLUO et al., 1993; DECRUSE et al., 2003; DORNELES & TREVELIN, 2011; ENDRES JUNIOR et al., 2015), e nenhum deles utilizou a espécie *Schomburgkia crispa*, uma orquídea nativa do Cerrado brasileiro e encontrada no estado de Mato Grosso do Sul (MENDONÇA et al., 2008; OSTETTO, 2015; BARROS et al., 2018). No entanto, tais estudos não avaliaram a reintrodução em diferentes substratos a partir do monitoramento da temperatura e da fluorescência da cloforila-*a* dos indivíduos reintroduzidos.

A reintrodução a partir de material produzido *in vitro*, de maneira assimbiótica, pode ser ainda mais desafiadora, uma vez que influencia o estabelecimento dos indivíduos, pois por conta de todas as particularidades morfológicas e fisiológicas que possuem, devem ser aclimatizados antes da reintrodução e ainda podem carecer da formação de associações simbióticas após a reintrodução (BRUSTULIN & SCHMITT, 2008). Mesmo assim, a aclimatização prévia em viveiro pode não ser suficiente para eliminar os efeitos do estresse enfrentado pelas plantas no ambiente natural, requerendo destas novas respostas de ajuste. O ajuste compreende a capacidade da planta de se adequar às novas condições ambientais, expressando mudanças de cunho fisiológico e/ou morfológico em resposta ao estresse (LARCHER, 2006).

Assim, foram avaliadas as respostas de ajuste de *S. crisper* reintroduzida em área em restauração ambiental no Bioma Cerrado, comparando a eficiência de substratos tradicionais e alternativos como forma de contribuir para seu manejo e reintrodução no ambiente natural.

## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Schomburgkia crisper* Lindl. foram reintroduzidas, em dezembro de 2016, na área do Bosque da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), em Dourados - MS (Figura 1). Essa área foi utilizada em projeto de restauração no ano 2012, na qual foram introduzidas 32 espécies de plantas arbóreas pioneiras e não pioneiras, típicas da Floresta Estacional Semidecidual e encontra-se a cinco anos em processo de restauração.

O clima da região é do tipo Am de Köppen (Tropical Monçônico), com temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C e no mais quente superior a 22°C (SOUZA, 2012) e precipitação total anual entre 1.250 e 1.500 mm.

Para o estudo, foram utilizadas plantas de *Schomburgkia crisper* obtidas a partir de germinação assimbiótica, de sementes oriundas de matrizes do Orquidário da Faculdade de Ciências Agrárias – FCA/UFGD, provenientes do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema (PEVRI – MS) e aclimatizadas durante seis meses em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, (Radiação fotossinteticamente ativa - PAR = 235,1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Para reintrodução, foram escolhidos, aleatoriamente, 30 indivíduos de *S. crisper*, com cerca de 4 cm de altura. Em seguida, foram fixados em 15 forófitos, de diferentes espécies, com malha sintética de náilon, na altura de 1,5 m, todos na face leste do caule, de forma que a incidência de luz sobre as plantas não fosse direta nos períodos mais quentes do dia.



**Figura 1.** Área de reintrodução de *Schomburgkia crisper* Lindl. na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. Dourados, UEMS, 2018. Carta imagem: Soares Filho, A.

Para avaliar a sobrevivência e o ajuste das plantas à nova condição, foram utilizados três tratamentos, compostos por diferentes substratos: tratamento 1 – sem substrato; tratamento 2 – substrato paú de buriti e tratamento 3 – substrato fibra de coco, cujas propriedades físicas estão caracterizadas na Tabela 1. Cada forófito recebeu até três indivíduos, de tratamentos distintos, sendo marcado por placa de identificação, em tira de alumínio, para posterior monitoramento dos indivíduos.

No dia da reintrodução (dia zero) e aos sete, 14 e 21 dias após a reintrodução, foram avaliadas a sobrevivência e as respostas ao estresse por meio de técnicas não destrutivas de emissão de radiação: Termografia, com auxílio de uma câmara termográfica Testo 875 2i e Fluorescência da clorofila-*a*, com auxílio de um sistema FluorPen FP 100-Max, em folhas adaptas ao escuro por 30 minutos, com o qual foram obtidas as variáveis instantâneas e a dinâmica de emissão de fluorescência (teste JIP).

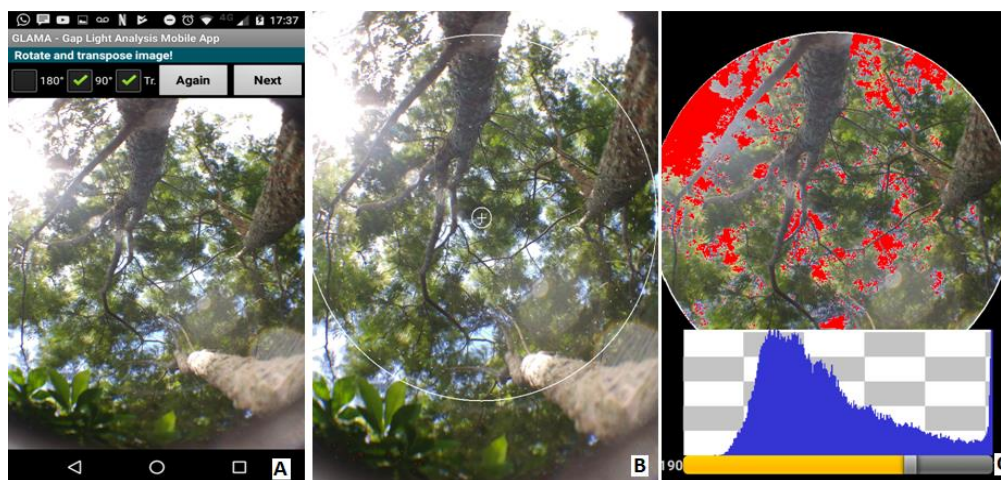
**TABELA 1.** Caracterização das propriedades físicas dos substratos utilizados na aclimatização de *Schomburgkia crispa*. Dourados, UEMS, 2018.

Substrato	Ma (%)	Mi (%)	P total (%)	CMRA (%)	De (Kg m <sup>3</sup> )
Fibra de coco	4,64	13,05	17,7	13,5	680
Esfagno	10,92	71,47	82,4	71,5	280
Paú de Buriti	35	57	92	57	670

Ma = Macroporosidade, Mi = Microporosidade, P total = Porosidade total, CMRA = Capacidade máxima de retenção de água; eDe = densidade do substrato.

\*Valores das propriedades físicas do substrato paú de buriti conforme Brito et al. (2017).

O ambiente de reintrodução foi avaliado quanto às condições de luz e cobertura de copa. Para tanto, foram tomados, aos 21 dias, à altura de cada planta de *S. crispa*, os dados de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), radiação ultravioleta na banda B (UVB) e radiação total (RAD) com o auxílio de um radiômetro Delta Ohm HD 2302.0 Light Meter. Os dados de cobertura de copa (CC), abertura de copa (AC) e índice de cobertura (CaCo) foram obtidos por meio de imagens hemisféricas tomadas por câmera em *smartphone* adaptado com lente “olho-de-peixe” 180°, sendo as imagens processadas com o auxílio do software GLAMA (TICHÝ, 2016) (Figura 2).



**Figura 2.** Sequência de etapas para o cálculo de índice de cobertura do dossel em fragmento florestal no qual plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. foram reintroduzidas. **A** = Imagem capturada por lente “olho-de-peixe” 180°; **B** = Campo de análise centralizado; **C** = Máscara simulada da abertura no dossel e histograma com nível de corte. Dourados, UEMS, 2018.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, arranjado em esquema fatorial 3x4 com três substratos, quatro tempos e dez repetições de uma planta cada. As variáveis de fluorescência foram avaliadas mediante análise de variância e posteriormente as médias foram comparadas por meio do teste Tukey até o nível de 5% de

probabilidade. Os dados de radiação e cobertura de copa foram submetidos à correlação de Pearson, seguido do teste t, até os níveis de 1 e 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 21 dias após a reintrodução de *Schomburgkia crispa*, independente do substrato utilizado, as plantas apresentaram porcentagem de sobrevivência de 100%, mesmo considerando o fato dos indivíduos terem sido produzidos por meio da semeadura assimbiótica. A sobrevivência de orquídeas dessa espécie, ainda que sob condições sub ótimas, pode estar relacionada ao seu metabolismo crassuláceo (CAM), que oferece eficiente custo/benefício em relação ao consumo de água e absorção de CO<sub>2</sub> (SILVERA et al., 2010).

A sobrevivência é baseada no vigor aparente das plantas, e fornece pouca informação sobre o real estado fisiológico dos organismos implantados. Mesmo em estágio juvenil, evidências da retomada da atividade metabólica das plantas puderam ser observadas pelo surgimento de novas folhas e raízes (Figura 3).

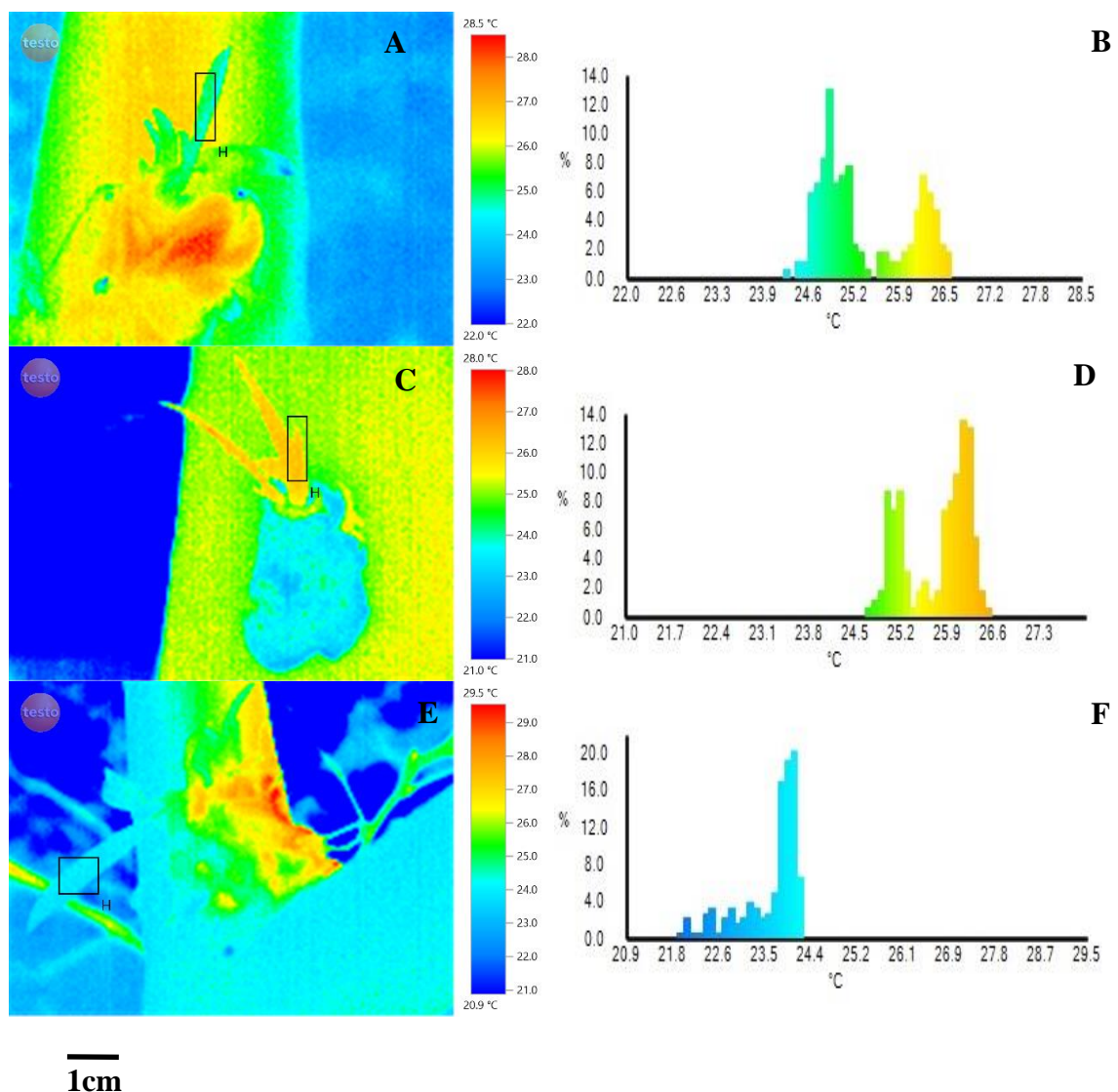


1cm

**FIGURA 3.** Plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. 21 dias após a reintrodução em ambiente natural, em diferentes condições de substratos. **A** - sem substrato (SS); **B** - Paú de Buriti (BU); e **C** - Fibra de coco (FC). Dourados, UEMS, 2018. Foto: Soares, J. S.

Alguns autores, no entanto, relatam que a reintrodução em ambiente de ocorrência natural não assegura a sobrevivência de algumas espécies de Orchidaceae, sendo necessário o estabelecimento da associação simbiótica prévia à reintrodução, como observado para *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl., que apresentou 80 e 10% de sobrevivência após propagação simbiótica a assimbiótica, respectivamente (AGGARWAL et al., 2012). Deste modo, pode-se inferir que *S. crispa* produzida *in vitro* e aclimatizada, apresentou elevada sobrevivência decorridos 21 dias após a reintrodução, mesmo sem propagação simbiótica.

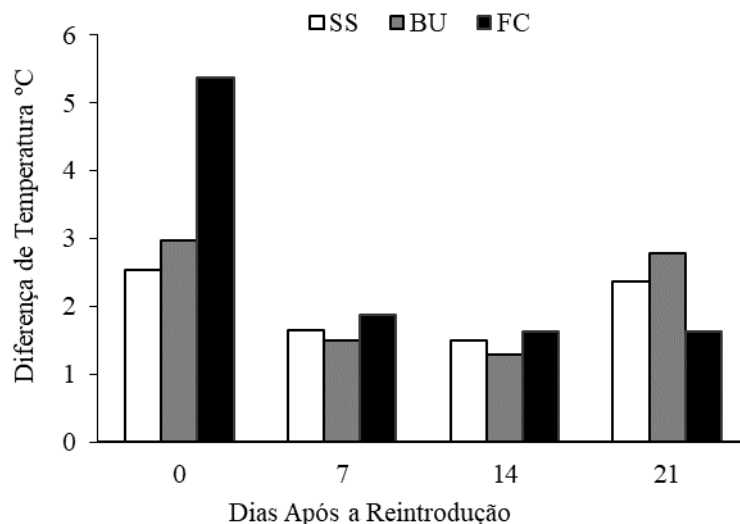
Imagens termográficas de indivíduos de *S. crispa*, em cada substrato, podem ser observadas na Figura 4. A temperatura das plantas de *S. crispa*, de modo geral, foi diferente da temperatura dos forófitos, independentemente do substrato utilizado. Variações térmicas entre as superfícies no sub-bosque estão associadas à heterogeneidade deste ambiente. A elevação da temperatura superficial, por exemplo, pode ser condicionada pelo tempo de incidência dos raios solares que atravessam a cobertura da vegetação, esta, por sua vez, pode variar em densidade de acordo com o comportamento decíduo das espécies e a sazonalidade (LARCHER, 2006).



**Figura 4.** Imagens termográficas de plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. aos 21 dias após a reintrodução em ambiente natural, em diferentes condições de substratos. **A e B** = sem substrato (SS); **C e D** = Paú de Buriti (BU); e **E e F** = Fibras de coco (FC). Dourados, UEMS, 2018.

A coloração da superfície, bem como seu conteúdo hídrico, também interferem na forma com que absorvem a energia luminosa e dissipam parte desta na forma de radiação infravermelha (PONZONI et al., 2015) de modo tal que superfícies mais escuras e com menor conteúdo de água tendem a absorver energia numa maior amplitude do espectro de radiação (KIRSCHBAUM et al., 2011), dissipando menor parte desta na vaporização da água, podendo apresentar assim, temperaturas mais elevadas. Deste modo, quanto mais escura for a tonalidade da casca do forófito e menor seu teor de água, dependendo da luz incidente, maior será sua temperatura, influenciando, conseqüentemente, a diferença térmica entre a temperatura foliar ( $T_f$ ) e o forófito.

As maiores variações ( $D_T$ ) entre a temperatura dos forófitos e a temperatura das plantas ocorreram no dia da reintrodução das mudas, quando foram retiradas do ambiente de cultivo protegido e levadas para o ambiente natural. Ainda, nessa data, a maior média para a variável foi observada no substrato fibra de coco (FB = 5,37 °C), seguida pelo Paú de Buriti (BU = 2,97 °C) e pelo tratamento sem substrato (SS = 2,53 °C), respectivamente. Aos 7 e 14 dias após a reintrodução, a  $D_T$  diminuiu, aumentando aos 21 dias após a reintrodução (Figura 5).



**Figura 5.** Diferença de temperatura entre o forófito e as plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl., durante 21 dias após a reintrodução das plantas em ambiente natural, em diferentes substratos. SS = sem substrato, BU = Paú de Buriti e FC = Fibra de coco. Dourados, UEMS, 2018.

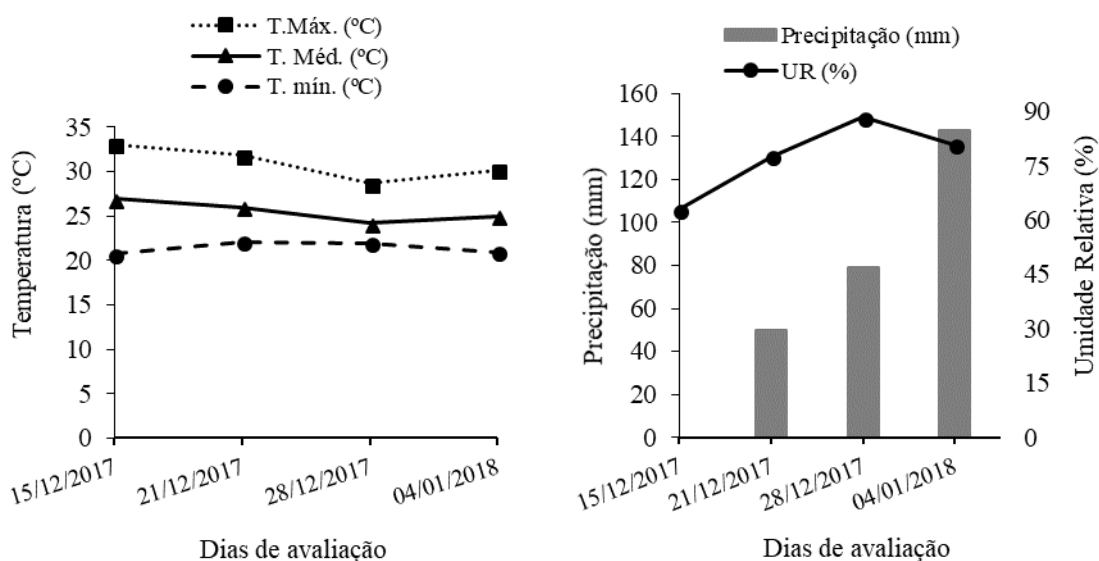
Considerando a temperatura ideal de cultivo para espécies de Orchidaceae como 25 °C (MULLER et al., 2007), observada em média durante todo o período experimental, a



escolha do forófito para a reintrodução de *S. crisper* poderia também considerar fatores inerentes à casca, como cor, textura, conteúdo de água, temperatura, entre outros.

Características inerentes às superfícies (cor e o conteúdo de água por exemplo), assim como fatores ambientais (temperatura, umidade relativa e precipitação) podem interferir nas temperaturas superficiais amostradas. Durante o experimento não foram observadas grandes variações térmicas no ambiente, já a UR e precipitação variaram ao longo do período experimental (Figura 6). Foi observada menor correlação entre as médias de  $D_T$  e a temperatura média do ambiente (Pearson = 0,74 e  $R^2 = 0,56$ ) e maior correlação negativa (Pearson = -0,90 e  $R^2 = 0,81$ ) com a Umidade Relativa.

As maiores variações térmicas, evidenciadas no início da reintrodução das plantas de *S. crisper*, refletem mais um fator que deve ser considerado como potencial gerador de estresse, quando da alteração do ambiente de aclimatização para o ambiente natural, sendo este detectável pela técnica termográfica.



**Figura 6.** Dados climáticos da EMBRAPA – CPAO para Dourados – MS durante o período experimental da reintrodução de plantas de *Schomburgkia crisper* Lindl. Dourados, UEMS, 2018.

A termografia tem sido aplicada como ferramenta para avaliação das interações entre a planta e o ambiente sendo as variações da temperatura das plantas associadas aos diferentes fatores geradores de estresse ambiental (COSTA et al, 2013). A temperatura foliar ( $T_f$ ) é reconhecida como um indicador da condição hídrica da planta e, portanto, como ferramenta potencial para a caracterização do status funcional sob as mais diversas condições de cultivo. A  $T_f$  está diretamente relacionada ao comportamento estomático, de

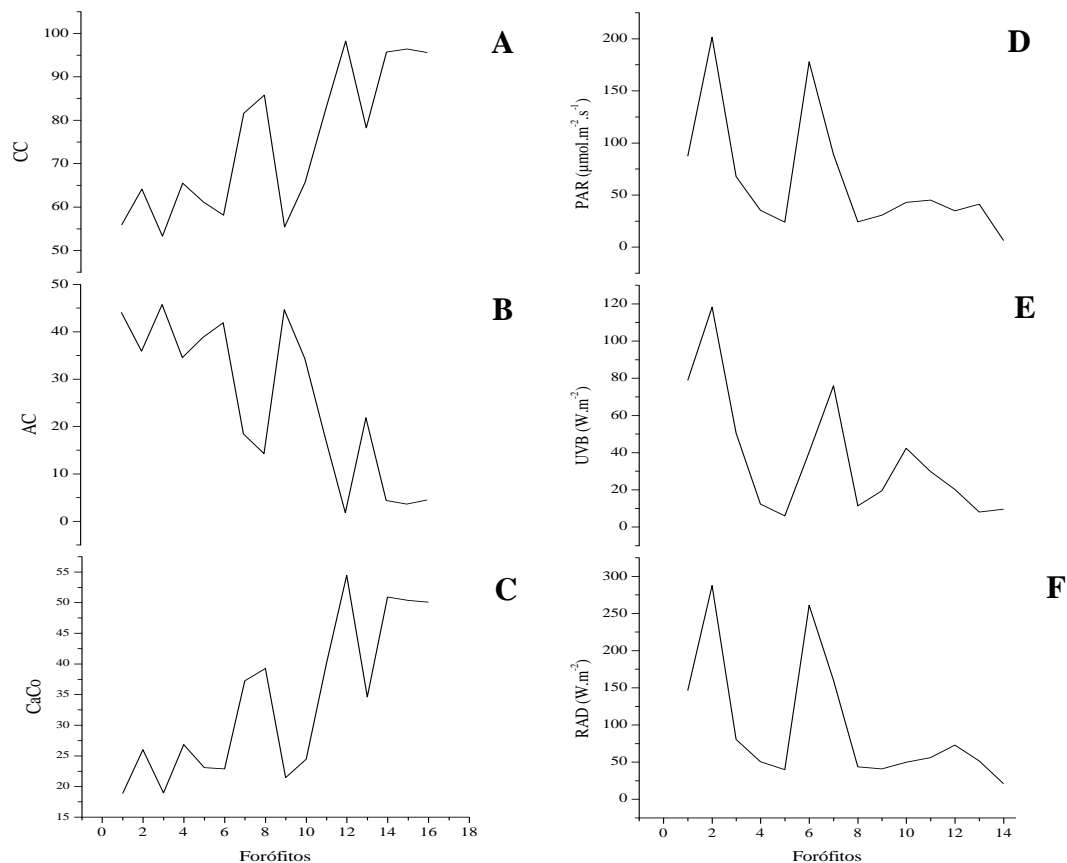
modo que o fechamento dos estômatos em decorrência do estresse, implica na elevação da  $T_f$  mensurada facilmente por câmeras termográficas no infravermelho (CHAVES et al., 2010; COSTA et al., 2013).

Assim, a termografia pode ser uma boa alternativa para a avaliação do estresse em orquídeas, uma vez que a porometria ou outras metodologias, que impliquem em avaliação do fluxo de gases através das folhas é limitada, dada às características morfoanatômicas comuns às espécies de metabolismo crassuláceo.

Além da temperatura do ambiente, o controle estomático (e conseqüentemente a  $T_f$  e a  $D_T$ ) também é influenciado pelas condições de luz. Para plantas adaptadas às condições de sub-bosque, a cobertura da copa propiciada pelos forófitos é determinante das condições de radiação disponível ao longo do dia. Novas ferramentas para a avaliação das condições do sub-bosque implicam na utilização de fotos hemisféricas obtidas por câmeras de *smartphones* com sistema *Android* adaptadas com lentes “olho-de-peixe” (TICHÝ, 2016).

No fragmento florestal, onde as plantas de *S. crispa* foram reintroduzidas, a proporção de abertura da copa (AC), cobertura da copa (CC) e índice de cobertura (CaCo) variaram em mais de 50% no ambiente imediatamente abaixo de cada forófito (Figura 7 A-C). As condições de radiação descreveram comportamento semelhante, com forófitos compondo microambientes com altas radiações (PAR superior a  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; UVB superior a  $70 \text{Wm}^{-2}$  e RAD superiores a  $250 \text{Wm}^{-2}$ ) e outros com condições de baixa irradiância (Figura 7 D-F).

Comparando as curvas obtidas com os dados de copa e radiação nota-se a falta de correspondência entre estes parâmetros em cada forófito, o que foi confirmado por meio do coeficiente de Pearson (Tabela 2), só foram observadas correlações, isoladamente entre as variáveis de copa ou entre as variáveis de radiação, sendo a maior correlação negativa apontada entre CC e AC (-0,99) e maior correlação positiva entre CaCo e CC (0,98). A dispersão dos pontos sugere maior padrão de linearidade para os dados de copa e ausência deste quando confrontadas as variáveis de copa e radiação (Figura 8).

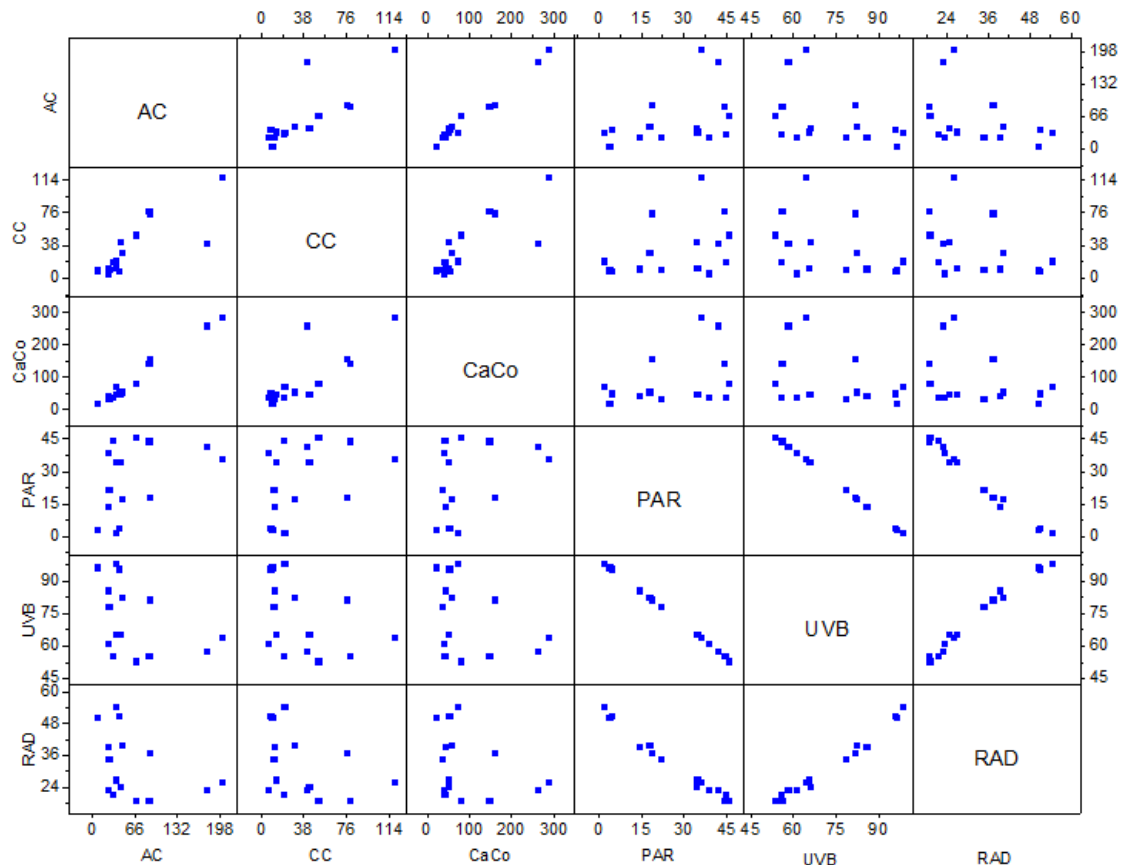


**Figura 7.** Condições ambientais do sub-bosque em fragmento florestal no qual plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. foram reintroduzidas. **A** = Cobertura da copa (CC); **B** = Abertura da copa (AC); **C** = Índice de cobertura da copa (CaCo); **D** = Radiação fotossinteticamente ativa (PAR); **E** = Ultravioleta B (UVB) e **F** = Radiação Total Visível (RAD); Dourados, UEMS, 2018.

**TABELA 2.** Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre as condições de radiação e cobertura do dossel em sub-bosque, no qual foram reintroduzidas as plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. Dourados, UEMS, 2018.

	PAR	UVB	RAD	AC	CC	CaCo
PAR	1					
UVB	0.7951*	1				
RAD	0.9862**	0.806*	1			
AC	0.4127 <sup>ns</sup>	0.3859 <sup>ns</sup>	0.3534 <sup>ns</sup>	1		
CC	-0.4109 <sup>ns</sup>	-0.3859 <sup>ns</sup>	-0.3508 <sup>ns</sup>	-0.9999**	1	
CaCo	-0.3858 <sup>ns</sup>	-0.3943 <sup>ns</sup>	-0.3291 <sup>ns</sup>	-0.9903**	0.9899**	1

\*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo, pelo teste t de Student. (PAR = Radiação fotossinteticamente ativa; UVB = Ultravioleta B; RAD = Radiação Total Visível; AC= Abertura da copa; CC= Cobertura da copa e CaCo = Índice de cobertura da copa)



**Figura 8.** Matriz de dispersão (Pearson = r) para as variáveis de copa e radiação em sub-bosque na área de reintrodução de *Schomburgkia crisper* Lindl. (PAR = Radiação fotossinteticamente ativa; UVB = Ultravioleta B; RAD = Radiação Total Visível; AC= Abertura da copa; CC= Coertura da copa e CaCo = Índice de cobertura da copa) Dourados, UEMS, 2018.

A maior correlação entre CC e AC é explicada pela relação inversa entre estas variáveis, uma vez que AC considera o branco (céu aberto) entre os demais *pixels* da imagem hemisférica digital enquanto CC considera a proporção no campo de análise centralizado (Figura 7B) que é obscurecido pelo dossel. A maior correlação positiva entre CaCo e CC implica na relação direta entre as variáveis, uma vez que CaCo é também um índice de estimativa de cobertura do dossel, no entanto, mais adequado para avaliar variações na densidade da copa, por exemplo, em estudos ecológicos de monitoramento com fotos tiradas em intervalos de seis meses (Tichý, 2016).

Os dados de copa e radiação no ambiente de reintrodução de *S. crisper* sugerem grande heterogeneidade de condições, com formação de micro-habitats, mesmo com a condição geral de ambiente bem iluminado (médias de PAR  $62,09 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; UVB  $35,55 \text{ Wm}^{-2}$  e RAD  $92,9 \text{ Wm}^{-2}$ ) considerando os valores de referência para a condição de luz plena (PAR  $1.264 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; UVB  $638 \text{ Wm}^{-2}$  e RAD  $1.825,3 \text{ Wm}^{-2}$ ), o estágio de desenvolvimento dos forófitos no fragmento propicia cobertura característica de floresta

em estádios iniciais de sucessão, uma vez que ambientes de sub-bosque em floresta semidecidual já estabelecida, possuem PAR entre 5 e 10  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Quanto às variáveis que caracterizam a emissão de fluorescência da clorofila-*a* (FChlo-*a*), não houve diferença significativa para Eficiência quântica potencial do FS II ( $F_v / F_m$ ), no entanto observou-se diferença estatística para Fluorescência inicial ( $F_0$ ), Fluorescência variável ( $F_v$ ), Intensidade da fluorescência no passo-J (2  $\mu\text{s}$ ) ( $F_j$ ) e Fluorescência máxima ( $F_m$ ), com maiores valores para o substrato Fibra de coco (FC), sem diferença para o substrato Fibra de Buriti (FB) e menores valores para as plantas sem substrato (SS) (Tabela 3).

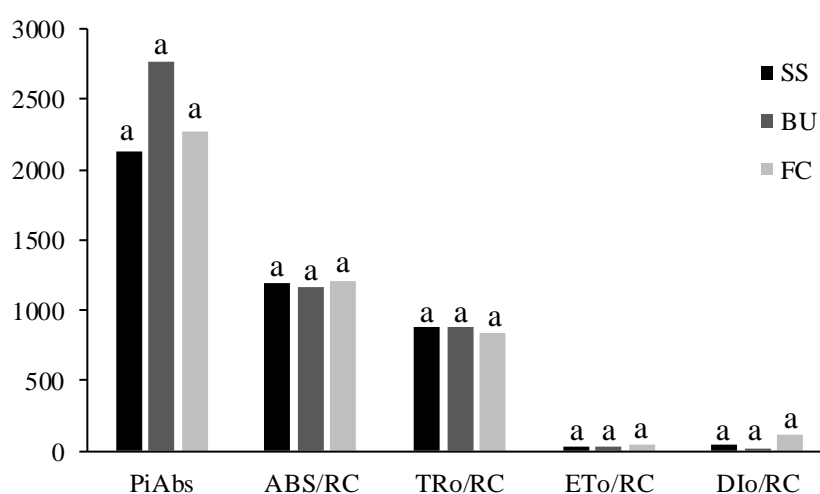
Aumentos na  $F_0$  acompanhados de redução em  $F_m$  estão normalmente associadas a respostas ao estresse (MATHUR et al., 2011), no entanto, para as plantas de *S. crisper* o tratamento FC, que apresentou maior  $F_0$  também apresentou a maior média de  $F_m$ , sendo assim compensadas as relações entre as variáveis ao longo da dinâmica de emissão ( $F_j$ ,  $F_i$ ) descaracterizando a possibilidade de danos ao PSII. A razão  $F_v/F_m$  indica as condições do aparato fotossintético das folhas para o rendimento quântico fotoquímico das etapas primárias da fotoquímica da fotossíntese. Valores de  $F_v/F_m$  entre 0,75 e 0,85 demonstram eficiente conversão da energia luminosa no complexo do FSII (BOLHÀR-NORDENKAMPF et al., 1989).

**Tabela 3.** Fluorescência inicial ( $F_0$ ), Intensidade da fluorescência no passo-J (2  $\mu\text{s}$ ) ( $F_j$ ), Intensidade da fluorescência no passo I (30 ms) ( $F_i$ ), Fluorescência máxima ( $F_m$ ), Fluorescência variável ( $F_v$ ), Fluorescência variável relativa no passo J (2  $\mu\text{s}$ ) ( $V_j$ ), Fluorescência variável relativa no passo I (30 ms) ( $V_i$ ), Eficiência máxima do processo fotoquímico no FSII ( $F_v/F_0$ ) e Eficiência quântica potencial do FSII ( $F_v/F_m$ ) de plantas de *Schomburgkia crisper* Lindl. reintroduzidas em três diferentes condições de substratos: SS = Sem substrato, PB = Paú de Buriti e FC = Fibra de coco. Dourados, UEMS, 2018.

	$F_0$	$F_j$	$F_i$	$F_m$	$F_v$
BU	276,60 ab	5648,03 ab	1003,25 ab	1171,28 ab	11585,05 a
FC	307,27 a	6770,50 a	12649,80 a	1465,78 a	8946,78 ab
SS	244,97 b	5227,96 b	9008,92 b	1041,88 b	7969,17 b
Cv (%)	16,05	18,91	18,86	18,37	20,26
	$V_j$	$V_i$	$F_v/F_0$	$F_v/F_m$	
BU	0,32 a	0,80 a	38,97 a	0,76 a	
FC	0,32 a	0,82 a	30,01 a	0,78 a	
SS	0,34 a	0,81 a	32,75 a	0,74 a	
Cv (%)	12,72	4,98	75,08	4,87	

Médias acompanhadas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Embora tenha sido constatada diferenças na maioria das variáveis instantâneas de FChlo-*a*, durante o período experimental, os diferentes substratos não afetaram as variáveis temporais  $V_j$  e  $V_i$  ou a eficiência quântica. Da mesma forma, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para os parâmetros de desempenho e índice de fluxos fenomenológicos analisados (Figura 9), sugerindo a capacidade das plantas reintroduzidas em absorver, aprisionar, transferir adequadamente elétrons dos centros de reação para os demais aceptores do FSII, utilizando a energia PAR disponível no sub-bosque, para a conversão de energia química.

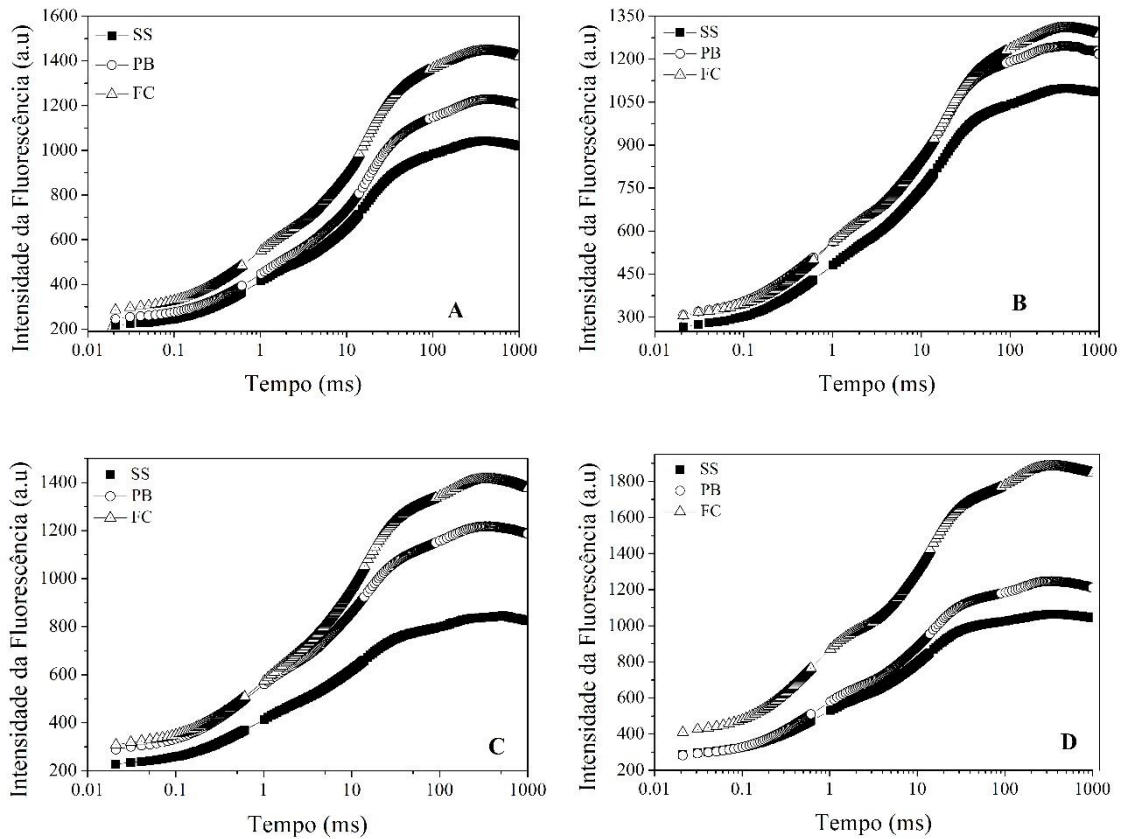


**Figura 9.** Índice de desempenho fotossintético (PIAbs), Fluxo específico de absorção por centro de reação (ABS/RC), fluxo específico de captura por centro de reação (TRo/RC), fluxo específico de transporte de elétrons por centro de reação (ETo/ RC) de plantas de *Schomburgkia crisper* Lindl. reintroduzidas em três diferentes condições de substratos: SS = Sem substrato, PB = Paú de Buriti e FC = Fibra de coco. Dourados, UEMS, 2018.

Sob baixa intensidade de radiação luminosa (menos de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de radiação), mais de 80% da energia quântica absorvida pode ser utilizada pela fotossíntese (BJÖRKMAN e DEMMIG-ADAMS, 1987); quando a intensidade de luz se aproxima de  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (cerca de 50% da luz solar disponível), menos de 25% da energia quântica absorvida é utilizada; e, sob condições de pleno sol, essa taxa diminui para 10% (LONG et al., 1994).

Ainda que as principais variáveis instantâneas ou por fluxo fenomenológico não tenham caracterizado o estresse ambiental, ou mesmo diferenças significativas entre os substratos utilizados na reintrodução de *S. crisper*, por meio da avaliação da dinâmica de FChlo-*a* (Figura 10 A-D), foi possível observar variações na sigmoicidade das curvas entre

os tratamentos, com maior uniformidade entre as médias obtidas aos sete dias de reintrodução (Figura 10B) e aumentos na intensidade de emissão para FC no decorrer do tempo experimental (Figura 10 C-D).



**Figura 10.** Cinética de emissão de fluorescência da clorofila- *a* em plantas de *Schomburgkia crispa* Lindl. reintroduzidas em três diferentes condições de substratos: SS = Sem substrato, PB = Paú de Buriti e FC = Fibra de coco. **A:** dia da reintrodução; **B:** sete dias após a reintrodução; **C:** quatorze dias após a reintrodução e **D:** vinte e um dias após a reintrodução. Dourados, UEMS, 2018.

Endres Júnior et al. (2015) estudando a reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham em borda e interior de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual, relataram que uma maior porcentagem de plantas reintroduzidas na borda, onde a incidência solar era maior em relação ao interior do fragmento, desenvolveram raízes sobre o tronco dos forófitos. No presente trabalho, a incidência luminosa nas condições de sub-bosque era alta e as plantas de *S. crispa* também demonstraram um bom desenvolvimento, com formação de novas raízes e folhas. De maneira geral, esse fato demonstra a capacidade das orquídeas de desenvolver características importantes para sua sobrevivência no ambiente natural quando reintroduzidas sob maior luminosidade.

Duarte & Gandolfi (2013), ressaltam que, no Brasil, a Ecologia de Restauração é uma ciência nova e ainda há carência de trabalhos para orientar introduções, reintroduções e transplantes de epífitas para florestas em processos de restauração. Os autores ainda salientam que apenas a partir dos anos 2000 a avaliação e o monitoramento de florestas em processo de restauração passaram a ser vistos como fundamentais para garantir o sucesso efetivo dos projetos de restauração já implantados. Assim, tornou-se evidente a necessidade do enriquecimento desses ambientes, já que muitos se encontram isolados de fragmentos.

Cardoso et al. (2016) em seu estudo sobre o impacto do desmatamento sobre as orquídeas do estado de São Paulo, relatam que a melhoria da legislação ambiental brasileira é necessária para definir o sucesso da conservação da biodiversidade. Além disso, é preciso definir o número de espécies de orquídeas que estão vulneráveis ou em perigo de extinção, sua riqueza e diversidade e a maneira como essas espécies podem ser reintroduzidas e restauradas em áreas reflorestadas.

Quanto à hipótese de que as epífitas podem ter preferência por determinados forófitos, conforme a espécie, no presente estudo, as plantas de *S. crispera* se estabeleceram satisfatoriamente independente da espécie de forófito para onde foram transferidas. Duarte & Gandolfi (2013) sugerem que, eventualmente, as características das epífitas a serem transplantadas podem ser mais importantes do que aquelas das árvores hospedeiras, devido, em partes, pela heterogeneidade dos ambientes. Assim, torna-se necessária a escolha de espécies de orquídeas com características que permitam favorável desenvolvimento frente às limitações do ambiente epifítico, sejam elas térmicas, hídricas ou luminosas.

## **CONCLUSÃO**

Com base nos resultados observados neste trabalho, pode-se concluir que o tipo de substrato pouco influenciou na sobrevivência das plantas de *S. crispera* no primeiro mês de reintrodução.



## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; NIRMALA, C.; BERI, S., RASTOGI, S.; ADHOLEYA, A. *In vitro* symbiotic seed germination and molecular characterization of associated endophytic fungi in a commercially important and endangered indian orchid *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl. **European Journal of Environmental Sciences**, v.2, n.1, p. 33-42, 2012.
- BARROS, F. DE; 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. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 03 Jan. 2018.
- BELLOTTO, A.; VIANI, R. A. G.; GANDOLFI, S.; RODRIGUES, R. R. Inserção de outras formas de vida no processo de restauração. In: R.R. Rodrigues, P.H.S. Brancalion & I. Isernhagen (orgs.). Pacto para a restauração ecológica da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal. **Instituto BioAtlântica**, São Paulo, cap. 1: fase 6, pp. 55-61, 2009.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMIG-ADAMS, B. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77k among vascular plants of diverse origins. **Planta**, Berlin, v.170, p.489-504, 1987.
- BRITO, L. P. S.; BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; AMARAL, G. C.; SILVA, A. A.; AVELINO, R. C. Reutilização de resíduos regionais como substratos na produção de mudas de cultivares de alface a partir de sementes com e sem peletização. **Revista de la Facultad De Agronomía (La Plata)**, La Plata, v. 116, n. 1, p. 51-61, 2017.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; ÖQUIST, G.; SCHREIDER, U.; LECHNER E. G. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrument. **Functional Ecology**, Londres, v.3, p.497-514, 1989.
- BRUSTULIN, J. & SCHMITT, J. L. Composição florística, distribuição vertical e floração de orquídeas epifíticas em três parques municipais do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas, Botânica**, Leopoldo, v.59, p.143-158, 2008.
- CARDOSO, J. C.; da SILVA, J. A. T.; VENDRAME, W. A. Impacts of deforestation on some orchids of São Paulo State, Brazil. **Natureza & Conservação**, Uberlândia, v. 1, n. 14, p. 28-32, 2016.
- CESTARI, C. Epiphyte plants use by birds in Brazil. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.13, n.4, p.689-712, 2009.
- CHAVES, M. M.; ZARROUK, O.; FRANCISCO, R.; COSTA, J. M.; SANTOS, T.; REGALADO, A. P.; RODRIGUES, M. L.; LOPES, C. M. Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. **Annals of Botany**, London, v.105, p. 661-676, 2010.

COSTA, J., GRANT, O., CHAVES, M. Thermography to explore plant– environment interactions. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.64, n.13, p.3937- 3949, 2013.

DECRUSE, S. W.; GANGAPRASAD, A.; SEENI, S.; MENON, S. Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v.72, p.199-202, 2003.

DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimação e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação in vitro. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v.66, p.167-174, 2011.

DUARTE, M. M.; GANDOLFI, S. Diversifying growth forms in tropical forest restoration: Enrichment with vascular epiphytes. **Forest Ecology**, Netherlands, v. 401, n.1, p.89-98, 2017.

DUARTE, M. M.; GANDOLFI, S. Enriquecimento de florestas em processo de restauração: aspectos de epífitas e forófitos que podem ser considerados. **Hoehnea**, São Paulo, v.40, n.3, p.507-514, 2013.

DUNCAN, M.; PRITCHARD, A.; COATES, F. MAJOR threats to endangered orchids of Victoria, Australia. **Selbyana**, Sarasota, v.26, n.1, p.89–195, 2005.

EGCP. Estratégia Global para a Conservação de Plantas. **Boletim informativo do subcomitê para a conservação de plantas da UICN**. 2011. Disponível em: <[http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/our\\_work/plants/](http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/our_work/plants/)>. Acesso em 10 Dez. 2017.

ENDRES JÚNIOR, D.; SASAMORI, M. H.; SILVEIRA, T.; SCHMITT, J. L.; DROSTE, A. Reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) em borda e interior de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.13, n.1, p. 33-40, 2015.

FONT QUER, P. **Diccionario de Botánica**. Editorial Labor, Barcelona., 1953.

GARCIA, L. C.; HOBBS, R. J.; RIBEIRO, D. B.; TAMASHIRO, J. Y.; SANTOS, F. A. M.; RODRIGUES, R. R. **Changes in vegetation along restoration time**: Influence of composition and diversity of planted trees on natural regeneration. In: Book of abstracts of the 4th World Conference on Ecological Restoration, Mérida, pp. 81-82, 2011.

GUERRANT, E. The Value and Propriety of Reintroduction as a Conservation Tool for Rare Plants. **Botany**, Charlottetown, v.91, 2013.

HERRERA, H.; VALADARES, R.; CONTRERAS, D.; BASHAN, Y.; ARRIAGADA, C. Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central Chile. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 27, p.175–188, 2017.

JOPPA, L. N.; D. L. ROBERTS; S. L. PIMM. 2010. **How many species of flowering plants are there?** Proceedings of the Royal Society. Publicado online em 7 Jul. 2010. Disponível em: <<http://rspsb.royalsocietypublishing.org>>. Acesso em: 15 Nov. 2017.

KIRSCHBAUM, M. U. F.; WHITEHEAD, D.; DEAN, S. M.; BEETS, P. N.; SHEPHERD, J. D.; AUSSEIL, A.-G. E. Implications of albedo changes following afforestation on the benefits of forests as carbon sinks. **Biogeosciences**, Katlenburg-Lindau, v.8, p.3687–3696, 2011.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. 3.ed. São Carlos: Rima. 2006. 531 p.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S. FALKOWSKI, P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, New York, v.45, p.633-662, 1994.

MATHUR, S.; JAJOO, A.; MEHTA, P.; BHARTI, S. Analysis of elevated temperature-induced inhibition of photosystem II using chlorophyll a fluorescence induction kinetics in wheat leaves (*Triticum aestivum*). **Plant Biology**, Berlim, v. 13, p. 1-6, 2011.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG C. W. Flora vascular do Bioma Cerrado: *checklist* com 12.356 espécies. In **Cerrado: ecologia e flora** (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, eds.). Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p. 422-442. 2008.

MULLER, T. S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S. Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 252-254, 2007.

NADKARNI, N. M.; SCHAEFER, D.; MATELSON, T. J.; SOLANO, R. Biomass and nutrient pools of canopy and terrestrial components in a primary and a secondary montane cloud forest, Costa Rica. **Forest Ecology and Management**, Colorado, v.198, p.223-236, 2004.

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

PONZONI, F.J.; PACHECO, L.R.F.; SANTOS, S.B. dos; ANDRADES FILHO, C. de O. Caracterização espectro-temporal de dosséis de *Eucalyptus* spp. mediante dados radiométricos TM/Landsat5. **Cerne**, Lavras, v.21, p.267-275, 2015.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, New York, v.47, n.1, p.1–4, 2011.

RUBLUO, A., CHÁVEZ, V., MARTÍNEZ, A. P. & MARTÍNEZVÁZQUEZ. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in-vitro* culture. **Biological Conservation**, McMinneville, v.63, p.163-169, 1993.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 2, p. 185–191, 2012

SILVERA, K.; NEUBIG, K. M.; WHITTHEN, W. M.; WILLIAMS, M. H.; WINTER, K.; CUSHMAN, J. C. Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. **Functional Plant Biology**, Australia, v.37, p. 995-1010, 2010.

SOUZA, F. R. **Influência da intensidade do tráfego e de sistemas de manejo nas propriedades físicas do solo e nas culturas de soja e girassol**. Dourados: UFGD. 2012. 78p. (Tese doutorado).

SWARTS, N.D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, Oxford, v.104, p.543–556, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TICHÝ, L. Field test of canopy cover estimation by hemispherical photographs taken with a smartphone. **Journal of Vegetation Science**, Montpellier, v.27, n.2, p. 427–435, 2016

ULISSES, C.; SOARES, G. **Aclimatização de mudas de orquídeas na agricultura familiar**: Biotecnologia, gestão e Inovação na floricultura em Pernambuco. Recife: Editora FASA, 2013.

YANG, F. S.; SUN, A. H.; ZHU, J.; DOWNING, J.; SONG, X. Q.; LIU, H. Impacts of host trees and sowing conditions on germination success and a simple ex situ approach to generate symbiotic seedlings of a rare epiphytic orchid endemic to Hainan Island, China. **The Botanical Review**, New York, v.83, n.1, p.74-86, 2017.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise destes resultados permite inferir que os estudos sobre germinação *in vitro* de orquídeas, principalmente nativas, são importantes, já que, por meio deles é possível conhecer não somente a espécie, como também a sua interação com o ambiente, ainda que controlado, considerando que os comportamentos das espécies dessa família botânica variam na literatura científica.

Plantas jovens de *Schomburgkia crispa* derivadas de germinação assimbiótica *in vitro* apresentaram rusticidade que as credenciam para utilização nas etapas de enriquecimento vegetal dos projetos de restauração, ou ainda nas áreas em regeneração natural que já sustentem o estrato arbóreo, entretanto com condições de radiação semelhantes às observadas nesta reintrodução, e não apenas no final da sucessão como forma de enriquecimento da biodiversidade. Os resultados apontam que *S. crispa* é uma espécie que pode ser utilizada para esse fim.

As práticas de resgate de flora, sobretudo decorrentes do passivo ambiental nos grandes empreendimentos, a formação de bancos de germoplasma com material replicado somaticamente *ex* e *in vitro* e material proveniente de germinação assimbiótica, bem como a reintrodução de epífitas ainda nos estádios iniciais das formações florestais, compõem ações importantes com uma nova concepção de restauração.