

CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS EM DOIS AMBIENTES
(SALA DE CRESCIMENTO E CASA DE VEGETAÇÃO):
CRESCIMENTO E CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA

LUCIENE SOUZA FERREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2014

CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS EM DOIS AMBIENTES
(SALA DE CRESCIMENTO E CASA DE VEGETAÇÃO):
CRESCIMENTO E CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA

LUCIENE SOUZA FERREIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof.^a D.Sc. Virginia Silva Carvalho
Coorientador: Eliemar Campostrini

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2014

CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS EM DOIS AMBIENTES
(SALA DE CRESCIMENTO E CASA DE VEGETAÇÃO):
CRESCIMENTO E CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA

LUCIENE SOUZA FERREIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovado em 03 de fevereiro de 2014.

Comissão Examinadora:

Prof. Paulo Cezar Cavatte (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – UFES

Fábio Afonso M. M. de Assis Figueiredo (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof. Eliemar Campostrini (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF
(Coorientador)

Prof. Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) – UENF
(Orientadora)

A eles que são meu porto seguro, meus pais Sebastião e Maria de Fátima, pelo amor, pelo exemplo, pela oração, pelo estímulo e pela compreensão em todos os momentos, mesmo na distância. Às minhas irmãs Lígia e Luciana por sempre me apoiarem e incentivarem, a buscar minha realização profissional, exemplos de coragem e determinação para mim. Família amo Vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por me permitir chegar até aqui;

Aos meus pais Sebastião Gonçalves Ferreira e Maria de Fátima Souza Ferreira, pela formação, pelo amor, pela confiança, pela educação, pelo exemplo, pela amizade, por acreditarem em mim e perseverarem nos meus objetivos, me apoiando e incentivando sempre;

Ao meu avô materno Antônio Satyro de Souza (em memória) por quem tenho grande e eterno amor, carinho, gratidão, admiração e respeito, um exemplo de homem justo, sereno e humilde;

Às minhas irmãs Lígia Souza Ferreira e Luciana Souza Ferreira, por serem sempre tão companheiras e amigas, sendo para mim, exemplos de coragem e determinação. Agradeço pela alegria de compartilhar momentos, por me ouvirem quando estes foram difíceis, por todo amor, todo apoio, todo carinho, todas as risadas, toda preocupação, enfim por tudo;

Ao meu sobrinho Gabriel Ferreira Viana por quem tenho amor maior, e tive imenso prazer de morar nestes dois anos, apesar de muitas vezes não ser uma tia tão presente devido aos compromissos e à correria do dia-a-dia. Obrigada por diversas vezes tornar meu dia e minha vida mais colorida, alegre e divertida com seu jeitinho puro, inocente e teimoso. Vou sentir sua falta pequeno;

Aos meus familiares por todo apoio e incentivo dado em meu curso;

Ao meu namorado Gabriel Pereira Titonel pelo carinho, pelo companheirismo, pelo incentivo, pela amizade, por me apoiar sempre e crescer junto comigo com muita dedicação, paciência, compreensão e amor;

À minha madrinha Angélica Regina e à minha sogra Silvia Titonel, pelas palavras de incentivo e pelo apoio;

À minha orientadora Virginia Silva Carvalho, pela orientação, pela confiança, pela oportunidade e pelos ensinamentos;

Ao meu coorientador Eliemar Campostrini pela participação ativa no trabalho, orientação, motivação e oportunidade de trabalharmos juntos;

Ao prof. Geraldo Gravina, Rafael e Altino, pela ajuda nas análises estatísticas;

Aos amigos do laboratório de Fitotecnia Andressa, Rafael, Monique, Nayara, Elizabeth, Naiara, Renato e Ramon, com quem tive o prazer em trabalhar dividindo dificuldades e somando aprendizado;

Em especial às minhas amigas Andressa, Larissa e Monique pelo companheirismo em tantos momentos de alegria e tristeza, trabalhos, incentivo durante o curso, apoio nas decisões, seja na vida profissional ou pessoal. Obrigada pela amizade, conversas e desabafos!

Aos amigos do laboratório de fisiologia Fábio, Thiago e Amanda pela ajuda nas avaliações do experimento, pelo aprendizado, pelas conversas e pelos conselhos;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade de aprendizado;

Ao Orquidário Viridescens, na pessoa da Maria Inês e do Aloísio Falqueto pela disponibilidade de infraestrutura física e pessoal para a realização do trabalho, por todo incentivo, todo apoio e toda dedicação ao trabalho da dissertação;

A todos estes e aos que não foram citados, eu agradeço por contribuírem direta ou indiretamente para esta conquista!

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 3 |
| 2.1. Geral..... | 3 |
| 2. 2. Específicos..... | 3 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 3.1 Aspectos gerais | 4 |
| 3. 2 Aspectos econômicos..... | 6 |
| 3. 3 Propagação seminífera | 8 |
| 3. 4 O ambiente de cultivo <i>in vitro</i> | 10 |
| 3. 5 Fatores ambientais que afetam o cultivo <i>in vitro</i> | 12 |
| 3.5.1 Luz..... | 12 |
| 3.5.2 Temperatura..... | 15 |
| 3.5.3 Trocas gasosas e umidade..... | 16 |
| 3.6 Espécies trabalhadas..... | 17 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 4.1 Delineamento experimental..... | 20 |
| 4.2 Material vegetal e montagem do experimento..... | 20 |
| 4.3 Descrição do ambiente de cultivo..... | 21 |
| 4.4 Recultivos..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 4.5 Avaliações do experimento..... | 22 |
| 4.5.1 Determinação da taxa de sobrevivência e número de brotos..... | 22 |
| 4.5.2 Determinação da área foliar..... | 22 |
| 4.5.3 Determinação da massa da matéria seca..... | 23 |
| 4.5.4 Determinação do volume radicular..... | 23 |
| 4.5.5 Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i> | 23 |
| 4.5.6 Intensidade de verde..... | 24 |
| 4.5.7 Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos..... | 24 |
| 4.5.8 Determinação das trocas gasosas..... | 25 |
| 4.5.9 Massa foliar específica..... | 25 |
| 4.6 Análise estatística..... | 25 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 27 |
| 5.1 Avaliações das condições ambientais | 27 |
| 5.2 Variáveis de crescimento..... | 33 |
| 5.3 Trocas gasosas..... | 37 |
| 5.4 Índice de SPAD, clorofila, relação F_v/F_m e índice fotossintético (PI)..... | 41 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 46 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 48 |

RESUMO

FERREIRA, LUCIENE SOUZA; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2014. **Cultivo *in vitro* de orquídeas em dois ambientes (sala de crescimento e casa de vegetação): Crescimento e capacidade fotossintética.** Orientadora: Virginia Silva Carvalho. Coorientador: Eliemar Campostrini.

A propagação seminífera de orquídeas é feita *in vitro*. Contudo, em relação às plantas propagadas convencionalmente, as plantas produzidas *in vitro* podem ter o processo fotoquímico e o bioquímico comprometidos devido às alterações na quantidade e qualidade da luz, à elevada umidade relativa nos frascos de cultivo e à alta concentração de sacarose no meio de cultura. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade fotossintética e o crescimento de plântulas de *Cattleya warneri* (Cw), *Epidendrum secundum* (Es) e *Encyclia pauciflora* x *Encyclia osmantha* (Ec) cultivadas *in vitro* em frascos com dois tipos de tampas e duas condições de ambiente. Sob condições de fluxo laminar, sementes das três espécies de orquídeas estudadas foram transferidas para quatro frascos-mãe, contendo 40 mL de meio de cultura B&G Orchidées[®], solidificado com 12,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico. Para aumentar a eficiência do controle de contaminantes, foi adicionado um disco de papel filtro embebido em solução saturada de sulfato de cobre na parte interna das tampas. Cada ambiente recebeu um frasco-mãe com tampa de plástico e outro com tampa de metal. O

primeiro recultivo foi realizado após três meses e o segundo aos seis meses quando foi montado o experimento. O delineamento experimental utilizado foi o DIC em um esquema fatorial 2 x 2, dois tipos de tampas (metal e plástica) e dois ambientes (sala de cultivo convencional e casa de vegetação) e três espécies (Cw, Es, Ec). A condição de cultivo em casa de vegetação (CV) foi no Orquidário Viridescens em Venda Nova do Imigrante-ES, enquanto que, a sala de crescimento (SC) utilizada foi no setor de Horticultura do LFIT/CCTA/UENF, em Campos dos Goytacazes-RJ. Em ambos os locais, foram monitorados, por meio de sensores automáticos, a temperatura do ar, a umidade relativa e a intensidade luminosa. Foram utilizados cinco frascos por tratamento com 10 plantas cada, oriundas do primeiro recultivo. Após 11 meses de cultivo *in vitro*, foram avaliados a taxa de sobrevivência, o número de brotos, a área foliar, a massa da matéria seca da parte aérea e da raiz, o volume radicular, a fluorescência da clorofila *a*, a intensidade de verde, os teores de pigmentos fotossintéticos, as trocas gasosas e a massa foliar específica. Para as variáveis biométricas de Ec e Es, a SC apresentou resultados superiores aos da CV, independente do tipo de tampa. Para a Cw os melhores resultados foram obtidos nas condições de CV. As variáveis fisiológicas relacionadas aos efeitos estomáticos nas espécies Ec e Es apresentaram melhores resultados na condição de CV e de tampa de plástico para a maioria das variáveis. Já a Cw apresentou resultados semelhantes nos dois ambientes com a tampa de plástico. As variáveis relacionadas aos efeitos não estomáticos de todas as espécies apresentaram resultados semelhantes em todas as condições estabelecidas. Com o objetivo de reduzir os custos da produção *in vitro* com energia elétrica com lâmpadas e ar condicionado, pode-se utilizar a casa de vegetação como ambiente para o crescimento das plântulas destas espécies.

Palavras-chave: Orchidaceae, *Epidendrum secundum*, *Encyclia osmantha*, *Encyclia pauciflora*, *Cattleya warneri*, trocas gasosas, fotossíntese, propagação seminífera *in vitro*.

ABSTRACT

FERREIRA, LUCIENE SOUZA; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2014. ***In vitro* orchids culture in two environments (growth room and greenhouse): Growth and photosynthetic capacity.** Advisor: Virginia Silva Carvalho. Co-advisor: Eliemar Campostrini

Orchid seeds are propagated by *in vitro* methods. However, plants produced *in vitro* can have the photochemical and the biochemist processes compromised because of changes in the light amount and quality, the high relative humidity on the jars and the high sucrose concentration in the culture medium. Therefore, this study aimed to assess the photosynthetic capacity and the growth of seedlings of *Cattleya warneri* (Cw), *Epidendrum secundum* (Es) and *Encyclia pauciflora* x *Encyclia osmantha* (Ec) cultured *in vitro* in jars with two types of covers and two environmental conditions. Under laminar flow conditions, seeds of the three studied species were transferred to four jars, containing 40 mL of medium culture B&G Orchidées[®], solidified with 12.0 g L⁻¹ of bacteriological agar. To increase the efficiency of contaminant control, was added a disk of filter paper soaked in a saturated solution of copper sulfate on the inside part of the covers. Each environment received a jar-mother covered with a plastic cover or with a metal cover. The first re-cultivation was carried out after three months and the second after six months when the experiment was set up. The experiment was conducted in a completely randomized design in a factorial 2 x 2 x 3, two types of jar covers

(plastic and metal) and two environments (growth room and greenhouse) and three species (Cw, Es, Ec). The greenhouse (CV) was located in 'Orquidário Viridescens' in Venda Nova do Imigrante, a city in Espírito Santo State in Brazil. The growth room (SC) was located in the Horticulture Sector LFIT / CCTA / UENF, in Campos dos Goytacazes city in Rio de Janeiro State. Air temperature, relative humidity and light intensity were monitored by automatic sensors in both environments. Five jars were used per treatment with 10 plants in each, derived from the first re-cultivation. After 11 months of *in vitro* growth, were evaluated: the seedlings survival, the number of shoots, leaf area, dry matter of shoot and root, root volume, chlorophyll a fluorescence, the green intensity, the levels of photosynthetic pigments, gas exchange and specific leaf mass. For biometric parameters, the Ec and Es showed superior results in the growth room, regardless of the cover type. The Cw best biometric results were obtained in the greenhouse. For the physiological parameters related to stomatal effects, the Ec and Es showed better results in the condition of greenhouse and plastic cover while the Cw showed similar results in both environments with the plastic cover. Parameters related to non-stomatal effects of all species showed similar results in all treatments. Aiming to reduce the cost of *in vitro* production, such as reduce the electricity consume with lamps and air conditioning, the greenhouse environment can be used for the seedlings growth of these three species.

Keywords : Orchidaceae, *Epidendrum secundum*, *Encyclia osmantha*, *Encyclia pauciflora*, *Cattleya warneri*, gas exchange, photosynthesis, *in vitro* seed propagation.

1. INTRODUÇÃO

Entre as espécies de maior aceitação no mercado de flores, destacam-se as orquídeas, nos seguimentos para corte e plantas em vasos (Kishor et al., 2006). As orquídeas são sucesso de venda no mundo inteiro e, entre as plantas ornamentais, estão entre as mais apreciadas e de maior valor comercial. Com a introdução constante de novas cultivares e florações que chegam a durar mais de um mês, estas plantas vêm conquistando a cada dia pessoas que ainda não conheciam as orquídeas e sua importância na horticultura (Kalimuthu et al., 2007).

As orquídeas podem ser propagadas de forma assexuada e sexuada. Comercialmente a maioria é propagada sexualmente, por meio de sementes, de forma assimbiótica *in vitro*, garantindo plantas saudáveis, uniformes e altas taxas de germinação (Faria et al., 2012).

Após a fase *in vitro* é necessária a aclimatização das plantas transferindo-as para um ambiente *ex vitro*. A adaptação a essa condição é delicada devido a fatores como temperatura, luminosidade, umidade do ar e do substrato, que podem levar a planta a uma condição de estresse e reduzir seu crescimento, influenciando na taxa de sobrevivência e no desenvolvimento das plântulas ao serem aclimatizadas (Costa et al., 2009b).

Outro fator que limita a expansão do uso da propagação seminífera *in vitro* é o elevado custo das mudas, devido, por exemplo, ao elevado gasto com energia elétrica nas salas de cultivo convencionais, que é um dos fatores mais onerosos do processo.

A fonte de luz, geralmente utilizada para o cultivo *in vitro* são as lâmpadas fluorescentes. No entanto, esta fonte possui baixa intensidade luminosa e alguns comprimentos de onda pouco efetivos para a promoção do crescimento das plântulas (Rezende et al., 2008). Além do grande gasto de energia elétrica com as lâmpadas, há elevado consumo com os aparelhos de ar condicionado que ficam ligados 24 horas por dia para manter constante a temperatura da sala de cultivo.

Com o objetivo de reduzir o custo das mudas produzidas *in vitro*, em um mercado cada vez mais competitivo, faz-se necessário reduzir o elevado custo de funcionamento e a manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura controlada (Kodym e Zapata-Arias, 1999; Savangikar, 2004; Erig e Schuch, 2005; Braga et al., 2009).

O Brasil, por ser um país de clima tropical e subtropical, possui grande disponibilidade de luz solar ao longo do ano, o que o torna propício ao emprego da luz natural para a propagação *in vitro* (Erig e Schuch, 2005). Dessa forma, uma alternativa para redução dos custos seria o cultivo das plântulas *in vitro* em ambiente de luz natural, substituindo a luz artificial. Essa tecnologia não é muito adotada por não estarem esclarecidos seus efeitos sobre as culturas que, convencionalmente, são condicionadas em luz artificial, com baixa intensidade luminosa, com fotoperíodo e temperatura controlados (Erig e Schuch, 2005).

Assim sendo, este trabalho visou estudar o efeito da luz natural e da temperatura ambiente no crescimento de plântulas de orquídeas *in vitro*. Objetivou ainda comparar as plântulas crescidas nesta condição com plântulas crescidas em salas de cultivo convencionais.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

O objetivo geral desse trabalho foi propor a otimização da propagação seminífera *in vitro* de orquídeas, avaliando as variações entre diferentes gêneros e espécies, relacionadas à capacidade fotossintética e ao crescimento das plântulas, em dois ambientes de cultivo *in vitro*, um artificial com controle de luz e temperatura e outro em casa de vegetação em condições naturais.

2.2. Específicos

- Comparar e avaliar o crescimento de plântulas de orquídeas cultivadas *in vitro* em dois diferentes ambientes: em sala de cultivo, com luz e temperatura controladas, e em casa de vegetação com condições climáticas variáveis;
- Avaliar a resposta de plântulas de orquídeas cultivadas *in vitro* em frascos com dois diferentes tipos de tampa: de metal e de plástico;
- Avaliar as características biométricas e a capacidade fotossintética das mudas obtidas ao final do período de cultivo *in vitro*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais

As orquídeas são de imensa importância na horticultura, considerada uma das maiores e mais diversificadas famílias entre as plantas fanerógamas (Kalimuthu et al., 2007; Yew e Hew, 2000).

A família Orchidaceae, pertence à classe Liliopsida e à ordem Asparagales (APG III, 2009). Plantas de grande importância comercial, as orquídeas são vastamente cultivadas. Estima-se que tenha entre 850 a 980 gêneros, os quais são constituídos por 20.000 a 30.000 espécies, o que torna a família Orchidaceae a maior em número de espécies entre as Angiospermas, representando cerca de 10% de todas as plantas espermatófitas. Além disso, já foram registrados cerca de 100.000 híbridos feitos pelo homem (Giulietti et al., 2005; Raven et al., 2007; Roberts e Dixon, 2008).

Segundo Barros et al. (2013), no Brasil existem 240 gêneros de orquídeas e 2.440 espécies, sendo cerca de 1.630 endêmicas, podendo ser considerado um dos países mais ricos em diversidade de orquídeas, comparável somente à Colômbia e ao Equador (Sampaio et al., 2010).

A família Orchidaceae possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todos os continentes, ocorrendo em campos, desertos e em várias fitofisionomias distintas, desde o nível do mar até acima de 4.500 metros (Pereira e Ribeiro, 2004). Apresentam maior diversidade nas regiões tropicais,

concentrando-se nas áreas de montanhas com maior umidade, especialmente nos trópicos americanos e no sudeste asiático (Van Den Berg e Azevedo, 2005).

As orquídeas são geralmente plantas autotróficas e possuem diferentes habitats, há espécies terrestres, epífitas, rupícolas (fixadas sobre as rochas). Há algumas espécies saprófitas que não possuem clorofila e se nutrem de vegetais em decomposição em solo de matas sombrias (Rocha, 2008). Nos trópicos há um predomínio das formas epífitas e rupícolas, enquanto que nas outras regiões predominam as terrestres (Joly, 2002). Acredita-se que a família Orchidaceae foi submetida a uma rápida especiação e diversificação, possibilitando a ocupação desta vasta gama de habitats (Smith e Read, 1997).

As plantas desta família apresentam muitas e variadas formas, cores e tamanhos, e são predominantemente das áreas tropicais. Cerca de 70% das espécies de orquídeas são epífitas. Não são plantas parasitas, crescem sobre as árvores apenas para fins de fixação, usando-as somente como apoio para buscar luz. Nutrem-se apenas de material em decomposição que cai das árvores (Boldrini et al., 2010). A umidade necessária é proveniente do ar, da água da chuva e do orvalho noturno (Oliveira, 1993; Demattê, 1996).

A despeito de sua natureza herbácea, essas espécies apresentam crescimento bastante lento e, conseqüentemente, a produção de novas mudas é bastante demorada. As orquídeas permanecem no estado juvenil por longo período até atingir a maturação, podendo levar de três a dez anos para florescerem, dependendo da espécie e das condições ambientais (Ferreira e Suzuki, 2008).

Morfologicamente a família Orchidaceae apresenta crescimento monopodial (presença de um único eixo caulinar, que produz folhas e cresce de forma vertical indefinida), simpodial (presença de vários eixos caulinares, em forma de pseudobulbos ou colmos, que se originam a partir de rizomas) ou misto. As plantas, de modo geral, são constituídas por raiz, caule (rizoma, colmo, pseudobulbo), folha, inflorescência, flor, fruto do tipo cápsula e sementes muito pequenas, geralmente sem reservas (Winter et al., 1974; Dressler, 1993).

Os pseudobulbos são formados pelo desenvolvimento lateral de um ou mais entrenós caulinares. Apresentam formas e tamanhos variados e podem funcionar como órgãos de reserva, particularmente nas espécies epífitas (Betchel et al., 1981).

As raízes aéreas são normalmente revestidas com uma estrutura denominada velame, cuja função é a captação da umidade do ar, transformando o vapor de água em água líquida nas células da exoderme (Júnior et al., 2012).

A família Orchidaceae apresenta grande importância para a manutenção da biodiversidade, indicando o estado de conservação das florestas, pois são sensíveis às interferências antrópicas em áreas de mata primária (Marrara et al., 2007). As orquídeas sempre representaram uma das plantas ornamentais mais cobiçadas, no Brasil e no mundo, devido à exuberância de suas flores perfeitas e suas cores delicadas com alto valor agregado. Assim, se tornam alvo fácil da extração predatória, correndo o risco de serem extintas antes mesmo de serem catalogadas (Carneiro et al., 2001).

As orquídeas não são cultivadas apenas para fins ornamentais. A baunilha, matéria-prima com cheiro característico, muito usada em cosméticos, alimentos, bebidas, possuindo ação antimicrobiana, é extraída de frutos e sementes da espécie *Vanilla planifolia* (Joly 2002; Peterson et al., 2004; Raven et al., 2007; Roberts e Dixon, 2008; Lim, 2012).

Outras espécies são também apreciadas na medicina tradicional e diversos estudos farmacológicos validaram sua utilização etnobotânica. Os caules de *Dendrobium* spp., empregados como alimentos saudáveis e medicinais na China, são ricos em ésteres e ácidos aromáticos simples com atividades antitumorais, antioxidantes e antimutagênicos (Fan et al., 2001; Chen et al., 2008). O extrato de *Cyrtopodium cardiochilum* apresenta propriedades imunológicas importantes no tratamento da tuberculose (Barreto e Parente, 2006). A utilidade de espécies desta família se estende para outros fins. Chifa et al. (2009) comprovaram a presença de saponinas em *Oncidium bifolium*. Os rizomas de *Gastrodia cunninghamii* são apreciados na culinária (Harris, 1997; citado por Rasmussen, 2002) e os tubérculos de *Satyrium nepalense* são consumidos como tônico energético na Ásia (Mahendran e Bai, 2009).

3.2 Aspectos econômicos

Embora as orquídeas e bromélias tenham contribuído para tornar o Brasil conhecido internacionalmente por suas plantas exóticas, elas foram obtidas, quase sempre, do extrativismo predatório das matas tropicais que, em

combinação com a urbanização em curso e as fronteiras agrícolas estendidas, têm contribuído para o perigo iminente de extinção de diversas espécies (Kämpf, 1997; Deb e Pongener, 2011).

Estudos com as espécies da família Orchidaceae vêm crescendo e sua produção comercial tem se tornado um importante negócio em todo mundo, devido ao seu grande valor ornamental como flor de vaso, flor de corte ou no paisagismo, pois são muito atrativas e encantam pela sua beleza, sendo considerada a família de plantas com maior valor comercial (Griesbach, 2002; Campos, 2008). Nos últimos anos a floricultura brasileira vem sendo uma atividade econômica importantíssima para o agronegócio, fazendo do cultivo de orquídeas um negócio que vem se consolidando (Reis, 2011). Dentro desse promissor setor se encontram as orquídeas, responsáveis por uma grande parcela do consumo de plantas ornamentais. As mudas são produzidas em biofábricas, que garantem certificação de qualidade e fitossanidade, sendo empresas especializadas em produzir mudas em larga escala por micropropagação ou por propagação seminífera *in vitro*.

O consumo per capita com flores no Brasil atualmente é de R\$ 24,00 por habitante. No ano de 2010 o setor faturou R\$ 3,8 bilhões, em 2011 o faturamento foi de R\$ 4,3 bilhões e em 2012 de R\$ 4,8 bilhões, demonstrando o crescimento do setor, e no ano de 2013 o crescimento era estimado na ordem de 12%. Desde 2006 o segmento de flores tem registrado altas de 8% a 12% em volume e de 15% a 17% em valor (Ibraflor, 2013).

O Brasil vem acumulando reduções gradativas nas exportações desde 2008, quando atingiu seu auge na exportação de produtos da floricultura com US\$ 35,6 milhões, caindo para US\$ 26,1 milhões em 2012 (Cardoso, 2013). Segundo Junqueira e Peetz (2011), a floricultura brasileira esta focada, principalmente, em atender ao mercado interno, mas ainda assim, a oferta é bem menor que a procura pelos consumidores (Ibraflor, 2012). No ano de 2012, as importações de produtos para a floricultura atingiram valor recorde de US\$ 40,1 milhões, sendo US\$ 13,0 milhões com mudas de plantas ornamentais, no qual destes, US\$ 8,8 milhões foram com importações de mudas de orquídeas (Cardoso, 2013).

Em 2009, nos Estados Unidos houve um aumento de 26% na balança comercial comparado ao ano anterior, com relação à comercialização das orquídeas de vaso, o que representou, aproximadamente, uma receita anual de

160 milhões de dólares. Em 2011, esse mercado em franca expansão contribuiu com 191 milhões de dólares, representando um aumento de 11% em relação ao ano anterior, no mesmo período em que todas as outras culturas nesta categoria diminuíram em valor em relação ao ano anterior (USDA, 2012).

No Brasil, a profissionalização e o dinamismo comercial da floricultura são recentes, embora a atividade já contabilize números bastante significativos. São cerca de nove mil produtores, cultivando uma área de aproximadamente 11,8 mil hectares, gerando 194 mil empregos diretos, dos quais 96.000 (49,5%) relativos à produção, 6.000 (3,1%) relacionados à distribuição, 77.000 (39,7%) no varejo e 15.000 (7,7%) em outras funções, principalmente de apoio (Ibraflor, 2013).

Embora ainda fortemente concentrada no Estado de São Paulo, que possui o maior número de produtores distribuídos em várias regiões como Mogi das Cruzes, Vale do Paraíba, Atibaia, Holambra e Cotia (Takane et al., 2012), a floricultura brasileira evidencia fortes tendências de descentralização produtiva e comercial para várias regiões do país. Outros estados como Rio de Janeiro (segundo maior produtor e consumidor), Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal e na maioria dos estados do Norte e do Nordeste são também importantes polos florícolas (Cozer et al., 2008, Ibraflor, 2013).

3.3 Propagação seminífera

As cápsulas de orquídeas possuem como característica a produção de numerosas sementes, o que permite a estas flutuarem sobre a menor corrente de ar ascendente. O número de sementes produzidas por cápsula varia de 1.300 até quatro milhões, dependendo da espécie, e variam em morfologia, tamanho, estruturas, cores e outras características (Arditti, 1992; Arditti e Ghani, 2000).

Um dos grandes problemas da propagação de orquídeas pelos métodos clássicos deriva do fato das sementes dessas plantas serem de tamanho reduzido e não possuírem endosperma. Além disso, embora ocorra formação de inúmeras sementes por cápsula, a porcentagem de germinação, em condições naturais, é em torno de 2 a 3 % por ser dependente de associações micorrízicas (Sheehan, 1992; Corrie e Tandon, 1993). Devido ao fato das sementes de orquídeas conterem poucas reservas de lipídios e proteínas, em ambiente natural, é obrigatória a

associação simbiótica com um fungo micorrízico compatível, para o fornecimento de carboidratos simples necessários à germinação, para o início do crescimento e a nutrição das plântulas sobre o substrato (Boldrini et al., 2010). Estes fungos micorrízicos, em contato com as sementes na natureza, estabelecem uma relação de equilíbrio mutualístico, onde a plântula obtém os nutrientes e em troca fornece proteção ao fungo.

A propagação *in vitro* de orquídeas se destaca como uma técnica que viabiliza a germinação de sementes, possibilitando a obtenção de grande quantidade de mudas em curto espaço de tempo (Pasqual et al., 2011). Em condições assimbióticas *in vitro*, o índice de germinação chega a quase 100%, para a grande maioria das espécies (Martini et al., 2001). Por meio desse processo, sementes são induzidas a germinarem em meio de cultura rico em fonte de carbono e nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião, sob condições assépticas, mantidas em sala de crescimento onde fatores ambientais como luz e temperatura são controlados (Torres et al., 1998).

A maioria das orquídeas produzidas comercialmente tem suas sementes germinadas de modo assimbiótico *in vitro*, não entrando em contato com fungos micorrízicos. Esta técnica eleva a taxa de germinação, diminuindo assim a retirada da natureza dessas plantas de alto valor comercial, contribuindo para sua preservação em seus habitats (Martini et al., 2001; Rego-Oliveira e Faria, 2005).

A propagação *in vitro* tem sido utilizada no Brasil há poucas décadas, para aumentar, principalmente, a produção de mudas de alta qualidade genética e, conseqüentemente, reduzir seu custo. Estudos que visem melhorar o processo de propagação e desenvolvimento de orquídeas são extremamente importantes não apenas para que se possa dominar seu cultivo, mas também para preservá-las e assim evitar sua extinção (Stancato et al., 2001).

Desta forma, as técnicas de cultivo *in vitro* são comprovadamente eficientes na melhoria da taxa de germinação de sementes de várias espécies de orquídeas, permitindo maiores taxas de multiplicação e a obtenção de plantas saudáveis e mais uniformes, atendendo as necessidades de produção e por isso é o método utilizado no cultivo comercial de orquídeas (Stancato e Faria, 1996; Faria et al., 2012).

3.4 O ambiente de cultivo *in vitro*

No cultivo *in vitro* convencional as plântulas são cultivadas em frascos sem que ocorra troca gasosa, com alta umidade relativa do ar (aproximadamente 98%), alta concentração de etileno, baixa concentração de CO₂ (menos de 100 μmol mol⁻¹ no período luminoso), baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (40 – 50 μmol m⁻² s⁻¹), e com sacarose como principal fonte de energia metabólica (Arigita et al., 2002).

O crescimento dos explantes não depende somente da composição de nutrientes do meio de cultura, mas, também, é afetado pela composição gasosa da atmosfera no interior do recipiente de cultivo *in vitro* (Zobayed et al., 2000) e pela intensidade de luz (Ibaraki e Nozaki, 2005).

O cultivo *in vitro* em condições ambientais controladas, origina plantas com elevado conteúdo de água, com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (Kubota e Kozai, 1992) ou com desordens anatômicas e fisiológicas que não possibilitam que o aparato fotossintético opere normalmente (Arigita et al., 2002), resultando na perda de mudas. As mudanças no ambiente habitual de crescimento das plantas como ocorre no processo de aclimatização, têm uma forte influência no desenvolvimento da parte aérea, tornando as plantas suscetíveis a grandes perdas de água por transpiração (Fachinello et al., 1995).

A propagação *in vitro* é utilizada comercialmente para várias culturas, mas ainda faz-se necessário reduzir os custos de produção que são muito elevados, e devem-se em grande parte às perdas causadas pela contaminação *in vitro*; por desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas; à baixa porcentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização; à necessidade de mão de obra especializada, para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas (Kurata e Kozai, 1992; Kozai e Kubota, 2001) e; principalmente, ao elevado custo de funcionamento e à manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura controlada (Standaert de Metsenaere, 1991; Kodym e Zapata-Arias, 1999).

Nas salas de crescimento são comumente utilizadas lâmpadas fluorescentes (Bula et al., 1991). Esse tipo de luz não é o ideal para o crescimento vegetal, pois essas lâmpadas possuem diferentes comprimentos de ondas (350 nm a 750 nm) e, geralmente, emitem luz branca de similaridade espectral entre as

bandas. A irradiância fornecida primariamente na sala de crescimento afeta o desenvolvimento das plantas, principalmente por meio de alterações fotomorfogênicas, que são observadas, principalmente, na formação dos tecidos do mesofilo e na ineficiência do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, afetando sua funcionalidade (Rezende et al., 2008). No cultivo *in vitro* com fornecimento de CO₂ e maior intensidade luminosa, a planta consegue se desenvolver em um sistema que reduz a evapotranspiração, formando maior quantidade de estômatos (Zobayed et al., 2000).

Espera-se que plântulas de orquídeas cultivadas desde a fase da sementeira em condições ambientais naturais de temperatura e de luz, tenham uma maior taxa fotossintética e, ao serem aclimatizadas, tenham uma maior chance de sobrevivência quando comparadas às plântulas providas de sala de cultivo com luz e temperatura controladas.

De acordo com Hazarika (2006), o cultivo *in vitro* convencional, caracterizado por condições controladas de luz, níveis elevados de açúcares e alta umidade, favorece a redução da atividade fotossintética, o mau funcionamento dos estômatos e o baixo desenvolvimento da cutícula. Diante disso, é provável que a luz natural apresente vantagens sobre o sistema de iluminação artificial, principalmente quanto às alterações anatômicas e fisiológicas. Sob estas condições destacam-se o crescimento de plântulas e a melhoria das características fisiológicas, em razão do ambiente de cultivo ser semelhante ao natural, o que facilita a adaptação das plantas quando transplantadas para ambiente *ex vitro* (Borges et al., 2011).

A modificação do ambiente *in vitro* e da sala de crescimento pode originar inúmeras vantagens para as plantas, promovendo um maior crescimento e desenvolvimento *in vitro* e reduzindo o estresse da planta durante a aclimatização, aumentando a porcentagem de sobrevivência, e para o produtor, reduzindo os custos com reparos e manutenção da sala de crescimento e ainda, possibilitando utilização de instalações simplificadas reduzindo os custos das construções.

Algumas vantagens relacionadas à utilização da luz solar já vêm sendo estudadas por alguns pesquisadores. Costa et al. (2009a) avaliaram a influência do ambiente de cultivo *in vitro* em duas cultivares de bananeira (*Musa* spp.) e, com exceção do comprimento da parte aérea, verificaram que a luz natural

proporcionou melhores respostas no espessamento dos parênquimas clorofilianos e no incremento da densidade estomática. Além disso, o enraizamento *in vitro* em luz natural promoveu maior rustificação das cultivares, com 100% de sobrevivência *ex vitro*. Kodym e Zapata-Arias (1999) obtiveram maior número de brotações de bananeira em casa de vegetação sob luz natural quando comparado com sala de crescimento. Dignart et al. (2009) trabalhando com *Cattleya walkeriana* obtiveram maior número de brotos em plântulas mantidas em casa de vegetação sem sombrite do que em casa de vegetação com sombreamento; também foram observadas maior: densidade estomática, espessura do mesofilo, diâmetro polar e equatorial dos estômatos em casa de vegetação comparados à sala de crescimento.

O desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* com o uso de luz solar e temperatura variável, surge como possibilidade de aumentar a eficiência das plântulas *in vitro* e auxiliar na redução de custo (Erig e Schuch, 2005).

3.5 Fatores ambientais que afetam o cultivo *in vitro*

3.5.1 Luz

A luz é importante para a realização da fotossíntese pelas plantas e o seu controle tem influência direta na formação de brotações, na germinação de sementes, no crescimento e na multiplicação dos explantes durante a propagação *in vitro*. Três fatores devem ser levados em consideração no que diz respeito à iluminação do ambiente de cultivo: a irradiância, o fotoperíodo e a qualidade da luz (Hartmann et al., 2011).

A irradiância está relacionada com o fluxo de fótons fotossintéticos interceptados pelo explante, que tem relação direta com o processo fotossintético. O fotoperiodismo é a quantidade de horas de luz e escuro requerida pela cultura no decorrer de um dia. A qualidade da luz, que é percebida por nossos olhos por meio das cores, corresponde aos comprimentos de onda (Hartmann et al., 2011). Esse é um fator que pode alterar a morfogênese das plantas por meio de uma série de processos mediados por receptores, que absorvem a luz na região do vermelho e azul do espectro, sendo, portanto, uma maneira viável de aumentar a qualidade das mudas (Braga et al., 2009). A luz vermelha, por exemplo, aumenta a germinação de sementes em algumas cultivares de alface, enquanto que o

vermelho-distante a inibe. No entanto, o comprimento de luz vermelho-distante pode promover a formação de bulbos em plantas de dias longos, como a cebola. (Hartmann et al., 2011).

A luz azul regula os movimentos estomáticos ao longo de toda a vida da planta e as respostas específicas da luz azul possuem um espectro de ação característico na região dos 400-500 nm. Os estômatos desempenham um importante papel regulador nas trocas gasosas nas folhas e a eficiência dessa regulação pode impactar a produtividade das culturas agrícolas. A abertura estomática acompanha a radiação fotossinteticamente ativa na superfície foliar como foi observado em folhas de *Vicia faba* cultivadas em casa de vegetação, onde a medida da largura da fenda estomática segue os níveis de radiação fotossinteticamente ativos (400 a 700 nm) incidentes sobre a folha, indicando que a resposta a luz é a dominante na regulação da abertura estomática (Taiz e Zeiger, 2013).

Estudos da qualidade de luz vêm sendo realizados para se descobrir os reais efeitos do espectro e de níveis de irradiância no crescimento das plântulas durante o cultivo *in vitro*. A variação na qualidade da luz pode interferir no crescimento *in vitro* de diversas espécies, de maneira alternativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. A qualidade espectral afeta também estruturalmente a anatomia das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar, exibindo alto grau de plasticidade tanto anatômico como fisiológico (Sims e Pearcy, 1992; Saebo et al., 1995; Schuerger et al., 1997; Dousseau, et al. 2008). A qualidade da luz influencia ainda a germinação, a biossíntese de pigmentos, o enverdecimento, a inibição de alongamento do hipocótilo, a expansão dos cotilédones e das folhas, o alongamento do caule e a indução ao florescimento em plantas propagadas convencionalmente (Saitou et al., 2004; Tsegay et al., 2005; Taiz e Zeiger, 2013).

A complexidade e a variabilidade da radiação natural, e as reações de múltiplas respostas das plantas ao ambiente de cultivo, tornam difícil prever como determinada manipulação na radiação natural afetará uma resposta da planta.

O emprego da luz solar é uma forma de aumentar a irradiância no ambiente de cultivo *in vitro*. Plântulas crescidas neste sistema podem apresentar melhor desenvolvimento do sistema radicular, maior diferenciação do parênquima

paliçádico, cutículas mais espessas, melhor funcionamento dos estômatos (Khan et al., 2003; Nelson e Sage, 2008).

A luz solar ainda proporciona economia, reduzindo o emprego de iluminação artificial em salas de crescimento, que podem gerar elevados gastos com energia elétrica em uma biofábrica (Savangikar, 2004; Erig e Schuch, 2005). Na Áustria, por exemplo, o custo da iluminação artificial em salas de crescimento em 2001, chegava a US\$ 3,00 por metro quadrado por semana, sem incluir os reparos e a manutenção, o que poderia ser eliminado com o uso de salas de crescimento iluminadas com luz natural (Kodym e Zapata-arias, 2001).

Analisando trabalhos relacionados ao cultivo *in vitro* em diferentes níveis e qualidade de irradiância, e a utilização da luz natural, pode-se observar a vantagem da luz natural e dos níveis de irradiação mais elevados em todos eles (Kozai et al., 1995; Kodym e Zapata-arias, 1999; Kodym e Zapata-arias, 2001; Radmann et al., 2001; Soontornchainaksaeng et al., 2001; Hazarika, 2006; Araújo, 2007; Rocha, 2007; Dousseau et al., 2008; Braga et al., 2009; Dignart et al., 2009; Borges et al., 2011; Braga et al., 2011).

Silva et al. (2008), em seus estudos observaram maior perda de água em mudas de abacaxizeiro oriundas da micropropagação convencional quando comparadas com aquelas micropropagadas sob luz natural. Após 120 minutos das plântulas terem sido retiradas dos frascos, as que cresceram *in vitro* sob luz natural apresentavam 18% mais água do que no sistema convencional. A espessura foliar, em todos os tempos de aclimatização, foi maior em plantas originadas do cultivo *in vitro* sob luz natural. As folhas de abacaxizeiro providas de cultivo na luz natural com seis e dez meses em aclimatização apresentaram epiderme recoberta por cutícula em toda sua extensão. Com estas características Silva et al. (2008), afirmam que o emprego de luz natural, durante a fase de enraizamento *in vitro*, proporciona melhor desempenho agrônômico e anatômico das plantas de abacaxizeiro durante a fase de aclimatização, apresentando o benefício de economizar energia elétrica.

No trabalho de Júnior et al. (2012) plantas, cultivadas *in vitro*, de *Laelia purpurata* var. *carnea*, mantidas em casa de vegetação com maior radiação e variação de temperatura, apresentaram maior grau de diferenciação dos tecidos radiculares, maior espessura de velame na raiz, maior espessura da epiderme, maior densidade estomática e maior espessura do mesofilo na folha. Com isso,

Júnior et al. (2012) afirmam que plantas cultivadas em casa de vegetação são mais adequadas para cultivo *in vitro* e posterior cultivo *ex vitro*, quando comparadas com plantas cultivadas em sala de crescimento.

3.5.2 Temperatura

A temperatura não é muito citada como um fator com efeito no cultivo *in vitro* sobre luz natural, sendo estas relações mais discutidas e os efeitos associados à intensidade e qualidade luminosa. Mas, sabe-se que a temperatura afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas, principalmente, no que diz respeito aos efeitos dos processos metabólicos: fotossíntese, respiração e transpiração, além de outros processos, em interação com a luz. Por meio deles, a temperatura afeta a produtividade e a qualidade do produto, a indução e o desenvolvimento da flor, a germinação de sementes, a absorção e a utilização de água e de elementos minerais (Carvalho e Teixeira, 2009).

Plantas expostas a temperaturas mais elevadas podem ter seu crescimento acelerado, enquanto que as baixas temperaturas podem levar a mudanças morfológicas. A influência de baixas temperaturas provoca o aumento da espessura das folhas e do comprimento das células dos parênquimas paliçádico e lacunoso (Stefanowska et al., 1999; Gursuch et al., 2010). Em plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. cv Smooth Cayenne) cultivadas *in vitro* foi observado um aumento na espessura foliar associada ao aumento nas camadas do parênquima clorofiliano, além da presença de um sistema vascular mais evidente nas plantas mantidas a 28°C (dia)/15°C (noite) em relação àquelas cultivadas a 28°C constante (Nievola et al., 2005).

A percepção de baixas temperaturas reduz a ação de enzimas e leva a diversas mudanças no metabolismo das plantas, que incluem alterações no ciclo celular, na arquitetura da parede, na fluidez da membrana, no acúmulo de açúcares, no rearranjo do citoesqueleto e modificações na composição dos pigmentos fotossintéticos (Haldimann, 1999; Lemos et al., 2002; Benson, 2008; Taiz e Zeiger, 2013).

A ação da temperatura se faz sentir sobre as plantas, também por meio do “termoperiodismo”, que é a variação da temperatura do dia e da noite. Neste sentido, a maioria das plantas prefere temperaturas diurnas mais elevadas do que as noturnas. A relação ideal entre a temperatura diurna e a noturna, para

crescimento ótimo da planta, depende da intensidade luminosa do dia. Por isto, quando se faz o controle de temperatura, a noturna deve ser fixada em função da estação do ano, e a diurna em função da intensidade da luz durante o dia (Carvalho e Teixeira, 2009).

3.5.3 Trocas gasosas e umidade

A umidade relativa dentro do frasco de cultura depende da temperatura e do estado físico do meio de cultura utilizado e desempenha uma função importante no crescimento e desenvolvimento de mudas. A umidade relativa do ar, no ambiente externo ao frasco, também afeta o desenvolvimento vegetal *in vitro* e influencia a escolha do tipo de tampa a ser utilizada nos frascos (George e Debergh, 2008).

A redução da umidade relativa diminui a incidência de hiperhidricidade nas plantas *in vitro*, favorece a formação de cutícula nas folhas e o funcionamento normal dos estômatos, aumentando a tolerância ao estresse hídrico (Zobayed et al., 2001), o que pode facilitar no momento da aclimatização das plantas.

A forma de vedação dos frascos interfere nas trocas gasosas entre o microambiente interno e o ar atmosférico. Em recipientes pequenos e frascos vedados hermeticamente, ocorre um aumento na concentração de CO₂ no período noturno e de etileno dentro dos frascos podendo ter um efeito inibidor no crescimento e desenvolvimento das plantas (Filho et al., 2002).

Na propagação *in vitro*, a vedação dos frascos é obrigatória, pois evita a contaminação, além de prevenir a desidratação das plantas e do meio de cultura. No entanto, quando a vedação é excessiva ocorre elevada concentração de etileno e reduzida concentração de CO₂, restrição no fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e nas trocas gasosas, diminuindo as taxas de transpiração e a fotossíntese das plantas. Isso dificulta a absorção de água e nutrientes, causando redução na taxa de crescimento dos explantes podendo levar a elevadas perdas durante a aclimatização (Nguyen e Kozai, 2005; Zobayed, 2006; Xião et al., 2011). Assim, o ideal para a propagação *in vitro* seria manter as condições *in vitro* o mais semelhante possível das condições de cultivo *ex vitro*, com níveis adequados de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e de CO₂, bem como de trocas gasosas, entre outros fatores ambientais (Xiao et al., 2011).

O aumento das trocas gasosas no frasco de cultivo reduz a concentração interna de etileno. O acúmulo de etileno prejudica o desenvolvimento das plantas, afetando a diferenciação celular, a morfologia e o crescimento das plantas, diminuindo a expansão foliar e o comprimento dos brotos (Jackson et al., 1991), inibindo a regeneração de novos brotos (Biddington, 1992) e causando necrose apical nas plantas.

Embora um pequeno fluxo gasoso para dentro e fora do frasco de cultura de tecidos vegetais seja causado pelas variações na temperatura e pressão atmosférica na sala de cultura, a maior parte das trocas gasosas se dá por meio de difusão. A quantidade de oxigênio, bem como de outras fontes gasosas disponíveis para os tecidos vegetais cultivados *in vitro* podem ser influenciadas principalmente pela concentração do gás no ambiente atmosférico, pela taxa de difusão no frasco de cultura e para as células ou tecidos (George, 2008). O material utilizado na vedação dos frascos pode permitir a entrada de CO₂ no interior dos frascos pelo aumento da difusão gasosa, o que pode favorecer a fotossíntese e geralmente facilitar o processo de aclimatização (Zobayed, 2000; Gonçalves, 2008).

Ziv (1995) cita que plântulas em frascos que não permitem as trocas gasosas podem apresentar elevada transpiração cuticular e estomática. Nestas condições de ausência de trocas gasosas, os estômatos estão frequentemente abertos, o que leva a estresse hídrico na fase *ex vitro*.

3.6 Espécies trabalhadas

Cattleya warneri

Entre os vários gêneros da família Orchidaceae, *Cattleya* é considerado um dos maiores e mais importantes, devido ao seu valor ornamental e à sua diversidade, com aproximadamente 48 espécies, das quais 30 ocorrem no Brasil, e destas, 25 são endêmicas (Van den Berg e Martins, 1998). Além disso, é muito usado em cruzamentos na obtenção de híbridos interespecíficos e intergenéricos para fins comerciais. Ocorrem em florestas úmidas que variam do nível do mar até 1500 metros de altitude; têm alto valor decorativo, devido ao tamanho das suas flores e estão distribuídos por toda a América tropical (Van Den Berg e Martins, 1998; Neves, 2014). As espécies deste gênero são predominantemente

epífitas, e assim como a maioria das epífitas, apresentam metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (Adelberg et al., 1998). As espécies CAM respondem às alterações ambientais, tais como a intensidade da luz, umidade relativa do ar e disponibilidade de água, mudando seu comportamento fisiológico e bioquímico (Cushman e Borland, 2002).

A *C. warneri* é uma espécie endêmica dos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, norte do Rio de Janeiro e sul da Bahia. Por ser uma espécie ornamental e possuir elevado valor de mercado, há muito tempo vem sofrendo grande extrativismo na natureza. Suas plantas são robustas, vegetando preferencialmente como epífitas ou raramente como rupícolas. Prefere lugares com boa luminosidade, alto teor de umidade, com mudanças de temperatura entre 20 °C – 28 °C durante o dia e 15 °C e 20 °C à noite. São plantas unifoliadas, com os pseudobulbos subclavados e largas folhas elípticas. Geralmente possuem de duas a três flores por haste e são de longa duração, floresce em outubro/novembro (Withner, 1998; Kautsky, 2008; Vasconcelos, 2011; Neves, 2014). É enorme a descendência de *C. warneri*, com mais de 9.500 híbridos registrados (Withner, 1998).

Epidendrum secundum

O gênero *Epidendrum* é um dos maiores da família Orchidaceae, com cerca de 1.125 espécies (Chase et al., 2003). No Brasil já foram descritas 133 espécies (Barros et al., 2013). É um gênero de hábito terrestre e, ou, rupícola, comum em campos e em afloramentos rochosos dos campos de altitude (Caiafa e Silva, 2005). Dependendo das condições ambientais, pode apresentar o metabolismo CAM (Oliveira e Sajo, 1999). Essas orquídeas apresentam ampla distribuição geográfica, são conhecidas por toda a América Tropical; estão compreendidas na subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae, subtribo Laelliae (Van Den Berg et al., 2005).

E. secundum, nativa do Brasil, é uma espécie muito variável tanto na forma como no tamanho e na cor das flores. Suas flores são pequenas, geralmente róseas e o labelo possui margem denticulada. Floresce de março a agosto, frutificando a partir de junho. Cresce em locais ensolarados, com substratos pedregosos e arenosos. Ocorre também no interior da mata. Está presente na Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, na Floresta Ombrófila

Mista, Floresta Ombrófila Densa, Restinga e Afloramentos Rochosos (Flora SBS, 2014).

Encyclia

O gênero *Encyclia* pertencente à família Orchidaceae, subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae e subtribo Laeliinae. Possui cerca de 242 espécies distribuídas desde a Flórida, o México até o sul do Brasil e o nordeste da Argentina (Van Den Berg et al., 2005; Neves, 2014). No Brasil ocorrem 57 espécies (Barros et al., 2013). *Encyclia* é uma orquídea epífita, de crescimento simpodial e que costuma florescer no verão. Encontradas em florestas secas e úmidas, desde o nível do mar até altitudes de 3000 metros, dependendo da espécie. A maioria das espécies apresenta flores de pequeno porte em hastes rígidas de até 50 centímetros, com touceiras na base; podendo gerar até 60 flores por haste. A maior parte das espécies é encontrada no México e Índia. Poucas espécies deste gênero são endêmicas da América do Sul (Farias, 2008; Neves, 2014). Assim como muitas orquídeas epífitas, pode apresentar metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (Adelberg et al., 1998).

Encyclia pauciflora é uma espécie epífita, encontrada em Minas Gerais. Possui tamanho pequeno para médio. As plantas florescem no verão, dezembro no Brasil. Como o nome já diz, (do latim *paucus*, poucas e *florus*, que floresce) produz poucas flores por haste. As flores são verde-oliva - marrom ou verde. O labelo é branco ou raramente rosa com veias de cor púrpura. Cada haste floral produz quatro ou cinco flores. Esta espécie possui flores agradáveis e bastante perfumadas (Cattleya Orchid Source, 2010).

Encyclia osmantha é encontrada crescendo na floresta tropical de Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo em altitudes de 400-1200 metros. Planta floresce de outono para o inverno com até trinta flores. As flores são de aproximadamente cinco centímetros de largura e perfumadas (Orchids Wiki, 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso em um esquema fatorial 2 x 2, que constituiu de dois ambientes diferentes de cultivos (sala de crescimento e casa de vegetação) e dois tipos de tampas (metálica e plástica), com cinco repetições. Cada repetição consistiu de um frasco contendo 40 mL de meio de cultura e 10 plântulas.

4.2 Material vegetal e montagem do experimento

O experimento foi conduzido em dois ambientes: no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e na casa de vegetação do Orquidário Viridescens em Venda Nova do Imigrante-ES. As cápsulas de três espécies de orquídeas foram provenientes de doações feitas por orquidófilos da Associação Orquidófila de Campos (Orquidecampos). As espécies utilizadas foram: *E. secundum*, *C. warneri* e o híbrido primário de duas espécies: *E. pauciflora* x *E. osmantha*.

As cápsulas maduras e fechadas das três espécies foram flambadas em câmara de fluxo laminar. Em seguida, foram cortadas e as sementes de cada cápsula foram colocadas em um frasco com aproximadamente 150 mL de solução

de NaClO a 0,25% por 15 minutos sob agitação contínua, para que todas as sementes fossem desinfestadas igualmente.

Em seguida, as sementes foram colocadas em frascos-mãe contendo 40 mL de meio de cultura B&G Orchidées[®] solidificado com 12 g L⁻¹ de Ágar Bacteriológico Vetec[®] e pH ajustado para 5,7. O meio foi previamente autoclavado por 20 minutos a 120 °C e 1 atm de pressão.

O meio de cultura suprimento da linha B&G Orchidées é composto por 14 elementos minerais essenciais às plantas, sacarose (40 g L⁻¹) e carvão ativo.

As sementes de cada cápsula foram transferidas para quatro frascos, sendo dois frascos com tampa de plástico (polipropileno) e dois frascos com tampa de metal. Para aumentar a eficiência do controle de contaminantes, nos diferentes ambientes de cultivo, foi adicionado na parte interna das tampas um disco de papel filtro embebido em solução saturada de sulfato de cobre, que possui propriedade fungicida e bactericida. Os frascos foram em seguida, vedados com filme PVC. Um frasco-mãe de cada espécie e com cada tipo de tampa foi levado para germinação das sementes em casa de vegetação e em sala de crescimento.

4.3 Descrição do ambiente de cultivo

A casa de vegetação no Orquidário Viridescens está localizada no município de Venda Nova do Imigrante-ES com coordenadas 41°07'58" W de longitude e 20°19'29"S de latitude. O município está inserido no território Montanhas e Águas do Espírito Santo com altitude de 730 metros. O clima é mesotérmico, de inverno seco com temperatura média em torno de 18,5 °C, sendo a média das máximas em torno de 24,5 °C e a média das mínimas de 12,3 °C. A umidade relativa do ar é em torno de 85%. A precipitação média anual nos últimos 13 anos foi de 1.460 mm (INCAPER, Fonte IPES, 2014).

A sala de crescimento do Setor de Horticultura do LFIT/CCTA/UENF, está localizada em Campos dos Goytacazes-RJ, em condições controladas de luz e temperatura. O fotoperíodo é de 16h de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM[®] luz do dia e 8h no escuro, com temperatura de 27 ± 2°C.

Nos dois ambientes de cultivo foram monitorados temperatura (T), luminosidade e umidade relativa (UR) durante oito meses. Os dados foram

coletados pelo aparelho datalogger Kimo -Kistock KM 110. A partir dos dados de T (°C) e UR (%), foi obtido o déficit de pressão de vapor do ar (DPV_{ar}), de acordo com a equação proposta por Jones (1992).

4.4 Recultivos

Após três meses de cultivo *in vitro*, foi realizado o primeiro recultivo dos protocórmios para o novo meio de cultura, de mesma composição do frasco-mãe, sendo transferidos cerca de cem protocórmios para cada frasco. No segundo recultivo, seis meses após o início do experimento, foram transferidas dez plântulas para cada frasco, totalizando dez frascos com dez plântulas por tratamento. Após cinco meses do segundo recultivo, cinco frascos de cada tratamento foram utilizados para avaliação das plântulas na fase *in vitro*, e nos outros cinco frascos que restaram, foram retiradas as plântulas, lavadas em água corrente para remoção completa do meio de cultura e levadas para a aclimatização.

4.5 Avaliações do experimento

As plântulas foram avaliadas após 11 meses de cultivo em relação à taxa de sobrevivência, ao número de brotos, à área foliar, à massa da matéria seca da parte aérea e da raiz, ao volume radicular, à fluorescência da clorofila *a*, à intensidade de verde, aos teores de pigmentos fotossintéticos, às trocas gasosas e à massa foliar específica.

4.5.1 Determinação da taxa de sobrevivência e número de brotos

O parâmetro sobrevivência foi determinado pela contagem das mudas de cada tratamento que sobreviveram até o fim da fase do experimento *in vitro*. E o número de brotos foi determinado pela contagem de brotos por plântula dentro de cada frasco.

4.5.2 Determinação da área foliar

A área foliar foi medida com o auxílio do medidor de área foliar (modelo Licor 3100), cujo funcionamento se dá em tempo real, ou seja, a área é medida ou

tomada no momento em que a folha passa pelo sensor. Seu visor apresenta medidas de no mínimo 1,0 mm² e resolução de até 0,1 mm² (LI-COR, 1996).

4.5.3 Determinação da massa da matéria seca

As plantas foram acondicionadas em sacos de papel identificados, parte aérea e raízes separadamente e foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçada, a 70 °C até atingirem peso constante. Posteriormente foram pesadas em balança analítica para determinação da massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR).

4.5.4 Determinação do volume radicular

O volume radicular foi determinado com o auxílio de proveta de vidro de 25 mL com volume inicial de água conhecido. O volume radicular foi considerado como sendo o valor do deslocamento do líquido pela raiz na proveta.

4.5.5 Determinação da fluorescência da clorofila a

As variáveis da fluorescência da clorofila a: a eficiência fotoquímica e o índice fotossintético (PI) foram determinados por meio de um fluorímetro de luz não-modulado modelo Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk). Para tanto, foram utilizadas pinças, fornecidas pelo fabricante, para a adaptação do tecido foliar ao escuro por 20 minutos, para que todos os centros de reação adquirissem a condição de abertos (Q_a oxidada) (Bòlhar-Nordenkampf et al, 1989). Por meio do fluorímetro não-modulado, foi possível obter as medidas de fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e fluorescência variável (F_v). A partir dos valores de F_v e F_m foi possível obter a relação F_v/F_m (rendimento quântico máximo do fotossistema II) (Bòlhar-Nordenkampf et al., 1989). A indução da fluorescência foi feita por meio de um pulso de luz vermelha (650 nm) com duração de dois segundos com intensidade de 600 W m⁻² (100% de intensidade), obtido por meio de seis LEDs (Light Emitting Diodes), localizados na sonda do aparelho.

A vitalidade da planta foi caracterizada por meio do índice fotossintético, ou *performance index* (PI). Essa variável integra outras três variáveis independentes, como a densidade de centros de reação ativos, ou seja, a eficiência na absorção da luz (RCs/ABS), a capacidade do elétron em reduzir Q_a no PSII (TR/DI) e a

capacidade do elétron que reduziu Q_a em entrar na cadeia de transporte de elétrons ($ET/(TR-ET)$). A variável PI é um índice multiparamétrico, reflete a atividade dos fotossistemas I e II e fornece uma informação quantitativa sobre o estado atual da atividade fotoquímica da folha sobre condições de estresse (Strasser et al. 2000). Para o cálculo de PI foi utilizada a equação abaixo relacionada:

$$PI = [1 - (F_0/F_m) / (M_0 / V_J)] \times [(F_m - F_0) / F_0] \times [(1 - V_J) / V_J]$$

$$PI = [RC/ABS] \times [TR/DI] \times [ET/(TR-ET)]$$

Em que: F_0 é a fluorescência a 50 μs , F_J é a fluorescência no tempo J (2 ms), F_m representa a fluorescência máxima, V_J é a variável da fluorescência relativa a 2 ms calculada como $V_J = (F_J - F_0)/(F_m - F_0)$, M_0 representa a inclinação inicial da curva referente à cinética da fluorescência, que pode ser derivada da equação: $M_0 = 4 \times (F_{300\mu s})/(F_m - F_0)$. $RC/ABS = 1 - (F_0/F_m)/(M_0 / V_J)$; $TR/DI = (F_m - F_0)/F_0$; $ET/(TR-ET) = (1 - V_J) / V_J$.

4.5.6 Intensidade de Verde

A intensidade da cor verde das folhas foi estimada por meio do Medidor Portátil de Clorofila, modelo SPAD-502 “Soil Plant Analyser Development” (Minolta, Japão). Foram realizadas cinco leituras por folha e em seguida foi obtida a média.

4.5.7 Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos

A quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e total) e de carotenoides foi determinada de acordo com Wellburn (1994). Seis discos foliares com 28,26 mm² de área foram colocados em tubos de ensaio, recobertos com papel alumínio, contendo 4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente orgânico. Foram mantidos no escuro, a fim de se evitar a degradação dos pigmentos pela ação da luz durante o período de extração. Após 24 horas, o extrato foi analisado em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm. As razões clorofila *a/b* e clorofila total/carotenoides foram calculadas. Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em um ambiente de pouca luz para evitar degradação dos pigmentos.

4.5.8 Determinação das trocas gasosas

A taxa fotossintética líquida, a condutância estomática, a transpiração e a relação da concentração interna de CO₂/ concentração externa de CO₂ (Ci/Ca) foram determinadas por meio de um analisador de gás a infravermelho (IRGA), modelo LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Foi feito o uso de luz artificial (LEDs), com fluxo de fótons fotossintéticos ajustado para 300 μmol m⁻² s⁻¹. De acordo com os dados do IRGA, no momento da avaliação a média das variáveis foi: CO_{2ar cv}=387 μmol mol⁻¹, CO_{2ar sc}=383 μmol mol⁻¹, UR%_{ar cv}= 38%, UR%_{ar sc} = 37%, T_{cv}= 22,6 °C e T_{ar sc} = 26,3 °C.

As folhas de orquídeas quando saíram da condição *in vitro*, estavam muito pequenas para serem utilizadas pelo aparelho. Desta forma, para as medições foram necessárias três a quatro folhas coladas uma às outras para ocupar a área de 6 cm² da câmara e permitir que as medições pudessem ser feitas. Esta avaliação foi realizada entre 09 e 12 horas, nos dois ambientes de cultivo, em Campos dos Goytacazes no dia 18/06/2013 e em Venda Nova do Imigrante no dia 26/06/2013.

4.5.9 Massa foliar específica

Foram extraídos discos foliares com área de 28,26 mm², e, após secagem em estufa de ventilação forçada até atingir peso constante, foi determinada a massa da matéria seca. Para determinação da massa foliar específica (MFE), foi obtida a razão entre a massa da matéria seca e área dos discos foliares.

4.6 Análise estatística

Inicialmente foram verificadas as pressuposições de normalidade e de homogeneidade de variâncias dos tratamentos para que os dados fossem submetidos à análise de variância. Atendidos estes pré-requisitos, foi feita a análise de variância e os dados qualitativos foram submetidos ao teste de médias (Tukey a 5 % de probabilidade).

Para os parâmetros Ci/Ca, transpiração e condutância não houve distribuição normal pelo teste de Lilliefors para *Epidendrum secundum*, sendo adotada para estes parâmetros a estatística descritiva.

Para os dados de clorofila, SPAD e massa foliar específica foi utilizado o programa ASSISTAT Versão 7.7 beta (Silva e Azevedo 2009). Para os demais parâmetros biométricos e fisiológicos utilizou-se o programa software estatístico SAEG (SAEG, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliações das condições ambientais

A temperatura na sala de crescimento (SC) teve uma amplitude térmica de aproximadamente 10°C, variando entre 22°C a mínima e 32°C a máxima. Apesar do ar condicionado ficar ligado 24 horas para manutenção da temperatura constante e ideal ao crescimento das plântulas *in vitro*, as lâmpadas fluorescentes quando acessas durante o dia (16 horas), promovem um aumento da temperatura, e no período da noite, quando as lâmpadas ficam desligadas (oito horas), ocorre uma queda na temperatura, o que provocou amplitude térmica na sala de crescimento (Figura 1.A).

Já na casa de vegetação (CV) onde a temperatura é ambiente, esta varia muito dependendo da estação do ano e das condições climáticas do local, tendo uma variação muito maior do que a encontrada na sala de crescimento. A amplitude térmica entre a maior (35°C) e menor (12°C) temperatura encontrada durante todo o período que as plântulas permaneceram na CV chegou a 23 °C (Figura 1.B).

Alguns fatores provocam questionamentos sobre os efeitos da luz natural nas culturas como o aumento e a oscilação da temperatura dentro dos frascos de cultivo. Ahloowalia & Savangikar (2004) afirmam que muitas plântulas cultivadas *in vitro* são capazes de tolerar altas flutuações de temperatura e se adaptam

melhor às condições de campo, quando aclimatizadas, do que aquelas que são cultivadas sempre sob a mesma temperatura.

A umidade relativa na SC em média foi de 40%, tendo valores mais elevados no período da noite e menores durante o dia, provavelmente devido às lâmpadas acessas no período do dia que, juntamente com o ar condicionado, ressecam o ar, fazendo com que a umidade relativa caia (Figura 1.C). Na CV, assim como ocorre com a temperatura, a oscilação da umidade também é muito alta, com uma média de 80%, o dobro da SC. Este valor se justifica pelo fato da CV estar localizada em um ambiente mais úmido e não possuir ar condicionado, e periodicamente o chão, coberto por britas, é irrigado para aumentar a umidade (Figura 1.D).

O decréscimo na umidade relativa com a maior troca gasosa no interior do frasco aumenta significativamente a taxa de transpiração da planta, e conseqüentemente a absorção de água e de nutrientes (Aitken-Christie et al., 1995). Ao mesmo tempo, a redução da umidade relativa diminui a incidência de hiperhidricidade nas plantas, favorece a formação de cutícula nas folhas e o funcionamento normal dos estômatos, aumentando a tolerância ao estresse hídrico (Zobayed et al., 2001) facilitando a aclimatização das plantas.

A média do déficit de pressão de vapor do ar (DPV_{ar}) na SC está entre 2,0 e 2,5 kPa, (Figura 1.E), o que é bem superior à CV que está entre 0,5 a 1,0 kPa (Figura 1.F). Isso se deve à SC ter o ar condicionado que ajuda a promover uma maior secar do ar, o que não ocorre na CV que devido ao chão ser molhado frequentemente, promove um aumento na umidade ambiente e diminui o DPV.

A intensidade luminosa no decorrer do período que as plântulas permaneceram *in vitro* foi bem superior na SC. O máximo de luz que chegou para as plântulas na SC foi de $52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1.G), já na CV foi de $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1.H). No caso das plântulas na SC, as lâmpadas ficam muito próximas aos frascos, possibilitando que chegue maior quantidade de luz dentro do frasco de cultivo. Já a CV é coberta com telha de fibra de vidro e sombrite de 30%, provocando uma interceptação da luz em torno de 85%, o que gera um sombreamento excessivo na CV, impedindo que a luz solar penetre com maior intensidade.

A partir dos dados de quantidade de luz que chega até cada um dos ambientes, foi possível calcular a quantidade de luz dentro de cada frasco com

tampa de plástico e tampa de metal, mas a diferença foi mínima. Isto se deve provavelmente ao disco de papel filtro que foi colocado nas tampas embebido em sulfato de cobre. Apesar da tampa de plástico ser transparente, o filtro praticamente igualou a entrada de luz por esta tampa com a tampa de metal.

No caso da CV, a disponibilidade de luz varia com a intensidade solar, que depende das condições climáticas, da hora do dia e da época do ano. Kodym & Zapata-arias (2001), obtiveram maiores taxas de multiplicação de bananeiras micropropagadas sob luz natural durante o verão, já no inverno, com a luminosidade menos favorável, a taxa de micropropagação caiu. A decisão pela utilização ou não da luz natural depende da espécie a ser micropropagada, da técnica *in vitro* utilizada (heterotrófica, fotomixotrófica ou fotoautotrófica) e das condições climáticas do local (Kodym & Zapata-arias, 1999).

A alta umidade relativa (próximo de 100%) e a baixa irradiância são os principais fatores que provocam alterações na estrutura e no funcionamento dos estômatos, causando a baixa capacidade das mudas *in vitro* em controlar a perda de água, quando submetidas em condições de ambiente natural (Schmidt, 2010).

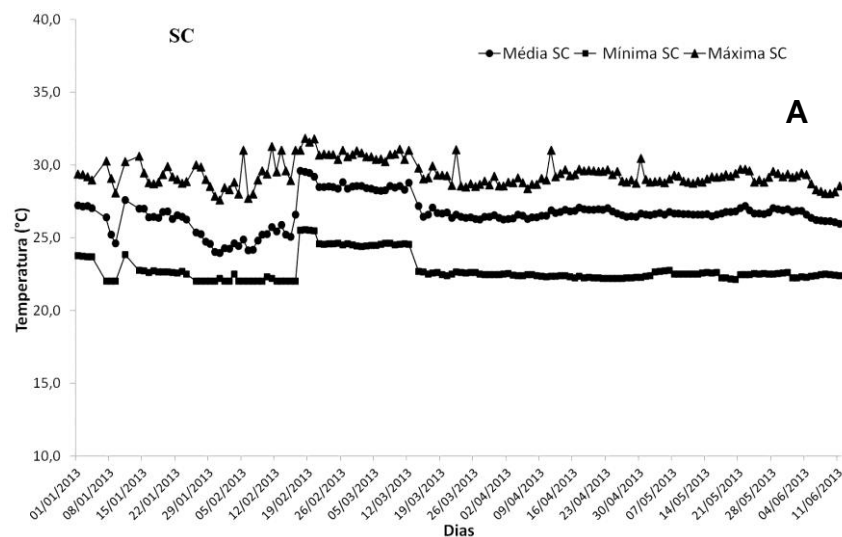


Figura 1 – Gráficos da Sala de Crescimento (SC) e Casa de Vegetação (CV) de temperatura (A e B), umidade relativa (C e D), déficit de pressão de vapor (E e F) e fluxo de fótons fotossintéticos (G e H).

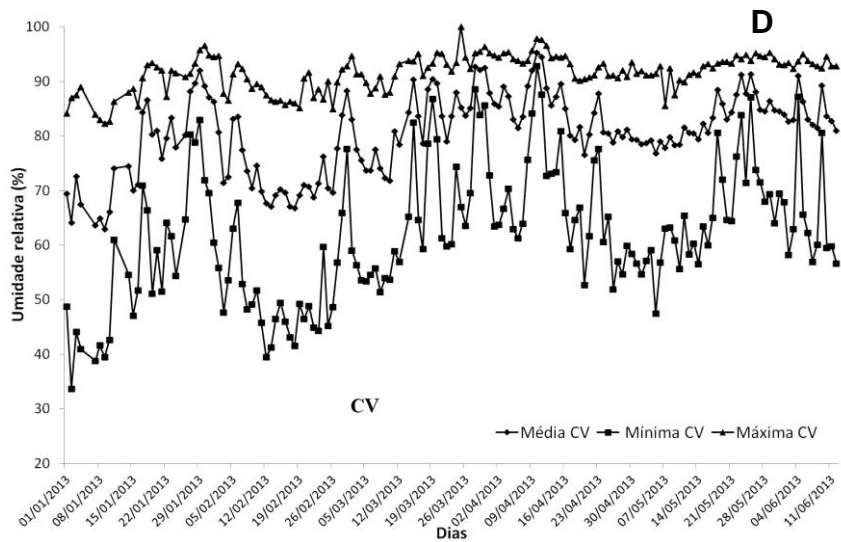
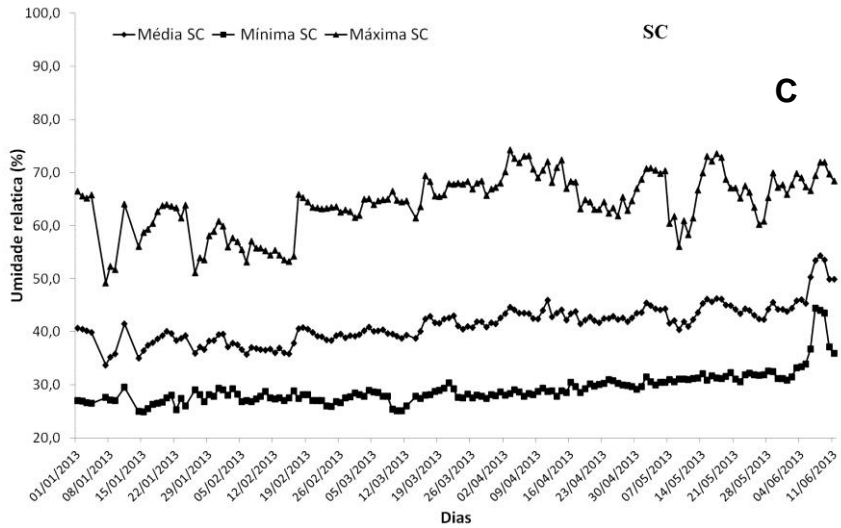
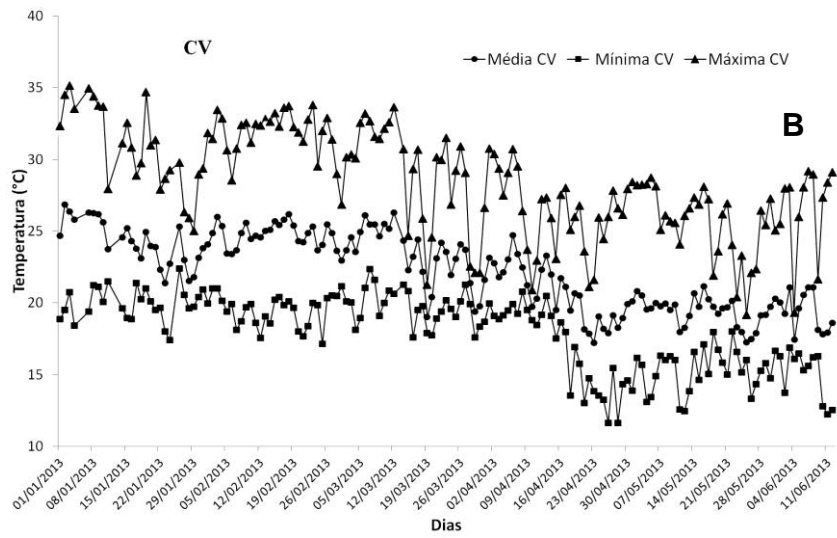


Figura 1 – Cont.

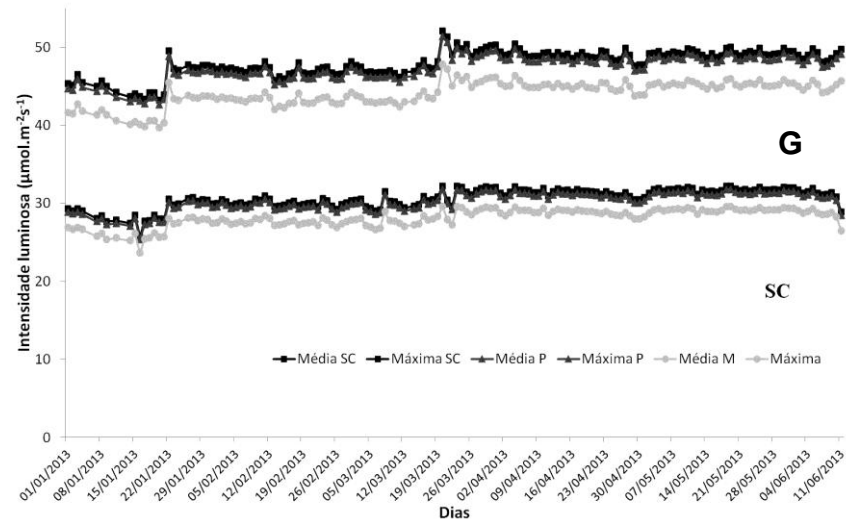
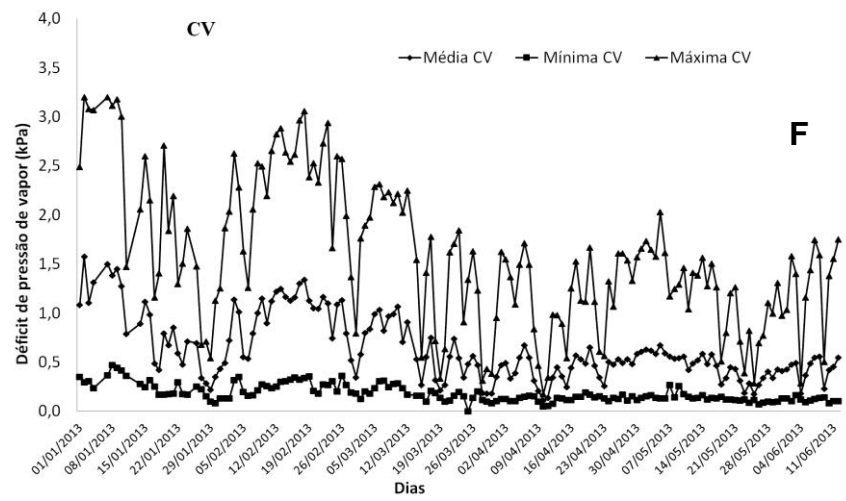
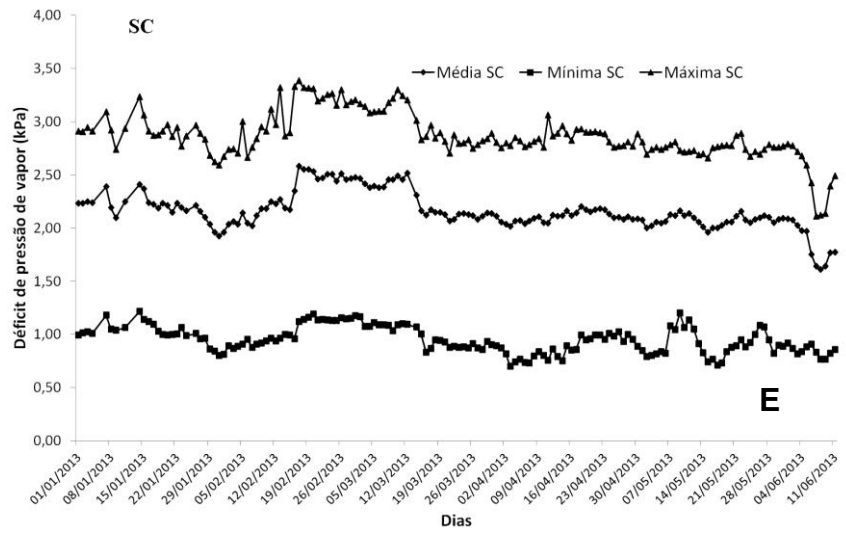


Figura 1 – Cont.

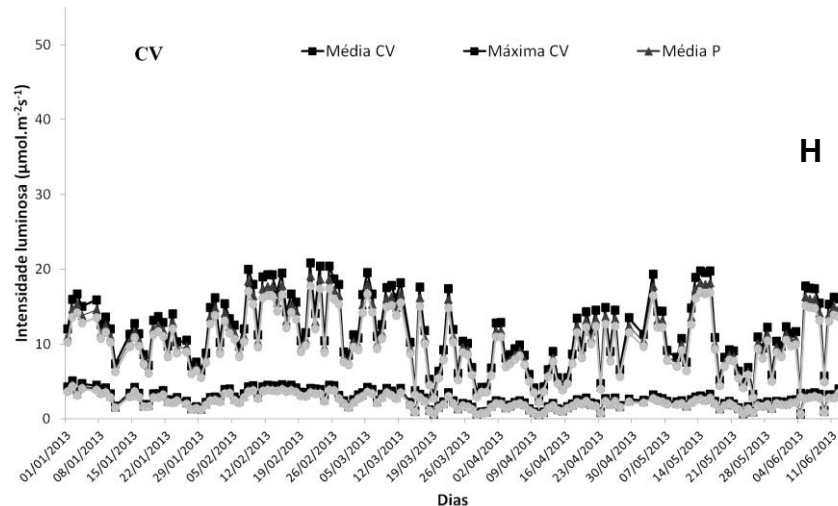


Figura 1 – Cont.

A distribuição do espectro da radiação luminosa emitida pelas lâmpadas foi feita com auxílio do aparelho Ocean Optics® (USB 2000+RAD, USA).

O gráfico (Figura 2) mostra dois picos de luz na SC, sendo um no comprimento de onda 545 nm (região do verde) e 435 nm (saindo da região do roxo e entrando no azul). Já a CV recebe uma maior quantidade de comprimentos de ondas tendo um pico maior na região do verde, 529 nm.

A luz é um fator fundamental na vida das plantas. A quantidade e a qualidade da luz, bem como o fotoperíodo, podem exercer função direta ou indireta na regulação do crescimento e desenvolvimento de plântulas *in vitro* (Economou e Read, 1987; Morini e Muleo, 2003).

No trabalho de Norton et al. (1988), a luz vermelha, em comparação à luz branca, incrementou o número de brotos axilares em culturas *in vitro* de *Rhododendron*, *Potentilla* e *Spiraea* e em porta-enxerto de *Prunus* GF 677, proporcionou aumento do comprimento dos entrenós (Morini e Muleo, 2003). Kim et al. (2004) verificaram alongamento dos entrenós de crisântemos cultivados sob LED's na faixa do vermelho e vermelho-distante. Chang et al. (2003) verificaram que os LED's vermelhos e azuis utilizados em copo de leite, mostraram respostas diferentes entre espécies, no entanto, houve uma superioridade dos LED's vermelhos, os quais estimularam o maior comprimento dos brotos e da massa da matéria fresca da parte aérea.

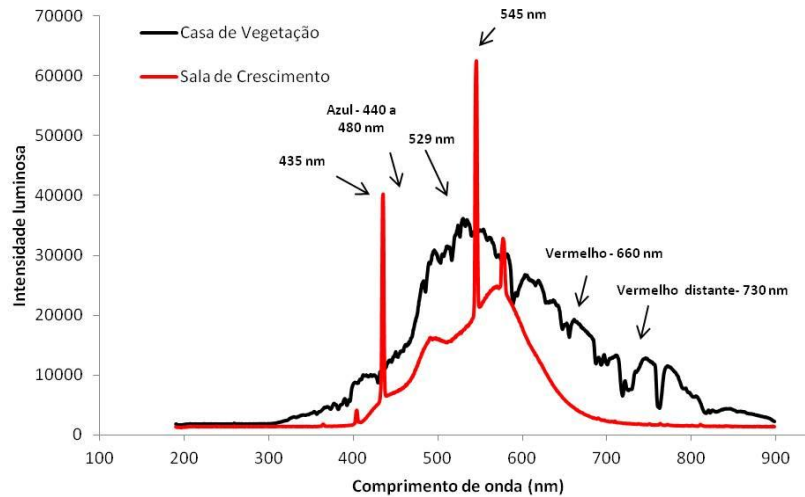


Figura 2 – Distribuição do espectro luminoso na sala de crescimento e na casa de vegetação.

5.2 Variáveis de crescimento

A massa da matéria seca da parte aérea das duas espécies trabalhadas *Epidendrum secundum* (Es), *Cattleya warneri* (Cw) e do híbrido *Encyclia pauciflora* x *Encyclia osmantha* (Ec) apresentou diferenças significativas. A Ec obteve um maior acúmulo de biomassa na sala de crescimento (SC) não havendo diferença no tipo de tampa. As plântulas de Es apresentaram maior acúmulo de biomassa na SC com tampa plástica (Tp) (0,0590 g) do que na casa de vegetação (CV) com tampa metálica (Tm) (0,0310 g). Para Cw nas condições de CV com Tp (0,0330 g) foram observados valores superiores aos obtidos com Tm na SC (0,0190 g) (Figura 3.A).

Para matéria seca da raiz, a espécie Cw não apresentou diferença entre os tratamentos. Já para Ec, a SC com Tp apresentou um maior incremento de raiz do que as plântulas desenvolvidas em CV nos dois tipos de tampa. O Es também obteve um maior incremento de raiz na SC, porém com a Tm (Figura 3.B).

O meio de cultura utilizado apresenta alta concentração de sacarose (40 g L⁻¹). Estudos comprovaram que 75 a 85% do aumento da biomassa em cultivos *in vitro* devem-se à incorporação de carbono via sacarose (De Riek et al., 1997). Assim sendo, a utilização de sacarose em altas concentrações gera plântulas com metabolismo heterotrófico ou mixotrófico e, em muitas espécies, verifica-se que ocorre um aumento na biomassa seca nessas condições. Schmidt (2010) em seu

trabalho observou que crescentes concentrações de sacarose no meio promoveram incrementos na massa da matéria seca da parte aérea em mamoeiro 'Golden'. Resultados similares foram obtidos por Crespo (2007) e Mothé et al. (2008), constatando um aumento da biomassa da parte aérea e da raiz, quando a concentração de sacarose foi aumentada em mudas de cana-de-açúcar.

Stancato e Tucci (2010) ressaltaram que o acúmulo de matéria seca de plantas está positivamente correlacionado com o alto conteúdo de sacarose no meio de cultura.

Em plantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro* foi observado o acúmulo de biomassa na parte aérea em frascos de cultura com membranas e meio de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose com enriquecimento de CO₂. A massa da matéria seca de raiz apresentou maiores valores em meios de cultura sem sacarose e com membrana (Saldanha et al., 2013).

A área foliar nas três espécies estudadas apresentou diferença significativa. As plântulas da Ec que permaneceram na SC apresentaram maior área foliar do que as plântulas da CV independente da tampa. O Es apresentou uma maior área nas plântulas da SC com Tm (9,85 cm²) e o pior resultado na CV com Tm (6,04 cm²). Já a Cw obteve uma maior área nas condições de CV com as duas tampas, e resultado inferior na SC com Tm (Figura 3.C).

Lee et al. (1988) e Dousseau et al. (2008) afirmam que baixas intensidades luminosas reduzem a divisão celular, resultando em reduzida área foliar, produzindo folhas mais delgadas, o que foi observado para as espécies Ec e Es. Entretanto, embora a CV tenha menor intensidade luminosa, as plântulas de Cw neste trabalho apresentaram maior área foliar nesta condição. Shin et al. (2013) trabalhando com plântulas de *Doritaenopsis*, observaram que em cultivo heterotrófico, onde não houve troca gasosa entre o interior e o exterior do frasco de cultura, o crescimento das plântulas foi menor e a área foliar diminuiu cerca de 56% quando comparado com plântulas cultivadas em condições fotoautotróficas e fotomixotróficas.

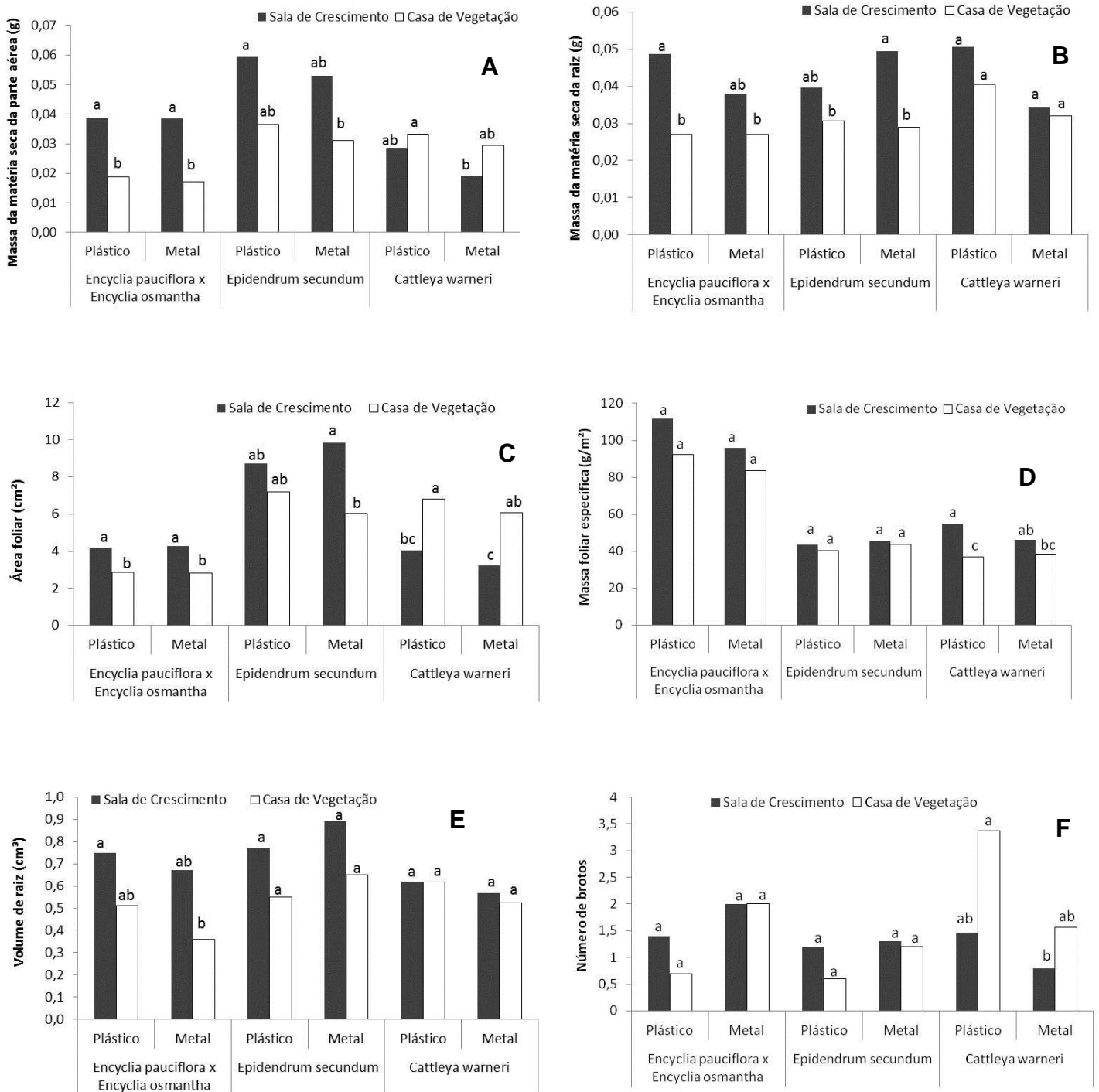


Figura 3 – Massa da matéria seca da parte aérea (A) e da raiz (B), área foliar (C), massa foliar específica (D), volume de raiz (E) e número de brotos (F) de três espécies de orquídea: *Encyclia pauciflora* x *Encyclia osmantha*, *Epidendrum secundum* e *Cattleya warneri* cultivadas *in vitro* durante 11 meses. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Das três espécies estudadas a Ec e o Es não apresentaram diferença significativa para a massa foliar específica. As plântulas de Cw na SC com Tp apresentaram maior espessura do que as plântulas desenvolvidas sob a condição de CV nos dois tipos de tampa (Figura 3.D). A SC apresentou maior intensidade luminosa, que pode ter sido responsável por esta maior espessura foliar obtida em Cw. Os maiores valores desta variável podem indicar folhas mais espessas, com maior quantidade de células e com menor espaço aéreo interno.

Resultados obtidos por Lee et al. (1988) e Dousseau et al. (2008) sugerem que altas intensidades de luz propiciaram um aumento no tamanho das células do mesofilo, maior espessura da folha, bem como uma compactação celular mais pronunciada, em folhas cultivadas de *Liquidambar styraciflua* L. Braga et al. (2011) trabalhando com abacaxizeiro 'Gomo de Mel' em luz natural observaram maior espessura dos tecidos do limbo foliar e maior número de estômatos demonstrando a adaptação dos tecidos às condições de alta irradiância. O aumento na espessura dos tecidos que compõem o limbo constitui um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade de luz e evidencia a plasticidade adaptativa da planta (Lee et al., 2000).

O volume de raiz para Es e Cw não apresentou diferença significativa. Para Ec os resultados em SC com Tp ($0,75 \text{ cm}^3$) foram melhores do que em CV com Tm ($0,36 \text{ cm}^3$) (Figura 3.E).

O número de brotos para Ec e para Es não apresentou diferença significativa em nenhum dos tratamentos. Já para Cw o número de brotos foi maior na CV com tampa de plástico (Tp) do que na SC com a tampa de metal (Tm) (Figura 3.F).

Resultados semelhantes foram encontrados por Borges et al. (2011) e Kodym & Zapata- Arias (1999) trabalhando com mudas de crisântemo e banana, respectivamente, onde foi obtido maior número de brotações em CV do que em SC. Já Dignart et al. (2009) trabalhando com *Cattleya walkeriana* obtiveram maior número de brotos em plântulas mantidas em CV sem sombrite e em SC do que em CV com sombreamento.

Em relação ao tempo de desenvolvimento das plantas, a avaliação de medidas biométricas pode ser uma excelente ferramenta para se investigar a capacidade produtiva de genótipos de interesse agrônômico (Torres Netto, 2005). Estas avaliações associadas às medidas da capacidade fotossintética podem ser

usadas para a investigação do efeito de fatores ambientais sobre o crescimento e a adaptabilidade de espécies em diferentes ecossistemas (Villar *et al.*, 2005).

Estudos indicam que o crescimento das plântulas pode ser significativamente promovido pelo aumento na intensidade da luz e da concentração de CO₂, e por remoção de gases que podem retardar o crescimento, tais como o etileno (Lian *et al.*, 2002;. Yoon *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2011).

5.3 Trocas gasosas

De acordo com os dados da taxa fotossintética líquida, a *Ec* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, cujos valores médios da taxa fotossintética ficaram entre 0,98 e 1,17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Na espécie *Es* foi observado uma maior taxa fotossintética nas plântulas na CV com os dois tipos de tampa, o que não refletiu em maior acúmulo de biomassa, que no caso desta espécie foi em SC (Figura 4.A).

As plântulas das espécies *Es* e *Cw* crescidas na condição de SC com Tm apresentaram fotossíntese líquida negativa, demonstrando que nestas condições as plântulas no momento da avaliação apresentavam taxa respiratória maior do que a taxa fotossintética. Nas demais condições, a *Cw* apresentou taxa fotossintética positiva (Figura 4.A). Pode-se associar essa resposta à alta concentração de sacarose no meio de cultura, o que é relatado em alguns trabalhos (Hdider e Desjardins, 1994; Mosaleeyanon *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2007; Schmildt, 2010) e pode ser confirmado neste trabalho, com um meio contendo 40 g L⁻¹ de sacarose.

Segundo Hdider e Desjardins (1994), o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura pode ocasionar acúmulo de amido e, ou inibição da enzima RUBISCO. De acordo com Kozai (1991) e Kitaya *et al.* (1995), na propagação *in vitro* convencional as mudas se desenvolvem como organismos heterotróficos, ou seja, realizam pouca ou nenhuma fotossíntese utilizando a sacarose no meio de cultura como principal fonte de carboidrato. Em plântulas de coco, Fuentes *et al.* (2007) confirmaram uma diminuição linear da atividade da enzima RUBISCO, com aumento dos níveis de sacarose no meio.

Kozai *et al.* (1990) observaram que mudas micropropagadas de *Cymbidium* sp. apresentaram maiores taxas fotossintéticas líquidas e, maior crescimento, quando os frascos foram enriquecidos com CO₂ e cultivados sob intensidade

luminosa alta ($226 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em ausência de sacarose. Esses mesmos autores concluíram que o fornecimento de condições favoráveis à fotossíntese resultou em crescimento autotrófico para o cultivo *in vitro* quando não havia sacarose presente no meio de cultura.

Mosaleeyanon et al. (2004) obtiveram a maior taxa fotossintética em *Samanea saman* Merr na ausência de sacarose no meio de cultura, e à medida que se aumentou a concentração de sacarose e CO_2 simultaneamente houve a redução na taxa fotossintética. Em condição de cultivo na ausência de sacarose, Schmidt (2010) encontrou maior assimilação fotossintética de carbono, e à medida que houve incremento de sacarose foi ocorrendo redução na taxa fotossintética.

Plântulas de *Doritaenopsis* cultivadas em condições enriquecidas com CO_2 e alta intensidade de luz mostraram uma elevada absorção de CO_2 durante toda a fase *in vitro* e a absorção de CO_2 foi notavelmente elevada em tratamentos fotoautotróficos. As mudas cultivadas em ambiente enriquecido com CO_2 e em alta intensidade de luz mostraram metabolismo semelhante ao de plantas CAM (metabolismo ácido das crassuláceas). A ativação do metabolismo CAM ou C3 depende do microambiente (Shin et al., 2013).

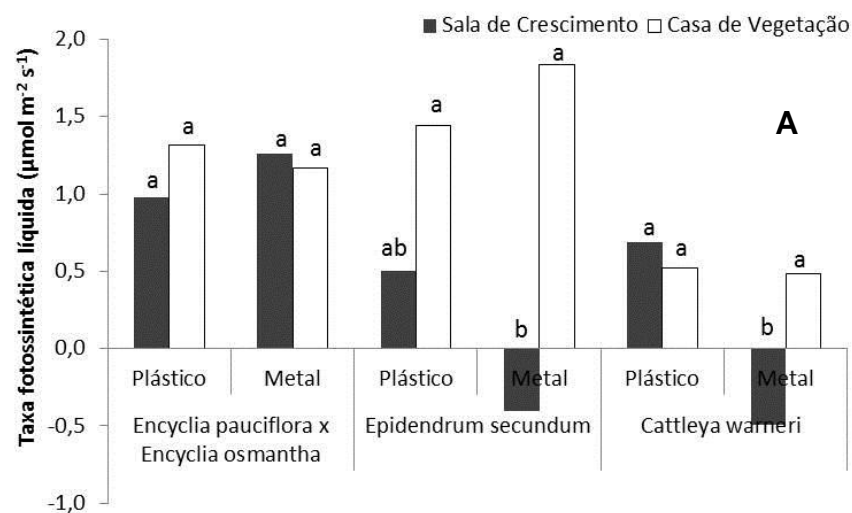


Figura 4– Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), transpiração (C) e concentração interna de CO_2 / concentração externa de CO_2 (Ci/Ca) (D) das orquídeas: *Encyclia pauciflora* x *Encyclia osmantha*, *Epidendrum secundum* e *Cattleya warneri* cultivadas *in vitro* durante 11 meses. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. A estatística descritiva das variáveis condutância estomática (B), transpiração (C) e concentração interna de CO_2 / concentração externa de CO_2 (Ci/Ca) (D) da espécie *Epidendrum secundum* está apresentada no gráfico em forma de barras com valores de intervalo de confiança.

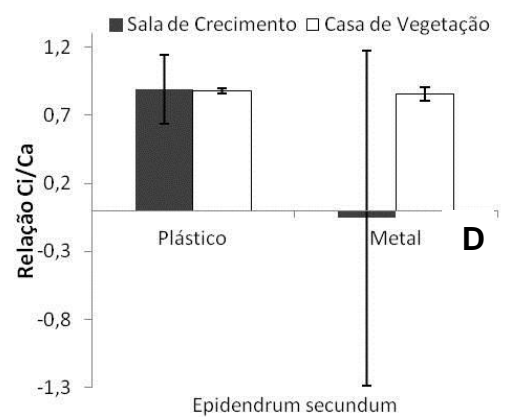
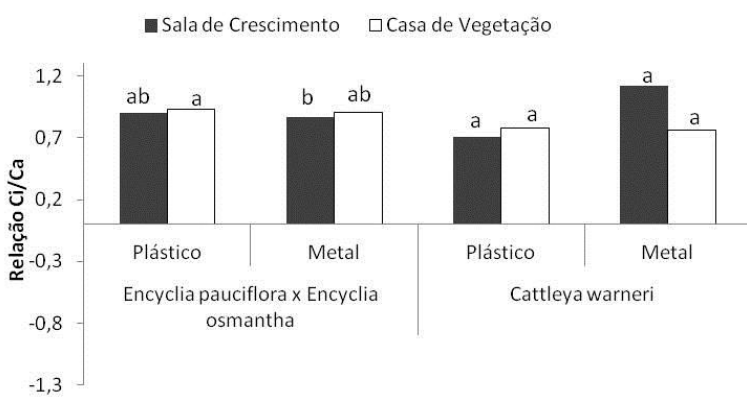
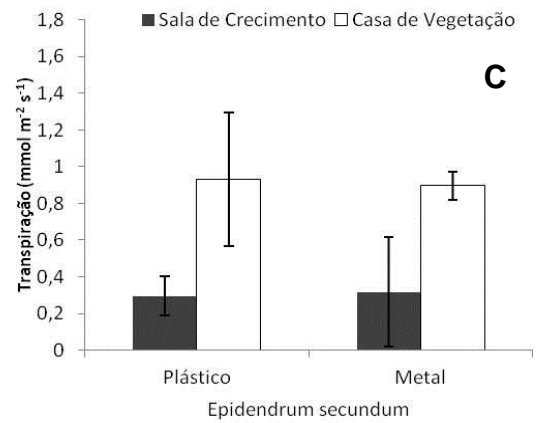
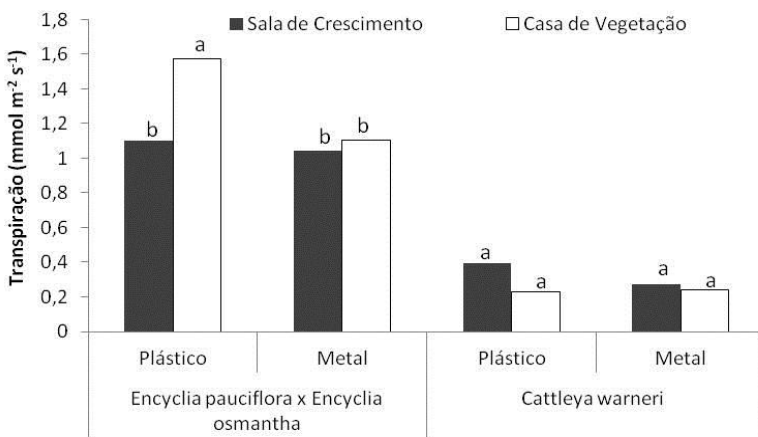
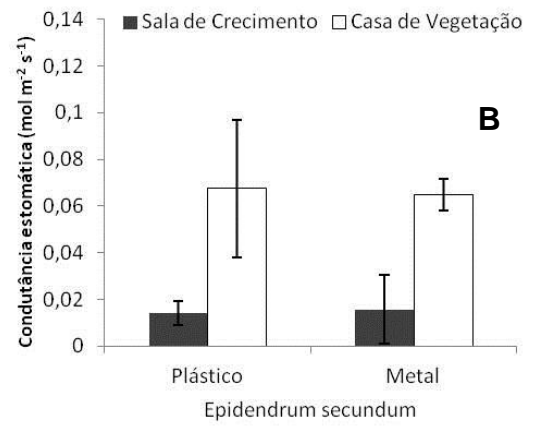
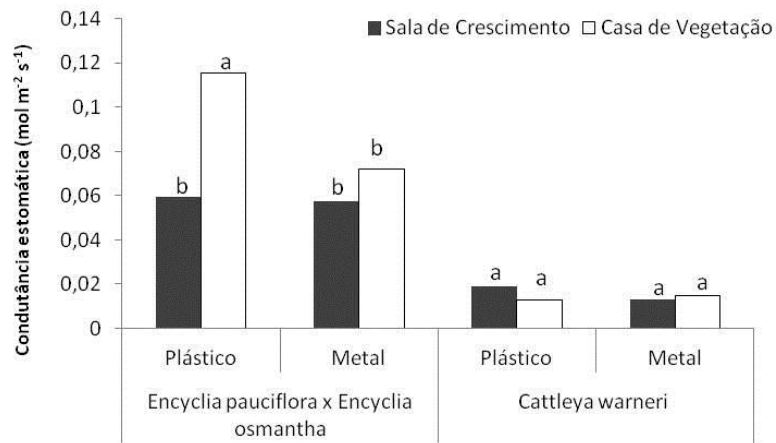


Figura 4–Cont..

Para as variáveis condutância estomática e transpiração, as espécies responderam de maneira semelhante. A *Ec* na CV com *Tp* apresentou maiores valores: $0,1157 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $1,5730 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Para *Es*, maiores médias também foram observadas na CV independente da tampa, e na *Cw* não houve diferença significativa (Figuras 4.B e 4.C). A baixa condutância encontrada nas três espécies pode ser considerada praticamente como sendo cuticular e não estomática.

Segundo Costa et al. (2009c), é provável que a excessiva transpiração das folhas *in vitro* se deva à alta densidade estomática, principalmente na face abaxial, ao ineficiente controle de perda de água pelos estômatos e à ausência ou baixa quantidade de cera epicuticular.

Crespo (2007) trabalhando com cana-de-açúcar em frascos ventilados observou que a troca gasosa no interior destes promoveu maior ajuste estomático, devido provavelmente à movimentação de ar em torno das plântulas, ocasionando melhor regulação na abertura e no fechamento dos estômatos. Ziv (1995) cita que plântulas micropropagadas em frascos que não permitem as trocas gasosas podem apresentar elevada transpiração cuticular e estomática.

Louro e Santiago (2000), afirmam que plantas *in vitro* apresentam estômatos anômalos, e uma grande parte é incapaz de fechar, e que esta anomalia pode ser atribuída à perda de elasticidade das paredes das células guardas, o que impediria o movimento de abertura e fechamento. Nestas condições, quando submetidas às condições de ambiente *ex vitro*, as plantas produzidas *in vitro* têm baixa capacidade de controlar a perda de água (Sutter et al., 1988; Barboza, et al., 2006), ocorrendo também a ausência de trocas gasosas e os estômatos ficam frequentemente abertos, o que leva a estresse hídrico, relatado como principal causa de mortalidade das plantas durante a aclimatização (Barboza, et al., 2006).

A relação C_i/C_a (concentração interna de CO_2 /concentração externa de CO_2) para as espécies *Cw* e *Es* não apresentou diferença significativa entre os ambientes e tipos de tampas; já a *Ec* na CV com *Tp* apresentou uma maior relação C_i/C_a do que na SC com *Tm* (Figura 4.D). A relação C_i/C_a é um bom indicador de limitação estomática da fotossíntese, e seus valores mudam de acordo com o habitat, sendo maior em espécies mesomórficas do que em xeromórficas, tais como epífitas vasculares (Lloyd e Farquhar, 1994).

Em um cultivo *in vitro*, a utilização do fechamento dos tubos de ensaio e frascos com tampa plástica e filme de PVC, além de restringir as trocas gasosas, favorece a alta umidade dentro dos frascos, podendo ocasionar hiperhidricidade e estômatos anormais (Kozai et al., 1986). Kozai e Kubota (2001) relataram que as mudanças no microambiente dos frascos de cultura, promovidas pelas trocas gasosas, favorecem a manutenção da concentração de CO₂, estimulam a fotossíntese e reduzem a concentração de etileno e a umidade relativa dentro dos frascos de cultivo.

5.4 Índice de SPAD, clorofila, relação Fv/Fm e índice fotossintético (PI)

Neste trabalho, para as três espécies avaliadas Ec, Es, Cw, não houve diferença significativa entre os tratamentos para a estimativa de cor verde das folhas. Este fato evidencia que não ocorreu ganho no conteúdo de clorofila total com a utilização de dois ambientes diferentes e dois tipos de tampa, conforme mostra o índice SPAD, devido provavelmente à baixa irradiância (Figura 5.A). Torres-Netto et al. (2002) afirmam que valores elevados do índice SPAD indicam uma ótima disponibilidade de N no tecido foliar, bem como excelente quantidade de pigmentos fotossintéticos.

O medidor portátil de clorofila Minolta SPAD-502 tem sido usado como ferramenta para detectar estresses abióticos em diversas culturas, como o hídrico, o de nitrogênio e o salino. Este medidor apresenta simplicidade no uso e possibilita uma avaliação não destrutiva do índice de verde presente no tecido foliar (Torres Netto et al., 2002; 2005; Pecanha, 2010; Castro, 2011).

Na Figura 5.B são apresentados os dados da relação Clorofila a/Clorofila b. As espécies Ec e Es não apresentaram diferença significativa, já a espécie Cw na SC com Tp apresentou maior valor (2,14) do que na SC com Tm (1,21). Plantas expostas a elevados fluxos de fótons fotossintéticos (FFF) apresentam razões clorofila a/b em torno de 3,2 a 4,0 e plantas crescendo em ambientes com reduzidos FFF possuem razões a/b em torno de 2,5 a 2,9 (Seybold e Egle, 1970). Os valores de Ca /Cb em todas as condições e espécies foram menores que 2,5, o que demonstra que o FFF nos dois ambientes estava muito baixo.

O teor de clorofila da folha se correlaciona positivamente com o teor de N na planta (Schadchina & Dmitrieva, 1995) e com o rendimento das culturas

(Smeal & Zhang, 1994; Piekielek & Fox, 1992). Esta relação é atribuída, principalmente, ao fato de que 50 a 70% do N total das folhas ser integrante de enzimas (Chapman & Barreto, 1997) que estão associadas aos cloroplastos (Stocking & Ongun, 1962). Parâmetros como o teor de clorofila na folha, pode ser uma importante ferramenta para aumentar a precisão no processo de recomendação de adubação nitrogenada (Argenta et al., 2001).

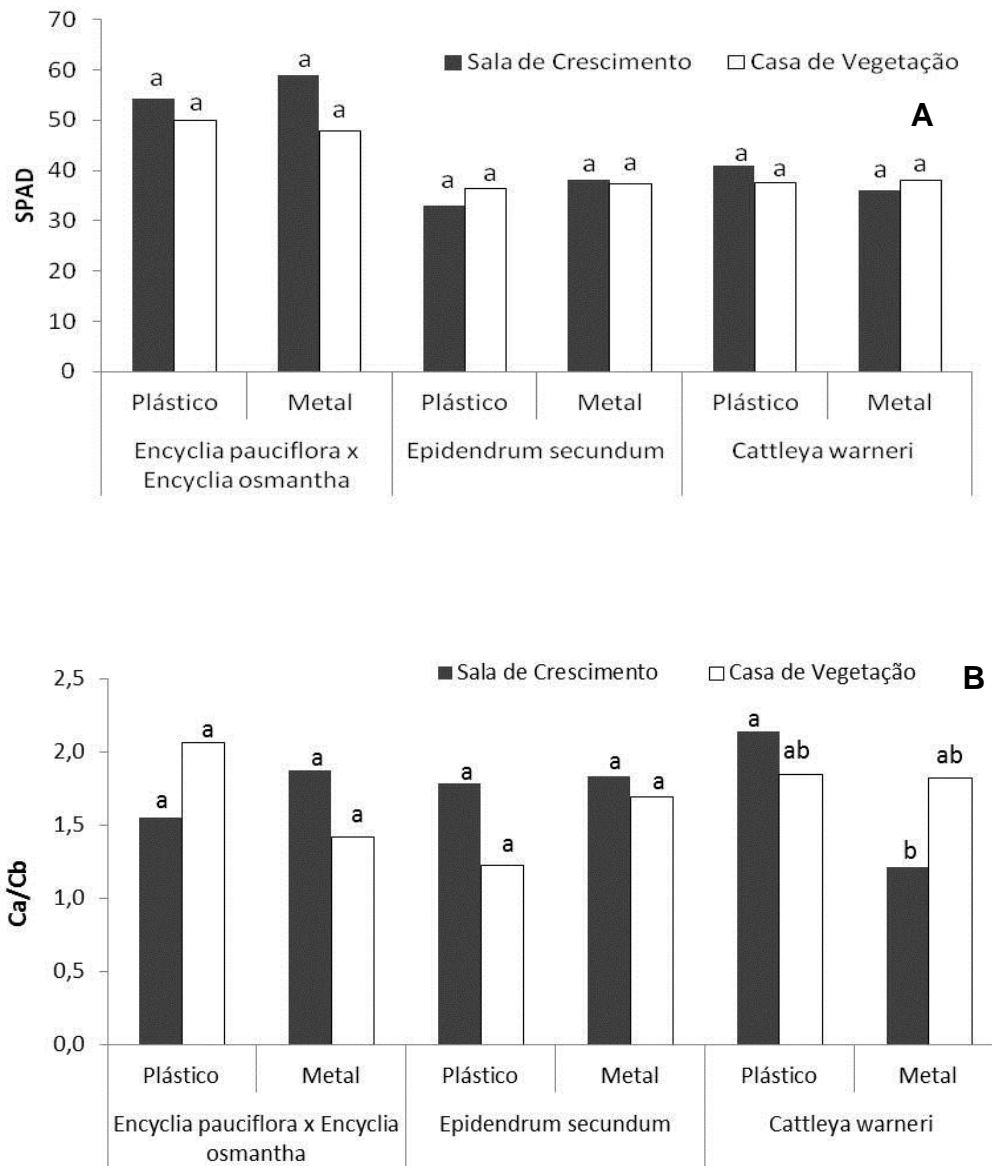


Figura 5– Índice SPAD (A), clorofila a/clorofila b (B), clorofila total (C), clorofila total /carotenoides (D), relação Fv/Fm(E) e índice fotossintético (PI) (F) das três espécies de orquídea: *Encyclia pauciflora* x *Encyclia osmantha*, *Epidendrum secundum* e *Cattleya warneri* cultivadas *in vitro* durante 11 meses. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

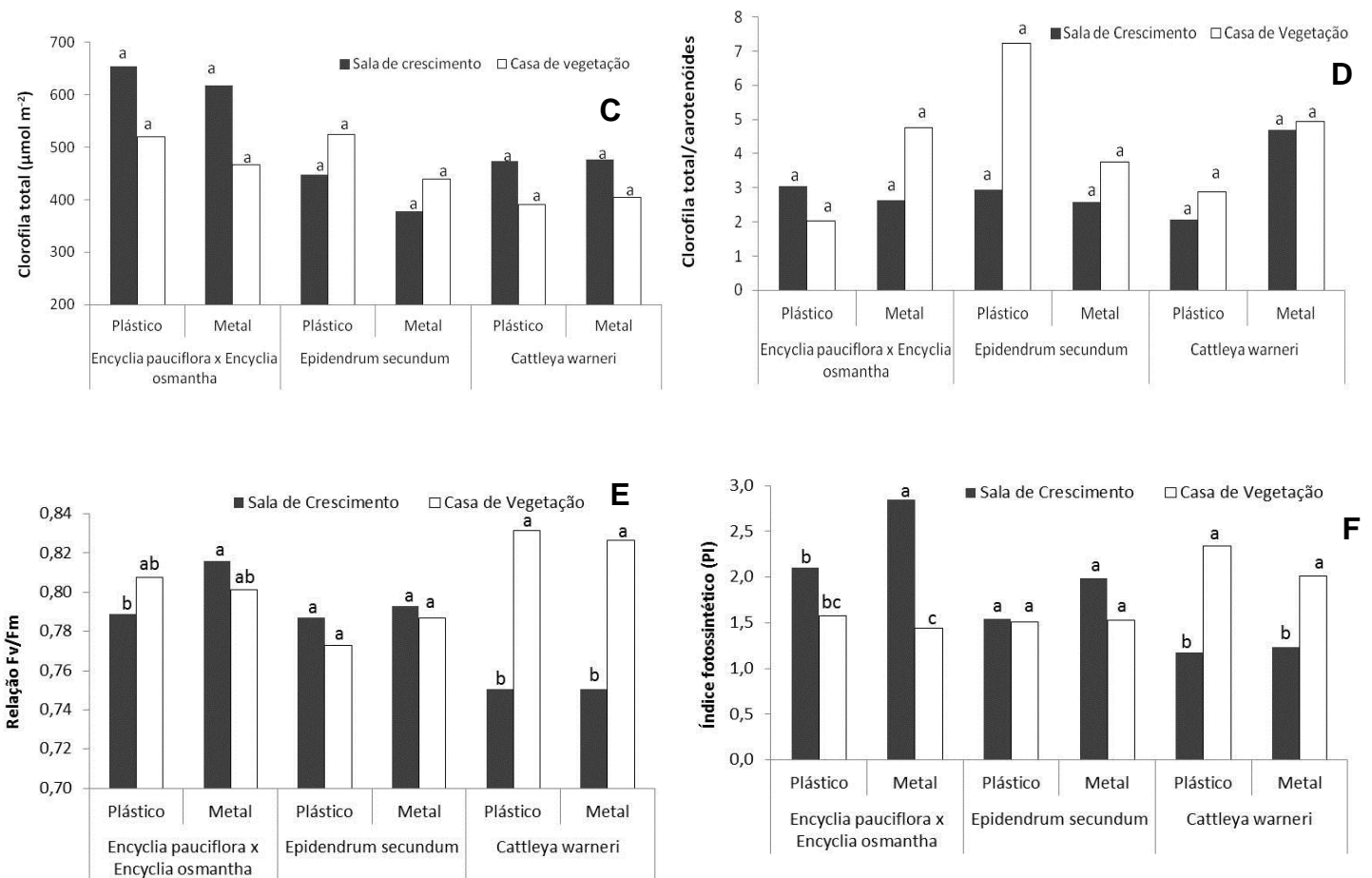


Figura 5– Cont

Nas condições desse trabalho, não se observou diferença significativa para as variáveis clorofila total e clorofila total/carotenóides, independente da espécie, do ambiente ou do tipo de tampa. Estes resultados mostram que nas espécies crescidas nas condições estabelecidas, a taxa fotossintética não foi afetada pela concentração de clorofilas totais, ou seja, o controle do processo fotossintético foi causado por efeitos estomáticos, pela abertura e pelo fechamento dos estômatos. Tal resultado, também mostra diante das condições estabelecidas no experimento, que as plântulas sofreram o que é considerado um estresse moderado, com efeito nas trocas gasosas e algumas características de crescimento, mas sem efeito sobre a concentração de clorofilas totais (Figura 5.C e 5.D).

Segundo Torres Netto et al. (2002, 2005), as variações no conteúdo total de clorofila e carotenóides são bons indicadores do estresse em plantas, bem

como podem se relacionar com o teor de nitrogênio. Deccetti (2004) afirma que o cultivo *in vitro* inibe, em determinado grau, a síntese de clorofila e cita que a presença de sacarose no meio de cultivo tem sido considerada a principal causa da redução nos teores de clorofila e, conseqüentemente, na fotossíntese, e os baixos níveis de sacarose no meio de cultura estão correlacionados com um potencial de maior produção de carboidrato.

O acúmulo de pigmentos, a formação de clorofilas, a diferenciação de cloroplastos e a anatomia da folha se devem muito a respostas da influência da luz nas plantas (Desjardins et al., 1995). A clorofila *a* tem absorção máxima na faixa do azul e vermelho, onde está o espectro de ação para a fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2013).

De acordo com os dados de fluorescência da clorofila *a*, o rendimento quântico máximo do FSII (Fv/Fm) em todas as espécies e condições ficou com as médias entre 0,75 a 0,85, o que indica que o fotossistema II estava funcionando adequadamente. Para a *Ec*, a condição de SC com Tm apresentou maior valor do que a SC com Tp. Para o *Es* não houve diferença significativa e para a *Cw* a CV foi superior à SC para os dois tipos de tampa (Figura 5.E). A fluorescência é usada como indicador de estresse, quando fatores bióticos ou abióticos alteram a funcionalidade do fotossistema II (FSII).

Avaliando a fluorescência, Shin et al. (2013) observaram que plântulas de *Doritaenopsis*, em condições fotoautotróficas e fotomixotróficas com alta intensidade de luz ($120 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e incremento de CO_2 ($1.500 \pm 100 \mu\text{mol mol}^{-1}$) mantiveram os valores de Fv/Fm entre 0,75-0,80 apresentando maior eficiência fotossintética e maior fotossíntese. No entanto, para os tratamentos expostos à luz de alta intensidade sem enriquecimento de CO_2 nas condições heterotróficas, o valor de Fv/Fm foi inferior. Diante destes resultados, pode-se afirmar que, se o objetivo for obter uma maior taxa fotossintética, deve-se promover um aumento na intensidade de luz nos dois ambientes estudados. Mas isso só se justifica se, ao mesmo tempo forem estabelecidas condições para que ocorram maiores trocas gasosas, pois só o aumento na intensidade de luz não é o suficiente para aumentar a eficiência fotoquímica, nem tão pouco, a taxa fotossintética.

O índice fotossintético (PI) para o Es e a Cw apresentou resultados semelhantes ao Fv/Fm, tendo uma pequena variação na Ec onde a SC com Tm o resultado foi superior à CV com Tm (Figura 5.F).

O índice fotossintético (PI) foi proposto por Strasser et al. (2000) e, na maioria dos estresses abióticos e, em diferentes culturas, tem sido considerado uma variável mais sensível que o Fv/Fm (Jiang et al., 2006, Christen et al., 2007). Enquanto a relação Fv/Fm reflete a máxima capacidade fotoquímica e se relaciona com o número de complexos PSII ativos (Schreiber et al., 1986), a variável PI mostra a atividade do fotossistema I e II, servindo para detectar, de forma mais refinada, alterações no desempenho da planta sob condição de estresse que não causam modificações na relação Fv/Fm (Strasser et al., 2004; Stirbet e Govindje, 2011).

6. CONCLUSÃO

- Para as características biométricas de *Encyclia pauciflora x Encyclia osmantha* (Ec) e *Epidendrum secundum* (ES) a sala de crescimento, independente do tipo de tampa, apresentou as maiores médias e melhores resultados;
- O cultivo *in vitro* nas condições de casa de vegetação promoveu maior crescimento e incremento de biomassa para a espécie *Cattleya warneri* independente do tipo de tampa;
- As variáveis fisiológicas relacionadas aos efeitos estomáticos em *Encyclia pauciflora x Encyclia osmantha* (Ec) e *Epidendrum secundum* apresentaram melhores resultados na condição de casa de vegetação e de tampa de plástico para a maioria dos parâmetros. Já a *Cattleya warneri* apresentou resultados semelhantes nos dois ambientes com a tampa de plástico;
- As variáveis relacionadas aos efeitos bioquímicos e fotoquímicos de todas as espécies apresentaram resultados semelhantes em todas as condições estabelecidas;
- Nas condições deste experimento, o incremento na produção de biomassa nas três espécies foi devido praticamente à fonte exógena de carbono por meio da adição de sacarose no meio de cultivo, uma vez que a taxa fotossintética foi baixa;
- Nas condições estudadas neste trabalho, a baixa intensidade luminosa e a alta concentração de sacarose no meio podem ter sido fatores limitantes para o maior crescimento da espécie e para realizar maior fotossíntese, respectivamente.

Sugere-se desta forma, em novos experimentos, usar concentrações menores de sacarose, aumentar o espaçamento entre os frascos e o nível de irradiância para estimular o metabolismo autotrófico nas plântulas;

- É recomendado o uso da casa de vegetação em Venda Nova do Imigrante-ES como ambiente para o crescimento de plântulas *in vitro* de *Cattleya warneri*;

- Dependendo do objetivo a ser alcançado, é recomendado o uso de casa de vegetação para *Encyclia pauciflora* x *Encyclia osmantha* (Ec) e *Epidendrum secundum*, pois, apesar de não terem obtido os melhores resultados nas variáveis de crescimento neste ambiente de cultivo, todas as plântulas sobreviveram e se desenvolveram em casa de vegetação com os dois tipos de tampas. Com o objetivo de reduzir os custos da produção *in vitro* com energia elétrica com lâmpadas e ar condicionado, pode-se utilizar a casa de vegetação como ambiente para o crescimento das plântulas destas espécies.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelberg J., Pollock R., Rajapakse N., Young R. (1998) Micropropagation, decontamination, transcontinental shipping and hydroponic growth of *Cattleya* while sealed in semipermeable membrane vessels. *Scientia. Horticulturae*. 73:23-35.

Ahloowalia, B. S, Savangikar, V. A. (2004) Low costs options for energy and labour. In: Low costs options for tissue culture technology in developing countries. Austria: IAEA, p. 41-45.

Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M. (1995) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 500p.

APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161:105-121.

Araújo, A.G. (2007) *Micropropagação de Cattleya loddigesii 'tipo': fontes de nitrogênio, qualidade de luz, sacarose e ácido giberélico*. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 74p.

Arditti, J. (1992) *Fundamentals of orchid biology*. New York: John Wiley & Sons, 691p.

Arditti, J., Ghani, A.K.A. (2000) Numerical e physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145:367-421.

Arigita, L., Gonzalez, A., Tamés, R.S. (2002) Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 115:166-173.

Barboza, S.B.S.C, Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, L.A.C. (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41:185-194.

Barreto, D.W., Parente, J.P. (2006) Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. *Carbohydrate Polymers*, Barking, 64 (2):287–291.

Barros, F., Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M., Forster, W. (2013) Orchidaceae In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179 / FB11498 / FB11518 / FB11329>. Acesso em: 07 de maio de 2013.

Barrueto Cid, L.P. (2001) A propagação *in vitro* de plantas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 3 (19):16-21

Benson, E.E. (2008) Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27:141-219.

Betchel, H., Cribb, P., Saunert, E. (1981) *The manual of cultivated orchid species*. MIT Press, Cambridge, 444p.

- Biddington, N.L. (1992) The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*, 11:173-187.
- Boldrini, R.F., Santos, W.O., Cruz, Z.M.A, Ramos, A.C. (2010) Bases da associação micorrízica orquidoide. *Natureza on line*, 8 (3):140-145.
- Borges, D.I., Oliveira, M.C., Penoni, E.S., Pádua, T.R.P., Braga, F.T., Pasqual, M. (2011) Micropropagação de crisântemo (*Dendranthema grandiflora tzevele* cv. rage) sob luz natural e artificial em diferentes concentrações do meio de cultivo. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 7 (1):1-8.
- Braga, F.T., Pasqual, M., Castro, E.M., Dignart, S.L., Biagiotti, G., Porto, J.M.P. (2009) Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: Características Morfofisiológicas, *Ciência e Agrotecnologia*, 33 (2):502-508.
- Braga, F.T., Pasqual, M., Castro, E.M., Rafael, G.C. (2011) Características morfofisiológicas de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’ enraizado *in vitro* sob luz natural e substrato vermiculita. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33 (2):551-557.
- Bula, R.J., Morrow, T.W., Barta, D.J., Ignatins, R.W., Martins, T.S. (1991) Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience*, Wisconsin, 26:203-205.
- Caiafa, A.N., Silva, A.F. (2005) Composição florística e espectro biológico de um Campo de Altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, *Rodriguésia*, 56:163-173.
- Campos, F.A.D.B. (2008) Considerações sobre a família orquidacea: e taxonomia, antropismo, valor econômico e tecnologia. *O mundo da saúde*, 32 (3):383-392.
- Cardoso, J.C., (2013) Melhoramento de espécies ornamentais como estratégia para o desenvolvimento e autossuficiência do setor. *Horticultura Brasileira* 31 (1):171-171.

Carneiro, M.F., Carneiro, I.F., Oliveira, S.A., Leite Júnior, C.B., Pacheco, R.A., Souza, M.M., Ramos, T.V. (2001) Bromélias e orquídeas na região dos Cerrados – Dados preliminares. *Anais do 13º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais*, 13 São Paulo: Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais, p. 13.

Carvalho, V.S., Teixeira, S.L. (2009) *Apostila de Propagação de Plantas*, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Campos dos Goytacazes - RJ, 193p.

Castro, F.A.; Campostrini, E.; Torres Netto, A.T.; Viana, L.H. (2011) Relationship between photochemical efficiency (JIP-Test Parameters) and portable chlorophyll meter readings in papaya plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23 (4):295-304.

Cattleya Orchid Source, (2010) *Encyclia pauciflora*. Disponível em: <http://cattleyaorchidsource.blogspot.com.br/2010/03/encyclia-pauciflora.html>
Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

Chamovitz, D. A., Deng, X-W. (1996) Light signaling in plants. *Critical Reviews in Plant Science*. 15:455-478.

Chang, H.S., Chakrabarty, D., Hahn, E.J, Paek, K.Y. (2003) Micropropagation of Calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39:129-134.

Chapman, S.C., Barreto, H.J. (1997) Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. *Agronomy Journal*, Madison, v.89, n.4, p.557-562.

Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L., Freudenstein, J.V. (2003) DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L., Cribb, P.J. (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, p.69-89.

Chen, Y., Liu, Y., Jiang, J., Zhang, Y., Yin, B. (2008) Dendronone, a new phenanthrenequinone from *Dendrobium cariniferum*. *Food Chemistry*, 111 (1):11-12.

Chifa, C., Ricciardi, A.I.A., Marinoff, M.A. (2009) Saponinas en espécies del género *Oncidium* (Orchidaceae) utilizadas como diuréticas por los nativos del chaco argentino. *Rojasiana*, 8 (2):53-57.

Christen, D.; Schonmann, S.; Jermini, M.; Strasser, R.J.; Defago, G. (2007). Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 60:504-514.

Corrie, S., Tandon, P. (1993) Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. through high frequency conversion of encapsulated protocorms under *in vivo* and *in vitro* conditions. *India Journal of Experimental Biology*, 31 :61-64.

Costa, F.H.S., Pasqual, M., Rocha, H.S., Pereira, J.E.S., Castro, E.M., Miyata, L. Y. (2009a) Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. *Bragantia*, 68:303-311.

Costa, F.H.S., Pereira, J.E.S., Pasqual, M., Castro, E.M., Santos, A.M. (2009c) Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. *Ciência Rural*, 39 (3):742-748.

Costa, M.A.P.C. et al. (2009b) Micropropagação de orquídeas. In: Junghans, T.G., Souza, A.S. (eds) *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. Cruz das Almas: EMBRAPA MFT, p.351-370.

Cozer, C.E.P., Domhof, M.L., Saab, M.S.M., Neves, M.F. (2008) Marketing e estratégia em flores. Disponível em: http://www.agroanalysis.com.br/materia_detalhe.php?idMateria=453. Acesso em 21 de abril de 2013.

Crespo, L.E.C. (2007) *Cultivo in vitro de cana-de-açúcar (saccharum spp.) em ambientes que favorecem condições heterotróficas e mixotróficas: um estudo relacionado à fotossíntese, à eficiência fotoquímica e às relações hídricas*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 49p.

Cruz C.D., Regazzi A.J., Carneiro P.C.S. (2004) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético 1. Viçosa, UFV. 480p.

Cushman J.C., Borland A.M. (2002). Induction of crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant Cell Environ.* 25:295-310.

De Riek J., Piqueras A., Deberegh P.C. (1997) Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47:269–278

Deb, C.R., Pongener, A. (2011) Assymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cymbidium aloifolium* L.) Sw.: a multipurpose orchid. *Jornal de Bioquímica de Plantas e Biotecnologia*, 20 (1):90-95.

Decetti, S.F.C. (2004) Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, 93p.

Demattê, J.B., Demattê, M.E.S.P. (1996) Estudos hídricos com substratos vegetais para o cultivo de orquídeas epífitas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 31 (11):803-808.

Desjardins, Y., Hdider, C., de Rieck, J. (1995) Carbon nutrition *in vitro*. Regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. *In: Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M.A.L. (eds.) Automation and environmental control in plant tissue culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.441-471.

Dignart, S.L., Castro E.M., Pasqual M., Ferronato, A., Braga F.T., Paiva, R. (2009) Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. *Ciência e Agrotecnologia*, 33 (3):780-787.

Dousseau, S., Alvarenga, A. A., Castro, E.M., Soares, R.P., Eliasson, M.K., Beyl, C.A., Barker, P. (1994) *In vitro* responses and acclimatization of *Prunus serotina* with paclobutrazol. *Journal Plant Growth Regulation*, 13:137-142.

Dressler, R.L. (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland, USA: Discorides Press, 314.

Economou, A.S., Read, P.E. (1987) Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortiScience*, 22 (5):751-754..

Erig, A.C., Schuch, M.W. (2005) Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, 35 (4):961-965.

Evans, G.C. (1972). *The quantitative analysis of Plant Growth*. Oxford: Blackwell Scientific publications.

Fachinello, J. C.; Hoffmann, A.; Nachtigal, J. C.; Kersten, E.; Fortes, G. R. L. (1995) Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. 2.ed. Pelotas: Editora UFPel, 179p.

Fan, C., Wang, W., Wang, Y., Qin, G., Zhao, W. (2001) Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. *Phytochemistry*, 57:1255–1258.

Faria, R.T., Assis, A.M., Unemoto, L.K., Carvalho, J.F.R.P. (2012) *Produção de Orquídeas em Laboratório*. Londrina: Mecenass, 116p.

Farias, J.N. (2008) *Uma historieta de flores, Encyclia osmantha*. Disponível em: <http://www.webartigos.com/artigos/encyclia-osmantha-uma-historieta-de-flores/94670/#ixzz2SraSzXoL>. Acesso em: 09 de março de 2013.

Ferreira, W.M., Suzuki, R.M. (2008) 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. (orgs.). *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Imagem Gráfica, Natal, p.67-68.

Filho, W.B., Pereira, A.M.S., França, S.C., Furlan, M. (2002) Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus Illicifolia*. *Eclética Química*, 27, Número Especial.

Flora SBS, Orchidaceae - *Epidendrum secundum*. (2014). Disponível em: <https://sites.google.com/site/florasbs/orchidaceae/orquidea-1>. Acesso em: 20 de janeiro de 2014

Fuentes, G., Talavera, C., Desjardins, Y., Santamaría, J.M. (2007) Lowexogenous sucrose improves *ex vitro* growth and photosynthesis in coconut *in vitro* plantlets if grown *in vitro* under high light. *Acta Horticulturae*, 748:151-156.

George, E.F. (2008) Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J. (eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer, p.1-28.

George, E.F., Debergh, P.C. (2008) Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J. (eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer, p.29-64.

Giulietti, A.M., Harley, R.M., Queiroz, L.P., Wanderley, M.G.L., Van Den Berg, C. (2005) Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation Biology*, 19:632-639.

Gonçalves, L.A., Geraldine, R.M., Picoli, A.T., Vendrame, W.A. (2008) *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92:243-250.

Griesbach, R.J. (2002) Development of Phalaenopsis orchids for the mass-market. In: *Trends in New Crops and New Uses*. Virginia: ASHS Press, p.458-465.

Gursuch, P.A., Pandey, S., Atkin, O.K. (2010) Temporal heterogeneity of cold acclimation phenotypes in Arabidopsis leaves. *Plant, Cell and Environment* 33:244-258.

Haldimann, P. (1999) How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *Journal of Experimental Botany*, 50 (333):543-550.

Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, J.R., F.T., Geneve, R.L. (2011) *Plant Propagation – Principles and Practices*. 8. ed., 915p.

Hazarika, B. N. (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108:105-120.

Hdider, C., Desjardins, Y. (1994) Effects of sucrose on photosynthesis and Phosphoenol pyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 36:27-36.

Ibaraki, Y., Nozaki, Y. (2005) Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80:111-113.

IBRAFLOR (2012), Flores e plantas resistem às crises e produção cresce 12%. Informativo Ibraflor.– Ano 03/ Volume 26, Publicação do Instituto Brasileiro de Floricultura, p.1-8.

IBRAFLOR (2013), O setor na mídia - Dados Gerais do Setor. Informativo Ibraflor.– Ano 04/ Volume 39, Publicação do Instituto Brasileiro de Floricultura, p. 1-11.

INCAPER, Fonte IPES, (2014) Venda Nova do Imigrante Disponível em: http://www.incaper.es.gov.br/institucional/downloads/venda_nova.pdf. Acesso em: 16 de novembro de 2013.

Jackson, M.B., Abbott, A.J., Belcher, A.R., Hall, K.C., Butler, R., Cameron, J. (1991) Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explants development. *Annals of Botany*, 67:229-237.

Jiang, C.D., Shi L., Gao, H.Y., Schansker, G., Tóth, S.Z., Strasser, R.J. (2006) Development of photosystems 2 and 1 during leaf growth in grapevine seedlings probed by chlorophyll a fluorescence transient and 820 nm transmission *in vivo*. *Photosynthetica*, 44:454-463.

Joly, A.B. (2002) *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Companhia Editora Nacional.

Jones, H.G. (1992). Plant and microclimate: *A quantitativ approach to environmental plant physiology*. 2 ed.: Cambridge University Press, p.19-46.

Júnior, J.M.S., Castro, E.M., Rodrigues, M., Pasqual, M., Bertolucci, S.K.V. (2012) Variações anatômicas de *Laelia purpurata* var. *cárnea* cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades e qualidade espectral de luz. *Ciência Rural*, 42 (3):480-486.

Junqueira, A.H., Peetz, M.S. (2011). Contexto & Perspectiva – Boletim de Análise Conjuntural do Mercado de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil – junho 2011 – 2011 (janeiro a maio). Balanço do comércio exterior da Floricultura Brasileira. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=161>. Acesso em: 20 de abril de 2013

Kalimuthu, K., Senthilkumar, R., Vilayakumar, S. (2007) *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). *African Journal of Biotechnology*, 6 (10):1171-1174.

Kämpf, A. N. A (1997) floricultura brasileira em números. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 3:1-7.

Kautsky, R., Moore, J. (2008) *Cattleya warneri*. Terra da Luz. Disponível em: <http://orquidarioterradaluz.blogspot.com.br/2008/08/cattleya-warneri-j-moore.html>
Acesso em: 09 de maio de 2013.

Khan, S.V., Kozai, T., Nguyen, O.T., Kubota, C., Dhawan, V. (2003) Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biologia das Plantas*. 46:161-166.

Kim, S. J., Hahn, E. J., Hoe, J. W., Paek, K. Y. (2004) Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 110:143-151,

Kishor, R., Khan, P.S.S.V., Sharma, G.J. (2006) Hybridization and *in vitro* culture of an orchid hybrid *Ascocenda* 'Kangla'. *Scientia Horticulturae*, 108:66-73.

Kitaya, Y. (1995) Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 62:15-24.

Kodym, A., Zapata-Arias, F.J. (1999) Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55:141-145.

Kodym, A., Zapata-Arias, F.J. (2001) Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66:67-71.

Kozai, T., Fujiwara, K., Watanabe, I. (1986) Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (2) Effect of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels closed with stoppers. *Journal of Agricultural Meteorology*, 42 (1):119-127

- Kozai, T, Kubota, C. (2001) Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *Journal of Plant Research*, 114:525-537.
- Kozai, T., Ohde, N., Kubota, C. (1991) Similarity of growth patterns between plantlets and seedlines of *Brassica campestris* L. under different *in vitro* environmental conditions. *Plant cell Tiss. Org. Cult.* 24:181-186.
- Kozai, T.; Oki, H.; Fujiwara, K. (1990) Photosynthetic characteristics of Cymbidium plantlet *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22 (3):205-211.
- Kozai, T., Watanabe, K., Jeon, B.R. (1995) Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* in response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. *Scientia Horticulturae*, 64:1-9.
- Kubota, C., Kozai, T. (1992) Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. *HortScience*, 27:1312-1314.
- Kurata, K., Kozai, T. (1992). *Transplant production systems*. Dordrecht : Kluwer Academic, 299p.
- Lee, N., Wezstein, Y., Sommer, H.E. (1988) Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*, Rockville, 78 (3):637-641.
- Lee, D. W.; Oberbauer. S. F.; Johnson, P.; Krishnapilay, B.; Mansor, M.; Mohamad, H.; Yap, S. K. (2000) Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. *American Journal of Botany*, 87 (4):447-455.

- Lemos, E.E.P., Ferreira, M.S., Alencar, L.M.C., Ramalho, C.E., Albuquerque, M.M. (2002) Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37 (10):1359-1364.
- Lian, F.L., Moyne, J.R. & Tilbury, D.M. (2002). Network Design Consideration for Distributed Control System, *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, 10 (2):297-307.
- LI-COR. LI-3100. (1996) *Area meter instruction manual*. Lincoln, 34p.
- Lim, T.K. (2012) *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. vol 4. New York: Springer, 1022p.
- Lloyd J. & Farquhar G.D. (1994) ^{13}C discrimination during CO_2 assimilation by the terrestrial biosphere. *Oecologia* 99:201–215.
- Louro, R.P., Santiago, L.J.M. (2000) Ultraestrutura de plantas cultivadas *in vitro*. *Caderno de Pesquisa Série. Botânica*, 12 (1):99-107.
- Mahendran, G., Bai, V.N. (2009) Mass propagation of *Satyrium nepalense* D.Don.— A medicinal orchid via seed culture. *Scientia Horticulturae*, 119:203-207.
- Marrara, M. et al. (2007) Florística da família Orchidaceae em fragmento florestal semidecidual da fazenda Montevideo, município de Araras, SP, Brasil. *Anais do 8º Congresso de Ecologia do Brasil*, 8, Caxambu, p.1-2.
- Martini, P. C.; Willadino, L.; Alves, G. D.; Donato, V. M. T. (2001) Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 36 (10):1319-1324.
- Morini, S., Muleo, R. (2003) Effects of light quality on micropropagation of woody species. *In: Jain, S.M., Ishii, K. Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.3-35.

Mosaleeyanon, K., Cha-Um, S., Kirdmanee, C. (2004) Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. *Scientia Horticulturae*, 103:51-63.

Mothé, G.P.B., Netto, A.T., Crespo, L.E.C., Campostrini, E. (2008) Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 4 (2):84-91.

Nelson, E.A., Sage, R.F. (2008) Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression. *Journal of Experimental Botany*, 59:1841-1850.

Neves, J.P. (2014) A orquídea: O cuidado com cada espécie. Divinópolis-MG. Disponível em: <http://www.aorquidea.com.br/arq04.html>. Acesso em: 09 de janeiro de 2014.

Nguyen, Q. T., Kozai, T. (2005) Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: Kozai, T.; Afreen, F.; Zobayed, S. M. A. (Eds.). Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. *Dordrecht: Springer*.123-146.

Nievola, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L., Souza, B.M., Mercier, H. (2005) Temperature determines the occurrence of cam or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 41 (6):832-837.

Norton, C.R., Norton, M.E., Herrington, T., Phillips, D. (1988) Light quality and light pipe in the micropropagation of woody ornamental plants. *Acta Horticulturae*, The Hague, 226:413-416.

Oliveira, S.A.A. (1993) Noções sobre o cultivo de orquídeas. *Boletim CAOB*, 5 (1):29-35.

Oliveira, V. D. C., Sajo M. G. (1999). Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. *Revista Brasileira de Botânica*. 22(3). p.365-374

Orchids Wiki, Encyclia osmantha, (2014) Disponível em: http://orchids.wikia.com/wiki/Encyclia_osmantha. Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

Pasqual, M. et al. (2011) Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. *Horticultura Brasileira*, 29:324-329.

Pecanha, A.L. (2010). Metabolismo fotossintético, crescimento e estado nutricional do mamoeiro (*Carica papaya* L.) em resposta a condutividade elétrica da solução de cultivo. Tese de Doutorado – (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 131p.

Pereira, U.Z., Ribeiro, L.F. (2004) Caracterização de comunidades de Orchidaceae em fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, em diferentes estágios de regeneração em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. *Natureza on line*, 2 (2):52-60.

Peterson, R.L., Massicote, H.B., Melville, L.H. (2004) *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. Ottawa: NRC Research Press.

Piekielek, W.P., Fox, R.H. (1992) Use of a chlorophyll meter to predict sidedress nitrogen requirements for maize. *Agronomy Journal*, Madison, 84 (1):59-65,

Radmann, E.B., Braga, E.J.B., Karan, M.A.L., Posada, M.A.C., Peters, J.A. (2001) Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. *Revista Brasileira de Agrociência*, 7 (3):171-175.

Rasmussen, H.N. (2002) Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244:149–163.

Raven, H.P., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2007) *Biologia Vegetal*. 7 ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 728.

Rego-Oliveira, L.V., Faria, R.T. (2005) *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum Agronomy*, 27:1-5.

Reis, J.N.P. (2011) Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? *IX Encontro Nacional da ECOECO*, 9. Brasília – DF. Brasília: Encontro.

Rezende, R.K.S., Paiva, L.V., Paiva, R., Chalfun Júnior, A., Torga, P. P., Castro, E. M. (2008) Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. *Ciência e Agrotecnologia*, 32, (3):821-827.

Roberts, D.L., Dixon, K.W. (2008) Orchids. *Current Biology*, 18 (8):325- 329.

Rocha, H.S., Silva, C.R.R., Araujo, A.G., Silva, A.B. (2007) Propagação *in vitro* de bananeira Prata Anã (AAB): intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 3 (1):10-16.

Rocha, J.R. (2008) *ABC do Orquidófilo: de uma, várias ou muitas orquídeas*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 424.

Rocha, P.S.G., Oliveira, R.P., Scivittaro, W.B., Santos, U.L. (2010) Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciência Rural*, 40 (9):1922-1928.

Saebo, A., Krekling, T., Appelgren, M. (1995) Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41 (2):177-185.

SAEG. Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1 (2007) Fundação Arthur Bernardes – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG.

Saitou, T., Hashidume, A., Tokutomi, S., Kamada, H. (2004) Reduction of phytochrome level and light-induced formation of adventitious shoots by introduction of antisense genes for phytochrome a in horseradish hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76:45-51.

Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Notini, M. M., Kuki K. N., Cruz, A. C. F., Neto, A. R., Dias, L. L. C., Otoni, W. C (2013) A CO₂-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Physiology*, 49:433–444

Sampaio, M.B., Silva M.I.L., Silva, D.C.V., Almeida, V.A., Almeida A.V. (2010) Orquídeas: do desconhecido ao Novo Mundo, *X Jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX 2010* – UFRPE: Recife.

Savangikar, V.A. (2004) Role of low cost options in tissue culture. In: *International Atomic Energy Agency. Low costs options for tissue culture technology in developing countries*. Austria, p.11-15.

Schadchina, T.M., Dmitrieva, V.V. (1995) Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. *Journal of Plant Nutrition*, New York, 18:1427-1437.

Schmildt, O. (2010) Cultivo *in vitro* e estaquia dos mamoeiros ‘Golden’ e ‘UENF/CALIMAN 01’. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 116p.

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulated fluorometer. *Photosynthesis Research* 10,51–62.

Schuerger, A.C., Brown, C., Stryjewski, E.C. (1997) Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. *Annals of Botany*, 79 (3):273-282.

Seybold, A.; Egle, K.(1970) *Planta*, 26:491.

Sheehan, T.J. (1992) Orchids. In: Larson, R.A. (ed) *Introduction to floriculture*. 2 ed. San Diego, Academic Press, p13-142.

Shin K.S., Park S.Y., Paek K.Y. (2013) Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of in vitro plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. *In Vitro Cell.Dev.Biol.* 49 (4): 445-454.

Silva, A.B., Pasqual, M., Castro, E.M., Miyata, L.Y., Melo, L.A., Braga, F.T. (2008) Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). *Interciência*, 33 (11):839-843.

Silva, F. A. S., Azevedo, C. A. V. (2009) Principal Components. Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: America Society of Agricultural and Biological Engineers.

Sims, D.A., Pearcy, R.W. (1992) Response of leaf anatomy and photosynthetic capacity in *Alocasia macrorrhiza* (Araceae) to a transfer from low to high light. *American Journal of Botany*, 79 (4):449-455.

Smeal, D., Zhang, H. (1994) Chlorophyll meter evaluation for nitrogen management in corn. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25:1495-1503.

Smith, S.E., Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge: Academic Press, 312.

Soontornchainaksaeng, P., Chaicharoen, S., Sirijuntarut, M., Kruatrachue, M. (2001) *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit) Bl. And *Vanda coerulea* Giff. *Science Asia*, 27:233-237.

Stancato, G.C.; Belmelmons, P.F.; Vegro, C.R.L. (2001) Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 7 (1) 25-33.

Stancato, G.C., Faria, R.T. (1996) *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae): effects of macro and microelements. *Lindleyana, West Palm Beach*, 11 (1):41-43.

Stancato, G.C., Tucci, M.L.S.A. (2010) Monitoring the end of the *in vitro* phase of *Anthurium andreaeanum* Lindl. Plantlets. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22 (1):61-68.

Standaert, D.E., Metsenaere, R.E.A. (1991) Economic considerations. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (eds). *Micropropagation*. Dordrecht : Kluwer Academic, p.131-140.

Stefanowska, M., Kuras, M., Kubacka-Zebalska, M., Kacperska, A. (1999) Low temperature affects patterns of leaf growth and structure of cell walls in winter oilseed rape (*Brassica napus* L., var. *oleifera* L.) *Annals of Botany*, 84:313-319.

Stirbet, A., Govindjee (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 104:236–257.

Stoking, C.R., Ongun, A. (1962) The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. *American Journal of Botany*, Columbus, 49 (3): 284-289.

Strasser, R.J.; Tsimilli-Michael, M.; Srivastava, A. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M., Pather, U., Mohanly P. (eds.). *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London, p 445-483.

Strasser, R.J.; Srivastava, A.; Tsimilli-Michael, M. (2004) Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, G., Govindjee (Eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration*. vol. 19: *Chlorophyll fluorescence: a Signature of photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p.321–362.

Sutter, E.G. (1988) Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113:234-138.

Taiz, L., Zeiger, E. (2013) *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 820 p.

Takane, R.J., Pivetta K., Faria, R.T., Gurgel, I., Araujo, L.C.V., Costa, F.N., (2012) I Simpósio sobre Cultivo de Orquídeas. Fortaleza - CE Disponível em: <http://www.aceg.ufc.br/simbraorq/?p=17>. Acesso em: 21 de abril de 2013.

Torres, A.C., Caldas, L.S. (1998) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: SPI/ Embrapa-CNPq, 509p.

Torres Netto, A. (2005) *Atributos fisiológicos e relações hídricas em genótipos de mamoeiro (Carica papaya L.) na fase juvenil*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes/RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. 116p.

Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G., Yamanishi, O.K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L.. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14 (3):203-210.

Tsegay, B.A., Olsen, J.E., Juntilla, O. (2005) Effect of red and far-red light on inhibition of hypocotyls elongation in ecotypes of *Betula pendula* Roth. *American Journal of Biotechnology*, 4(1).

United States Department of Agriculture (USDA) Floriculture Crops 2009 Summary – June 2010 revision. Agricultural Statistics Board, 2012.

Van Den Berg, M., Birnbaum, L.; Bosveld, A.T.C., Brunstro, M.B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R, Kennedy, S.W., Kubiak, T, Larsen, J.C., Van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L, Safe, S, Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T. (1998) Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* 106 (12):775-792.

Van Den Berg, C., Azevedo, C.O. (2005) Orquídeas. In: Juncá. F., Funch, L.S., Rocha, W. (org) *Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p.195-208.

Vasconcelos, R. (2011) Variações em *Cattleya warneri* T. Moore. Disponível em: <http://www.sodmg.com.br/artigos/variacoes-em-cattleya-warneri-t-moore.html>
Acesso em: 09 de maio de 2013.

Vilar, R.; Maranon, T.; Quero, J. L.; Panadero, P.; Arenas, F.; Lambers, H. (2005) Variation in relative growth rate of 20 *Aegilops* species (Poaceae) in the field: the importance of net assimilation rate or specific leaf area depends on the time scale. *Plant and Soil*, 272:11-27.

Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.

Withner L. (1998) *The Cattleyas and Their Relatives, Volume I, The Cattleyas*, Timber Press. 147p.

Winter, D. A., Quanbury, A. O., Hobson, D. A., Sidwall, H. G., Reimer, G., Trenholm, B. G., Steinke, T. and Shlosser, H. (1974) Kinematics of normal locomotion--a statistical study based on television data. *J. Biomechanics* 7:479-486.

Xião, Y.; Niu, G.; Kozai, T. (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105:149-158.

Yew, C.K.; Hew, C. S. (2000) Orchid pseudobulbs – ‘false’ bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival. *Scientia Horticulturae*, 83 (2000):165 – 172.

Yoon YJ, Mobin M, Hahn EJ, Paek KY (2009) Impact of in vitro CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to ex vitro conditions. *Environ Exp Bot* 65:183–188.

Ziv, M. (1995) The control of biorreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae*, 393:25-38.

Zobayed, S.M.A.; Afreen, F.; Kozai, T. (2000) Quality biomass production via photoautotrophic micropropagation. *Acta Horticulturae*, 530:377-386.

Zobayed, S.M.A.; Afreen, F.; Kozai, T. (2001) Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. *In vitro Cellular and Developmental Biology*.

Zobayed, S. (2006) Aeration in plant tissue culture. In: Dutta Gupta, S.; Ibaraki, Y. (Ed.). *Plant tissue culture engineering*. Springer, 313-327.