



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

VANESSA FAVETTA

**FONTES DE LUZ E MEIOS DE CULTURA NO
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS**

Londrina
2015

VANESSA FAVETTA

**FONTES DE LUZ E MEIOS DE CULTURA NO
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Agronomia,
da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F273f Favetta, Vanessa.

Fontes de luz e meios de cultura no crescimento *in vitro* de orquídeas / Vanessa Favetta.
– Londrina, 2015.

51 f. : il.

Orientador: Ricardo Tadeu de Faria.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Plantas ornamentais – Teses. 2. Plantas – Efeito da luz – Teses. 3. Orquídea – Propagação
in vitro – Teses. I. Faria, Ricardo Tadeu de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 631.53

VANESSA FAVETTA

**FONTES DE LUZ E MEIOS DE CULTURA NO CRESCIMENTO *IN*
VITRO DE ORQUÍDEAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Agronomia,
da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr.^a Christina da Silva Wanderley
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Prof. Dr.^a Lúcia Sadayo Assari Takahashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2015.

Ao meu esposo, Saulo de Souza Gabriel, e à minha mãe, Sandra de Lourdes Estrada, indispensáveis em minha caminhada, sempre estiveram ao meu lado, dando-me força, incentivo e amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o meu Guia e Companheiro, aquele que por sua presença e luz sempre me abençoa, direciona-me e capacita-me. A Ele toda honra e toda glória!

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, pela oportunidade de conhecimento e realização do Mestrado.

A CAPES pelo incentivo financeiro, por meio da bolsa de Mestrado.

Ao meu orientador, professor Dr. Ricardo Tadeu de Faria, meu muito obrigada pela amizade, ensinamentos e orientação neste e em muitos outros trabalhos.

A professora Dr^a. Lúcia Sadayo Assari Takahashi pela orientação, conselhos e amizade durante todo o período de graduação e Mestrado. Obrigada por fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

A professora Dr^a. Christina da Silva Wanderlei, meu muito obrigada por aceitar fazer parte da banca examinadora deste trabalho, tenho certeza que suas correções acrescentarão muito em meu trabalho.

A Dr^a. Lilian Unemoto, pela participação da banca avaliadora do meu Exame de Qualificação. Obrigada por suas correções e sugestões.

A professora Dr^a. Inês C. de Batista Fonseca, por toda orientação e ensinamentos durante a graduação e o Mestrado.

Ao meu grande amigo, Ronan Carlos Colombo, por me “suportar” todos os dias, pelos ensinamentos valiosos, conselhos (muitos não pude seguir), por todas as risadas e muitas vezes choro, por toda ajuda na condução deste trabalho; e, principalmente, pela amizade cultivada desde o início da graduação, peço a Deus que ela seja por toda vida.

Aos amigos do Laboratório de Fitotecnia, Edilene Preti Ferrari, Lilian Yukari Yamamoto, Renata Koyama, Rodrigo Thibes Hoshino, Guilherme Cito, Franciele Vero, Karla Lopes e Thiago Oro, pela amizade.

Ao meu irmão Tiago Favetta, pelo amor, carinho, amizade, incentivo e até pelas brigas, obrigada!

Ao meu pai Humberto Favetta e aos meus irmãos Maria Eduarda

Favetta, Davi Favetta e Miguel Favetta, que mesmo distantes sempre me incentivaram.

Agradeço as amigas e exemplos, Nayla Molan e Gislaine Rodrigues, pela força, amizade, orações e, principalmente, por fazerem parte da minha vida.

As amigas Franciane Beline, Mariana Fontoura, Jaqueline Fontoura, Thaynara Pozzobon, Ligia Silva, Mayara Souza pelos momentos de distração e por toda amizade dedicada.

Aos colaboradores do Laboratório de Fitotecnia, em especial, José Vicentini Neto (Seu Bié) e Geraldo Lopes da Silva, pelos cuidados e auxílio durante a condução dos experimentos.

Ao professor Dr. Edson Laureto e o doutorando Ricardo Vignoto Fernandes do Laboratório de Óptica e Optoeletrônica da UEL pelo auxílio nas análises das lâmpadas.

Ao professor Dr. José Mangili Junior pela instalação das lâmpadas e por toda orientação durante o presente trabalho.

Agradeço à Philips do Brasil pela doação das lâmpadas necessárias para o trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e não foram expressamente aqui mencionados.

FAVETTA, Vanessa. **Fontes de luz e meios de cultura no crescimento *in vitro* de orquídeas**. 2015. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

As orquídeas se encontram entre as plantas ornamentais mais apreciadas, devido ao exotismo e singularidade de suas flores. Para a produção de mudas de qualidade, recorre-se às técnicas de propagação *in vitro*, que dependem do controle de fatores como luminosidade e meio de cultura. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de fontes de luz e meios de cultura no crescimento *in vitro* das orquídeas *Microlaelia lundii* e um híbrido de *Dendrobium nobile*. Foram conduzidos ensaios para comparação de dois meios de cultura: ½ MS e meio simplificado (SP) composto por Biofert Plus® acrescido de polpa de banana, em ambientes caracterizados pelo tipo de luz (L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500k; L3 - L1 + L2; L4 – L1 + L1; L5 - LED vermelho; L6 - LED azul; L7 - Lâmpada fluorescente). Após 200 dias do início do experimento foram avaliadas as variáveis biométricas, teor de clorofila, pH final do meio de cultura e a porcentagem de sobrevivência *ex vitro*. Foram realizadas análises de variâncias individuais e análise conjunta de ambientes para cada espécie e as médias foram comparadas pelo teste de tukey à 5% de probabilidade. Para a espécie *M. lundii*, apenas, as variáveis número de brotos e número de raízes não apresentaram interação significativa entre os fatores estudados. O meio simplificado propiciou plântulas mais altas e incremento no sistema radicular. As fontes de luz L5 e L6, independente do meio de cultura, apresentaram resultados inferiores para número de brotos e raízes, massa fresca e seca de parte aérea e raízes. Para teor de clorofila *a* e *b*, as fontes de luz L4 e L7, no meio SP, apresentaram os maiores valores. Ainda, verificou-se que o meio simplificado propiciou mais de 90% de sobrevivência *ex vitro* em todas as fontes de luz. Para o híbrido de *D. nobile*, o meio SP proporcionou a maior média para a variável altura da parte aérea, não havendo diferença significativa entre as fontes de luz. Em relação aos teores de clorofila e carotenoides, não houve diferença significativa entre os fatores estudados. O meio SP, ainda, propiciou o aumento do sistema radicular, especialmente nas fontes de luz L3 e L4. Conclui-se que o meio simplificado e as fontes de luz L1, L2, L3 e L4 podem ser usadas em substituição ao meio MS e as lâmpadas fluorescentes, respectivamente, para o crescimento *in vitro* de plântulas de *M. lundii* e *D. nobile*.

Palavras-chave: Orchidaceae. LED. Propagação *In Vitro*. Meio Nutritivo. Luminosidade.

FAVETTA, Vanessa. **Light sources and culture media on *in vitro* growth orchids**. 2015. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Orchids are among the most appreciated ornamental plants, due to the exoticism and singularity of its flowers. For production of quality seedlings, refers to the *in vitro* propagation techniques, which depend on factors such as luminosity control and the culture medium. The objective of this study was to evaluate the influence of light sources and culture media on *in vitro* growth of *Microlaelia lundii* orchids and a hybrid of *Dendrobium nobile*. Two experiments were carried out or comparison of two culture media: ½ MS and simplified medium (SP), consists of Biofert Plus[®] together with banana pulp, in environments characterized by the type of light (L1-LEDtube 4000K; L2-LEDtube 6500k; L3- L1 + L2; L4 - L1 + L1; L5- red LED; L6- blue LED; L7- Fluorescent lamp). After 200 days from the beginning of the experiment were assessed biometrics parameters, chlorophyll content, the final pH of the culture medium and survival percentage *ex vitro*. Were performed analysis of individual variances and combined analysis to environments for each species and the means were compared by Tukey test at 5% probability. For the species *M. lundii*, only the variables number of shoots and number of roots showed no significant interaction between treatments. The simplified medium led to higher seedlings and increase the root system. Light sources L5 and L6, regardless of the medium, showed lower results for number of shoots and roots, fresh and dry matter of shoot and root. For chlorophyll *a* and *b* content, light sources L4 and L7, in the SP medium, showed the highest values. Yet, it was found that the simplified medium led over 90% of the *ex vitro* survival in all light sources. For hybrid of *D. nobile*, the SP medium provided the highest average for the shoot height, with no significant difference between the light sources. Regarding the contents of chlorophyll and carotenoids, there was no significant difference between treatments. The SP medium also led to an increase of the root system, especially in the light sources L3 and L4. It is concluded that the simplified medium and the light sources L1, L2, L3 and L4 can be used to replace MS medium and fluorescent light, respectively, for the *in vitro* growth of *M. lundii* and *D. nobile* seedlings.

Key words: Orchidaceae. LED. *In Vitro* Propagation. Nutritious Medium. Luminosity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.5.1 – Distribuições espectrais de energia relativa dos LEDs e da lâmpada fluorescente. Londrina, PR, 2014.....	29
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.4.1 – Caracterização das fontes de luz usadas para a iluminação de plântulas de <i>Microlaelia lundii</i> cultivadas <i>in vitro</i> . Londrina, PR, 2014..	27
Tabela 3.5.1 – Parâmetros biométricos avaliados em plântulas de <i>Microlaelia lundii</i> submetidas a diferentes fontes de luz e meios de cultura. Londrina, PR, 2014..	30
Tabela 3.5.2 – Parâmetros biométricos avaliados em plântulas de <i>Microlaelia lundii</i> submetidas a diferentes fontes de luz e meios de cultura. Londrina, PR, 2014.	32
Tabela 3.5.3 – Conteúdo de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila <i>a</i> + clorofila <i>b</i> e relação de clorofila <i>a/b</i> em plântulas de <i>Microlaelia lundii</i> submetidas a diferentes lâmpadas e meios de cultura. Londrina, PR, 2014.	33
Tabela 3.5.4 – Porcentagem de sobrevivência de plântulas de <i>Microlaelia lundii</i> submetidas a diferentes lâmpadas e meios de cultura e aclimatizadas em esfagno. Londrina, PR, 2014	34
Tabela 4.4.1 – Caracterização das fontes de luz usadas para a iluminação de plântulas de um híbrido de <i>Dendrobium nobile</i> cultivadas <i>in vitro</i> . Londrina, PR, 2014.	39
Tabela 4.5.1 – Parâmetros biométricos avaliados em plântulas de um híbrido de <i>Dendrobium nobile</i> submetidas a diferentes fontes de luz e meios de cultura. Londrina, 2014.	41
Tabela 4.5.2 – Parâmetros biométricos avaliados em plântulas de um híbrido de <i>Dendrobium nobile</i> submetidas a diferentes fontes de luz e meios de cultura. Londrina, 2014.	43
Tabela 4.5.3 – Conteúdo de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila <i>a</i> + clorofila <i>b</i> , relação de clorofila <i>a/b</i> , carotenoides e pH do meio de cultura em plântulas de um híbrido de <i>Dendrobium nobile</i> submetidas a diferentes lâmpadas e meios de cultura. Londrina, 2014	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	FLORICULTURA	14
2.1.1	Mercado Mundial e Nacional de Orquídeas	15
2.2	FAMÍLIA ORCHIDACEAE	16
2.2.1	Gênero <i>Dendrobium</i> Lindl.	17
2.2.2	Gênero <i>Laelia</i> Lindl.	17
2.3	PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ORQUÍDEAS	18
2.4	MEIOS DE CULTURA	18
2.5	LUMINOSIDADE	19
2.5.1	Influência do Tipo de Luz na Propagação <i>In Vitro</i>	20
2.5.2	Lâmpadas Fluorescente vs LEDs	21
2.6	ACLIMATIZAÇÃO	22
3	ARTIGO A: FONTES DE LUZ E MEIOS DE CULTURA NO CRESCIMENTO DA ORQUIDEA BRASILEIRA <i>Microlaelia lundii</i>	23
3.1	RESUMO	23
3.2	ABSTRACT	23
3.3	INTRODUÇÃO	24
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.6	CONCLUSÃO	35
4	ARTIGO B: LEDs COMO ALTERNATIVA À LÂMPADAS FLUORESCENTES NO CRESCIMENTO DE <i>Dendrobium nobile</i> EM DOIS MEIOS DE CULTURA	36
4.1	RESUMO	36
4.2	ABSTRACT	36
4.3	INTRODUÇÃO	37
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

4.6 CONCLUSÃO.....45

REFERÊNCIAS.....46

INTRODUÇÃO

A floricultura é um dos segmentos mais importantes e promissores do agronegócio mundial. Apresenta forte impacto na geração de emprego e renda, especialmente para pequenos produtores.

Dentre as plantas ornamentais, as orquídeas estão entre as mais valorizadas; isto se deve, principalmente, a beleza de suas flores, associada à grande variedade de formas, cores e tamanhos. A espécie *Dendrobium nobile* e seus híbridos têm sido intensamente cultivados no Brasil, especialmente, pela facilidade de cultivo e preço relativamente baixo, se comparado com outras espécies de orquídeas. Em contrapartida, a espécie *Microlaelia lundii*, endêmica de algumas regiões brasileiras, apresenta dificuldades em seu cultivo, por isso é cultivada, atualmente, por colecionadores.

Com relação à propagação comercial de orquídeas, recorre-se às técnicas de propagação *in vitro*, seja pela germinação assimbiótica de sementes ou pela micropropagação a partir de ápices caulinares, principalmente. O sucesso desta técnica depende de vários fatores, dentre os quais se destacam as características genéticas do material vegetal, a qualidade do espectro luminoso absorvido pelos propágulos e os meios de cultura.

Apesar da luz ser um dos principais fatores para o crescimento vegetal, cada espécie pode responder de modo diferente a um determinado comprimento de onda. A maioria dos laboratórios utiliza lâmpadas fluorescentes como fonte de iluminação; porém, devido às vantagens que os LEDs apresentam em relação a essas lâmpadas, torna-se importante o estudo do comportamento das espécies propagadas *in vitro* sob esses espectros luminosos.

Outro fator que contribui para o crescimento e desenvolvimento das plântulas *in vitro* é a formulação dos meios de cultura. Meios de cultura com formulação simplificada, elaborados com fertilizantes comerciais e compostos orgânicos têm sido empregados com sucesso em detrimento aos sais mais 'tradicionais', como os do meio MS, por exemplo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de fontes de luz e meios de cultura no crescimento *in vitro* das orquídeas *Microlaelia lundii* e *Dendrobium nobile*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FLORICULTURA

A floricultura mundial ocupa uma área estimada em 430 mil hectares e movimentava valores próximos a US\$ 60 bilhões por ano. O segmento de flores de corte é o mais expressivo, seguido pelo de plantas vivas, bulbos e folhagens. O comércio mundial de flores e plantas ornamentais está concentrado na União Europeia – com destaque para a Holanda – Estados Unidos e Japão. Ainda são destaques a Colômbia, o Equador e a Costa Rica, na América Latina, e a China, na Ásia (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

Assim como nesses países, no Brasil a floricultura é um importante setor do agronegócio. A sustentação econômica essencial dessa atividade é garantida pelo vigor do mercado interno, que efetivamente sinaliza para as reais potencialidades de sucesso econômico e empresarial. Isto se torna importante, uma vez que o País vem sofrendo queda nos valores exportados desde o final de 2008 (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008; 2014). No entanto, o País, ainda tem um grande mercado a ser explorado e a evidência desse potencial está na comparação do mercado brasileiro com o mercado europeu, no qual a média de consumo por habitante em 2010 estava entre US\$ 70 a US\$ 100 por ano. No Brasil, a média de consumo é de aproximadamente US\$ 11 por ano (SEBRAE, 2012).

Em 2013 o total de vendas ao exterior decaiu 8,43% em relação a 2012, fechando o ano no valor de US\$ 23,81 milhões. Ou seja, a balança comercial brasileira em 2013, apresentou um saldo negativo de US\$ 18,125 milhões; sendo as importações do setor 76,11% maiores que as exportações (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

O grupo formado por bulbos, tubérculos, rizomas e similares em repouso vegetativo representaram 53,54% das exportações, seguido pelo das mudas de plantas ornamentais 35,77%. O primeiro grupo somou resultado exportado de US\$ 12,751 milhões, decréscimo de 12,35% em relação a 2012 (US\$ 14,547 milhões). Os estados de São Paulo (70,82%) e Ceará (29,18%) são os principais produtores de plantas desse grupo, e a Holanda o principal país importador, responsável por 79,36% das compras internacionais no segmento (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

Apesar de quedas na exportação, os últimos dez anos foram marcados por um significativo crescimento da produção de flores no Brasil. A produção, antes concentrada principalmente no estado de São Paulo, tem se expandido para todo o País, com cultivos nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Alagoas, Pernambuco, Ceará e, também, na região norte (SEBRAE, 2013). Em todo o País, são cultivadas mais de 350 espécies em uma área de aproximadamente 14 mil hectares, dividida entre oito mil produtores, que em média, possuem 2,5 hectares de terra, em que 81,3% da mão obra é contratada e 18,7% mão de obra familiar. Em 2012 o setor faturou R\$ 4,8 bilhões e gerou mais de 206 mil empregos diretos (IBRAFLO, 2013).

O estado do Paraná, apesar de participar muito pouco do mercado brasileiro de flores, possui grande potencial para expansão, em virtude de ser abastecido praticamente pelo estado de São Paulo (ANDRETTA, 2006). Em 2010 quase 90% dos produtos que chegaram às floriculturas paranaenses vieram de São Paulo, sendo pouco mais de 10% produzido no estado (CEASA-PR, 2010), o que sinaliza para um real potencial de crescimento.

2.1.1 Mercado Mundial e Nacional de Orquídeas

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais comercializadas em todo mundo, movimentando milhões de dólares em diversos países, a exemplo da Tailândia, Austrália, Cingapura, Malásia, entre outros. São comercializadas tanto como flores de corte como plantas envasadas. Essa importância se deve, principalmente, a beleza particular destas plantas, além de sua longa vida de prateleira (CHUGH, 2009).

Os principais líderes do comércio internacional de orquídeas são Holanda, Estados Unidos, Alemanha, Malásia, Tailândia, Inglaterra, Formosa, Austrália e África do Sul. Na América Latina, a Colômbia é o principal exportador, seguido de Peru e Equador (ITC apud REIS, 2011).

O Brasil possui um amplo mercado interno e consome praticamente tudo o que produz. Embora seja uma planta presente em todo País, gera apenas um pequeno fluxo de produtos para o mercado internacional, sendo as espécies nativas e seus híbridos os principais produtos exportados, especialmente para colecionadores (REIS, 2011).

Grande parte do que é consumido em orquídeas no Brasil ainda é oriunda do mercado externo. Em 2013, das mercadorias adquiridas internacionalmente destinadas à propagação vegetativa, 25,61% foram mudas de orquídeas, vindas da Holanda (65,88%), Tailândia (29,45%), Japão (2,98%), EUA (1,57%) e Equador (0,12%). Neste mesmo ano, a importação de orquídeas para o consumo final, como as phalaenopsis, cymbidiuns e vandas, somaram US\$ 10,739 milhões, um aumento de 21,07% em relação ano anterior (JUNQUEIRA; PEETZ 2014)

2.2 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

A palavra “orquídea” vem do grego: “orchis”, nome usado pelo filósofo grego Theophrastus (372-287 a. C.) para designar os tubérculos de algumas orquídeas terrestres do mediterrâneo, devido ao seu formato semelhante ao de testículos. No entanto, apenas na metade do século 18, Carolus Linnaeus definiu o gênero *Orchis*, estendendo esse nome a toda família (TERAO; CARVALHO; BARROSO, 2005).

Considerado um dos grupos mais evoluídos, Orchidaceae é a maior família dentro das angiospermas, com cerca de 25 mil espécies distribuídas em 850 gêneros. Esse número corresponde a 8-10% de todas as plantas com flores, e tende a aumentar, visto que todo ano são descritas entre 200 e 500 novas espécies (GOVAËRTS, 2012).

Na família Orchidaceae encontra-se desde espécies epífitas, que são a grande maioria, até espécies terrícolas, rupícolas e saprofíticas. A grande adaptabilidade encontrada nessa família faz com que seus representantes sejam encontrados em todos os continentes, com exceção às regiões polares e àquelas, extremamente, áridas. O Brasil apresenta uma das maiores floras orquidáceas do mundo; cerca de 190 gêneros com aproximadamente 2.300 espécies (TERAO; CARVALHO; BARROSO, 2005).

2.2.1 Gênero *Dendrobium* Lindl.

O gênero *Dendrobium*, com mais de 1.500 espécies, encontra-se distribuído ao longo da Ásia tropical e subtropical, prolongando-se para leste até as

ilhas Fiji e sul da Austrália. Algumas espécies têm flores pouco notórias, outras são mais vistosas; podem ser solitárias ou agrupadas, muitas vezes sobre hastes arqueadas mais ou menos longas, todas têm as sépalas laterais unidas na base, formando um pequeno saco. As espécies são consideradas epífitas, embora algumas cresçam em rochas ou mesmo, ocasionalmente, no solo (SUTTLEWORTH; ZIM; DILON, 1994).

A espécie *D. nobile* Lindl., conhecida como “olho de boneca”, nativa do sudoeste asiático, é cultivada no mundo todo, principalmente, por sua grande adaptabilidade a uma faixa de temperatura de 5 a 35 °C. A planta, formada por pseudobulbos, mede cerca de 30 cm e é pouco exigente em sombreamento, sendo 30% suficiente para seu cultivo. Suas hastes florais são pequenas (2 cm), e suas flores, geralmente 3 por haste, desabrocham na primavera, durando até 30 dias (WATANABE et al., 2002). No Brasil, esta espécie se tornou muito popular e é uma das mais comercializadas, especialmente, pelas suas belas floradas, grande durabilidade das flores, facilidade de cultivo e preço relativamente baixo, quando comparado a outras orquídeas.

A Universidade Estadual de Londrina possui um programa de melhoramento genético dessa espécie, do qual foram lançadas 3 cultivares: UEL 6 (FARIA et al., 2009), UEL 7 (FARIA et al., 2011) e UEL 8 (FARIA et al., 2013).

2.2.2 Gênero *Laelia* Lindl.

Lélias são plantas epífitas ou rupícolas, originárias do México e do Brasil. Seus pseudobulbos são espessos, mais ou menos ocos, claviformes, fusiformes, ovóides ou cilíndricos e possuem no ápice, uma ou duas folhas geralmente coriáceas. A inflorescência é terminal podendo carregar uma única flor ou diversas flores, dispostas em racemo ou, mais raramente, em panícula (CHIRON; CASTRO, 2002).

Desde sua classificação em 1831, por John Lindley, há uma polêmica em torno desse gênero. Diversos autores questionavam a separação de muitas espécies do gênero, principalmente relacionados a diferenças entre espécies brasileiras e mexicanas. Por isso, o gênero *Laelia* foi reclassificado, e as espécies reagrupadas em quatro gêneros: *Hoffmannseggella* H. G. Jones (1968); *Microlaelia* (Schlechter) Chiron e Castro; *Dungsia* Chiron e Castro; *Hadrolaelia* (Schlechter)

Chiron e Castro (CHIRON; CASTRO, 2002).

A espécie brasileira *Microlaelia lundii* ((Rchb.f. & Warm.) Chiron & V.P.Castro), é uma microorquídea muito apreciada, especialmente pelas suas belas floradas. A planta tem em média 12 cm de altura e apresenta pequenas flores (3 x 3 cm) no inverno, por um período aproximado de 10 dias (WATANABE et al., 2002).

2.3 PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS

A propagação *in vitro* de plantas é uma técnica de cultivo que envolve condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂ (CID, 2010), dentro de recipientes de vidro ou plástico.

Em condições naturais a propagação das orquídeas ocorre por meio da dispersão de sementes, produzidas em grande número dentro de frutos do tipo cápsula. No entanto, por serem desprovidas de tecidos de reserva, a germinação é dependente da associação simbiótica com fungos micorrízicos, o que, mesmo assim, ocasiona uma porcentagem muito baixa de germinação. Porém, Lewis Knudson, em 1921, desenvolveu um método de germinação assimbiótica (*in vitro*), que permite a germinação de praticamente 100% das sementes (KERBAUY; CHAER, 2011).

Outra forma de se propagar orquídeas *in vitro* é pelo cultivo de micro estruturas como: ápices caulinares e radiculares e segmentos de folhas e de hastes florais; o que resulta na regeneração de plantas com as mesmas características da planta matriz (clones).

2.4 MEIOS DE CULTURA

Os meios nutritivos empregados na micropropagação fornecem ao propágulo as substâncias essenciais ao crescimento (STANCATO; NÉRI; TAVARES, 2009). Devido à sua grande importância têm sido um dos fatores mais estudados na micropropagação de plantas.

Esta preocupação é justificável pelo fato de cada espécie, cultivar ou híbrido possuir exigências específicas quanto aos componentes nutricionais inorgânicos e orgânicos e reguladores de crescimento (KERBAUY; CHAER, 2011).

Existem diversas formulações de meios de cultura utilizados no cultivo *in vitro* de plantas. Os primeiros desenvolvidos foram Knudson (KNUDSON,

1946), e Vacin e Went (VACIN; WENT, 1949). Porém, o meio MS (MURASHIGE; SHOOG, 1962) é um dos mais consagrados e vem sendo utilizado com algumas modificações, como a redução da concentração de macronutrientes e a adição de outros componentes, dentre eles, carvão ativado. No cultivo de orquídeas, o meio MS modificado é um dos mais utilizados (FARIA et al., 2002; MORAES; FARIA; CUQUEL, 2005).

Além disso, a elaboração de meios de cultura com fertilizantes comerciais e suplementação com componentes orgânicos, como a polpa de banana é descrita na propagação *in vitro* de orquídeas por Araújo et al. (2006), Colombo, Favetta e Faria (2012), Favetta, Colombo e Faria (2014), Su, Schnitzer e Faria (2012), Stancato, Abreu e Furlani (2008), por proporcionar crescimento satisfatório às plântulas.

2.5 LUMINOSIDADE

A luz é uma modalidade da energia radiante verificada pela sensação visual de claridade. A faixa de radiações das ondas eletromagnéticas detectada pelo olho humano se situa entre 380 nm e 780 nm (LUZ, 2002).

Para as plantas, a luz é um fator ambiental fundamental, desempenhando um papel crucial, diretamente, na regulação do desenvolvimento e crescimento (MORINI; MULEO, 2003; NHUT et al. 2005), por meio da fotossíntese e ativação ou inibição hormonal. A radiação utilizada pelas plantas para o processo fotossintético está contida na faixa da luz visível (400 – 700 nm), denominada de PAR (Photosynthetic Active Radiation), correspondendo a 45 - 50%, aproximadamente, do total de radiação incidente (OMETTO, 1981); e o fluxo de fótons ideal para fotossíntese varia de 20 a 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dependendo da espécie (YEH; CHUNG, 2009).

Assim, a fim de otimizar a aquisição de energia da luz para a fotossíntese, as plantas desenvolveram uma série de fotorreceptores transdutores que regulam o seu crescimento e desenvolvimento, em relação à presença, quantidade, direção, duração e qualidade de radiação luminosa incidente (MORINI; MULEO, 2003). A radiação fotossinteticamente ativa é captada por moléculas de clorofilas e carotenoides, que juntamente com proteínas estruturais constituem o complexo antena (TAIZ; ZEIGER, 2013); dessa forma, para que a planta tenha

eficiência fotossintética são importantes os seguintes fatores: qualidade da luz (comprimento de onda específico), fotoperíodo e intensidade da luz.

2.5.1 Influência do Tipo de Luz na Propagação *In Vitro*

A luz é um dos principais fatores nas câmaras de cultivo, portanto, é importante controlá-la para que as plantas, ali mantidas, se desenvolvam adequadamente. A importância da luz ocorre sob o ponto de vista da fotossíntese, da fotomorfogênese e do fototropismo. Nessa câmara, a luz deve seguir um determinado fotoperíodo, por exemplo, 16 h de luz e 8 h de escuro (CID, 2010).

Atualmente, nas câmaras de cultivo, as lâmpadas fluorescentes ainda são as fontes de luz mais encontradas. No entanto, embora tenham comprimento de onda de 400 a 700 nm, essa luminosidade é de baixa qualidade para a promoção do crescimento das plantas (GUPTA; JATOTHO, 2013).

Diversos estudos vêm sendo realizados para investigar a eficácia da qualidade de luz emitida por LEDs (Light Emitting Diode) na promoção do crescimento e morfogênese de diferentes plantas propagadas *in vitro* (KIM et al., 2004; MENGXI et al., 2011; NHUT et al., 2005; ROCHA et al., 2010). Isso se deve ao fato dos LEDs emitirem luz em comprimentos de onda específicos (GUPTA; JATOTHU, 2013).

Os LEDs se destacam como uma fonte de luz mais versátil e eficiente para a regeneração e o crescimento de plantas *in vitro* e podem oferecer novas e importantes possibilidades para alcançar o sucesso comercial na propagação *in vitro* de plantas.

De modo geral, a luz branca estimula a indução de brotos, no entanto, tende a inibir a indução de raízes. A luz rica em vermelho pode estimular a indução de raízes adventícias e a luz azul está ligada à indução de calos (CID, 2010), porém, depende da espécie cultivada. Heo et al. (2006) em estudos com uva, observaram que o LED vermelho promoveu o alongamento, e o LED azul reduziu a capacidade fotossintética nesta espécie. Em *Zantedeschia jucunda* o LED azul proporcionou aumento na altura da planta e no conteúdo de clorofila (JAO et al., 2005).

Em geral, verifica-se na literatura que os LEDs vermelhos (620-680 nm), LEDs azuis (420-480 nm), a combinação de LEDs vermelhos e azuis, e LEDs

emissores de luz vermelho-distante (735 nm), em várias intensidades, estão sendo utilizados como fontes de iluminação em câmaras de cultivo de plantas (WU; TOIT, 2012). A exemplo pode-se, citar os trabalhos com *Chrysanthemum* sp. (KIM et al., 2004) *Spathiphyllum* sp. (NHUT et al., 2005), *Fragaria vesca* (ROCHA et al., 2010), *Calanthe* sp. (BAQUE et al., 2011), *Oncidium* sp. (MENGXI et al 2011), entre outros.

Ainda, em relação aos LEDs coloridos, diversas relações, principalmente a de vermelho:azul, estão sendo estudadas e têm apresentado bons resultados para as espécies *Tripterospermum japonicum* (70% vermelho + 30% azul) (MONN et al., 2006); *Phalaenopsis* (80% vermelho + 20% de azul) (WONGNOK et al., 2008) e *Gossypium hirsutum* (50% azul + 50% vermelho) (LI; XU; TANG, 2010).

2.5.2 Lâmpadas Fluorescentes vs LEDs

As lâmpadas fluorescentes utilizam a descarga elétrica através de um gás para produzir energia luminosa. As lâmpadas fluorescentes tubulares consistem em um bulbo cilíndrico de vidro, tendo em suas extremidades eletrodos metálicos de tungstênio, recobertos de óxidos que aumentam seu poder emissor, por onde circula a corrente elétrica. Em seu interior existe vapor de mercúrio ou argônio a baixa pressão e as paredes internas do tubo são pintadas com materiais fluorescentes conhecidos por cristais de fósforo (LUZ, 2002).

Diferentemente das lâmpadas fluorescentes, os LEDs, são componentes eletrônicos que emitem luz através de eletroluminescência, transformando energia elétrica em radiação visível, ou seja, em luz (BLEY, 2012). Apesar de não ser monocromático, o LED consiste de uma banda espectral relativamente estreita que é produzida pelas interações energéticas do elétron (VALENTIM; FERREIRA; COLETTI, 2010).

Os LEDs apresentam várias vantagens em relação às tradicionais lâmpadas fluorescentes, entre elas podemos destacar: a vida útil, que em lâmpadas LED pode chegar até 100.000 horas, enquanto uma lâmpada fluorescente comum possui um tempo de vida típico de 15.000 horas (GUPTA; JATOTHU, 2013). Os LEDs são livres de mercúrio, sendo assim menos prejudiciais ao ambiente, além de gerar economia em relação à energia gasta com aparelhos de ar condicionado, pois como o calor emitido pelo LED é menor, ocorrerá redução na necessidade de climatização do ambiente; o consumo de energia chega a ser cinco vezes menor que

o consumido por uma lâmpada fluorescente de 15 W (VALENTIM, FERREIRA E COLETTI, 2010) e são as únicas fontes de luz artificial que emitem quase todos os comprimentos de onda da luz visível, individualmente (BLEY, 2010). Com isso, os LEDs podem tornar a propagação comercial de plantas *in vitro* mais rentável (GUPTA; JATOTHU, 2013).

Atualmente, os LEDs coloridos vêm ganhando destaque na micropropagação de plantas. Segundo Bley (2010) elas emitem as cores de forma saturada sem que isso cause perda no fluxo luminoso, como ocorre com outras lâmpadas, em que é necessária a utilização de filtros coloridos para reter a luminosidade; os LEDs RGB (vermelho, verde e azul) permitem um dinâmico controle de cores além de emitir a luz branca nas suas diversas temperaturas de cor.

2.6 ACLIMATIZAÇÃO

O processo de transferência das plântulas da condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (casa de vegetação) é denominado aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Essa fase consiste na adaptação climática de um organismo, especialmente uma planta, que é transferida para um novo ambiente, sendo todo esse processo realizado artificialmente (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

As plântulas recém-saídas da condição *in vitro*, possuem baixa eficiência do sistema radicular e reduzida competência vascular, associadas a estômatos não funcionais e cutícula mal formada. Por isso, durante o processo de aclimatização é essencial reduzir a perda de água e consequente desidratação das plântulas (TAVEIRA, 2011).

A influência da fonte de luz usada na fase de cultivo *in vitro* sobre a etapa de aclimatização, ainda não está esclarecida; pois, poucos autores estudaram essa possível influência. No entanto, há relatos que LEDs azul e vermelho podem aumentar o crescimento de plantas durante a aclimatização (NHUT et al., 2005; TANAKA et al., 1998).

3 ARTIGO A: FONTES DE LUZ E MEIOS DE CULTURA NO CRESCIMENTO DA ORQUIDEA BRASILEIRA *Microlaelia lundii*

3.1 RESUMO

A micro-orquídea brasileira *Microlaelia lundii* encanta pelas belas floradas no inverno, no entanto o seu cultivo ainda é um desafio, requerendo cuidados específicos. Assim, objetivou-se avaliar a influência de fontes de luz e meios de cultura no crescimento *in vitro* e na sobrevivência *ex vitro* dessa micro-orquídea. Plântulas de *M. lundii* foram transferidas para frascos contendo os meios de cultura: ½ MS e Meio Simplificado, composto por 5 mL L⁻¹ do fertilizante Biofert Plus® NPK (08-09-09) e 60 g L⁻¹ de polpa de banana 'Nanica'. Estes frascos foram acondicionados em câmara de cultivo composta por sete ambientes, caracterizados pelo tipo de iluminação: L1) LEDtube 4000K; L2) LEDtube 6500K; L3) L1 + L2; L4) L1 + L1; L5) LED vermelho; L6) LED azul; L7) Lâmpada fluorescente (controle). Após 200 dias de cultivo nas referidas condições avaliou-se o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plântulas e o teor de clorofila nas folhas. Também, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência das plântulas, quando aclimatizadas. Ao final do experimento foram realizadas análises de variâncias individuais e análise conjunta de ambientes. O meio simplificado propiciou plântulas mais altas, com destaque para a fonte de luz L6. As fontes de luz L1, L2, L3 e L4 no meio simplificado proporcionaram aumento do sistema radicular das plântulas. Quanto ao teor de clorofila, L4 e L7 apresentaram maiores teores de clorofila *a* e *b*. O meio simplificado propiciou, praticamente, 100% de sobrevivência das plântulas, independente da fonte de luz utilizada. Conclui-se que o meio simplificado nas fontes de luz L1, L2, L3 e L4 é recomendado para a propagação *in vitro* de *M. lundii*.

Palavras chaves: LED. Meio Nutritivo. Orchidaceae. Qualidade da Luz.

3.2 ABSTRACT

The Brazilian micro-orchid *Microlaelia lundii* enchants the beautiful blooms in winter, but its cultivation is still a challenge, requiring specific care. The objective was to

evaluate the influence of light sources and culture media on *in vitro* growth and *ex vitro* survival of this micro-orchid. *M. lundii* seedlings were transferred to jars containing the culture medium ½ MS and Simplified Medium, consisting of 5 mL L⁻¹ of Biofert Plus® NPK fertilizer (09-08-09) and 60 g L⁻¹ of banana 'Nanica' pulp. These jars were placed in growth chamber composed of seven environments, characterized by the type of lighting: L1) LEDtube 4000K; L2) LEDtube 6500K; L3) L1 + L2; L4) L1 + L1; L5) red LED; L6) blue LED; L7) Fluorescent lamp (control). After 200 days of cultivation in these conditions was evaluated the growth of canopy and roots of seedlings and the chlorophyll content in leaves. Also, it was evaluated the percentage of seedling survival when acclimatized. At the end of the experiment were performed analysis of individual variances and combined analysis to environments. The simplified medium led to higher seedlings, especially to light source L6. The light sources L1, L2, L3 and L4 provided increase of the root system seedlings in the simplified medium. As for the chlorophyll content, L4 and L7 showed higher contents of chlorophyll *a* and *b*. The simplified medium led practically 100% seedling survival, independent of the light source used. It is concluded that the simplified medium on the light sources L1, L2, L3 and L4 is recommended for *in vitro* propagation of *M. lundii*.

Keywords: LED. Nutritious Medium. Orchidaceae. Quality of Light.

3.3 INTRODUÇÃO

As orquídeas encontram-se entre as plantas ornamentais mais cultivadas no mundo, devido, especialmente, ao potencial econômico e a beleza de suas flores. Com destaque nesse mercado, as micro-orquídeas têm atraído o interesse de alguns produtores e vêm ganhando espaço entre os consumidores de flores.

A espécie brasileira *Microaelia lundii* ((Rchb. f. & Warm.) Chiron & V. P. Castro) apresenta belas floradas no inverno, suas flores são pequenas (3 x 3 cm) (WATANABE et al., 2002) e se assemelham às flores da espécie *Laelia purpurata*, o que desperta a atenção para o seu cultivo. No entanto, o cultivo desta micro-orquídea não é comum entre os produtores, visto que a espécie ainda não foi domesticada. Nesse sentido, trabalhos vêm sendo realizados com a espécie no

Orquidário da Universidade Estadual de Londrina a fim de domesticá-la, sob o ponto de vista agrônomo.

A propagação *in vitro* é uma importante ferramenta utilizada na propagação de orquídeas. Por meio dessa técnica, é possível produzir mudas de qualidade, em larga escala e em tempo reduzido, quando comparado aos métodos tradicionais de propagação de orquídeas (FARIA et al., 2012). Porém, para a obtenção de sucesso na propagação *in vitro* dessas plantas, fatores como meio de cultura e luminosidade precisam ser adequados a cada espécie.

A formulação do meio de cultura deve concentrar as substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plântulas (STANCATO; NÉRI; TAVARES, 2009), de acordo com as exigências de cada espécie (KERBAUY; CHAER, 2011). Na propagação *in vitro* de orquídeas, o meio MS (MURASHIGE; SHOOG, 1962) modificado vem sendo utilizado pela maioria dos laboratórios (FARIA et al., 2002; MORAES; FARIA; CUQUEL, 2005), assim como diversos meios simplificados, à base de fertilizantes comerciais e componentes orgânicos como polpa de banana, polpa de tomate e água de coco (ARAÚJO et al., 2006; BAQUE et al., 2011; COLOMBO; FAVETTA; FARIA, 2012; FAVETTA; COLOMBO; FARIA, 2014; STANCATO; ABREU; FURLANI, 2008; SU; SCHNITZER; FARIA, 2012).

Além da adequação do meio de cultura à espécie, deve se ajustar as condições de luminosidade na câmara de crescimento; pois, a quantidade e a qualidade da luz oferecida aos propágulos são importantes para a regulação das vias bioquímicas que controlam o crescimento e morfogênese vegetal. Embora, atualmente, as lâmpadas fluorescentes sejam as mais utilizadas (POUDEL; KATAOKA; MOCHIOKA, 2008), estudos vêm sendo realizados para investigar a qualidade de luz emitida por LEDs (Light Emitting Diode) na promoção do crescimento e morfogênese em plantas propagadas *in vitro* (HEO et al., 2006; MENGXI et al., 201; ROCHA et al., 2010), havendo também indícios de que a qualidade da luz possa afetar o processo de aclimatização de plantas (NHUT et al., 2005).

Ademais, do ponto de vista econômico, os LEDs são mais eficientes na utilização da energia elétrica, o consumo chega a ser cinco vezes menor que uma lâmpada fluorescente de 15 W e, como o calor emitido pelo LED é menor, ocorrerá redução na necessidade de climatização do ambiente (VALENTIM, FERREIRA E COLETTI, 2010); outra vantagem econômica gerada pelo uso do LED é com a

manutenção, visto que a durabilidade dessa fonte de luz é cerca de sete vezes maior que a da lâmpada fluorescente comum (GUPTA; JATOTHU, 2013). Ainda, o fato dos LEDs serem livres de mercúrio, também se torna importante quando se pensa na preservação do meio ambiente (VALENTIM, FERREIRA E COLETTI, 2010).

Assim, objetivou-se avaliar a influência de fontes de luz e meios de cultura no crescimento *in vitro* e na sobrevivência *ex vitro* da orquídea brasileira *Microlaelia lundii*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina-UEL. No Laboratório de Cultura de Tecidos, foram conduzidos ensaios para comparação de dois meios de cultura em sete ambientes, caracterizados por tipos de iluminação.

Plântulas de *Microlaelia lundii* originárias de sementes germinadas *in vitro*, em meio de cultura MS, com metade da concentração de macronutrientes ($\frac{1}{2}$ MS) (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), com comprimento médio de 5 mm (± 1) e dois a três primórdios foliares foram transferidas para os meios de cultura: 1) $\frac{1}{2}$ MS; e 2) meio simplificado, composto de 5 mL L⁻¹ do fertilizante Biofert Plus[®] NPK (08-09-09) e polpa de banana 'Nanica' (60 g L⁻¹), no estágio de maturação quatro. A base dos meios foi composta por 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 8 g L⁻¹ de ágar; o pH dos meios foi ajustado para $6,0 \pm 0,2$ antes da adição do ágar. Os meios de cultura foram acondicionados em frascos de vidro com volume de 350 mL, com 50 mL de meio, e autoclavados à temperatura de 121 °C e pressão de 1atm. durante 25 minutos.

Após a transferência das plântulas para os meios de cultura, em câmara de fluxo laminar, acondicionaram-se os frascos em câmaras de cultivo composta por sete ambientes (Tabela 3.4.1). Cada ambiente consistiu em uma prateleira de MDF (123 cm de comprimento x 50 cm de altura x 66 cm de profundidade) isolado em todos os lados com placas de isopor, a fim de evitar interferência entre os comprimentos de ondas emitidos pelas fontes de luz.

Tabela 3.4.1 – Caracterização das fontes de luz usadas para a iluminação de plântulas de *Microlaelia lundii* cultivadas *in vitro*. Londrina, PR, 2014.

	Fonte de Luz	Luminosidade (lux)
L1	Lâmpada tubular LEDtube 4000k Philips Cool White	1840
L2	Lâmpada tubular LEDtube 6500k Philips Daylight	2782
L3	L1 + L2	3940
L4	L1 + L1	3750
L5	Duas fitas de LED vermelho	112
L6	Duas fitas de LED azul	157
L7	Lâmpada tubular Fluorescente OSRAM 40 W Luz do Dia Especial – controle	1683

Fonte: o próprio autor.

A combinação entre um meio de cultura e uma fonte de iluminação consistiu em um tratamento, composto por oito repetições (frascos) com sete plântulas por frasco, distribuídos ao acaso dentro de cada ambiente.

As diferenças de iluminâncias entre as lâmpadas foram medidas por meio de luxímetro (Tabela 3.4.1). O aparelho foi posicionado na altura dos frascos em três posições diferentes na prateleira; região central e extremidades, sob a área iluminada. A temperatura da câmara foi mantida a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 16 horas-luz.

A análise dos LEDs e da lâmpada fluorescente para a caracterização da qualidade da luz foi realizada no Laboratório de Óptica e Optoeletrônica da UEL, e a partir dos dados obtidos foi gerado um gráfico no software MATLAB.

Aos 200 dias, avaliou-se as variáveis fitométricas: altura da parte aérea (cm), número de brotos, massa fresca e seca da parte aérea (g), número de raízes, comprimento médio das raízes (cm), massa fresca e seca de raízes (g) e conteúdo de clorofila das folhas (mg g^{-1}). Foram avaliados quatro frascos por tratamento, totalizando 28 plântulas.

Para a determinação do teor de clorofila das folhas retirou-se 50 mg de tecido foliar de cada repetição para maceração em acetona 80%. Após a maceração, as amostras foram colocadas em tubos graduados envolvidos em papel alumínio (a fim de manter a solução protegida da luz), completando-se o volume para 10 mL com acetona 80%. Os tubos foram centrifugados para separação das fases sólida e líquida, retirando-se uma alíquota da fase líquida para leitura da

absorbância em espectrofotômetro (modelo Genesys 10S Spectrophotometer, UV-VIS®). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda 663 nm para clorofila *a* e 645 nm para clorofila *b*. O conteúdo de clorofila foi determinado por meio das equações propostas por Arnon (1949) e os resultados foram expressos em miligrama de clorofila por grama de matéria fresca.

- Clorofila *a* (mg g^{-1}) = $(12,7 A_{663} - 2,69 A_{645}) 10 / (1000 * \text{massa das amostras})$
- Clorofila *b* (mg g^{-1}) = $(22,9 A_{645} - 4,68 A_{663}) 10 / (1000 * \text{massa das amostras})$
- Clorofila *a + b* (mg g^{-1}) = clorofila *a* + clorofila *b*
- Relação clorofila *a/b* = clorofila *a* / clorofila *b*

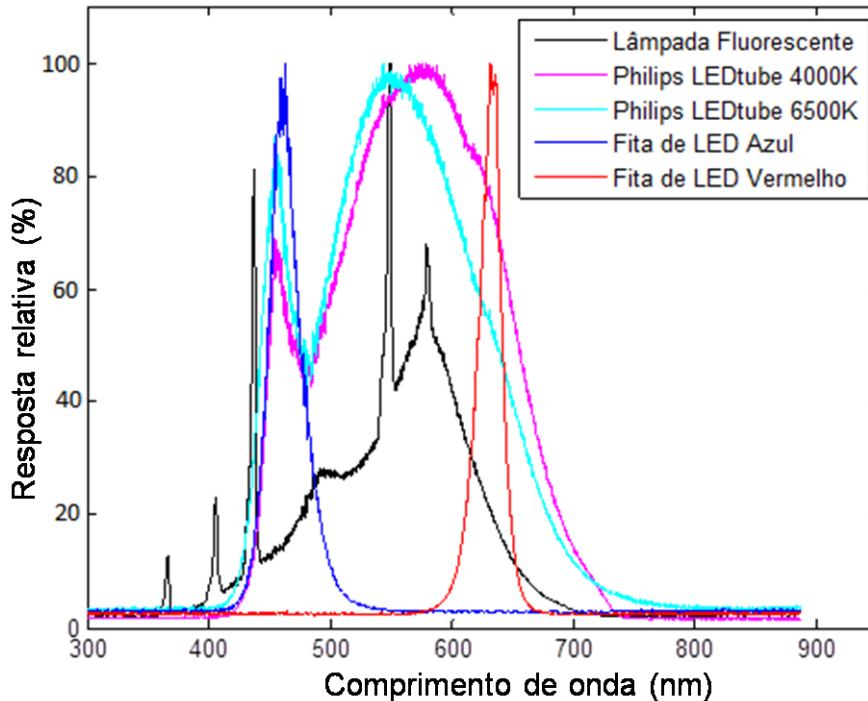
Para a avaliação da porcentagem de sobrevivência na etapa de aclimatização, as plântulas foram transferidas para bandejas de isopor, com 128 células, empregando esfagno como substrato; cada célula recebeu uma plântula e o conjunto de sete plântulas consistiu em uma repetição, totalizando quatro repetições por tratamento (28 plântulas). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com sombreamento de 70%, sob irrigações realizadas diariamente por microaspersão. Após 60 dias verificou-se a porcentagem de sobrevivência das plantas.

A análise estatística dos dados foi composta de análise de variâncias individuais e análise conjunta de ambientes (tipo de lâmpada). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3.5.1 apresenta a Densidade Espectral de Potência (PSD) das fontes de luz estudadas. As fitas de LED apresentam a PSD em forma de sino, centrada nos respectivos comprimentos de onda de sua cor (aproximadamente 460 nm para LED azul e 640 nm para o LED vermelho), e as lâmpadas LEDtube da Philips são semelhantes a essas fitas, porém deslocadas. A LEDtube 6500k apresenta seu máximo em um comprimento de onda menor que a LEDtube 4000k. Portanto, embora sejam LEDs brancos, o LEDtube 6500k tende para o azul, enquanto a LEDtube 4000k tende para o vermelho.

Figura 3.5.1 – Distribuições espectrais de energia relativa dos LEDs e da lâmpada fluorescente. Londrina, PR, 2014.



Fonte: o próprio autor.

Por outro lado, a lâmpada fluorescente apresentou picos de intensidade em comprimentos de ondas discretos. Isto se atribui ao fato da luz visível (menor energia) ser gerada pela excitação da camada de fósforo após a circulação da corrente elétrica no gás. Assim, o elétron do átomo de fósforo sobe níveis energéticos discretos e bem definidos que quando retornados ao estado inicial emite fótons com energia definida e, por conseguinte, comprimentos de ondas específicos.

A qualidade da luz é um dos fatores de maior importância na regulação do desenvolvimento da planta, visto que existem fotorreceptores que são ativos sob comprimentos de ondas de luz específicos (LEE et al., 2007). Nesse estudo, diferenças no crescimento de plântulas de *Microlaelia lundii* foram verificadas quando as plântulas foram submetidas a diferentes fontes de luz e meios de cultura (Tabela 3.5.1). Para a variável altura da parte aérea (APA) existiu interação entre as fontes de luz e os meios de cultivo. No meio simplificado (SP) verifica-se plântulas mais altas em relação ao meio MS, exceto para as fontes de luz L2 e L5 (L2 - LEDTUBE 6500K, L5 - LED vermelho), nas quais a APA não diferiu

entre as duas formulações de meios cultura.

Tabela 3.5.1 - Parâmetros biométricos avaliados em plântulas de *Microlaelia lundii* submetidas a diferentes fontes de luz e meios de cultura. Londrina, PR, 2014.

Lâmpada*	Altura da parte aérea (cm)			Número de brotos		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	4,6 abB**	5,36 bcA	4,98	2,67	2,83	2,75 ab
L2	4,41 abA	4,88 bcA	4,64	2,75	3,00	2,88 ab
L3	3,39 cB	4,56 cA	3,98	3,04	3,63	3,33 a
L4	3,68 bcB	5,61 bA	4,64	1,88	2,54	2,21 b
L5	5,17 aA	5,60 bA	5,38	0,75	0,75	0,75 c
L6	5,36 aB	6,67 aA	6,01	0,75	1,21	0,98 c
L7	2,91 cB	5,62 bA	4,27	0,75	1,12	0,94 c
Média	4,22	5,47		1,86 A	2,09 A	
CV (%)	9,57			33,16		

Lâmpada	Massa fresca da parte aérea (g)***			Massa seca da parte aérea (g)***		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	1,45 aA	1,15 abcA	1,30	0,15 aA	0,14 bA	0,15
L2	1,42 aA	1,40 abA	1,41	0,17 aA	0,14 bA	0,15
L3	1,01 abcB	1,42 abA	1,21	0,14 aB	0,21 aA	0,17
L4	1,27 abA	1,50 aA	1,38	0,18 aB	0,22 aA	0,20
L5	0,80 bcA	0,74 cA	0,77	0,05 bA	0,05 cA	0,05
L6	1,13 abcA	0,93 bcA	1,03	0,07 bA	0,06 cA	0,07
L7	0,65 cA	0,85 cA	0,74	0,08 bB	0,13 bA	0,10
Média	1,10	1,14		0,12	0,14	
CV (%)	20,81			17,20		

*L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500K; L3 - L1 + L2; L4 - L1 + L1; L5 - LED vermelho; L6 - LED azul; L7 - Lâmpada fluorescente (controle). MS - meio MS com metade da concentração de macronutrientes e SP - meio simplificado. **Letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha, para cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.*** Valores calculados com base na soma de sete plântulas.

Fonte: o próprio autor.

Como o fertilizante utilizado no meio simplificado apresenta, praticamente, os mesmos macro e micro nutrientes presentes no meio MS (FAVETTA, COLOMBO e FARIA, 2014), o incremento na altura das plântulas, provavelmente, ocorreu pela adição da polpa de banana. Pois, a polpa de banana 'Nanica' é fonte de potássio e vitaminas: A, C, tiamina, riboflavina e niacina (ARDITTI, 2008), componentes que enriquecem os meios nutritivos e incrementam o crescimento das plântulas *in vitro* (FAVETTA, COLOMBO e FARIA, 2014).

Em estudos com meio simplificado, Unemoto et al. (2007)

observaram que as plântulas de *Microlaelia lundii* não sobreviveram no meio simplificado à base do adubo NPK (10-30-20), sugerindo que a espécie requer um meio nutritivo com maior complexidade de elementos, como o meio MS. Desta forma, observa-se neste trabalho, que a banana 'Nanica' presente no meio SP supriu as necessidade de nutrientes das plântulas, superando o meio MS.

Com relação às fontes de luz, L6 (LED azul) apresentou a maior média para APA das plântulas nos dois meios de cultura analisados. No entanto, Poudel, Kataoka e Mochioka (2008) e Heo et al. (2006) observaram maior comprimento de parte aérea em micro-estacas de uva cultivadas sob LED vermelho. Assim, neste trabalho, esse fato pode indicar apenas um estiolamento das plântulas devido à menor intensidade luminosa; pois, a luminosidade (lux) apresentada pelas fitas de LED é, aproximadamente, 15 vezes menor a das demais fontes de luz. Resultados semelhantes foram observados para as plântulas que cresceram sob a fonte de luz L5. Ainda, observa-se que as plântulas submetidas às fontes de luz L5 e L6, em ambos os meios de cultura, apresentaram menor número de brotos e sistema radicular menos desenvolvido (Tabelas 3.5.1 e 3.5.2).

Para a variável número de brotos (Tabela 3.5.1) não houve efeito significativo dos meios de cultura, sendo que a resposta para essa variável foi influenciada pela fonte de luz. As plântulas cultivadas sob as fontes de luz L3, L2, L1 e L4 (L3 - LEDTube 4000k + LEDTube 6500k; L1 - LEDTube 4000k; L4 - LEDTube 4000k + LEDTube 4000k) apresentaram o maior número de brotos, respectivamente. No entanto, o acúmulo de massa seca na parte aérea foi dado em função da interação entre meio de cultura e fonte de luz. É provável que o número de brotos, também tenha relação direta com o acúmulo de matéria seca, conforme verificou-se para as plântulas cultivadas em meio SP sob as fontes de luz L3 e L4.

Dessa forma, pode-se inferir que a maior luminosidade fornecida por essas fontes de luz e o maior aporte de nutrientes ao meio, fornecidos pela polpa de banana, estimularam a síntese e o acúmulo de reservas pelos brotos. O número de brotos, também, torna-se importante na fase de aclimatização, pois, a maximização da produção em número, tamanho e qualidade de brotos, reflete em maior porcentagem de sobrevivência nessa fase.

A composição do meio de cultura e a fonte de luz, também influenciaram o crescimento do sistema radicular (Tabela 3.5.2). Assim, analisando as variáveis relacionadas ao sistema radicular observa-se que a indução de raízes,

provavelmente, é dependente da intensidade luminosa, corroborando Lee et al., (2007).

Tabela 3.5.2 – Parâmetros biométricos avaliados em plântulas de *Microlaelia lundii* submetidas a diferentes fontes de luz e meios de cultura. Londrina, PR, 2014.

Lâmpada*	Número de raízes			Comprimento médio de raízes (cm)		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	8,38	9,54	8,96 a**	3,59 bA	4,05 bA	3,82
L2	8,58	9,38	8,98 a	3,07 bA	3,92 bA	3,50
L3	8,79	12,08	10,44 a	2,90 bA	3,47 bA	3,18
L4	7,21	10,21	8,71 a	3,39 bB	6,20 aA	4,8
L5	3,58	3,71	3,65 c	2,94 bA	3,35 bA	3,15
L6	4,46	4,13	4,29 bc	3,27 bA	4,02 bA	3,65
L7	4,46	7,29	6,38 b	5,45 aA	5,54 aA	5,50
Média	6,64 B	8,05 A		3,52	4,37	
CV (%)	20,45			15,90		
Lâmpada	Massa fresca de raízes (g)***			Massa seca de raízes (g)***		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	1,88 abB	2,64 bA	2,26	0,21 abcB	0,29 bcA	0,25
L2	1,24 bB	2,14 bcA	1,69	0,15 cdeB	0,25 cA	0,20
L3	1,24 bB	2,19 bcA	1,71	0,18 bcdB	0,30 bcA	0,24
L4	1,65 abB	4,89 aA	3,27	0,26 abB	0,59 aA	0,42
L5	0,96 bA	1,04 dA	1,00	0,07 eA	0,08 dA	0,07
L6	1,09 bA	1,35 cdA	1,22	0,08 deA	0,11 dA	0,10
L7	2,49 aA	3,05 bA	2,77	0,29 aB	0,39 bA	0,34
Média	1,50	2,47		0,18	0,29	
CV (%)	24,46			19,99		

*L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500K; L3 - L1 + L2; L4 - L1 + L1; L5 - LED vermelho; L6 - LED azul; L7 - Lâmpada fluorescente (controle). MS - meio MS com metade da concentração de macronutrientes e SP - meio simplificado.

Letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha, para cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. * Valores calculados com base na soma de oito plântulas.

Fonte: o próprio autor.

Os LEDs tubulares L1, L2, L3 e L4, propiciaram maior número de raízes por planta nos dois meios de cultura. Por outro lado, raízes mais compridas foram observadas em plântulas cultivadas sob L7 (Lâmpada fluorescente) em ambos os meios e sob L4 em meio SP. Para a massa fresca e seca de raízes, verifica-se valores superiores em meio SP, na fonte de luz L4.

Para os teores de clorofila (Tabela 3.5.3), verifica-se diferenças entre

os tratamentos e interação significativa entre os meios de cultura e as fontes de luz. Maior teor de clorofila *a* e clorofila *b* foram encontrados nas plântulas cultivadas em meio SP para nas fontes de luz L4 e L7. Rocha et al. (2010) e Nhut et al. (2003) observaram maior conteúdo de clorofila em brotações de morango iluminadas por LEDs vermelho e vermelho combinado com azul, respectivamente. A fonte de luz L4 apresenta tendência para o vermelho, corroborando as observações desses autores. Por outro lado, Mengxi et al., 2011 em estudos com *Oncidium* sp., obtiveram conteúdos de clorofila superiores sob LED azul.

Tabela 3.5.3 – Conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *a* + clorofila *b* e relação de clorofila *a/b* em plântulas de *Microlaelia lundii* submetidas a diferentes lâmpadas e meios de cultura. Londrina, 2014.

Lâmpada*	Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹)			Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹)		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	0,66 abA**	0,55 bA	0,61	0,40 abA	0,29 cB	0,35
L2	0,72 aA	0,57 bB	0,64	0,44 aA	0,32 bcB	0,38
L3	0,56 abA	0,51 bA	0,54	0,37 abA	0,28 cB	0,33
L4	0,64 abB	0,82 aA	0,73	0,38 abA	0,40 abA	0,39
L5	0,53 abA	0,54 bA	0,54	0,32 bA	0,29 cA	0,30
L6	0,52 bA	0,59 bA	0,56	0,34 bA	0,30 cA	0,32
L7	0,49 bB	0,89 aA	0,69	0,35 abB	0,46 aA	0,40
Média	0,59	0,64		0,37	0,33	
CV (%)	14,38			13,11		
Lâmpada	Clorofila Total (mg g ⁻¹)			Relação Clorofila <i>a/b</i> (mg g ⁻¹)		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	1,06 abA	0,84 bB	0,95	1,66 abB	1,89 abcA	1,78
L2	1,16 aA	0,88 bB	1,02	1,63 abB	1,80 cA	1,72
L3	0,94 abA	0,79 bA	0,86	1,50 bcB	1,83 bcA	1,66
L4	1,02 abB	1,22 aA	1,12	1,71 abB	2,07 aA	1,89
L5	0,85 bA	0,83 bA	0,84	1,67 abB	1,90 abcA	1,79
L6	0,86 bA	0,89 bA	0,87	1,54 abcB	2,01 abA	1,77
L7	0,84 bB	1,34 aA	1,09	1,43 cB	1,92 abcA	1,68
Média	0,96	0,97		1,59	1,92	
CV (%)	13,70			5,18		

*L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500K; L3 - L1 + L2; L4 - L1 + L1; L5 - LED vermelho; L6 - LED azul; L7 - Lâmpada fluorescente (controle). MS - meio MS com metade da concentração de macronutrientes e SP - meio simplificado.

**Letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha, para cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Fonte: o próprio autor.

Os pigmentos fotossintéticos apresentam grande importância para a fotossíntese; estão relacionados à multiplicação celular e ao crescimento das plantas, sendo as clorofilas responsáveis pela absorção e envio de energia luminosa para os centros de reação (TAIZ; ZEIGER, 2013); assim, diferenças na qualidade espectral da radiação podem influenciar a composição desses pigmentos e conseqüentemente todo o aparato funcional fotossintético (TOPCHIIY et al., 2005). No entanto, maior conteúdo desses pigmentos não indicam, necessariamente, maior taxa fotossintética, pois Saebo et al. (1995) em estudos com a espécie arbórea *Betula pendula* encontraram evidências de que plântulas com menor teor de clorofila podem usa-lá de forma mais eficiente do que plântulas com clorofila em excesso.

A relação clorofila *a/b* (Tabela 3.5.3) apresentou interação significativa entre os fatores, sendo o meio SP superior ao meio MS. A fonte de luz L4 apresentou a maior relação no meio SP, porém diferiu apenas de L2 e L3. Para a planta medicinal *Withania somnifera*, maior razão entre clorofila *a* e *b*, foi obtida em folhas que cresceram sob uma mistura de luz vermelho e vermelho distante (LEE et al., 2007).

Na fase de aclimatização, o meio SP proporcionou mais de 90% de sobrevivência (Tabela 3.5.4), indicando a superioridade desse meio em relação ao MS para o cultivo de *M. lundii*. Dada a alta porcentagem de sobrevivência, as fontes de luz não influenciaram a sobrevivência dessas plantas no meio simplificado. No entanto, o meio MS proporcionou baixas porcentagens de sobrevivência, especialmente, sob as fontes L4 e L7.

Tabela 3.5.4 - Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Microlaelia lundii* submetidas a diferentes lâmpadas e meios de cultura e aclimatizadas em esfagno. Londrina, 2015.

Lâmpada*	% de Sobrevivência	
	MS	SP
L1	75,00 aB**	100,00 aA
L2	64,29 abB	92,86 aA
L3	53,57 abB	100,00 aA
L4	18,45 cB	100,00 aA
L5	35,71 abcB	96,43 aA
L6	35,71 abcB	96,43 aA
L7	25,00 bcB	96,43 aA
CV (%)	17,36	

*L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500K; L3 - L1 + L2; L4 - L1 + L1; L5 - LED vermelho; L6 - LED azul; L7 - Lâmpada fluorescente (controle). MS - meio MS com metade da concentração de macronutrientes e SP - meio simplificado.

**Letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha, para cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Fonte: o próprio autor.

Em suma, o meio simplificado nas fontes de luz L1, L2, L3 e L4 propiciou melhores condições para o desenvolvimento das plântulas, o que garantiu uma grande porcentagem de sobrevivência durante a fase de aclimatização. Embora a lâmpada fluorescente tenha proporcionado resultados semelhantes aos LEDs para diversas variáveis, pensando em economia e preservação do meio ambiente recomenda-se o uso dos LEDs. Ademais, como as fontes de luz L1, L2 e L3, L4 tiveram resultados semelhantes, seria interessante o uso das fontes L1 e L2, pelo menor custo de instalação e também de manutenção, já que esses tratamentos utilizam apenas uma lâmpada e não duas como os tratamentos L3 e L4.

3.6 CONCLUSÃO

O meio simplificado composto pelo fertilizante Biofert[®] e polpa de banana 'Nanica' nas fontes de luz L1, L2, L3 e L4 são recomendados para a propagação *in vitro* de *Microlaelia lundii*.

4 ARTIGO B: LEDs COMO ALTERNATIVA À LÂMPADAS FLUORESCENTES NO CRESCIMENTO DE *Dendrobium nobile* EM DOIS MEIOS DE CULTURA

4.1 RESUMO

A espécie *Dendrobium nobile* está entre as principais orquídeas comercializadas no mundo, isso devido à beleza de suas flores, aliada a facilidade de cultivo. No entanto, para atender a demanda do mercado, são necessárias mudas de qualidade e com preço reduzido. Tal demanda é suprida pela propagação *in vitro*, mas, para isso, fatores como meio de cultura e luminosidade devem estar adequados a espécie. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de fontes de luz e meios de cultura no crescimento *in vitro* de um híbrido de *D. nobile*. Plântulas de *D. nobile*, subcultivadas em frascos contendo meio de cultura ½ MS e meio simplificado, foram acondicionadas em câmara de cultivo caracterizadas pelo tipo de luz: L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500K; L3 – L1 + L2; L4 – L1 + L1; L5 - Lâmpada fluorescente (controle). Após 200 dias avaliou-se as variáveis fitométricas, teor de clorofilas e carotenóides e pH do meio de cultura; também foi avaliada a porcentagem de sobrevivência *ex vitro*. O meio simplificado propiciou maior altura da parte aérea, massa fresca e seca da parte aérea e raízes, e volume do sistema radicular. A altura e massa seca da parte aérea não sofreram influências da fonte de luz. Conclui-se que o meio simplificado e as lâmpadas LEDs podem ser usados na propagação *in vitro* de *D. nobile*.

Palavras chaves: Fonte de Luz. LED. Orchidaceae.

4.2 ABSTRACT

Dendrobium nobile species is among the leading orchids marketed in world, that due to the beauty of its flowers, combined with ease of cultivation. However, to attend the market demand, are necessary the quality seedlings and reduced price. This demand is supplied by *in vitro* propagation, but for this, factors such as culture medium and luminosity must be appropriate to the species. The objective of this study was to evaluate the influence of light sources and culture media on *in vitro* growth of a *D. nobile* hybrid. Seedlings of *D. nobile*, subcultured in jars containing a ½ MS medium

and simplified medium, were placed in growth chamber characterized by the type of light: L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500K; L3 - L1 + L2; L4 – L1 + L2; L5- Fluorescent lamp (control). After 200 days it was evaluated the phytometrics parameters, chlorophylls and carotenoids content and the final pH of the culture medium; was also evaluated the percentage of *ex vitro* survival. The simplified medium led to greater canopy height, fresh and dry mass of canopy and root, and root system volume. The canopy height and dry mass did not suffer influences of the light source. It is concluded that the simplified medium and the LED lamps can be used *in vitro* propagation of *D. nobile*.

Keywords: Light Source. LED. Orchidaceae.

4.3 INTRODUÇÃO

A orquídea *Dendrobium nobile* Lindl., popularmente conhecida como “olho de boneca”, nativa do sudoeste asiático, é cultivada em vários continentes, principalmente, pela sua adaptabilidade a temperaturas entre 5 e 35 °C (WATANABE et al., 2002). Esta espécie e seus híbridos estão entre as orquídeas mais comercializadas no Brasil; devido, especialmente, às suas belas floradas, grande durabilidade das flores, facilidade de cultivo e preço relativamente baixo, quando comparado a outras orquídeas.

A propagação vegetativa, por meio de estacas do pseudobulbo, ainda é bastante utilizada pelos produtores para a propagação desta espécie. No entanto, além de ser onerosa, não apresenta alto rendimento, assim, para garantir o sucesso comercial, é necessário colocar no mercado mudas de qualidade e com preço mais acessível, assegurados pela propagação *in vitro*.

As técnicas de propagação *in vitro*, têm suprido a demanda do mercado, mas como cada espécie e híbrido pode responder, de modo diferente, a fatores como composição do meio de cultura e iluminação, estudos precisam ser realizados visando adequar para cada espécie às condições ideais (FARIA et al., 2012).

A formulação do meio de cultura é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plântulas *in vitro*. O meio de cultura MS (MURASHIGE; SHOOG, 1962) é o mais empregado na propagação *in vitro* de orquídeas.

Entretanto, os meios simplificados, compostos por fertilizantes comerciais e polpa de frutas (STANCATO; NÉRI; TAVARES, 2009; SU; SCHNITZER; FARIA, 2012; UNEMOTO et al., 2007) têm sido utilizados, com sucesso, devido ao baixo custo dos componentes e a grande acessibilidade, dispensando o uso de reagentes como nitrato de amônia e de potássio, utilizados no MS, cuja obtenção é controlada pelo Ministério da Defesa por meio da Lei Federal nº 3.665 de 20 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000; SU; SCHNITZER; FARIA, 2012;).

Além do meio de cultura, as condições de luminosidade nas câmaras de crescimento influenciam o crescimento e desenvolvimento das plântulas. Embora, a lâmpada fluorescente, ainda, seja a principal fonte de iluminação nas câmaras de crescimento, as lâmpadas LEDs vêm se destacando como uma fonte de luz mais eficiente para a regeneração e o crescimento de plantas *in vitro* (GUPTA; JATOTHU, 2013). Ademais, os LEDs apresentam alta eficiência energética, maior vida útil, ausência de calor no feixe de luz e ausência de substâncias tóxicas, como o mercúrio (STEELE, 2007); vantagens que podem impulsionar o rendimento da propagação comercial de orquídeas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de fontes de luz e meios de cultura no crescimento *in vitro* de um híbrido de *D. nobile*.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Estadual de Londrina, em 2014.

Sementes de um híbrido obtido a partir do cruzamento de dois genótipos de *Dendrobium nobile* foram germinadas em meio de cultivo ½ MS e mantidas por três meses sob lâmpada fluorescente. Ao atingirem 10 mm ± 2, com dois a três primórdios foliares, foram subcultivadas em dois meios de cultura: 1) ½ MS e 2) meio simplificado, composto de 5 mL L⁻¹ do fertilizante Biofert Plus® NPK (08-09-09) e polpa de banana 'Nanica', 60 g L⁻¹, no estágio de maturação quatro. A base dos dois meios nutritivos foi composta por 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 8 g L⁻¹ de ágar; o pH dos meios foi ajustado para 5,8 ± 0,2 antes da adição do ágar. Frascos de vidro de 350 mL receberam 50 mL de meio e foram autoclavados à temperatura de 121 °C e pressão de 1atm. durante 25 minutos.

Os frascos com as plântulas foram acondicionadas em câmaras de crescimento, constituída por uma prateleira de MDF (123 cm comprimento; 50 cm de altura; 66 cm de profundidade), caracterizadas por diferentes fontes de luz (Tabela 4.4.1); para evitar a interferência entre os comprimentos de ondas de luz emitidos, as prateleiras foram isoladas por placas de isopor.

Tabela 4.4.1 – Caracterização das fontes de luz usadas para iluminação de plântulas de um híbrido de *Dendrobium nobile*. Londrina, PR, 2014.

	Fonte de Luz	Luminosidade (lux)
L1	Lâmpada tubular LEDTube 4000k Philips Cool White	1840
L2	Lâmpada tubular LEDTube 6500k Philips Daylight	2782
L3	L1 + L2	3940
L4	L1 + L1	3750
L5	Lâmpada tubular Fluorescente OSRAM 40 W Luz do Dia Especial (controle)	1683

Fonte: o próprio autor.

A combinação entre um meio de cultura e uma fonte de luz consistiu em um tratamento, composto por 10 repetições (frascos) com oito plântulas por frasco, distribuídos ao acaso dentro de cada ambiente.

A temperatura da sala de crescimento foi mantida a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 16 horas-luz. Para medir as diferenças de iluminâncias entre as lâmpadas foi utilizado Luxímetro, posicionando o aparelho na altura dos frascos em três posições diferentes na prateleira; região central e extremidades, sob a área iluminada.

Após 200 dias avaliou-se as variáveis: altura da parte aérea (cm); número de brotos; massa fresca e seca da parte aérea (g); volume radicular (mL); massa fresca e seca de raízes (g); conteúdo de clorofilas e carotenóides, pH final do meio de cultura e porcentagem de sobrevivência *ex vitro*.

Para análise do conteúdo de clorofila das folhas, retirou-se 50 mg de tecido da segunda e terceira folha expandida, em seguida as amostras foram colocadas em tubos graduados, envolvidos com papel alumínio (para manter a solução protegida da luz), contendo sete mL de solução extratora (acetona 80%). Os tubos foram mantidos em geladeira e após cinco dias verificou-se que as amostras

estavam completamente descoloridas. O volume da solução extratora (acetona 80%) de cada tubo foi completado para 10 mL e homogeneizado. Então, retirou-se uma alíquota desse extrato para leitura da absorvância em espectrofotômetro (modelo Genesys 10S Spectrophotometer, UV-VIS®) (VIEIRA et al., 2010). As leituras dos extratos cetônicos foram realizadas nos comprimentos de onda de 663 nm para clorofila *a* e 645 nm para clorofila *b*. O conteúdo de clorofila foi determinado por meio das equações propostas por Arnon (1949) e os resultados foram expressos em miligrama de clorofila por grama de matéria fresca.

- Clorofila *a* (mg g^{-1}) = $(12,7 A_{663} - 2,69 A_{645}) 10 / (1000 * \text{massa da amostra})$
- Clorofila *b* (mg g^{-1}) = $(22,9 A_{645} - 4,68 A_{663}) 10 / (1000 * \text{massa da amostra})$
- Clorofila *a + b* (mg g^{-1}) = clorofila *a* + clorofila *b*
- Relação clorofila *a/b* = clorofila *a* / clorofila *b*
- Carotenoides (mg g^{-1}) = $(1000 A_{470} - 3,27 \text{ clorofila } a - 104 \text{ clorofila } b) 10 / (229 * 1000 * \text{massa da amostra})$

Para avaliar a porcentagem de sobrevivência, as plântulas foram transferidas para bandejas de isopor de 128 células, contento esfagno como substrato, e acondicionadas em casa de vegetação, com 70% de sombreamento. Cada célula recebeu uma plântula, totalizando 32 por tratamento (quatro repetições). Aos 60 dias avaliou-se a porcentagem de sobrevivência das plantas.

Os dados foram avaliados por meio de análise de variâncias individuais e conjunta de ambientes (fontes de luz) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento das plântulas de *Dendrobium nobile* foi influenciado pelo meio de cultivo e pelas fontes de luz. Para a variável altura da parte aérea (APA), o meio simplificado (SP) proporcionou plântulas mais altas, independente das fontes de luz (Tabela 4.5.1). Corroborando esses resultados, Su, Schnitzer e Faria, 2012, verificaram para a mesma espécie que o meio simplificado à base de fertilizante NPK (08-09-09) e polpa de banana 'Nanica' propiciou a maior média para a variável altura da parte aérea. A polpa de banana supre grande parte do nitrogênio, potássio e vitaminas A, C, tiamina, riboflavina e niacina utilizados para o

crescimento do explante (ARAÚJO et al., 2006; ARDITTI, 2008), podendo incrementar a altura das plântulas.

Tabela 4.5.1 – Parâmetros biométricos avaliados em plântulas de um híbrido de *Dendrobium nobile* submetidas a diferentes fontes de luz e meios de cultura. Londrina, PR, 2014.

Lâmpada*	Altura da parte aérea (cm)			Número de brotos		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	4,43 aA**	5,61 aA	5,02	4,67 aA	2,58 abB	3,63
L2	4,20 aA	5,15 aA	4,68	3,33 bA	3,17 aA	3,25
L3	4,70 aA	5,71 aA	5,21	2,38 cA	2,13 bA	2,25
L4	4,72 aA	5,59 aA	5,15	2,08 cB	2,79 abA	2,44
L5	4,70 aB	6,19 aA	5,45	2,08 cA	2,55 abA	2,32
Média	4,55	5,65		2,64	2,90	
CV (%)	17,40			15,45		
Lâmpada	Massa fresca da parte aérea (g)***			Massa seca da parte aérea (g)***		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	2,28 abB	3,57 abA	2,93	0,27 abB	0,36 aA	0,32
L2	2,65 aB	4,06 aA	3,36	0,28 abB	0,37 aA	0,33
L3	2,56 aB	3,20 bA	2,88	0,29 aB	0,37 aA	0,33
L4	1,98 abB	3,40 abA	2,69	0,24 abB	0,37 aA	0,30
L5	1,77 bB	3,90 abA	2,83	0,20 bB	0,37 aA	0,28
Média	2,25	3,63		0,25	0,36	
CV (%)	12,96			13,46		

*L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500K; L3 - L1 + L2; L4 - L1 + L1; L5 - Lâmpada fluorescente (controle). MS - meio MS com metade da concentração de macronutrientes e MSP - meio simplificado.

Letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha, para cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.* Valores calculados com base na soma de oito plântulas.

Fonte: o próprio autor.

Para número de brotos (Tabela 4.5.1), o meio MS na fonte de luz L1 (L1 - LEDTube 4000k) propiciou a maior média, com aproximadamente cinco brotos por plântula. Enquanto no meio SP a fonte de luz L2 (L2 - LEDTube 6500k) apresentou a maior média, diferindo apenas de L3 (L3 - LED 4000k + LED 6500k). Rocha et al. (2010) também encontraram maior número de brotos em morangueiro, sob LEDs vermelho, azul e verde, em comparação à lâmpadas fluorescentes.

Com relação a massa fresca e seca da parte aérea (Tabela 4.5.1), o meio SP também se destacou, proporcionando as maiores médias. Quanto as fontes de luz, não houve diferença significativa para massa seca da parte área. Para massa

fresca, L2 apresentou a maior média, diferendo apenas de L3, no meio simplificado. Kim et al. (2004), em estudos com plântulas de crisântemo, observaram maior massa fresca e seca sob lâmpada fluorescente e a combinação de LED azul e vermelho. No entanto, Nhut et al. (2005) registraram maior massa fresca de parte aérea, apenas, sob a combinação de LED azul e vermelho, em plântulas de *Spathiphyllum* sp.

Das variáveis avaliadas no sistema radicular (Tabela 4.5.2), o meio SP apresentou-se, em média, superior para todas as variáveis, demonstrando a influência desse meio no crescimento do sistema radicular das plântulas. O incremento do sistema radicular proporcionado pelo meio SP pode ter ocorrido em função da adição da polpa de banana 'Nanica' ao meio, pois diversos autores encontraram resultados semelhantes (ARAÚJO et al., 2006; FAVETTA; COLOMBO; FARIA, 2014; SU; SCHNITZER; FARIA, 2012).

Sob as fontes de luz L3 e L4, as plântulas cultivadas em meio SP apresentaram os maiores valores absolutos para volume do sistema radicular e massa fresca e seca de raízes, apesar de não diferirem estatisticamente dos demais. Como a luminosidade em L3 e L4 assumiu maior intensidade que nos demais tratamentos (3940 e 3750 lux, respectivamente) e o meio SP apresenta mais açúcares que o meio MS; pode-se inferir que a assimilação desses carboidratos via fotossíntese tenha sido mais eficiente e aumentado as taxas de crescimento. Soontornchainaksaeng et al. (2001) encontraram os melhores resultados para crescimento e acúmulo de massa seca em plântulas de *Phaius tankervilleae* e *Vanda coerulea* quando essas foram cultivadas em meio Vacin & Went suplementado com 100 g L^{-1} de polpa de banana sob intensidade luminosa de aproximadamente 4000 lux.

Tabela 4.5.2 – Parâmetros biométricos avaliados em plântulas de um híbrido de *Dendrobium nobile* submetidas a diferentes fontes de luz e meios de cultura. Londrina, PR, 2014.

Lâmpada*	Volume de raízes (mL)**			Massa fresca de raízes (g)**			Massa seca de raízes (g)**		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	4,37 abB**	8,13 aA	6,25	3,08 abB	5,9 bA	4,49	0,38 abB	0,54 bA	0,46
L2	5,63 aA	6,75 aA	6,19	5,10 abB	7,94 abA	6,52	0,45 aA	0,55 bA	0,50
L3	6,00 aB	9,50 aA	7,75	6,19 aB	8,95 abA	7,57	0,52 aB	0,79 aA	0,65
L4	4,25 abB	9,25 aA	6,75	2,94 abB	9,24 aA	6,09	0,32 abB	0,73 abA	0,52
L5	2,25 bB	7,00 aA	4,63	1,94 bB	7,08 abA	4,51	0,24 bB	0,60 abA	0,42
Média	4,50	8,13		3,85	7,82		0,38	0,64	
CV (%)	23,69			27,08			21,71		

* L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500K; L3 – L1 + L2; L4 – L1 + L1; L5 - Lâmpada fluorescente (controle). MS - meio MS com metade da concentração de macronutrientes e MSP - meio simplificado. **Letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha, para cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. *** Valores calculados com base na soma de oito plântulas.

Fonte: o próprio autor.

Com relação a fonte de luz, L3 proporcionou maior volume, massa fresca e massa seca das raízes, não diferindo das fontes L1, L2 e L4 (L4 – LEDtube 4000k + LEDTube 4000K) para volume; L2 e L4 para massa fresca; e L4 e L5 (L5 - Lâmpada fluorescente) para massa seca de raízes. Nhut et al. (2005) não observaram diferenças significativas entre as combinações de LEDs vermelho e azul e a lâmpada fluorescente para as variáveis comprimento de raízes e massa seca de raízes em plântulas de *Spathiphyllum*. Assim, tendo em vista que a função do sistema radicular é nutrir a parte aérea, o sistema radicular bem desenvolvido poderá garantir o desenvolvimento da parte aérea.

Ainda, com relação ao acúmulo de biomassa fresca e seca, tanto na parte aérea como nas raízes, verifica-se maiores valores para as plântulas cultivadas no meio SP. É provável que a maior concentração de carboidratos nesse meio, devido à polpa de banana, tenha favorecido o crescimento das plântulas e acúmulo de biomassa. Faria et al. (2004) encontraram resultados semelhantes para *D. nobile* quando o meio de cultura MS foi suplementado com 60 g L⁻¹ de sacarose.

Quanto ao teor de clorofila e carotenoides acumulados nas folhas (Tabela 4.5.3), não verificou-se diferenças estatísticas entre os tratamentos. Isso evidencia a plasticidade da espécie em relação ao acúmulo de pigmentos fotossintéticos em diferentes comprimentos de onda; é provável que essa

característica seja inerente à própria espécie, visto que a mesma é 'plástica' em relação à adaptabilidade a temperaturas entre 5 e 35 °C.

Tabela 4.5.3 – Conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *a* + clorofila *b* e relação de clorofila *a/b*, carotenoides e pH do meio de cultura em plântulas de um híbrido de *Dendrobium nobile* submetidas a diferentes lâmpadas e meios de cultura. Londrina, 2014.

Lâmpada*	Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹) ^{ns}			Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹) ^{ns}		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	0,54	0,50	0,52	0,14	0,12	0,13
L2	0,23	0,44	0,34	0,06	0,11	0,09
L3	0,49	0,43	0,46	0,13	0,11	0,12
L4	0,67	0,50	0,58	0,18	0,14	0,16
L5	0,54	0,52	0,53	0,17	0,13	0,15
Média	0,50	0,48		0,14	0,12	
CV (%)	34,95			46,21		
Lâmpada	Clorofila Total (mg g ⁻¹) ^{ns}			Relação Clorofila <i>a/b</i> (mg g ⁻¹) ^{ns}		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	0,69	0,61	0,65	4,13	4,37	4,25
L2	0,30	0,56	0,43	3,89	4,43	4,16
L3	0,62	0,54	0,58	3,94	4,05	3,99
L4	0,85	0,64	0,74	3,99	3,86	3,93
L7	0,71	0,65	0,68	3,34	4,13	3,74
Média	0,65	0,59		3,86	4,17	
CV (%)	37,07			15,16		
Lâmpada	Carotenoides (mg g ⁻¹) ^{ns}			pH		
	MS	SP	Média	MS	SP	Média
L1	0,20	0,18	0,19	4,82 aA	3,61 aB	4,22
L2	0,18	0,16	0,17	4,71 aA	3,77 aB	4,24
L3	0,20	0,17	0,18	4,91 aA	3,65 aB	4,28
L4	0,24	0,20	0,22	4,35 aA	3,75 aB	3,46
L5	0,22	0,19	0,20	3,69 bA	3,78 aA	
Média	0,21	0,18		4,50	3,71	
CV (%)	31,45			12,73		

* L1 - LEDtube 4000K; L2 - LEDtube 6500K; L3 - L1 + L2; L4 - L1 + L1; L5 - Lâmpada fluorescente (controle). MS - meio MS com metade da concentração de macronutrientes e MSP - meio simplificado.

**Letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha, para cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. ns:diferenças não significativas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Fonte: o próprio autor.

Para variável pH, de maneira geral, verifica-se maior acidificação nos meios de cultura em que as plantas apresentaram maiores taxas de crescimento. Isso pode ser explicado pela atividade da bomba eletrogênica, H⁺ATPase (YI-YONG et al., 2011); pois, à medida que as plântulas absorvem nutrientes, liberam H⁺ para o meio e, com isso ocorre a sua acidificação.

Contudo, os meios de cultura e as fontes de luz não influenciaram a sobrevivência das plântulas na fase de aclimatização, verificando-se 100% de sobrevivência em todos os tratamentos. Isso ocorreu, provavelmente, porque as plântulas dessa espécie apresentam pseudobulbos mais desenvolvidos que plântulas de outras espécies; assim, mais reservas podem ter sido acumuladas durante o crescimento *in vitro*. Dessa forma, visto que a espécie não apresenta dificuldade para ser propagada, o principal objetivo na produção de mudas de *D. nobile*, deve ser a a qualidade final da muda.

Em síntese, o uso de meio simplificado, apresentou-se, de modo geral, superior ao meio MS para o crescimento *in vitro* dessa espécie. Assim como, os LEDs tubulares da Philips, apresentaram-se como fontes de luz alternativas às lâmpadas fluorescentes, além do mais, seu emprego apresenta menor custo, do ponto de vista energético, e conseqüente apelo ambiental.

4.6 CONCLUSÃO

O meio de cultura simplificado e as lâmpadas LEDs, são indicados para o crescimento *in vitro* de *Dendrobium nobile*.

REFERÊNCIAS

- ANDRETTA, G. M. A. C. **Valor Bruto da Produção Agropecuária Paranaense 1997 e 2004**. Curitiba: DERAL/SEAB/DEB. v. 89, 2006.
- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 53, n. 310, p. 608-613, 2006.
- ARDITTI, J. Micropropagation of orchids. California: A Wiley – **Interscience Publication**, v. 1. 2008.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v.24, p.1-15, 1949.
- BAQUE, Md. A.; SHIN, Y. K.; Elshari, T.; LEE, J.; PAEK, K.Y. Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the micropropagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 10, p. 1247-1254, 2011.
- BLEY, F.B. LED's versus Lâmpadas Convencionais Viabilizando a troca. **Revista Especialize**. Maio 2012.
Disponível <<http://www.ipog.edu.br/uploads/arquivos/9892c8941ef4a84c8c47d8a8ccd fda57.pdf>> Acesso em: 01 de jul. de 2013.
- BRASIL. Ministério da Defesa. **Decreto-Lei n. 3.665, de 20 de novembro de 2000**. Disponível <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d3665.htm> Acesso em: 07 de jan. de 2015.
- BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeia produtiva de flores e mel**. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Série Agronegócios. v. 9, 2007. Disponível em:
<<http://www.ica.org.br/Docs/CadeiasProdutivas/Cadeia%20Produtiva%20de%20Flores%20e%20Mel.pdf>> Acesso em: 16 de jul. de 2014.
- CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DO PARANÁ S.A. - CEASA-PR. **Boletim Anual 2010**. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento – SEAB, 2010. 73 p.
- CHIRON, G. R.; CASTRO, V. P. **Revisão das espécies brasileiras do gênero *Laelia* Lindley**. Trad. ARAÚJO, D. Richardiana Volume II, 2002. Disponível em:
<<http://www.delfinadearaujo.com/on/on17/paginas/vitor01.htm>>. Acesso em: 20 de jul. de 2013.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. S. Chugh et al. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v. 122 , p. 507–520, 2009.
- CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2010. 303 p. Disponível em:
<http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00084010.pdf>. Acesso em: 15 de

abril de 2013.

COLOMBO, R. C.; FAVETTA, V.; FARIA, R. T. Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo *in vitro* de um híbrido de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.6, p. 873-876, 2012

FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 2, n. 3, p. 489-492, 2002.

FARIA, R. T. DE; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. DO V. R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose Concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p.780-783, out-dez 2004.

FARIA, R. T.; TAKAHASHI, L. S. A.; LONE, A. B. UEL 6: nova cultivar de *Dendrobium*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p.114-115, 2009.

FARIA, R. T.; TAKAHASHI, L. S. A.; LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; TAKAHASHI, A.; SILVA, G. L. UEL 7: nova cultivar de *Dendrobium*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 441-442, 2011.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. 1. ed. Londrina: Mecenias, 2012. 124 p.

FARIA, R. T.; TAKAHASHI, L. S. A.; LONE, A. B.; SOUZA, G. R. B.; SILVA, G. L.; HOSHINO, R. T. UEL 8: nova cultivar de *Dendrobium*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 509-511, 2013.

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

GOVAERTS, R. **Kew Royal Botanic Gardens**. Monocots III: Orchids, 2012. Disponível em: < <http://www.kew.org/science-research-data/directory/teams/monocots-III-orchids/index.htm>>. Acesso em: 30 jun. 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

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

HEO, J. W.; SHIN, K. S.; KIM, S. K.; PAEK, K. Y. Light quality affects *in vitro* growth of grape 'Teleki 5BB'. **Journal of Plant Biology**, v. 49, n.4, p. 276-280, 2006.

IBRAFLOR – Instituto Brasileiro de Floricultura. Números do setor – **Mercado interno**. 2013. <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=213>> Acesso em 01 de ago de 2014.

INTERNATIONAL TRADE CENTRE. Annual Report 2009. apud REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? In: **IX Encontro Nacional da ECOECO**, Brasília. Outubro, 2011. Disponível em: <http://www.ecoeco.org.br/conteudo/publicacoes/encontros/ix_en/GT1-48-21-20110518142713.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2013.

JAO, R. C.; LAI, C. C.; FANG, W.; CHANG, S. F. Effect of red light on the growth of *Zantedeschia* plantlets in vitro and tuber formation using light emitting diodes. **HortScience**, v. 40, n. 2, p. 436–438, 2005.

JUNQUEIRA, A. H; PEETZ, M. da S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista brasileira de horticultura ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

JUNQUEIRA, A. H; PEETZ, M. da S. **2013: balanço do comércio exterior da floricultura brasileira**. 2014. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2014/2013_Comercio_Exterior_Floricultura.pdf>. Acesso em 15 de jul. de 2014.

KERBAUY, G. B.; CHAER, L. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. In: LEE, T. S. G. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro**. 1. ed. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 178-205.

KIM, S. j.; HAHN, E. J.; HEO, J. W.; PAEK, K. Y. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets in vitro. **Scientia Horticulturae**. v. 101, p. 143–15, 2004.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

LEE, S. H.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. plantlets. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 90, p.141–151, 2007.

LI, H.; XU ,Z.; TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 103, p. 155–163, 2010.

LUZ, J. M. **Manual Luminotécnico**. Unicamp, 2002. Disponível em: <<http://www.iar.unicamp.br/lab/luz/ld/Livros/Luminotecnica.pdf>>. Acesso em: 25 de mai. de 2013.

MENGXI, L., ZHIGANG, X., YANG, Y. FENG, Y. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 106, p.1–10, 2011.

MOON, H. K.; PARK, S. K.; KIM, Y. W.; KIM, C. S. Growth of *Tsuru-rindo* (*Tripterispermum japonicum*) cultured in vitro under various sources of light-emitting diode (LED) irradiation. **Journal of Plant Biology**, v. 49, p. 174–179, 2006.

MORAES, L.; FARIA, R. T.; CUQUEL, F. L. Activated charcoal for *in vitro* propagation of brazilian orchids. **Acta Horticulturae**, Bélgica, v. 683, p. 383-390, 2005.

MORINI, S.; MULEO, R. 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, 2003. p.3-35.

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

NHUT, D.T.; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; OKAMOTO, K.; TANAKA, M. Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.73, p.43-52, 2003.

NHUT, D. T.; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; TANAKA, M. Artificial Light Source Using Light-emitting Diodes (LEDs) in the Efficient Micropropagation of *Spathiphyllum* Plantlets. **Acta Horticulture**, Bélgica, v. 692, p. 137-142, 2005.

OMETTO, J. C. **Bioclimatologia vegetal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 425p.

POUDEL, P. R.; KATAOKA, I.; MOCHIOKA R. Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 92, p. 147–153, 2008.

REIS, J. N. P. **Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar?** Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? In: **IX Encontro Nacional da ECOECO**, Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.ecoeco.org.br/conteudo/publicacoes/encontros/ix_en/GT1-48-21-20110518142713.pdf>. Acesso em: 25 de abril de 2013.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; SANTOS, U. L. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria v.40, n.9, p.1922-1928, 2010.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995.

SEBRAE. **Pequenos produtores de flores têm momento propício para crescimento**. 2012. Disponível em: <http://sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/fortaleza_boletim_2014_junho.pdf> Acesso em: 23 de jul. de 2013.

SEBRAE. **Plantas e flores semeando bons negócios desde a produção até a comercialização**. 2013. Disponível em <<http://www.sebraemercados.com.br/?p=19562>> Acesso em: 23 de jul. de 2013.

SOONTORNCHAINAKSAENG, P; CHAICHAROENB, S; SIRIJUNTARUTB, M; KRUATRACHUEB, M. In vitro Studies on the Effect of Light Intensity on Plant Growth

of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit.) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. **Science Asia**, v. 27, p. 233-237, 2001.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 51-57, 2008.

STANCATO, G. C.; NÉRI, F. C. S.; TAVARES, A. R. Micropropagação de violeta africana. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 165-170, 2009.

STEELE, R. V. The story of a new light source. **Nature Photonics**, v. 1, p. 25-26, 2007.

SU, M. J.; SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica: Revista de Ciências Agrárias**, Jaboticabal, v. 40, n. 1, p. 28–34, 2012.

SUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S.; DILON, G. W. 1994. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. Rio de Janeiro: Editora Expressão e Cultura. 158p.

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

TANAKA, M.; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; ENDO, M.; YANAGI, T.; OKAMOTO, K. In vitro growth of *Cymbidium* plantlets cultured under super bright and blue light emitting diodes (LEDs). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, p. 39–44, 1998.

TAVEIRA, J. A. M. novas tecnologias na aclimatização, formação e manejo de mudas. In: LEE, T. S. G. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. ed. 1. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 246-267.

TERAO, D.; CARVALHO, A.C.P.P.; BARROSO, T.C. da S.F. **Flores tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 225p.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. (Boletim técnico, 174).

TOPCHIIY, N. M.; SYTNIK, S. K.; SYVASH, O. O.; ZOLOTAREVA, O.K. The effect of additional red irradiation on the photosynthetic apparatus of *Pisum sativum*. **Photosynthetica**, v. 43, n.3, p. 451-456, 2005.

UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T. DE; VIEIRA, A. O. S.; DALIO, R. J. D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n.2, p. 267-269, 2007.

VACIN, E. T.; WENT, F. W. pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-613, 1946.

- VALENTIM, A. B., FERREIRA, H. S., COLETTI, M. A. Lâmpadas de LED: impacto no consumo e fator de potência. **Ciências do Ambiente On-Line**, v. 6, n. 1, p. 29-36, 2010.
- VIEIRA, D. A. de P.; PORTES, T. de A.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; TEIXEIRA, J. B. **Fluorescência e teores de clorofilas em abacaxizeiro cv. pérola submetido a diferentes concentrações de sulfato de amônio**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 360-368, 2010.
- WATANABE, D.; KIHARA, G. T. E.; MORIMOTO, L. M.; MORIMOTO, M. S. **Orquídeas: manual de cultivo**. São Paulo: AOSP – Associação Orquidófila de São Paulo, 2002. p. 296.
- WONGNOK, A.; PILUEK, C.; TECHASILPITAK, T.; TANTIVIVAT, S. Effect of light emitting diodes on micropropagation of Phalaenopsis orchids. **Acta Horticulture**, v. 788, p. 149–156, 2008.
- WU, H. C.; TOIT, E. S. du. *In Vitro* Organogenesis of *Protea cynaroides* L. Shoot-Buds Cultured Under Red and Blue Light-Emitting Diodes. in: SATO, Ken-Ichi. **Embryogenesis**. 2012. p. 652. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/224830473_In_Vitro_Organogenesis_of_Protea_cynaroides_L_Shoot-Buds_Cultured_Under_Red_and_Blue_Light-Emitting_Diodes>. Acesso em 15 de jul. de 2013.
- YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs - energy efficient lighting sources and their potential in door plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 2175-2180, 2009.
- YI-YONG, Z.; JUAN, L.; HOU-QING, Z.; GAN, L.; TING-JUN, D.; QI-RONG, S.; GUO-HUA, X. Involvement of plasma membrane H⁺-ATPase in adaption of rice to ammonium nutrient. **Rice Science**, v. 18, n. 4, p. 335-342, 2011.