



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS

NADHINE NOSTRANI CABRAL

**COMO AS QUALIDADES ESPECTRAIS DE LUZES LEDs APLICADAS
NO CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS
INFLUENCIAM NOS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO?**

FLORIANÓPOLIS

2021

Nadhine Nostrani Cabral

**COMO AS QUALIDADES ESPECTRAIS DE LUZES LEDs APLICADAS
NO CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS
INFLUENCIAM NOS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO?**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Ciências.
Orientadora: Prof^a Dr^a Rosete Pescador

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nostrani Cabral , Nadhine

Como as qualidades espectrais de luzes LEDs aplicadas no cultivo in vitro de orquídeas brasileiras influenciam nos parâmetros morfofisiológicos e bioquímicos durante a aclimatização? / Nadhine Nostrani Cabral ; orientador, Rosete Pescador , 2021.
90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Luzes LEDs. 3. Orquídeas Brasileiras. 4. Epidendrum denticulatum. 5. Gomesa flexuosa. I. Pescador , Rosete . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Nadhine Nostrani Cabral

**COMO AS QUALIDADES ESPECTRAIS DE LUZES LEDs APLICADAS
NO CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS
INFLUENCIAM NOS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO?**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a Dr^a Ana Maria Viana
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Paulo César Poeta Fermino Júnior
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Paulo Tamaso Miotto
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares
Coordenador do Programa

Prof^a Dr^a Rosete Pescador
Orientadora

Florianópolis, 27 de agosto de 2021.

Este trabalho é dedicado aos amantes de orquídeas e aos curiosos por entender como essas espetaculares plantas se comportam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, da razão e do discernimento.

Agradeço aos meus pais pois o amor, a paixão, a fidelidade e o companheirismo de um pelo outro foram capazes de me gerar. Agradeço por toda educação, investimento, experiências e amor.

Agradeço a mim pela coragem de não desistir frente a todas as adversidades enfrentadas durante a condução desse trabalho. Aprendi durante o mestrado que não existe nada mais poderoso do que disciplina e determinação.

Agradeço à família materna e paterna por toda a confiança, compreensão e preocupação comigo e com as plantas, em especial à minha avó Lídia que me acolheu durante toda a graduação e o primeiro ano do mestrado e à tia Vanda por nunca duvidar de minha capacidade.

Agradeço à Julia Zappellini por ter sido sua estagiária durante a graduação e ter me moldado a ser uma pesquisadora a sua altura.

À Bruna Vargas Andriolli por me ensinar a cultivar orquídeas *in vitro*.

Ao Sebastián Francisco Montoya Serrano por todas as conversas, dicas, planejamentos de experimentos, por todos os desabafos, choros e reclamações.

À Priscila Fernandes de Souza pela disponibilidade constante, pelas dicas de beleza e dieta e por seu jeito calmo, determinado e sempre disposto a ajudar. Um exemplo de como a disciplina, constância e persistência nos levam a construir o extraordinário.

À Rafaela Gadret Rizzolo pelo grande auxílio com as análises com o IRGA, as quais foram fundamentais para enriquecer meu trabalho e compreender melhor a fisiologia dessas plantas.

À Mariana Izabel Schvambach pelo seu jeito tímido, mas sempre ativo. Me ensinou que não falar ou falar menos pode ser uma grande oportunidade para parar e ouvir.

Ao Giulano Rigo pelas exaustivas conversas que duravam simplesmente mais de 10 horas discutindo o futuro do país e de nossas próprias vidas e sempre chegando à conclusão de que estávamos ferrados de qualquer maneira e essa era a nossa motivação diária.

Ao Helder Ricardo Marchini pelo jeito cativante, solícito e disposto. Agradeço por compartilhar comigo toda a sua experiência de vida e também profissional. Com certeza foi um grande colega de trabalho e que me salvou em grandes momentos de cálculos químicos.

À Suelen Martinez Guterres, amiga que me identifiquei desde o primeiro momento e que admiro seu jeito de ser e de levar a vida. Agradeço por todos os almoços durante a

pandemia, todos os desabafos, todos os conselhos e guloseimas que com certeza deixavam nossos dias mais felizes e doces.

À Tainara Gris por todos os desabafos ouvidos, os conselhos sobre levar a vida mais leve, sobre me fazer acreditar que o pensamento cria a realidade, mas que ficar parado não resolve. Obrigada por me fazer perceber que sempre merecemos muito da vida.

À Samya Uchôa Bordallo por toda disponibilidade durante a pandemia, além da amizade e das experiências que me proporcionou, das conversas e das risadas.

Ao Marcos Vinícius Marques Pinheiro, o qual foi luz no meu caminho durante o mestrado quando tudo pareceu estar apagado. Agradeço pela atenção, pela ajuda, pelas mensagens, pelo incentivo, por acreditar em mim quando eu já não acreditava e por me mostrar que somos quem somos independentemente de onde estivermos.

Ao Thiago Sanches Ornellas, outra grande luz em meu caminho. Pessoa que sempre oferece mais quando você acha que ele já ofereceu tudo o que podia. Agradeço pela atenção e disponibilidade infinita. O amor com que você leva a vida e a pesquisa com as plantas é inspirador e com certeza deixou marcas na pessoa que sou.

Agradeço a toda a equipe do LFDGV. Sempre muito receptivos e dispostos a ajudar.

Aos colegas de pós-graduação de forma geral, já que cada pessoa que passa pela nossa vida é capaz de nos transformar um pouco por meio de um sorriso, uma conversa, um desabafo, uma gargalhada.

Agradeço, em especial, à pessoa que possibilitou que a minha vontade de fazer mestrado se transformasse em realidade, que é a professora Rosete Pescador, orientadora desse trabalho. Agradeço a toda confiança em mim e ajuda.

Agradeço à UFSC por tudo o que ela me proporcionou. Ela fez parte da minha vida de maneira muito bonita e é o grande símbolo de educação em minha vida.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, o qual me aceitou como pós-graduanda e me ensinou muito daquilo que sei como mestre em ciências com foco no cultivo de orquídeas.

Agradeço à CAPES pelas bolsas que caíam sem atrasos durante os 30 meses de mestrado e que deixaram minha vida mais feliz e prazerosa durante o trabalho e o estudo.

Por fim, quero agradecer à vida pela grande oportunidade que me foi dada de viver tudo o que vivi e por poder aprender sempre algo novo a cada momento.

Gratidão.

RESUMO

O presente estudo contemplou duas espécies pouco estudadas de orquídeas brasileiras: *Gomesa flexuosa* de hábito epífita, endêmica do Brasil, com inflorescência exuberante formada por pequenas flores amarelas; e *Epidendrum denticulatum*, de hábito terrestre ou litofítico, tem ocorrência natural no Sudeste e Nordeste do Brasil. Ambas, além da importância nos ambientes naturais, apresentam belas flores e são visadas para o uso decorativo e paisagístico. O uso do cultivo *in vitro* de orquídeas para obter mudas, via semente encontra-se bem elucidado com numerosos trabalhos presentes na literatura. No entanto, para orquídeas brasileiras pouco tem sido trabalhado quanto às respostas relativas ao cultivo *in vitro* e aclimatização, sob o efeito de lâmpadas LEDs. O objetivo deste trabalho foi compreender e elucidar como as lâmpadas LEDs por meio da emissão de diferentes espectros luminosos, interferem na morfofisiologia e na bioquímica das espécies alvo do estudo ao final do cultivo *in vitro* e durante o processo de aclimatização. Plantas das duas espécies, oriundas de sementes, após sucessivos subcultivos em meio MS, acrescido de vitaminas de Morel e carvão ativado, foram submetidas às luzes LEDs monocromáticas azul, vermelha e branca e à combinação azul/vermelho por um período de 90 dias. No 90º dia de cultivo *in vitro* sob luzes LEDs e no 45º dia de aclimatização sob luz natural, foram avaliados parâmetros morfométricos como massa seca, fresca, número de folhas e altura das plantas; bem como parâmetros bioquímicos como os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, relação clorofilas *a/b*, clorofilas totais, carotenoides, antocianinas e parâmetros fisiológicos como fluorescência da clorofila “a”, trocas gasosas e índice SPAD. Com esse trabalho foi possível concluir que os diferentes comprimentos de onda emitidos por luzes LEDs foram capazes de afetar o crescimento e o desenvolvimento de plantas da espécie *Epidendrum denticulatum*. Quanto aos parâmetros morfológicos e bioquímicos houve intensa sobreposição de médias não sendo possível apontar um tratamento destaque. Em relação aos parâmetros fisiológicos, ao final da aclimatização, os tratamentos vermelho, azul/vermelho e branco promoveram aumentos dos valores de taxa de fotossíntese líquida (*A*), condutância estomática (g_s) e transpiração (*E*), enquanto que os valores de carbono interno (*C_i*) diminuem. Os comprimentos de onda azul, azul/vermelho induzem maiores valores de F_v/F_m (0,75) em plantas da espécie. O índice SPAD mostra queda nos valores para todos os espectros ao final do período de 45 dias de aclimatização. Para *Gomesa flexuosa*, não houve um tratamento destaque quanto aos parâmetros morfométricos e bioquímicos. No entanto, lâmpadas LEDs azuis destacam-se quanto à fluorescência da clorofila *a* pois plantas submetidas a elas apresentaram altos valores de F_v/F_m (0,79), enquanto LEDs vermelhos apresentaram valores mais baixos, durante os 45 dias de aclimatização, provavelmente devido a “síndrome da luz vermelha”. Para as duas espécies estudadas, ao final do experimento, obteve-se 100% de sobrevivência das plantas que apresentavam adequado desenvolvimento de folhas e raízes, independente do tipo de lâmpada LED utilizado para cada tratamento. Este estudo contribui na compressão do metabolismo de orquídeas brasileiras e ajuda a melhorar o processo de cultivo e propagação das espécies.

Palavras-chave: espectros luminosos, luzes LEDs, *Epidendrum*, *Gomesa*

ABSTRACT

The present study included two little studied species of Brazilian orchids: *Gomesa flexuosa* with an epiphytic habit, endemic to Brazil, with an exuberant inflorescence formed by small yellow flowers; and *Epidendrum denticulatum*, with terrestrial or lithophytic habit, occurs naturally in the Southeast and Northeast of Brazil. Both are importance in natural environments, have beautiful flowers and intended for decorative and landscape use. The use of *in vitro* cultivation of orchids to obtain seedlings via seed is well elucidated with numerous works in the literature. However, for Brazilian orchids, little has been done about the responses related to *in vitro* cultivation and acclimatization under the effect of LED lamps. The objective of this work was to understand and elucidate how LED lamps, through the emission of different light spectra, interfere in the morphophysiology and biochemistry of the target species of the study at the end of *in vitro* cultivation and during the acclimatization process. Plants of both species, from seeds, after successive subcultures in MS medium, added with Morel's vitamins and activated charcoal, were subjected to monochromatic blue, red and white LED lights and a blue/red combination for a period of 90 days. On the 90th day of *in vitro* cultivation under LED lights and on the 45th day of acclimatization under natural light, morphometric parameters such as dry and fresh mass, number of leaves and plant height were evaluated; as well as biochemical parameters such as chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a/b ratio, total chlorophyll, carotenoids, anthocyanins and physiological parameters such as chlorophyll "a" fluorescence, gas exchange and SPAD index. With this work it was possible to conclude that the different wavelengths emitted by LED lights were able to affect the growth and development of plants of the species *Epidendrum denticulatum*. As for the morphological and biochemical parameters, there was an intense superposition of means, and it was not possible to point out a prominent treatment. As for the physiological parameters, at the end of acclimatization, the red, blue/red and white treatments promoted increases in the values of net photosynthesis rate (A), stomatal conductance (g_s) and transpiration (E), while internal carbon values (C_i) decrease. Blue, blue/red wavelengths induce higher F_v/F_m values (0.75) in plants of the species. The SPAD index shows a drop in values for all spectra at the end of the 45th acclimatization period. For *Gomesa flexuosa*, there was no prominent treatment regarding morphometric and biochemical parameters. However, blue LED lamps stand out in terms of chlorophyll fluorescence a because plants subjected to them had high F_v/F_m values (0.79), while red LEDs had lower values during the 45 days of acclimatization, probably due to the "red light syndrome". For the two species studied, at the end of the experiment, 100% survival of plants that presented adequate development of leaves and roots was obtained, regardless of the type of LED lamp used for each treatment. This study contributes to the compression of the metabolism of Brazilian orchids and helps to improve the cultivation process and propagation of the species.

.Keywords: Light spectrums. LED lights. *Epidendrum*. *Gomesa*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Inluorescência exuberante de *Epidendrum denticulatum* (Orquídeas & Bromélias, 2020).....15
- Figura 2: Inluorescência de *Gomesa flexuosa* formada por pequenas flores amarelo-ouro (Varella, 2020).....16
- Figura 3: Figura 3: Representação gráfica dos comprimentos de onda emitidos pelos diferentes tipos de lâmpadas LEDs utilizadas nos experimentos com plantas das espécies *Epidendrum denticulatum* e *Gomesa flexuosa*, durante o cultivo *in vitro*.....22
- Figura 4: Plantas de *Epidendrum denticulatum* no 90° dia de cultivo *in vitro* (A – Tratamento LED Azul, B – Tratamento LED Vermelho, C – Tratamento LED Luz Azul/Vermelho, D – Tratamento LED Branco) e no 45° dia de aclimatização (E – Tratamento LED Azul, F – Tratamento LED Vermelho, G – Tratamento LED Azul/Vermelho, H – Tratamento LED Branco). Barras: 2cm.....34
- Figura 5: Dinâmica do rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de plantas de *Epidendrum denticulatum* durante o período de aclimatização *ex vitro* sob luz natural de plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....38
- Figura 6: Dinâmica de índice SPAD de plantas de *Epidendrum denticulatum* durante o período de aclimatização *ex vitro* sob luz natural de plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.39
- Figura 7: Temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) a que estavam submetidas plantas de *Epidendrum denticulatum* no 90° dia de cultivo *in vitro* (dia 0 - umidade relativa do ar e a temperatura dentro da sala de crescimento onde estavam localizados os frascos com as plantas *in vitro*) e após o período de 45 dias de aclimatização (dia 1 ao dia 45), submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....40
- Figura 8: Plantas de *Gomesa flexuosa* no 90° dia de cultivo *in vitro* (A – Tratamento LED Azul, B – Tratamento LED Vermelho, C – Tratamento LED Luz Azul/Vermelho, D – Tratamento LED Branco) e no 45° dia de aclimatização (E – Tratamento LED Azul, F – Tratamento LED Vermelho, G – Tratamento LED Azul/Vermelho, H – Tratamento LED Branco). Barras: 2cm.....60
- Figura 9: Dinâmica da fluorescência basal (F_o) – unidades arbitrárias – de plantas de *Gomesa flexuosa* durante o período de aclimatização *ex vitro* sob luz natural de plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....64
- Figura 10: Dinâmica da fluorescência máxima (F_m) – unidades arbitrárias – de plantas de *Gomesa flexuosa* durante o período de aclimatização *ex vitro* sob luz natural de plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....65
- Figura 11: Dinâmica do rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de plantas de *Gomesa flexuosa* durante o período de aclimatização *ex vitro* sob luz natural de plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....66

Figura 12: Temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) a que estavam submetidas plantas de *Gomesa flexuosa* no 90º dia de cultivo *in vitro* (dia 0 - umidade relativa do ar e a temperatura dentro da sala de crescimento onde estavam localizados os frascos com as plantas *in vitro*) e após o período de 45 dias de aclimatização (dia 1 ao dia 45), submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos com diferentes tipos de qualidades espectrais e seus respectivos comprimentos onda utilizados nos experimentos com plantas das espécies <i>Epidendrum denticulatum</i> e <i>Gomesa flexuosa</i> , durante o cultivo <i>in vitro</i>	21
Tabela 2: Dados morfométricos de plantas de <i>Epidendrum denticulatum</i> no 90° dia de cultivo <i>in vitro</i> e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....	33
Tabela 3: Dados bioquímicos de plantas da espécie <i>Epidendrum denticulatum</i> no 90° dia de cultivo <i>in vitro</i> e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....	35
Tabela 4: Dados fisiológicos relativos a trocas gasosas de plantas de <i>Epidendrum denticulatum</i> no 90° dia de cultivo <i>in vitro</i> e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs. A – taxa de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol de CO}_2\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), g_s – condutância estomática ($\text{mol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C_i – concentração interna de carbono ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e E – transpiração ($\text{mmol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).....	37
Tabela 5: Dados morfométricos de plantas de <i>Gomesa flexuosa</i> no 90° dia de cultivo <i>in vitro</i> e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....	58
Tabela 6: Dados bioquímicos de plantas de <i>Gomesa flexuosa</i> no 90° dia de cultivo <i>in vitro</i> e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.....	62
Tabela 7: Dados fisiológicos relativos a trocas gasosas no 90° dia de cultivo <i>in vitro</i> e após o período de 45 dias de aclimatização de plantas de <i>Gomesa flexuosa</i> submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs. A – taxa de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol de CO}_2\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), g_s – condutância estomática ($\text{mol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C_i – concentração interna de carbono ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e E – transpiração ($\text{mmol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Taxa de fotossíntese líquida - $\mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	m - Metro
atm – Atmosfera	mg – Miligramas
C _i – Concentração interna de carbono – $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	MINI-PAM – Mini pulso de amplitude modulada
cm – Centímetros	mL – Mililitros
cm ² – Centímetro quadrado	mmol – Milimol
CV – Coeficiente de Variação	MS – Meio de cultura Murashige e Skoog
DMSO – Dimetilsulfóxido	nm – Nanômetros
E – Transpiração - $\text{mmol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	NPK – Nitrogênio, fósforo e potássio
F _o – Fluorescência basal	pH – Potencial hidrogeniônico
F _m – Fluorescência máxima	PSII – Fotossistema II
F _v – Fluorescência variável	ppm – Partes por milhão
F _v / F _m – Rendimento quântico máximo do fotossistema II	W – Oeste
g - Gramas	°C – Graus Celcius
gs – Condutância estomática - mol de H ₂ O. $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	S – Sul
L – Litros	s – Segundo
LED – Diodo emissor de luz	SPAD – <i>Soil plant analysis development</i>
IRGA – <i>Infrared gas analyser</i>	μg – Micro-grama
M – Molar	μmol – Micromol
MF – Massa fresca	± – Mais ou menos
	u.a. – Unidades Arbitrárias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Material Vegetal	20
3.2	Tratamentos com diferentes Luzes LEDs em plantas cultivadas <i>in vitro</i>	20
3.3	Aclimatização <i>ex vitro</i> em viveiro sob em luz natural	23
3.4	Análises morfométricas	23
3.5	Análises bioquímicas.....	24
3.5.1	Clorofilas e Carotenoides	24
3.5.2	Antocianinas	25
3.6	Análises fisiológicas.....	25
3.6.1	Fotossíntese e Parâmetros Relacionados - IRGA	26
3.6.2	Fluorescência da Clorofila <i>a</i> do Fotossistema II - MINI-PAM	26
3.6.3	Índice SPAD - SPAD 502	27
3.7	Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	27
4	INFLUÊNCIA DAS QUALIDADES ESPECTRAIS NOS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS AO FINAL DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> E DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Epidendrum denticulatum</i> Barb. Rodr. (ORCHIDACEAE)	29
4.1	RESUMO	29
4.2	INTRODUÇÃO.....	30
4.3	RESULTADOS	32
4.3.1	Parâmetros Morfométricos	32
4.3.2	Parâmetros Bioquímicos	35
4.3.3	Parâmetros Fisiológicos	36

4.3.3.1	Fotossíntese e parâmetros relacionados	36
4.3.3.2	Fluorescência da Clorofila <i>a</i> do PSII	38
4.3.3.3	Índice SPAD.....	39
4.4	DISCUSSÃO.....	41
4.4.1	Parâmetros Morfométricos	41
4.4.2	Parâmetros Bioquímicos.....	41
4.4.3	Parâmetros Fisiológicos	43
4.5	CONCLUSÕES.....	47
4.6	REFERÊNCIAS	48
5	INFLUÊNCIA DAS QUALIDADES ESPECTRAIS NOS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS AO FINAL DO PERÍODO <i>IN VITRO</i> E DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Gomesa flexuosa</i> (Lodd.) M.W. Chase & N.H. Williams (ORCHIDACEAE).....	55
5.1	RESUMO	55
5.2	INTRODUÇÃO.....	56
5.3	RESULTADOS	58
5.3.1	Parâmetros Morfométricos	58
5.3.2	Parâmetros Bioquímicos.....	61
5.3.3	Parâmetros Fisiológicos	62
5.3.3.1	Fotossíntese e parâmetros relacionados	62
5.3.3.2	Parâmetros relacionados à Fluorescência da Clorofila <i>a</i> do Fotossistema II.....	63
5.4	DISCUSSÃO.....	68
5.4.1	Parâmetros morfológicos	68
5.4.2	Parâmetros bioquímicos	68
5.4.3	Parâmetros fisiológicos	69
5.5	CONCLUSÃO.....	73
5.6	REFERÊNCIAS	74
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	82

7	REFERÊNCIAS	83
---	--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO GERAL

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e valiosas comercialmente. Muitas espécies, entretanto, estão em risco de extinção devido à destruição de seu habitat e extrativismo predatório (Colombo *et al.*, 2005; Roberts & Dixon, 2008).

A família Orchidaceae apresenta grande importância para a manutenção da biodiversidade, indicando o estado de conservação das florestas, pois são sensíveis às interferências antrópicas em áreas de mata primária (Marrara *et al.*, 2007). Devido às características intrínsecas a essas plantas e o interesse em algumas poucas espécies para a comercialização, apenas a fisiologia de uma pequena porção de orquídeas nativas do Brasil foi estudada.

O gênero *Epidendrum* é conhecido pela sua riqueza de espécies, sendo considerado um dos mais diversos dentro da família Orchidaceae, com mais de 1.500 espécies (Govaerts *et al.*, 2020). Apresenta ampla distribuição neotropical (Hágsater & Soto-Arenas, 2005), ocupando diferentes latitudes e biomas. *Epidendrum denticulatum* é uma espécie de orquídea terrestre ou litofítica, que ocorre no sudeste e nordeste do Brasil (Pinheiro *et al.*, 2013; Pinheiro & Barros, 2007). Apresenta flores rosas, com guias brancas (Figura 1), caules longos, eretos e finos, raramente intumescidos em pseudobulbos (São Leão, 2012).



Figura 1: Inflorescência exuberante de *Epidendrum denticulatum* (Orquídeas & Bromélias, 2020).

O gênero *Gomesa* inclui 125 espécies, é endêmico do Brasil, sendo amplamente distribuído na Região Neotropical (Neubig *et al.*, 2012). Ocorre principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país nos biomas Cerrado e Mata Atlântica. As espécies desse gênero são muito similares na aparência geral das flores (Faria, 2004a). *Gomesa flexuosa* é uma espécie de orquídea epífita, apresenta inflorescência em forma de panícula, com mais de 100 flores de coloração amarelo-ouro (Figura 2). É uma espécie produtora de óleo em glândulas chamadas elaióforos que estão localizadas no labelo com intuito de atrair polinizadores (Gomiz *et al.*, 2013).



Figura 2: Inflourescência de *Gomesa flexuosa* formada por pequenas flores amarelo-ouro (Varella, 2020).

As orquídeas, principalmente as epífitas, apresentam metabolismo diferenciado em relação às outras espécies de planta, demonstrando crescimento e desenvolvimento lento, provavelmente pelo seu modo de aquisição de carbono e por sua economia no uso de água (Hew & Yong, 2004).

Elas se beneficiam de intensa irradiância e relativamente pouca competição, mas são confrontadas com suprimentos limitados de nutrientes e água (Zotz & Hietz, 2001). Metade de todas as orquídeas epífitas possuem metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), que é caracterizado pela separação temporal da fixação de CO₂ e sua assimilação fotossintética em compostos orgânicos (Lüttge, 1987). Plantas CAM mostram variação na sua capacidade para aclimatação à luz (Fetene *et al.*, 1990; Skillman & Winter, 1997) e algumas exibem expressiva plasticidade (Maxwell *et al.*, 1999; Haslam *et al.*, 2002). Geralmente apresentam

fase vegetativa longa, taxa de crescimento lento e baixo potencial fotossintético (Zhang *et al.*, 2018). Dessa forma, encurtar o período de crescimento vegetativo e entender a fisiologia dessas plantas é uma preocupação importante para cientistas e produtores de orquídeas.

Técnicas de cultura de tecidos foram amplamente exploradas para orquídeas, não apenas para sua rápida propagação e em grande escala, mas também para sua conservação *ex situ*. (Chugh *et al.*, 2009). As técnicas de cultivo de células e tecidos vegetais permitem a produção massal de orquídeas (Nayak *et al.*, 2002). Com isso, é possível reduzir o número de espécies em extinção, aumentar o índice da germinação de sementes *in vitro*, acelerar o processo de crescimento e desenvolvimento, formando vitroplantas muito mais vigorosas e adaptáveis para o cultivo *ex vitro* (Martini *et al.*, 2001).

O ambiente *in vitro* é caracterizado por elevada umidade relativa, temperaturas constantes, baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos, elevadas concentrações de açúcar, sais e substâncias reguladoras de crescimento no meio de cultivo, acúmulo de substâncias tóxicas e a ausência de microrganismos (Xiao *et al.*, 2011; Zobayd *et al.*, 2004). Essas condições costumam levar a baixas taxas de transpiração, fotossíntese, absorção de água, nutrientes e CO₂, o que resulta em um lento crescimento *in vitro* e diminui a adaptabilidade durante o período de aclimatização (Xiao *et al.*, 2011).

A intensidade de luz, o comprimento de onda e o fotoperíodo regulam o crescimento, a diferenciação e a morfogênese de células na cultura de tecidos (Silva *et al.*, 2014). Tamanho reduzido, comprimento de onda específico, intensidade e qualidade de luz ajustáveis, bem como a eficiência de conversão fotoelétrica são vantagens que tornam as lâmpadas LEDs extremamente relevantes para contribuir com o crescimento de plantas em ambientes controlados (Yeh & Chung, 2009; Bourget, 2008; Bian *et al.*, 2015; Yeh *et al.*, 2015; Bantis *et al.*, 2018; Martineau *et al.*, 2012). Além disso, possuem durabilidade e superfícies de emissão relativamente frias, o que facilita manejo e instalação em câmaras de crescimento (Li *et al.*, 2010; Muneer *et al.*, 2014; Massa *et al.*, 2008; Agarwal & Gupta 2016; Bello-Bello *et al.*, 2017; Shukla *et al.*, 2017; D'Souza *et al.*, 2015). Essa tecnologia tem sido amplamente utilizada para reduzir o tempo das plantas *in vitro*, estimular características específicas, investigar as respostas fotobiológicas ao estresse abiótico, à fluorescência da clorofila *a*, à atividade fotossintética além do crescimento e desenvolvimento das plantas (Johkan *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2019; Miyashita *et al.*, 2005; Parrine *et al.*, 2018).

A família Orchidaceae possui elevada capacidade de adaptação a diferentes regimes de luz (Valladares & Pearcy, 2000). O grau em que as plantas se adaptam ao regime de luz é determinado geneticamente e define sua plasticidade fisiológica frente a um fator ambiental (Lin & Hsu, 2004). A adaptação de plântulas durante a aclimatização, elevadas taxas de sobrevivência e desenvolvimento adequado garantem o sucesso da micropropagação (Cha-um *et al.*, 2010).

Durante a aclimatização, as condições ambientais para o crescimento das plantas são bastante diferentes daquelas usadas para cultivo *in vitro* (Kozai *et al.*, 1997; Hazarika, 2006). Com isso, muitas mudanças ocorrem na fisiologia das plantas. Para analisar o que ocorre fisiologicamente durante essas etapas, existem muitas técnicas que podem ser combinadas.

A fluorescência da clorofila *a* do PSII, associada às medições de troca gasosas, possibilitam a obtenção de uma imagem completa da resposta das plantas ao seu ambiente (Hanelt, 2018; Misra *et al.*, 2012; Kalaji *et al.*, 2014, 2016). Elas são ferramentas capazes de diagnosticar a integridade do aparato fotossintético frente às adversidades ambientais, sendo técnicas rápidas, precisas e não destrutivas (Torres Netto *et al.*, 2005; Strasser *et al.*, 2010; Stirbet *et al.*, 2018). O clorofilômetro SPAD também é uma ferramenta utilizada para detectar estresses abióticos em diversas culturas e possibilita uma avaliação não destrutiva do índice de verde presente no tecido foliar (Torres Netto *et al.*, 2002; 2005; Pecanha, 2010; Castro *et al.*, 2011). Todas essas análises combinadas são capazes de contribuir na interpretação do comportamento fisiológico das plantas frente aos estresses a que são submetidas durante o cultivo *in vitro* e posteriormente durante a aclimatização.

Devido às restrições da propagação de orquídeas em meio natural, estudos para aperfeiçoar o processo de propagação são importantes, assim como entender melhor como a fisiologia dessas plantas pode ser influenciada pelos diferentes espectros luminosos provenientes de lâmpadas LEDs. Com isso, o objetivo desse trabalho foi analisar como plantas de orquídeas das espécies *Epidendrum denticulatum* Barb.Rodr. e *Gomesa flexuosa* (Lodd.) M.W. Chase & N.H. Williams se comportam, investigando aspectos morfométricos, bioquímicos e fisiológicos no período de aclimatização, após terem sido submetidas às luzes LEDs durante a fase de cultivo *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar, interpretar e descrever como as qualidades espectrais de luzes emitidas por diodos emissores de luz (LEDs) ao serem aplicadas em plantas *in vitro* das espécies *Epidendrum denticulatum* Barb.Rodr. e *Gomesa flexuosa* (Lodd.) M.W. Chase & N.H. Williams influenciam no padrão de desenvolvimento ao final do cultivo *in vitro* e durante a aclimatização *ex vitro* sob iluminação natural.

2.2 Objetivos Específicos

Para plantas das espécies *Epidendrum denticulatum* Barb.Rodr. e *Gomesa flexuosa* (Lodd.) M.W. Chase & N.H. Williams teve-se como objetivos específicos:

- Quantificar e comparar parâmetros morfométricos, como massa fresca e seca de folhas, número de folhas e altura das plantas ao final do cultivo *in vitro* e ao final do período de aclimatização avaliado.
- Quantificar e compreender de que forma os parâmetros bioquímicos como clorofilas, carotenoides e antocianinas são afetados sob os diferentes espectros de luzes LEDs e interpretar como eles estiveram envolvidos com as respostas fisiológicas observadas das espécies.
- Mensurar parâmetros fisiológicos como a fluorescência da clorofila *a* do PSII, trocas gasosas e índice SPAD e relacioná-los com a qualidade espectral a que as plantas foram submetidas durante o cultivo *in vitro* e como isso afetou na aclimatização das espécies sob iluminação natural.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

O trabalho foi realizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (27°34'55.1"S 48°30'14.9"W) no Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal e no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, durante os meses de março de 2019 a dezembro de 2020.

As sementes de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Gomesa flexuosa* (Lodd.) M.W. Chase & N.H. Williams foram cedidas por Rogério Mamoru Suzuki pesquisador do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo e coletadas no mês de fevereiro de 2019 a partir de plantas cultivadas na estufa administrada pelo professor Suzuki, localizada no instituto.

As sementes, após a coleta, foram depositadas em frascos de cultivo com capacidade de 300mL para germinação assimbiótica. Cada frasco continha 30 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), 30g.L⁻¹ de sacarose, 2g. L⁻¹ de carvão ativado e 6 g.L⁻¹ de ágar e permaneceram ali de março até agosto de 2019. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e submetido à esterilização em autoclave vertical AV Phoenix Lufenco por 20 minutos a 121°C e 1,3 atm de pressão. O meio de cultura com as sementes foi mantido em prateleira com duas lâmpadas fluorescentes brancas (120 cm de comprimento cada) de 35 Watts (60 ± 50 µmol. m⁻². s⁻¹) a 25±2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Esse meio foi usado durante todas as fases de crescimento das plantas inclusive durante o experimento. A partir de setembro de 2019, procedeu-se com o subcultivo das plantas, a cada 2 meses, em câmara de fluxo laminar horizontal Pachane, para outros frascos contendo o mesmo meio de cultivo, MS (Murashige & Skoog, 1962). Plantas com 14 meses, foram então, submetidas aos diferentes tratamentos. Os experimentos foram conduzidos entre os meses de junho a dezembro de 2020.

3.2 Tratamentos com diferentes Luzes LEDs em plantas cultivadas *in vitro*

Cada um dos tratamentos (Tabela 1) foi composto por duas lâmpadas LEDs tubulares, sendo que cada uma emitia 36 µmol.m⁻².s⁻¹ a 50 cm de altura em relação aos frascos.

Tabela 1: Tratamentos com diferentes tipos de qualidades espectrais e seus respectivos comprimentos onda utilizados nos experimentos com plantas das espécies *Epidendrum denticulatum* e *Gomesa flexuosa*, durante o cultivo *in vitro*.

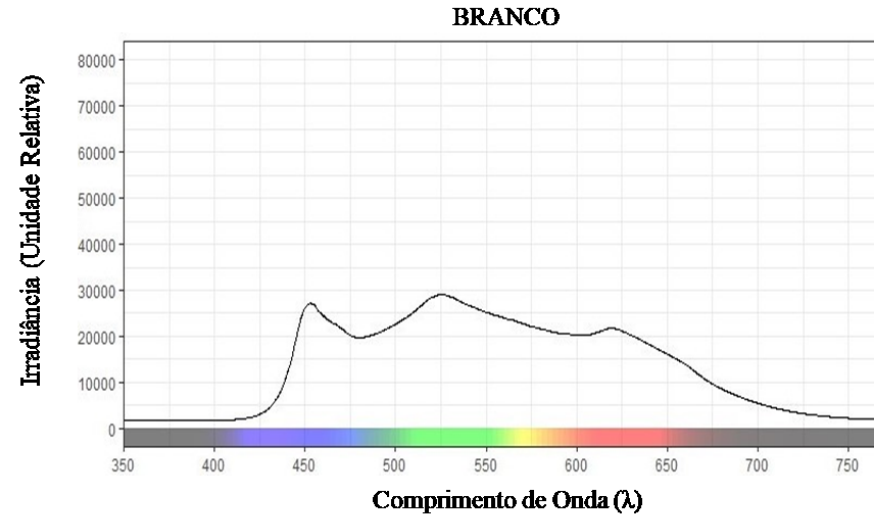
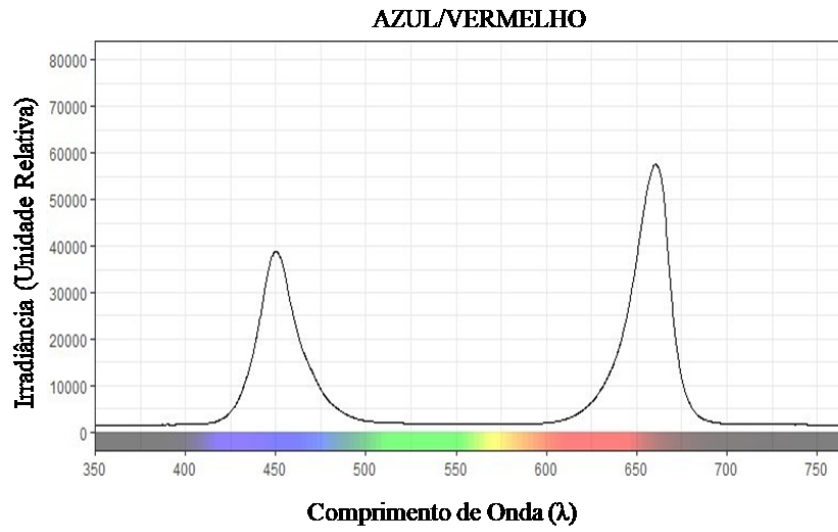
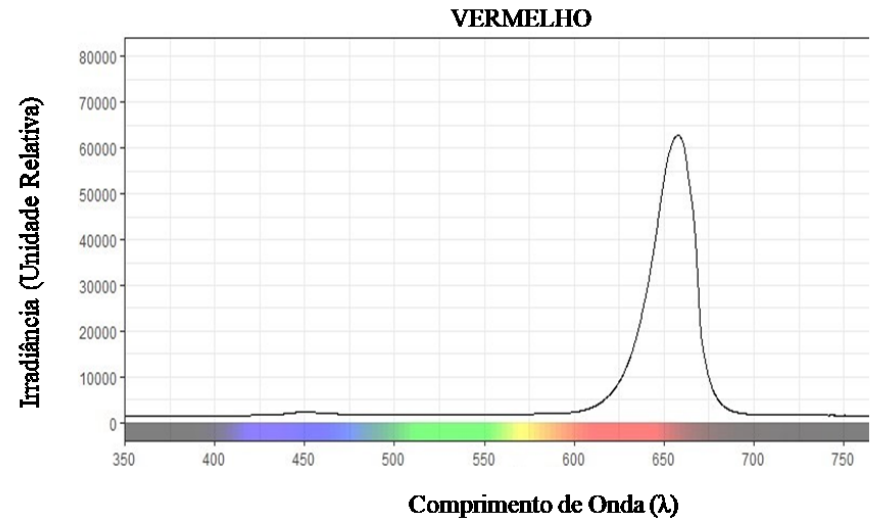
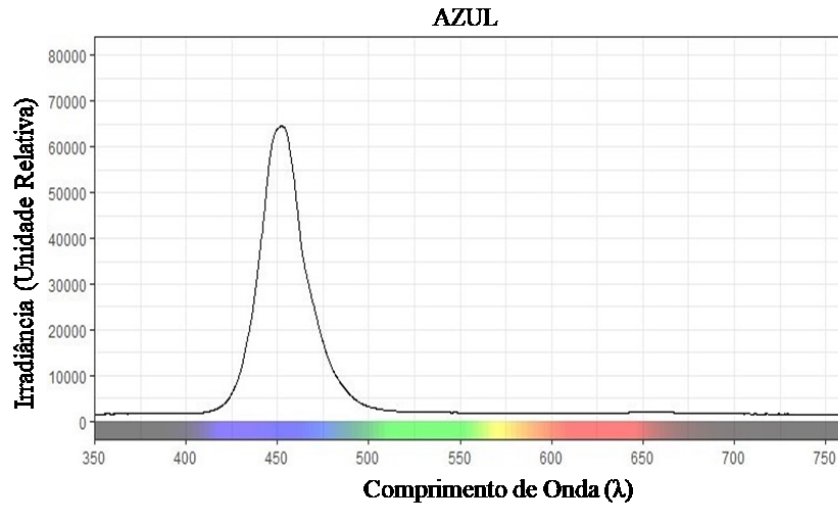
Tratamentos	Qualidade Espectral	Comprimento de Onda
Azul	LED Azul	450 nm
Vermelho	LED Vermelha	660 nm
Azul/Vermelho	LED Azul/Vermelha	450 nm e 665 nm
Branco	LED Branca	400 a 700 nm

Plantas com 14 meses de idade, oriundas de sementes germinadas *in vitro* e mantidas nessa condição, sob luzes fluorescentes brancas, com subcultivos a cada 2 meses foram submetidas aos diferentes comprimentos de onda emitidos por lâmpadas LEDs (Figura 3). A fase *in vitro*, sob influência das luzes LEDs teve duração de 90 dias. Após 45 dias da implantação do experimento (metade do período do experimento *in vitro*) houve um subcultivo.

As condições de temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo da sala de cultivo durante o experimento foram: $28,5 \pm 5^\circ\text{C}$, $42,5 \pm 5\%$ de umidade e 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Ao final desta fase, ou seja, após 90 dias, as plantas foram superficialmente lavadas para retirar qualquer resquício de meio de cultura em suas raízes, avaliadas e conduzidas para a etapa de aclimatização *ex vitro* em viveiro sob luz natural.

Figura 3: Representação gráfica dos comprimentos de onda emitidos pelos diferentes tipos de lâmpadas LEDs utilizadas nos experimentos com plantas das espécies *Epidendrum denticulatum* e *Gomesa flexuosa*, durante o cultivo *in vitro*.



3.3 Aclimatização *ex vitro* em viveiro sob em luz natural

As plantas provenientes da fase *in vitro* foram colocadas em bandejas contendo 72 células, mantendo-se identificadas de acordo com os tratamentos aos quais foram submetidas na fase anterior.

Foi utilizado o substrato para plantas Agrinobre TN MIX CE 0,4, composto por turfa de Sphagno, vermiculita expandida, casca de arroz carbonizada, calcário dolomítico, gesso agrícola, fertilizante, NPK e micronutrientes (proporção desses componentes não divulgadas pelo fabricante).

As bandejas foram colocadas dentro de um viveiro sobre bancadas sob sombrite 50% de retenção da luminosidade solar. A etapa de aclimatização teve duração de 45 dias sob condições ambientais do município de Florianópolis. Com isso, o experimento foi conduzido a nível do mar, em viveiro localizado nas coordenadas 27°34'55.1"S 48°30'14.9"W, com clima Cfa na classificação de Köppen e umidade relativa média do ar de 85%.

Dentro do viveiro em que se realizou a aclimatização das plantas a temperatura média foi de 24±5°C. As plantas foram submetidas a regas diárias com pulverizador manual. Cerca de 600ml de água eram aplicadas sobre as plantas diariamente, sempre no período da manhã.

3.4 Análises morfométricas

As análises realizadas foram: massa fresca (g), massa seca (g) número de folhas, altura das plantas (cm), sobrevivência (%) e foram obtidas ao final das etapas *in vitro* e de aclimatização. Para essas análises foram utilizadas 6 repetições de cada por tratamento.

Antes de iniciar as análises as plantas foram superficialmente limpas para retirar qualquer resquício de meio de cultivo. O número de folhas e sobrevivência das plantas foram minuciosamente observados e quantificados. Logo após, realizou-se, com as mesmas plantas, a medição da altura com uma régua de 30 cm, medindo sempre da base da planta, não considerando as raízes, até a ponta final da maior folha, sem que ela fosse esticada.

Posteriormente, as plantas foram pesadas em balança analítica Shimadzu AUY 220, para quantificação da massa fresca. Após, as mesmas plantas foram utilizadas para massa seca. Para isso elas foram colocadas em placas de petri de vidro abertas e posteriormente depositadas em estufa de secagem e esterilização Solab SL100 a 65°C por 72 horas (Adaptado de Centofane, 2020). Após esse período as plantas foram pesadas e obteve-se a massa seca.

3.5 Análises bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos analisados foram os teores de clorofilas *a* e *b*, carotenoides e antocianinas. A partir desses parâmetros, obteve-se os teores de clorofilas totais e a razão entre clorofila *a/b*. Todos os parâmetros citados foram determinados no 90º dia da fase de cultivo *in vitro* e ao final dos 45 dias da fase de aclimatização. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento.

3.5.1 Clorofilas e Carotenoides

Para a quantificação dos teores de clorofilas e carotenoides foram utilizados 0,05g de massa fresca de folhas totalmente expandidas, por repetição. A massa fresca pesada foi então depositada em tubos de ensaio de 50 mL envolvidos com papel aluminizado contendo 5mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos foram mantidos por 48 horas no escuro sob temperatura de 25±2°C, sem maceração. Após esse tempo, as amostras foram depositadas em cubetas de quartzo e procedeu-se com a quantificação por meio de espectrofotometria em espectrofotômetro PRÓ-ANÁLISE V-1600 (Santos *et al.*, 2008). Os cálculos para a determinação da concentração das clorofilas *a* e *b* e carotenoides foram realizados utilizando as fórmulas de Wellburn (1994). Os comprimentos de onda utilizados foram 665 nm para clorofila *a*, 649 nm para clorofila *b* e 470 nm para carotenoides.

Os cálculos da concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, dos carotenoides, clorofilas totais e da razão clorofila *a/b* foram realizados de acordo com as equações abaixo (Wellburn, 1994).

$$\text{Clorofila } a = 12,19. A_{665} - 3,45. A_{649}$$

$$\text{Clorofila } b = 21,99. A_{649} - 5,32. A_{665}$$

$$\text{Carotenoides} = (1000.A_{470} - 2,86. \text{Clorofila } a - 129,2. \text{Clorofila } b) / 221$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

Razão Clorofila $a/b = \text{Clorofila } a / \text{Clorofila } b$

3.5.2 Antocianinas

Para análises de antocianinas da espécie *Epidendrum denticulatum* foram utilizados 0,05g de massa fresca de folhas totalmente expandidas, cortadas na forma de discos foliares. Os discos foliares foram depositados em tubos falcon de 15 mL, revestidos com papel aluminizado, nos quais foram adicionados 5 mL da solução de extração, composta por ácido clorídrico a 3M, água e metanol, na proporção 1:3:16. Os tubos foram mantidos no escuro a 4 °C por 48 horas e em seguida centrifugados em Centrifuga Klindly KC16R a 3.000 x g por 20 minutos a 4°C. Após esse período as amostras foram depositadas em cubetas de quartzo e determinadas por meio de espectrofotometria em espectrofotômetro PRÓ-ANÁLISE V-1600, adaptado de Murray & Hackett (1991). As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 530 e 653 nm. Os conteúdos de antocianinas foram estimados como descrito por Murray & Hackett (1991), por meio da seguinte equação: $\text{Antocianina} = A_{530} - (0,24 \times A_{653})$, em que A representa a absorvância em um respectivo comprimento de onda, sendo expressos em mmol.g^{-1} MF.

3.6 Análises fisiológicas

Os parâmetros fisiológicos foram analisados no 90º dia da fase de cultivo *in vitro* e ao final dos 45 dias do processo de aclimatização. Para análises mais fiéis ao ambiente *ex vitro* em que as plantas se encontravam, a temperatura e a umidade relativa eram medidas sempre antes de se proceder com as análises de MINI-PAM, com termohigrômetro KASVI. Para esses parâmetros foram utilizadas 5 repetições.

Para realizar as análises fisiológicas utilizou-se os aparelhos:

- Analisador de Gás Infravermelho, IRGA LI – 6400 (LI-COR Biosciences)
- Fluorômetro Portátil, MINI-PAM (Heinz Walz GmbH)
- Clorofilômetro Portátil, SPAD – 502 (Konica Minolta Sensing)

3.6.1 Fotossíntese e Parâmetros Relacionados - IRGA

A análise das trocas gasosas foi realizada nas plantas após os 90 dias *in vitro* e após 45 dias de aclimatização. Ocorreu no período de 09 h às 10 h da manhã, nas folhas expandidas das plantas. Utilizou-se o analisador de gás infravermelho IRGA com fluxo de ar de 500 mL.min⁻¹, com luminosidade controlada de 1000 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sendo a área da câmara de 6 cm² e concentração de CO₂ do ar de 400 ppm. Na ocasião foram mensuradas:

- a taxa de fotossíntese líquida (A) ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$),
- a condutância estomática (g_s) ($\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$),
- a concentração interna de carbono (C_i) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$),
- a transpiração (E) ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

3.6.2 Fluorescência da Clorofila *a* do Fotossistema II - MINI-PAM

O MINI-PAM mede a fluorescência da clorofila *a* e alguns outros parâmetros relacionados a ela. Para tanto, foram feitas duas medições utilizando o aparelho, com as plantas ao final da fase *in vitro*, nos dias 88 e 90. Já na fase de aclimatização, as medições foram feitas em dias alternados durante os primeiros 17 dias, uma medição após 30 dias e uma última medição quando as plantas completaram 45 dias na condição *ex vitro*. Ao todo foram realizadas 13 coletas de dados, sendo as duas primeiras coletas realizadas com as plantas no ambiente *in vitro* (dias 88 e 90) e os demais dados foram durante a etapa de aclimatização (dias 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 30 e 45).

Todas as análises da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas no período da manhã, entre as 9h e as 10h. As plantas foram colocadas previamente em ambiente escuro por, no mínimo duas horas. As análises foram conduzidas no escuro, apenas com a luz do computador, sempre nas mesmas folhas expandidas e marcadas de cada planta. Individualmente, cada planta foi cuidadosamente retirada, de sua célula da bandeja com substrato para realização da análise e em seguida foi devolvida a sua respectiva posição marcada na bandeja. A fluorescência basal (F_o) foi medida com a folha aclimatada ao escuro e a fluorescência máxima (F_m) foi determinada durante um pulso de fótons saturante de 7.500 $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Foram analisadas as variáveis fluorescência basal (F_o), fluorescência máxima (F_m) e o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m). Esses dados após o pulso de luz eram obtidos automaticamente por meio do software Win-Control 3.

3.6.3 Índice SPAD - SPAD 502

A análise com SPAD, foi realizada somente na espécie *Epidendrum denticulatum* e seguiu o mesmo número de coletas de dados do MINI-PAM. Foram realizadas duas medições com as plantas ao final da fase *in vitro*, nos dias 88 e 90. Na fase de aclimatização, as medições foram feitas em dias alternados durante os primeiros 17 dias de aclimatização, uma medição após 30 dias e uma última quando as plantas completaram 45 dias *ex vitro*. Assim, ocorreram 13 coletas de dados, sendo as duas primeiras coletas quando as plantas ainda estavam no ambiente *in vitro* (dias 88 e 90) e as demais durante a etapa de aclimatização (dias 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 30 e 45).

A análise com SPAD era realizada logo após a análise com MINI-PAM, sempre ocorrendo no escuro.

Para proceder com as análises com SPAD foram medidos 3 pontos próximos de uma região previamente marcada da folha e após se procedia com a média desses três pontos, realizada pelo próprio aparelho.

3.7 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e 16 repetições (Tabela 1). Cada repetição, equivalente a uma unidade experimental, foi composta por um frasco de cultivo com 2 plântulas.

O experimento contou com duas fases: cultivo *in vitro*, em que ocorreu a influência das luzes LEDs e aclimatização *ex vitro* em viveiro, sob iluminação natural.

Ao final do experimento os dados foram submetidos à análise de variância e teste de separação de médias, quando significativas estatisticamente. O teste t-student, foi utilizado para os parâmetros morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, dentro de cada período analisado - fase *in vitro* e fase de aclimatização -, de forma independente, ou seja, não se comparou uma fase com a outra. O teste utilizado para a comparação de médias foi o Tukey a 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico Statistica 10.0 software (Statsoft INC., 2010).

Para as análises de MINI-PAM – fluorescência basal (F_o), fluorescência máxima (F_m) e rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) – e SPAD, foram ajustadas regressões de primeiro e segundo grau, sendo escolhida aquela que melhor representava a tendência dos dados.

4 INFLUÊNCIA DAS QUALIDADES ESPECTRAIS NOS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS AO FINAL DO CULTIVO *IN VITRO* E DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO DE *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (ORCHIDACEAE)

4.1 RESUMO

Epidendrum denticulatum é uma espécie de orquídea terrestre ou litofítica, que ocorre no Sudeste e Nordeste do Brasil, sobre a qual existem poucos estudos relacionados a sua fisiologia, principalmente durante processo de aclimatização. Muitas das técnicas de cultivo *in vitro* de orquídeas estão bem estabelecidas, entretanto, as luzes LEDs são uma inovação. Compreender e elucidar como essa espécie responde às luzes LED ao final do cultivo *in vitro* e durante a aclimatização são os objetivos deste trabalho. Plantas da espécie, originadas de sementes, após sucessivos subcultivos em meio MS, acrescido de vitaminas de Morel e carvão ativado, foram submetidas a luzes LEDs monocromáticas azul, vermelha e branca e à combinação azul/vermelha durante 90 dias. No 90º dia de cultivo *in vitro* sob luzes LEDs e no 45º dia de aclimatização as plantas foram avaliadas. Foram analisados os parâmetros morfométricos como massa seca, fresca, número de folhas e altura das plantas; parâmetros bioquímicos como os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, relação clorofilas *a/b*, clorofilas totais, carotenoides e antocianinas; parâmetros fisiológicos como fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e índice SPAD. A espécie passou por uma condição estressante ao ser transferida do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* e teve que reparar seu metabolismo como um todo e adaptar-se a um novo ambiente. Com esse trabalho foi possível concluir que os diferentes comprimentos de onda emitidos por luzes LEDs foram capazes de afetar o crescimento e o desenvolvimento de plantas da espécie *Epidendrum denticulatum*. Quanto aos parâmetros morfológicos e bioquímicos houve intensa sobreposição de médias não sendo possível apontar um tratamento destaque. Quando aos parâmetros fisiológicos, ao final da aclimatização, os tratamentos vermelho, azul/vermelho e branco promoveram aumentos dos valores de taxa de fotossíntese líquida (*A*), condutância estomática (*g_s*) e transpiração (*E*), enquanto que os valores de carbono interno (*C_i*) diminuem. Os comprimentos de onda azul, azul/vermelho induzem maiores valores de F_v/F_m (0,75) em plantas da espécie. O índice SPAD mostra queda nos valores para todos os espectros ao final do período de 45 dias de aclimatização. Com relação a aclimatização, obteve-se 100% de sobrevivência de todas as plantas avaliadas durante o experimento, independente do tratamento com luz LED aplicado. Esse estudo contribui para uma melhor compreensão da morfofisiologia e bioquímica de uma espécie de orquídea brasileira durante a aclimatização e ajuda no aprimoramento de seu processo de propagação.

4.2 INTRODUÇÃO

Muitas espécies de orquídeas estão em risco de extinção devido à destruição de seu habitat e extrativismo predatório. Muito disso ocorre por serem plantas ornamentais muito apreciadas e valiosas comercialmente (Colombo *et al.*, 2005; Roberts & Dixon, 2008).

O gênero *Epidendrum* é conhecido pela sua riqueza de espécies, sendo considerado um dos gêneros mais diversos dentro da família Orchidaceae, com mais de 1.500 espécies (Govaerts *et al.*, 2020). Apresenta distribuição neotropical, desde o Sudeste dos Estados Unidos ao Norte Argentina (Hágsater & Soto-Arenas, 2005). Dependendo das condições ambientais, pode apresentar o metabolismo CAM (Oliveira & Sajo, 1999). No Brasil já foram descritas em torno de 100 espécies, distribuídas por todo o território, em regiões com diversos biomas e climas (Pabst & Dungs, 1975).

Epidendrum denticulatum Barb. Rodr. é uma espécie de orquídea terrestre ou litofítica, que ocorre no Sudeste e Nordeste do Brasil (Pinheiro *et al.*, 2013; Pinheiro & Barros, 2007). Cresce em duas principais regiões neotropicais, na Mata Atlântica brasileira, em dunas e matas ao longo do litoral e no Cerrado, na parte interior do continente (Pinheiro & Barros 2007). Floresce na estação quente e úmida, apresentando flores rosas, com guias brancas. Apresenta caules longos, eretos e finos, raramente intumescidos em pseudobulbos. Possui nectários extraflorais nos pecíolos de seus botões, flores e frutos (São Leão, 2012; Stancik *et al.*, 2009; Almeida, 2003).

As orquídeas, principalmente as epífitas, se beneficiam de intensa irradiância e relativamente pouca competição, mas são confrontadas com suprimentos limitados de nutrientes e água (Zotz & Hietz, 2001).

A luz é um dos fatores ambientais mais importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Elas a utilizam como fonte de energia para a fotossíntese e conseguem perceber a intensidade, comprimento de onda, fotoperíodo e direção por meio de fotorreceptores, como os fitocromos e criptocromos, e respondem a eles gerando uma série de respostas fisiológicas específicas (Muneer *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018). Diferentes luzes monocromáticas, emitidas por lâmpadas LEDs (Wang *et al.*, 2016; Manivannan *et al.*, 2017), podem influenciar o crescimento e a qualidade das plantas regulando a fotossíntese, fotomorfogênese e metabolismo secundário (Hamdani *et al.*, 2019; Muneer *et al.*, 2014; Hernández & Kubota, 2016).

Luzes provenientes de diodos emissores de luz (LEDs) apresentam diversas vantagens, como a possibilidade de seleção do comprimento de onda, tamanho pequeno, longa vida útil e baixa emissão de calor (Agarwal & Gupta 2016; Bello-Bello *et al.*, 2017; Shukla *et al.*, 2017; Massa *et al.*, 2008). A capacidade de controle de espectro com luzes LEDs permite fornecer comprimentos de onda que correspondem aos fotorreceptores vegetais e pigmentos fotossintéticos, contribuindo para otimizar o metabolismo e o crescimento da planta (Olle & Virsile, 2013).

A utilização de luzes artificiais como as LEDs tem sido cada vez mais presente na micropropagação. Nesse processo as plantas são expostas a alta umidade relativa, baixa troca gasosa, altas concentrações de carboidratos, nitrogênio e reguladores de crescimento (Kozai 2010; Badr *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2016). Esses fatores afetam diretamente diversos processos fisiológicos e bioquímicos, como a fotossíntese em plantas *in vitro* (Xiao *et al.*, 2011; Shin, Park & Paek, 2014).

Existem diferentes técnicas e análises capazes de investigar as mudanças nos parâmetros fisiológicos que ocorrem durante a transição com ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. O fluorômetro PAM, por exemplo é uma ferramenta de monitoramento adequada porque é rápido, não destrutivo e fornece informações fisiológicas aprofundadas sobre organismos fotossintéticos (Ralph & Gademann, 2005). Esta informação pode ser usada para identificar mudanças no estado fotossintético antes que mudanças morfológicas sejam observadas (Suassuna *et al.*, 2011). O clorofilômetro SPAD, também é uma ferramenta utilizada para detectar estresses abióticos em diversas culturas e possibilita uma avaliação não destrutiva do índice de verde presente no tecido foliar (Torres Netto *et al.*, 2002; 2005; Pecanha, 2010; Castro, 2011). Todas essas análises combinadas são capazes de ajudar a interpretar o comportamento fisiológico das plantas frente aos estresses a que são submetidas durante o cultivo *in vitro* e posteriormente durante a aclimatização.

O objetivo desse trabalho foi investigar como diferentes qualidades de luzes LEDs aplicadas durante o cultivo *in vitro* em plantas da espécie *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. podem afetar seu padrão de desenvolvimento ao final do cultivo *in vitro* e durante o período de aclimatização.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Parâmetros Morfométricos

Para variáveis de massa fresca e seca de plantas da espécie *Epidendrum denticulatum*, oriundas do cultivo *in vitro* houve diferença estatística significativa entre os tratamentos azul e branco (Tabela 2).

Para massa fresca no 90º dia do cultivo *in vitro*, plantas do tratamento branco apresentaram a maior média (1,11g), seguidas pelas plantas dos tratamentos vermelho (0,85g), e vermelho/azul (0,92g), apesar de não diferirem estatisticamente entre si (Tabela 2). As plantas referentes ao tratamento azul demonstraram os menores valores de massa fresca (0,44g), diferindo-se estaticamente do tratamento branco. A massa seca média das plantas submetidas ao tratamento branco é 152,27% maior do que para plantas do tratamento azul.

A massa seca média no 90º dia do cultivo *in vitro*, seguiu a mesma tendência das médias de massa fresca. Plantas submetidas ao tratamento branco apresentaram a maior média (0,12g), seguidas pelas plantas do tratamento vermelho (0,09g) e vermelho/azul (0,09g) e com menor média para as plantas sob influência dos LEDs azuis (0,06g), sendo os tratamentos branco e azul diferentes estatisticamente entre si (Tabela 2).

Após o período de 45 dias de aclimatização, observou-se diferença estatística significativa entre os tratamentos azul e azul/vermelho apenas para a variável número de folhas (Tabela 2). As plantas do tratamento azul apresentaram maior média (9,75), seguido pelas plantas dos tratamentos vermelho (9,25) e branco (8,00) e com menor média as plantas do azul/vermelho (6,50), sendo esse último tratamento cerca de 33,34% menor que a média das plantas do tratamento azul (9,75)

Tabela 2: Dados morfométricos de plantas de *Epidendrum denticulatum* no 90° dia de cultivo *in vitro* e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

	Massa Fresca (g)		Massa Seca (g)	
	<i>In vitro</i> *	Aclimatização	<i>In vitro</i> *	Aclimatização
	Azul	0,44 ± 0,08 b	0,71 ± 0,14 a	0,060 ± 0,01 b
Vermelho	0,85 ± 0,15 ab	0,74 ± 0,42 a	0,098 ± 0,02 ab	0,065 ± 0,01 a
Azul/Vermelho	0,92 ± 0,02 ab	1,05 ± 0,34 a	0,095 ± 0,01 ab	0,061 ± 0,02 a
Branco	1,11 ± 0,35 a	1,06 ± 0,11 a	0,122 ± 0,02 a	0,058 ± 0,01 a
CV (%)	23,55	37,44	18,32	28,32

	Número de Folhas		Altura (cm)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatização *	<i>In vitro</i>	Aclimatização
	Azul	11,33 ± 2,02 a	9,75 ± 1,50 a	7,81 ± 2,57 a
Vermelho	9,33 ± 0,58 a	9,25 ± 1,50 ab	10,01 ± 2,43 a	9,70 ± 2,46 a
Azul/Vermelho	8,66 ± 0,58 a	6,50 ± 1,30 b	7,67 ± 2,02 a	7,00 ± 2,41 a
Branco	9,66 ± 0,58 a	8,00 ± 1,42 ab	9,85 ± 2,12 a	8,85 ± 2,32 a
CV (%)	11,84	17,06	26,01	31,29

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. * significativo a 5% pelo teste t-student.

No 45° dia de aclimatização as plantas de *Epidendrum denticulatum* obtiveram 100% de sobrevivência. Em todos os tratamentos as plantas apresentavam-se bem desenvolvidas, saudáveis, com novas raízes e folhas (Figura 4).

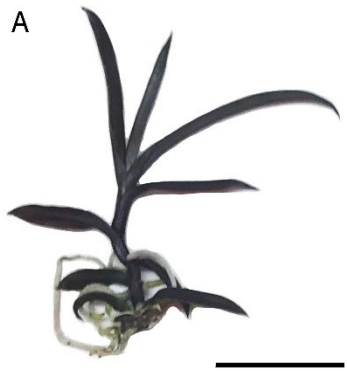


Figura 4: Plantas de *Epidendrum denticulatum* no 90º dia de cultivo *in vitro* (A – Tratamento LED Azul, B – Tratamento LED Vermelho, C – Tratamento LED Luz Azul/Vermelho, D – Tratamento LED Branco) e no 45º dia de aclimatização (E – Tratamento LED Azul, F – Tratamento LED Vermelho, G – Tratamento LED Azul/Vermelho, H – Tratamento LED Branco). Barras: 2cm.

4.3.2 Parâmetros Bioquímicos

Ao 90º dia de cultivo *in vitro* e ao 45º dia de aclimatização de plantas da espécie *Epidendrum denticulatum*, pode-se afirmar que para os parâmetros avaliados de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais, razão clorofila *a/b* e carotenoides não houve diferença estatística significativa (Tabela 3).

Apenas os teores de antocianinas das plantas cultivadas *in vitro*, apresentaram-se significativos estatisticamente, sendo o tratamento azul diferente estatisticamente do tratamento azul/vermelho (Tabela 3). O tratamento azul (0,76 mmol.g⁻¹ MF), apresentou os maiores valores médios de antocianinas nas plantas, seguido pelos tratamentos vermelho (0,49 mmol.g⁻¹ MF) e branco (0,42 mmol.g⁻¹ MF), sendo que esses três tratamentos não diferem estatisticamente entre si. O tratamento azul/vermelho (0,37 mmol.g⁻¹ MF) induziu os menores valores médios de antocianinas, mas não diferiu estatisticamente dos tratamentos vermelho e do branco. O tratamento azul (0,76 mmol.g⁻¹ MF) apresentou valor médio de antocianinas 105,4% maior que tratamento azul/vermelho (0,37 mmol.g⁻¹ MF).

Tabela 3: Dados bioquímicos de plantas da espécie *Epidendrum denticulatum* no 90º dia de cultivo *in vitro* e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

	Clorofila a (mg.g ⁻¹ MF)		Clorofila b (mg.g ⁻¹ MF)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatização	<i>In vitro</i>	Aclimatização
Azul	0,55 ± 0,02 a	0,30 ± 0,04 a	0,13 ± 0,02 a	0,04 ± 0,01 a
Vermelho	0,62 ± 0,02 a	0,39 ± 0,20 a	0,11 ± 0,01 a	0,06 ± 0,03 a
Azul/Vermelho	0,61 ± 0,07 a	0,27 ± 0,02 a	0,15 ± 0,03 a	0,04 ± 0,01 a
Branco	0,43 ± 0,15 a	0,30 ± 0,09 a	0,08 ± 0,01 a	0,05 ± 0,01 a
CV (%)	16,06	37,05	20,26	37,84

	Razão Clorofila a/b		Clorofilas Totais (mg.g ⁻¹ MF)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatização	<i>In vitro</i> *	Aclimatização
Azul	8,13 ± 2,27 a	6,04 ± 1,20 a	0,64 ± 0,04 a	0,34 ± 0,05 a
Vermelho	4,42 ± 1,58 a	6,24 ± 0,75 a	0,72 ± 0,01 a	0,47 ± 0,24 a
Azul/Vermelho	5,33 ± 0,47 a	6,07 ± 0,92 a	0,76 ± 0,07 b	0,32 ± 0,02 a
Branco	7,64 ± 3,40 a	5,10 ± 2,00 a	0,50 ± 0,18 ab	0,35 ± 0,11 a
CV (%)	30,95	22,35	15,34	37,22

	Carotenoides (mg.g ⁻¹ MF)		Antocianinas (mmol.g ⁻¹ MF)	
	<i>In vitro</i> *	Aclimatização	<i>In vitro</i> *	Aclimatização
Azul	1,67 ± 0,22 ab	1,05 ± 0,06 a	0,76 ± 0,09 a	0,61 ± 0,06 a
Vermelho	2,02 ± 0,16 a	1,44 ± 0,58 a	0,49 ± 0,12 ab	0,24 ± 0,01 a
Azul/Vermelho	2,33 ± 0,18 b	1,01 ± 0,08 a	0,37 ± 0,20 b	0,24 ± 0,10 a
Branco	1,54 ± 0,54 ab	1,09 ± 0,26 a	0,41 ± 0,10 ab	0,29 ± 0,08 a
CV (%)	16,69	28,23	26,54	21,06

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. * significativo a 5% pelo teste t-student.

4.3.3 Parâmetros Fisiológicos

4.3.3.1 Fotossíntese e parâmetros relacionados

No 90° dia de cultivo *in vitro* para plantas da espécie *Epidendrum denticulatum*, as variáveis analisadas, taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de carbono (C_i) e transpiração (E) não apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 4). Ademais, os dados de condutância estomática (g_s) e transpiração (E) foram negativos.

Para plantas de *Epidendrum denticulatum* no 45° dia de aclimatização, as diferenças entre as variáveis taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E) foram significativas estatisticamente (Tabela 4).

Ao final do período de 45 dias de aclimatização, as plantas submetidas ao tratamento azul, para a variável taxa de fotossíntese líquida (A), apresentaram valores estatisticamente diferentes quando comparados aos demais tratamentos, com menor média (0,62 $\mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) quando comparadas às plantas submetidas aos tratamentos vermelho (1,60 $\mu\text{mol$

de $\text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), branco ($1,43 \mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e azul/vermelho ($1,40 \mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), sendo que esses três últimos tratamentos não diferem estatisticamente entre si (Tabela 4).

Para a variável condutância estomática (g_s), ao final dos 45 dias de aclimatização, as plantas submetidas ao tratamento branco ($0,13 \text{ mol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) apresentaram menor média, não diferindo estatisticamente das plantas do tratamento azul/vermelho ($0,23 \text{ mol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Tabela 4).

A variável transpiração (E), seguiu a mesma tendência da condutância estomática (g_s), no 45º dia de aclimatização. As plantas do tratamento branco ($1,29 \text{ mmol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), apresentaram menor média, não diferindo estatisticamente das plantas do tratamento azul/vermelho ($1,84 \text{ mmol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Tabela 4).

Tabela 4: Dados fisiológicos relativos a trocas gasosas de plantas de *Epidendrum denticulatum* no 90º dia de cultivo *in vitro* e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs. A – taxa de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), g_s – condutância estomática ($\text{mol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C_i – concentração interna de carbono ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e E – transpiração ($\text{mmol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

	A ($\mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		g_s ($\text{mol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatização *	<i>In vitro</i>	Aclimatização *
Azul	$0,77 \pm 0,03$ a	$0,62 \pm 0,05$ b	$-0,00885 \pm 0,005$ a	$0,28 \pm 0,03$ a
Vermelho	$0,72 \pm 0,05$ a	$1,60 \pm 0,23$ a	$-0,00885 \pm 0,005$ a	$0,27 \pm 0,04$ a
Azul/Vermelho	$0,64 \pm 0,13$ a	$1,40 \pm 0,34$ a	$-0,00618 \pm 0,008$ a	$0,23 \pm 0,08$ ab
Branco	$0,74 \pm 0,07$ a	$1,43 \pm 0,23$ a	$-0,00924 \pm 0,004$ a	$0,13 \pm 0,02$ b
CV (%)	11,53	18,99	.	21,9

	C_i ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		E ($\text{mmol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatização	<i>In vitro</i>	Aclimatização *
Azul	$544,09 \pm 114,41$ a	$388,14 \pm 1,05$ a	$-0,123 \pm 0,040$ a	$2,28 \pm 0,162$ a
Vermelho	$502,24 \pm 31,02$ a	$385,78 \pm 4,72$ a	$-0,124 \pm 0,041$ a	$2,21 \pm 0,197$ a
Azul/Vermelho	$492,96 \pm 25,29$ a	$375,52 \pm 9,25$ a	$-0,088 \pm 0,101$ a	$1,84 \pm 0,433$ ab
Branco	$519,12 \pm 16,62$ a	$355,00 \pm 45,12$ a	$-0,129 \pm 0,026$ a	$1,29 \pm 0,194$ b
CV (%)	11,89	6,16	.	14,13

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. * significativo a 5% pelo teste t-student.

4.3.3.2 Fluorescência da Clorofila *a* do PSII

Quanto aos dados relativos ao rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) de plantas submetidas aos diferentes espectros de luz, obteve-se regressão quadrática ajustada para os tratamentos azul e azul/vermelho e regressão linear para o tratamento vermelho (Figura 5).

As curvas dos diferentes tratamentos partem de valores bastante distintos de F_v/F_m (Figura 5 – Dia 0). O primeiro dado da curva refere-se ao 90º dia do cultivo *in vitro*. As plantas submetidas ao tratamento azul, apresentaram como primeiro dado médio de sua curva, o valor de 0,72 de F_v/F_m ; plantas do tratamento vermelho 0,60 de F_v/F_m ; plantas do tratamento azul/vermelho 0,42 de F_v/F_m e as plantas do tratamento branco 0,70 de F_v/F_m . Quando se analisa o último valor das curvas dos diferentes tratamentos, referente ao 45º dia de aclimatização (Figura 5 – Dia 45), pode-se perceber que os valores aumentaram e se aproximaram. As plantas do tratamento azul apresentam como valor final médio 0,75, assim como as plantas dos tratamentos azul/vermelho e branco. As plantas do tratamento vermelho apresentam 0,74 de F_v/F_m .

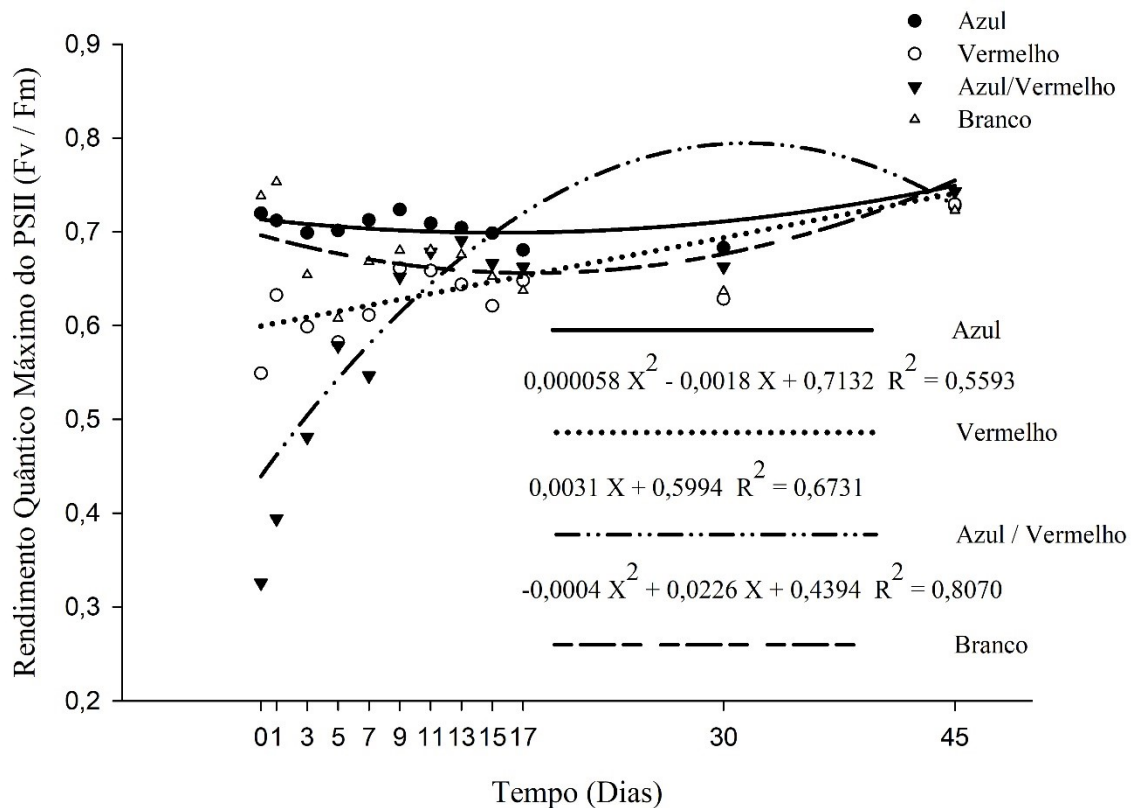


Figura 6: Dinâmica de índice SPAD de plantas de *Epidendrum denticulatum* durante o período de aclimatização *ex vitro* sob luz natural de plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

Pode-se dizer que durante a condução da aclimatização de plantas de *Epidendrum denticulatum* a umidade relativa do ar variou mais do que a temperatura (Figura 7). É importante salientar que o dia 0 se refere a umidade relativa do ar e a temperatura dentro da sala de crescimento onde estavam localizados os frascos com as plantas *in vitro*. O dia 1 se refere ao primeiro dia em que às plantas foram colocadas em ambiente natural, a partir disso estando sujeitas às variações climáticas. A menor umidade relativa do ar em condições ambientais foi de 60% e a temperatura mínima foi de 20,6°C. A umidade relativa máxima foi de 88% e a temperatura máxima foi 28,5°C. Com isso, pode-se afirmar que as plantas estiveram sujeitas a variações ambientais durante o período de 45 dias de aclimatização às quais foram submetidas.

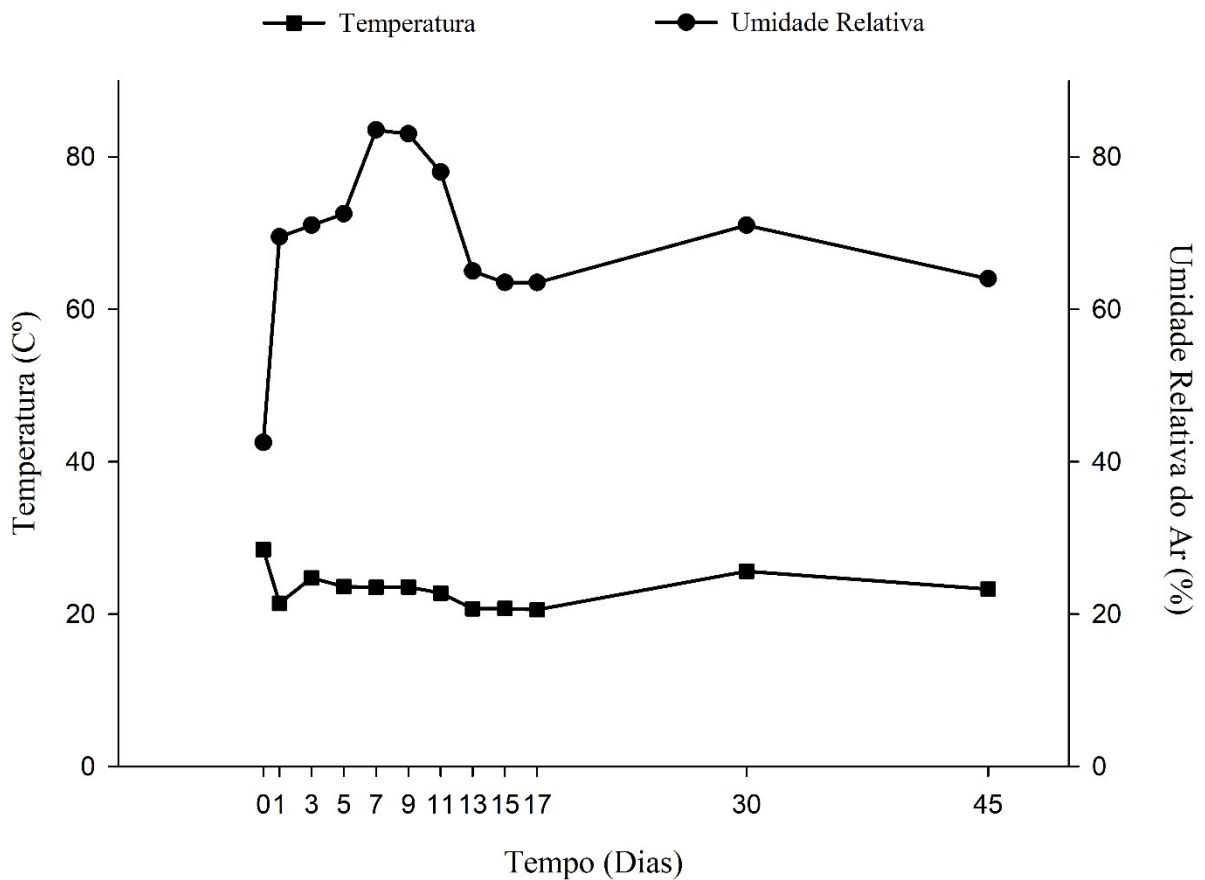


Figura 7: Temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) a que estavam submetidas plantas de *Epidendrum denticulatum* no 90º dia de cultivo *in vitro* (dia 0 - umidade relativa do ar e a temperatura dentro da sala de crescimento onde estavam localizados os frascos com as plantas *in vitro*) e após o período de 45 dias de aclimatização (dia 1 ao dia 45), submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Parâmetros Morfométricos

Quanto aos parâmetros morfométricos analisados pode-se perceber intensa sobreposição de médias, o que torna difícil isolar o efeito de apenas um tratamento. Apesar disso, o tratamento com o comprimento de onda azul, sempre acaba por apresentar diferença com outro tratamento; com o tratamento branco para acúmulo de massa fresca e seca no 90º dia de cultivo *in vitro* e com o tratamento azul/vermelho para número de folhas após 45 dias de aclimatização (Tabela 2).

De forma geral, a luz azul influencia vários processos fisiológicos, principalmente por meio da ativação de criptocromos e das fototropinas; portanto, a exposição por longo período de tempo das plantas à luz azul monocromática pode influenciar positiva ou negativamente no crescimento e na morfologia, como percebeu-se neste trabalho. Além disso, a luz azul influencia induzindo mudanças no aparato fotossintético (Huché-Thélier *et al.*, 2016) estando também envolvida com o fototropismo, a fotomorfogênese e a abertura estomática (Whitelam & Halliday, 2007).

Quanto a luz vermelha, apesar de não ter se diferido estatisticamente dos outros tratamentos, não sendo possível observar grandes efeitos dela sob a espécie estudada, a literatura aborda que esse comprimento de onda é conhecido por promover ganho de massa fresca e seca, alongamento do caule e expansão da folha para muitas espécies de plantas (Heo *et al.*, 2002; Johkan *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2007), além de influenciar no diâmetro do caule e área foliar (Wu *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2009; Johkan *et al.*, 2010; Shimizu *et al.*, 2011).

Em relação a combinação de luz azul/vermelha, apesar de não ter sido possível identificar sua diferença para os outros tratamentos, é bastante conhecida por excitar os fotorreceptores de forma mais eficiente e aumentar a fotossíntese e o crescimento da planta (Sabzalian *et al.*, 2014; Spalholz *et al.*, 2020). Além disso, estudos relatam que a combinação favorece o aumento da biomassa (Shin *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011).

4.4.2 Parâmetros Bioquímicos

Verificou-se os maiores teores de antocianinas para a espécie quando submetidas a luz azul (0,76 mmol.g⁻¹ MF), vermelho (0,49 mmol.g⁻¹ MF) e branca (0,41 mmol.g⁻¹ MF) (Tabela 3).

É importante salientar que *Epidendrum denticulatum* apresenta caracteristicamente folhas arroxeadas quando está na fase de plântula *in vitro* (Figura 4). A luz azul é conhecida por estimular a biossíntese de metabólitos secundários que possuem funções fotoprotetoras (Landi *et al.*, 2019). A adição de luz azul ao ambiente de iluminação é uma ferramenta para aumentar a taxa de crescimento das plantas, conteúdo de pigmentos e capacidade antioxidante dos vegetais (Naznin *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2019). Quanto a luz vermelha, ela é responsável por regular a síntese de fitoquímicos, como compostos fenólicos e oxalato (Saebo *et al.*, 1995; Furuya, 1993; Qi *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2015), em alguns casos, resultando em concentrações aumentadas de flavonóides, incluindo antocianinas (Mizuno *et al.*, 2022; Manivannan *et al.*, 2015), o que também pode ser observado para *Epidendrum denticulatum*.

De forma geral, mudanças qualitativas e quantitativas no teor de pigmentos de uma espécie estão intimamente relacionadas com a luz em que a plantas são submetidas. Isso foi observado no trabalho de Zhang *et al.* (2018), em que os autores estudaram os efeitos da luz azul e da luz vermelha no acúmulo de antocianinas e na diferenciação da expressão de genes de morangueiro (*Fragaria x ananassa*) e afirmaram que o acúmulo de antocianinas depende da espécie e do cultivar estudado, além do microambiente em que as plantas estão inseridas.

A espécie *Epidendrum denticulatum* caracteriza-se pelo hábito terrícola tendo bom crescimento e desenvolvimento sob elevada intensidade luminosa (Juras *et al.*, 2020). Apresentam caules longos e finos, raramente intumescidos em pseudobulbos. (São Leão, 2012; Stancik *et al.*, 2009). Plantas epífitas sob elevada intensidade luminosa possuem desenvolvimento dependente dos compostos de armazenamento de pseudobulbos (Stancato, Mazzafera & Buckeridge, 2002). O fato de a espécie não apresentar pseudobulbos, faz com que seja necessário, provavelmente, desenvolver outros mecanismos para adaptar-se às elevadas intensidades luminosas a que é submetida em ambiente natural. Provavelmente a presença de antocianinas na fase jovem da planta seja uma característica vantajosa, evitando a fotoinibição. Autores como Dewez & Perreault (2012), afirmam que quando as plantas são expostas a condições estressantes, elas normalmente acumulam antocianinas para alterar a reflexão e a absorção da luz nos tecidos foliares e com isso proteger os fotossistemas.

4.4.3 Parâmetros Fisiológicos

Quanto a análise de trocas gasosas, as plantas submetidas a luz azul no 45º dia de aclimatização apresentaram as menores médias para a taxa de fotossíntese líquida ($0,62 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e se diferenciaram estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 4). A luz azul monocromática, também reduziu a fotossíntese, a altura de plantas, a condutância estomática, taxa de transpiração e conteúdo de clorofila para *Salvia miltiorrhiza* (Zhang *et al.*, 2020). Em alface (*Lactuca sativa* L.), entretanto, a luz azul estimulou o acúmulo de biomassa, aumento das taxas fotossintéticas, transpiratórias, da condutância estomática e dos valores de F_v/F_m (Muneer *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2020). Existe essa diferença de resposta entre as espécies pois o efeito dos diferentes espectros luminosos é específico para cada espécie (Jones, 2018).

A luz azul possui papel crucial nas relações hídricas e trocas gasosas, sendo um dos principais reguladores da condutância estomática (g_s), abertura estomática nas primeiras horas do dia e conseqüentemente do crescimento e produção vegetal (Blaauw & Blaauw-Jansen, 1970; Cosgrove, 1981; Silva *et al.*, 2019).

Landi *et al.* (2019), afirmam que a taxa fotossintética em plantas cultivadas com luz azul pode ser semelhante ou maior à das plantas cultivadas com luz branca e maior do que em plantas cultivadas com luz vermelha ou verde. No entanto, no caso de *Epidendrum denticulatum*, a luz azul causou uma redução significativa no valor da taxa de fotossíntese líquida (A).

Os valores de A, g_s e E aumentaram ao final da aclimatização, no entanto, os valores da variável C_i diminuíram. Isso se deve provavelmente ao fato de que as plantas estavam assimilando CO_2 durante a fase de aclimatização, sugerindo que as plantas *in vitro* apresentavam uma conversão fotossintética baixa.

O fato dessas três variáveis estarem intimamente relacionadas explica por que para *Epidendrum denticulatum*, elas apresentaram valores estatisticamente significativos. Um aumento na condutância estomática (g_s) ao final do período de 45 dias de aclimatização aumentou a transpiração e conseqüentemente a assimilação de CO_2 (A), para os todos os tratamentos, com excessão do tratamento azul (Tabela 4). Segundo Huché-Thélier *et al.*

(2016), a luz azul pode induzir mudanças no aparato fotossintético da planta. O que se percebe para *Epidendrum denticulatum* é que provavelmente a luz azul influenciou de forma negativa a fotossíntese líquida (A), entretanto os outros aspectos não foram influenciados por esse tratamento.

Em relação ao rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), as plantas submetidas ao tratamento azul tiveram destaque apresentando valores elevados durante o período de aclimatização (Figura 5). Assim como para *Epidendrum denticulatum*, Ko *et al.* (2020), ao estudar a orquídea epífita *Phalaenopsis aphrodite*, afirmam que esse comprimento de onda promoveu valores elevados de F_v/F_m e alta taxa de transporte de elétrons, melhorando a atividade do PSII.

Quanto aos valores de F_v/F_m para *Epidendrum denticulatum* percebeu-se que as plantas da espécie quando estão sujeitas aos diferentes tratamentos com luzes LEDs, apresentam bastante variação em seus comportamentos fisiológicos no 90º dia de cultivo *in vitro* (Figura 5 – Dia 0). Valores baixos de F_v/F_m no início da fase de aclimatização, provavelmente deve-se à fotoinibição por estresse luminoso, o que leva à formação de oxigênio reativo nos cloroplastos e por consequência, danos ao PSII. (Maxwell & Johnson, 2000; Baker & Rosenqvist, 2004). Baixo F_v/F_m representa que a luz incidente sob as plantas e capturada nos centros de reação PSII provavelmente foi subutilizada (Fracheboud & Leipner, 2003). PSII é um componente suscetível da maquinaria fotossintética e muitas vezes suportará o impacto das condições de estresse, o que leva a uma diminuição na F_v/F_m (Demmig-Adams & Adams, 2018; Long, Humphries & Falkowski, 1994).

Entretanto, quando não estão mais sob influência dos LEDs as plantas mostram aumento nos valores F_v/F_m . Isso é um bom indício de uma possível recuperação do aparato fotossintético das plantas ao longo do período dos 45 dias de aclimatização. Valores elevados de F_v/F_m , pode ser um indicativo de eficiência no uso da radiação pela etapa fotoquímica e, conseqüentemente, boa assimilação de carbono (Tester & Bacic, 2005).

Além disso, à medida que o tempo passa durante a aclimatização esses valores vão se aproximando entre si, para todos os tratamentos até que, no último dia de análise, o dia 45 da etapa de aclimatização, todos os tratamentos apresentam valores muito próximos de 0,73 (Figura 5 – Dia 45). Quando a planta está com o PSII intacto, a razão F_v/F_m deve variar entre 0,75 e 0,85 enquanto uma queda nesta razão reflete a presença de dano fotoinibitório nos centros (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989; Ronquim *et al.*, 2009; dos Santos *et al.*, 2013).

Supostamente a recuperação nos dados de F_v/F_m ao longo da etapa de aclimatização se deve a plasticidade e recuperação do aparato fotossintético das plantas de *Epidendrum denticulatum* após submetidas as diferentes qualidades espectrais. Entretanto, essa capacidade é própria para cada espécie (Bjorkman, 1981; Pearcy, 1998).

As plantas submetidas a luz azul/vermelha também apresentaram valores elevados de F_v/F_m (Figura 5 – Dia 30). A combinação azul/vermelho pode excitar os fotorreceptores de forma mais eficiente e aumentar a fotossíntese e o crescimento da planta (Sabzalian *et al.*, 2014; Spalholz *et al.*, 2020; Dou *et al.*, 2017). Essa combinação também proporcionou maior eficiência fotossintética, com altos valores de F_v/F_m para *Campomanesia pubescens* (Centofane, 2020).

Quanto ao índice SPAD, para todos os tratamentos houve redução nos valores ao final do período de 45 dias de aclimatização. Essa variação provavelmente está ligada à variação nos fatores ambientais como temperatura e umidade a que as plantas de *Epidendrum denticulatum* estavam submetidas, além de se relacionar também com a redução nos valores dos pigmentos vegetais analisados, mostrando que possivelmente os fatores ambientais unidos aos parâmetros bioquímicos afetam os valores de índice SPAD.

O aparelho SPAD apresenta um sistema eficiente para compensar as diferenças na espessura nas folhas e em seus conteúdos de água. Apesar disso, essa análise pode apresentar grandes variações entre os dados e em genótipos de uma mesma espécie (Bullock & Anderson, 1998) cultivados em uma mesma condição de ambiente, devido a diferenças na estrutura e anatomia foliar. Assim, apesar de ser uma análise não destrutiva muito vantajosa, que nos mostra dados sobre o status da planta, ele pode apresentar grandes variações entre os dados o que torna difícil interpretá-los, fato que ocorreu com a espécie *Epidendrum denticulatum*.

Plantas da espécie *Epidendrum denticulatum* ao final da aclimatização, apresentam valores elevados de F_v/F_m e aumento da taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E). As orquídeas de forma geral, são capazes de tolerar e se aclimatar às condições estressantes, modificando sua fisiologia e morfologia, conforme relatado por Cameron *et al.* (1999).

As plantas da espécie apresentaram plasticidade frente aos estresses luminosos, sob os quais foram submetidas *in vitro*. Isso porque ao final do período de aclimatização os

valores de F_v/F_m estavam bastante próximos entre si, o que foi considerado um comportamento plástico das plantas da espécie (Figura 5 – Dia 45). A capacidade de responder a mudanças nos recursos ambientais, como diferentes comprimentos de onda por exemplo, é conhecida como plasticidade fenotípica. Espécies com alta plasticidade fenotípica possuem maiores chances de sobreviver em ambientes instáveis e heterogêneos devido à sua capacidade de se aclimatar morfológicamente, fisiológica e bioquimicamente, para tolerar o ambiente de estresses (Valladares *et al.*, 2005). Essa capacidade adaptativa de se recuperar fisiologicamente quando cessou a fonte de estresses luminosos, refletiu em 100% de sobrevivência das plantas, as quais se mostraram resilientes, sadias e com bom desenvolvimento de folhas e raízes ao final do período de aclimatização avaliado.

4.5 CONCLUSÕES

Com esse trabalho foi possível concluir que os diferentes comprimentos de onda emitidos por luzes LEDs foram capazes de afetar o crescimento e o desenvolvimento de plantas da espécie *Epidendrum denticulatum*.

Quanto aos parâmetros morfológicos e bioquímicos houve intensa sobreposição de médias não sendo possível apontar um tratamento destaque. Em relação aos parâmetros fisiológicos, ao final da aclimatização, os tratamentos vermelho, azul/vermelho e branco promoveram aumentos dos valores de taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E), enquanto que valores de carbono interno (Ci) diminuem. Os comprimentos de onda azul, azul/vermelho induzem maiores valores de F_v/F_m (0,75) em plantas da espécie. O índice SPAD mostra queda nos valores para todos os espectros ao final do período de 45 dias de aclimatização.

Com relação a aclimatização, obteve-se 100% de sobrevivência de todas as plantas avaliadas durante o experimento, independente do tratamento com luz LED aplicado. Esse estudo contribui para a melhor compreensão da morfofisiologia e bioquímica de uma orquídea brasileira durante a aclimatização e ajuda no aprimoramento do processo de propagação da espécie.

4.6 REFERÊNCIAS

- AHMED, H. A.; YU-XIN, T.; QI-CHANG, Y. Optimal control of environmental conditions affecting lettuce plant growth in a controlled environment with artificial lighting: A review. **South African Journal of Botany**, v. 130, p. 75-89, 2020.
- AGARWAL A.; GUPTA S.D. Impact of light-emitting diodes (LEDs) and its potential on plant growth and development in controlled environment plant production system. **Current Biotechnology**, v. 5, p. 28-43, 2016.
- ALMEIDA, A. M.; FIGUEIREDO R. A. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. **Brazilian Journal of Biology**. v. 63, p. 551-558, 2003.
- BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, p.13-24, 2011.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.403, p.1607-1621, 2004.
- BELLO-BELLO, J.J.; PÉREZ-SATO, J.A.; CRUZ-CRUZ, C.A.; MARTÍNEZ-ESTRADA, E. Light-emitting diodes: progress in plant micropropagation. **InTech**, v. 6, p. 93, 2017.
- BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. and Zeigler, H., Eds., Physiological Plant Ecology I., **Ency in Plant Physiology**, NS, 12A, Springer, New York, 1981.
- BLAAUW, O. H.; BLAAUW-JANSEN, G. Third positive (c-type) phototropism in the *Avena coleoptile*. **Acta Botanica Neerlandica**, v.19, n.5, p.764-776, 1970.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; ÖQUIST, G.; SCHREIDER, U.; LECHNER E. G. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrument. **Functional Ecology**, v.3, p.497-514, 1989.
- BULLOCK, D. G.; ANDERSON, D. S. Evaluation of the Minolta SPAD-502 chlorophyll meter for nitrogen management in corn. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.4, p.741-755, 1998.
- CASTRO, F.A.; CAMPOSTRINI, E.; TORRES NETTO, A.T.; VIANA, L.H. Relationship between photochemical efficiency (JIP-Test Parameters) and portable chlorophyll meter readings in papaya plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 44, p. 295-304, 2011.
- CAMERON, K.M.; CHASE, M.W.; WHITTEN, W.M.; KORES, P.J.; JARRELL, D.C.; ALBERT, V.A., *et al.* A Phylogenetic Analysis of the Orchidaceae: Evidence from rbcL Nucleotide Sequences. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 208-224, 1999.

- CENTOFANTE A.R. Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. 259, 2020.
- CHOI, H.G.; MOON, B.Y.; KANG, N.J. Effects of LED light on the production of strawberry during cultivation in a plastic greenhouse and in a growth chamber. **Scientia Horticulturae**, v. 189, p. 22-31, 2015.
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 145-150, 2005.
- COSGROVE, D.J. Rapid suppression of growth by blue light occurrence, time course, and general characteristics. **Plant Physiology**, v.67, n.3, p.584-590, 1981.
- DEMMIG-ADAMS B.; ADAMS W.W. An integrative approach to photoinhibition and photoprotection of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany** v. 154, p.1-3, 2018.
- DEWEZ, D.; PERREAULT, F. Effect of the anthocyanic epidermal layer on Photosystem II and I energy dissipation processes in *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 463-472, 2012.
- DOS SANTOS, C.M.; VERISSIMO, V.; WANDERLEY FILHO, H.C.L.; FERREIRA, V.M.; CAVALCANTE, P.G.S.; ROLIM, E.V.; ENDRES, L. Seasonal variations of photosynthesis gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grow in semi-humid and semi-arid areas subjected to water stress. **Industrial Crops and Products**, v.41, n.6, p. 203-213, 2013.
- DOU, H.J.; NIU, G.H.; GU, M.M.; MASABNI, J.G. Effects of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. **Horticulturae**, v. 3, n. 2, p. 36, 2017.
- FRACHEBOUD Y.; LEIPNER J. The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. Boston, MA: Springer In: DeEll JR, Tiovonen PMA eds. **Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology**. Boston: Kluwer Academic Publishers, p.125-150, 2003.
- FURUYA, M. Phytochromes: their molecular species, gene families, and functions. **Annual Review of Plant Biology**, v. 44, p.617-645, 1993.
- GOVAERTS R.; BERNET P.; KRATOCHVIL K.; GERLACH G.; CARR G.; ALRICH P.; PRIDGEON A.M.; PFAHL J.; CAMPACCI M.A.; BAPTISTA D.H.; TIGGES H.; SHAW J.; CRIBB P.; GEORGE A.; KREUZ K.; WOOD J. C. **World Checklist of Orchidaceae**, 2020. Disponível em : <https://wesp.science.kew.org/qsearch.do> . Acesso em: 01 jul. 2021.

HÁGSATER, E.; SOTO ARENAS, M.A. *Epidendrum*. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. (Eds.) **Genera Orchidacearum, Epidendroideae 4**. Oxford University, p. 236-251, 2005.

HAMDANI S.; KHAN N.; PERVEEN S.; QU M.; JIANG J., GOVINDJEE; ZHU X.G. Changes in the photosynthesis properties and photoprotection capacity in rice (*Oryza sativa*) grown under red, blue, or white light. **Photosynthesis Research**, v.139, p.107-121, 2019.

HEO, J.; LEE, C.; CHAKRABARTY, D.; PAEK, K. Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromic or mixture radiation provided by a light emitting diode (LED). **Plant Growth Regulation**, v. 38, p. 225-230, 2002.

HERNÁNDEZ R.; KUBOTA C., Physiological responses of cucumber seedlings under different blue and red photon flux ratios using LEDs. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 66-74, 2016.

JURAS, M.C.R.; PURGATTO, E.; FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R.M. Direct organogenesis and ethylene regulators in the cloning of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae), **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 374-379, 2020.

JONES, M.A. Using light to improve commercial value. **Horticulture. Research**, v 5, p. 47, 2018.

KO, S.S.; JHONG, C.M.; SHIH, M.C. Blue Light Acclimation Reduces the Photoinhibition of *Phalaenopsis aphrodite* (Moth Orchid). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n.17, 61-67, 2020.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, p. 188-204, 2010.

HUCHÉ-THÉLIER, L.; CRESPEL L.; GOURRIEREC J.L.; MOREL P.; SAKR S.; LEDUC N. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations - Perspectives for applications in horticulture. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 22-38, 2016.

LANDI M.; ZIVCAK M.; SYTAR O.; BRESTIC M.; ALLAKHVERDIEV S.I. Plasticity of photosynthetic processes and the accumulation of secondary metabolites in plants in response to monochromatic light environments: A review. **Biochimica and Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1861, n. 2, 131-148, 2019.

LIN, Y.; LI, J., LI, B; HE, T.; CHUN, Z. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 329-335, 2011.

LONG S.P.; HUMPHRIES S.; FALKOWSKI P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Biology**, v.45, n. 1, p. 633-662, 1994.

OLLE M.; VIRSILE A. The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. **Agricultural and Food Science**. v. 22 p. 223-234, 2013.

- MANIVANNAN A.; SOUNDARARAJAN P.; PARK Y.G.; WE H.; KIM S.; JEONG B.R. Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of in vitro-grown carnations 'green beauty' and 'purple beauty'. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 58, p.12-20, 2017.
- MANIVANNAN, A; SOUNDARARAJAN, P; HALIMAH, N; KO, C.H; JEONG, B.R. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56. P. 105-113, 2015.
- MASSA G.D.; KIM H.H., WHEELER R.M.; MITCHELL C.A. Plant productivity in response to LED lighting. **Hortscience**, v. 43, p. 1951-1956, 2008
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.345, p.659-668, 2000.
- MIZUNO, T; AMAKI, W; WATANABE, H. Effects of Monochromatic Light Irradiation by Led on the Growth and Anthocyanin Contents in Leaves of Cabbage Seedlings. **Acta Horticulturae**, p. 179-184, 2011.
- MUNEER, S. et al. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.15, n.3, p.4657-4670, 2014.
- NAZNIN, M.T.; LEFSRUD, M.; GRAVEL, V.; AZAD, M.O.K. Blue light added with red LEDs enhance growth characteristics, pigments content, and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment. **Plants** v. 8, n. 4, p. 93, 2019.
- NGUYEN Q.T.; XIAO Y.; KOZAI T. Photoautotrophic micropropagation. In: Kozai T, Niu G, Takagaki M. (eds) **Plant factory**, p. 271-283, 2016.
- NISHIMURA, T; OHYAMA, K; GOTO, E; INAGAKI, N. Concentrations of perillaldehyde, limonene, and anthocyanin of *Perilla* plants as affected by light quality under controlled environments. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 134-137, 2009.
- QI, L.D.; LIU, S.Q.; XU, L. Effects of light qualities on accumulation of oxalate: tannin and nitrate in spinach. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v. 4, p. 201-205, 2007.
- OLIVEIRA, V. C.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 3, p. 365-374, 1999.
- PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Editor: Brucke verlag Kurt Schmiersow, p. 408, 1975.

PEARCY R.W. Acclimation to sun, shade. In: Raghavendra AS, editor. **Photosynthesis: a comprehensive treatise**, p. 250-63, 1998.

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

PINHEIRO F.; COZZOLINO S.; DE BARROS F.; GOUVEIA T.M.Z.M.; SUZUKI R.M.; FAY M.F.; PALMA-SILVA C. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the Neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. **Evolution**, v. 67, p. 2024-2039, 2013.

PINHEIRO, F.; BARROS F. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua separação. **Hoehnea**, v.34, p. 563-570, 2007.

RALPH, P.J.; GADEMANN, R. Rapid light curve: a powerful tool for the assessment of photosynthetic activity. **Aquatic Botany**, v. 82, p. 222-237, 2005.

RAO, M.J.; XU, Y.; HUANG, Y.; TANG, X.; DENG, X.; XU, Q. Ectopic expression of citrus UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE gene enhances anthocyanin and proanthocyanidins contents and confers high light tolerance in Arabidopsis. **BMC Plant Biol**, v. 19, p. 603, 2019.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, v. 18, n. 8. p. 325-329, 2008.

RONQUIM, C.C.; PRADO, C.H.B.A.; SOUZA, J.P. Growth, photosynthesis and leaf water potential in Young plants of *Capaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae) under contrasting irradiances. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 21, n. 3, p. 197-208, 2009.

SABZALIAN, M.R.; HEYDARIZADEH, P.; ZAHEDI, M.; BORROOMAND, A.; AGHAROKH, M.; SAHBA, M. R.; SCHOEFS, B. High performance of vegetables, flowers, and medicinal plants in a red-blue LED incubator for indoor plant production. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, p. 879-886, 2014.

SÃO LEÃO, L.C. Estudos reprodutivos em duas espécies simpátricas de *Epidendrum* L. (Epidendroideae – Orchidaceae) em vegetação de restinga. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, 2012.

SHIMIZU, H.; SAITO, Y.; NAKASHIMA, H.; MIYASAKA, J.; OHDOI, K. Light environment optimization for lettuce growth in plant factory. Paper presented at the 18th **IFAC World Congress**, Milano, Italy. p. 605-609, 2011.

SHIN, K.S.; MURTHY, H.N.; HEO, J.W.; HALN, E.J.; PAEK, K.Y. The effect of light quality on the growth and development of in-vitro plants act breaks and rearrangements *Doritaenopsis*. **Plant Physiology**, v. 30, p. 339-343, 2008.

SHIN, K.S.; PARK, S.Y.; PAEK, K.Y. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p 26-33, 2014.

- SHUKLA M.R.; SINGH A.S.; PIUNNO K.; SAXENA P.K.; JONES A.M.P. Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. **Plant Methods**, v. 13, p. 6-15, 2017.
- SILVA, T. D., BATISTA, D. S., FORTINI, E. A., DE CASTRO, K. M., FELIPE, S. H. S., FERNANDES, A. M., *et al.* Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of in vitro *Pfaffia glomerata* accessions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, p. 111761, 2019.
- SPALHOLZ, H.; PERKINS-VEAZIE, P.; HERNANDEZ, R. Impact of sun-simulated white light and varied blue: red spectrums on the growth, morphology, development, and phytochemical content of green-and red-leaf lettuce at different growth stages. **Science Horticulturae**. v. 264, p. 109-195, 2020.
- STANCATO, G.C.; MAZZAFERA P.; BUCKERIDGE M.S. Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 2, n. 25, p. 229-235, 2002.
- STANCIK, J.F.; GOLDENBERG, R.; BARROS, F. O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 3, p. 864-880, 2009.
- SUASSUNA, J. F. et al. Eficiência fotoquímica e produtiva de frutos de meloeiro cultivado sob diferentes lâminas de irrigação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1251-1262, 2011.
- TESTER, M.; BACIC, A. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. **Plant Physiology**, v.137, p.791-793, 2005.
- TORRES NETTO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J.G.; YAMANISHI, O.K. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, n. 3, p. 203-210, 2002.
- TORRES NETTO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J. G. DE; BRESSAN- SMITH, R. E. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll *a* fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v.104, p.199-209, 2005.
- VALLADARES, F.; ARRIETA, S.; ARANDA, I.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; TENA, D.; SUÁREZ, F.; PARDOS, A. Shade tolerance, photoinhibition sensitivity and phenotypic plasticity of *Ilex aquifolium* in continental Mediterranean sites. **Tree Physiology**, v. 25, p. 1041-1052, 2005.
- WANG J.; LU W.; TONG Y.; YANG Q. Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. **Front Plant Science**, v. 7, p. 250, 2016.

WHITELAM, G.; HALLIDAY, K. Light and plant development. **Blackwell: Oxford**, 2007.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 149-158, 2011.

ZHANG, Y.; JIANG, L.; LI, Y.; CHEN, Q.; YE, Y.; ZHANG, Y.; LUO, Y.; SUN, B.; WANG, X.; TANG, H. Effect of Red and Blue Light on Anthocyanin Accumulation and Differential Gene Expression in Strawberry (*Fragaria × ananassa*). **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 820, 2018.

ZHANG, S.C., MA, J.Q., ZOU, H.Y., ZHANG, L., LI, S.H. & WANG, Y.P. The combination of blue and red LED light improves growth and phenolic acid contents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. **Ind. Crops Prod.** v. 158, p. 112959, 2020.

ZOTZ, G.; HIETZ, P. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 2067-2078, 2001.

5 INFLUÊNCIA DAS QUALIDADES ESPECTRAIS NOS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS AO FINAL DO PERÍODO *IN VITRO* E DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO DE *Gomesa flexuosa* (Lodd.)
M.W. Chase & N.H. Williams (ORCHIDACEAE)

5.1 RESUMO

Gomesa flexuosa é uma espécie de orquídea epífita, endêmica do Brasil. Apresenta inflorescência exuberante formada por mais de 100 pequenas flores de coloração amarelo-ouro. São escassos os estudos que abordam o comportamento fisiológico da espécie objeto de estudo. Nos últimos anos o cultivo *in vitro* de orquídeas nativas brasileira vem avançando, no entanto, aperfeiçoar esse tipo de cultivo com a utilização de luzes LEDs pode ser uma alternativa interessante. Compreender como luzes LEDs aplicadas durante o cultivo *in vitro* da espécie podem influenciar nos aspectos morfofisiológicos e bioquímicos durante a etapa de aclimatização dessas plantas foi o foco do trabalho. Plantas da espécie, originadas de sementes, após sucessivos subcultivos em meio MS, acrescido de vitaminas de Morel e carvão ativado, foram submetidas a luzes LEDs monocromáticas azul, vermelho e branca e a combinação azul/vermelha por 90 dias. Plantas foram avaliadas no 90º dia de cultivo *in vitro* e ao final de 45 dias do período de aclimatização. Analisou-se os parâmetros morfológicos como massa seca, massa fresca, número de folhas e altura das plantas; parâmetros bioquímicos como os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, relação clorofilas *a/b*, clorofilas totais e carotenoides; parâmetros fisiológicos como fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas. Não houve um tratamento destaque quanto aos parâmetros morfométricos e bioquímicos. No entanto, lâmpadas LEDs azuis destacam-se quanto à fluorescência da clorofila *a* pois plantas submetidas a elas apresentaram altos valores de F_v/F_m (0,79), enquanto LEDs vermelhos apresentaram valores mais baixos, durante os 45 dias de aclimatização, provavelmente devido a “síndrome da luz vermelha”. Pode-se dizer, após a realização desse trabalho, que *Gomesa flexuosa* é uma espécie de orquídea que apresentou forte capacidade de adaptação e recuperação frente as condições estressantes sob às quais foi submetida. Ao final do experimento, obteve-se 100% de sobrevivência das plantas da espécie que apresentavam adequado desenvolvimento de folhas e raízes, independente do tipo de lâmpada LED utilizado. Este estudo contribui para a compressão do metabolismo de uma orquídea brasileira e ajuda a melhorar o processo de cultivo da espécie.

5.2 INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das maiores famílias de angiospermas do mundo e possui enorme importância para a horticultura (Hossain, 2011). O gênero *Gomesa* inclui 125 espécies, é endêmico do Brasil sendo amplamente distribuído na Região Neotropical (Neubig *et al.*, 2012). Ocorre principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país nos biomas Cerrado e Mata Atlântica (Faria, 2004). *Gomesa flexuosa* é uma espécie de orquídea epífita, de ocorrência na Mata Atlântica em alguns estados do Brasil (Pereira *et al.*, 2005). Apresenta inflorescência formada por mais de 100 flores de coloração amarelo-ouro com cerca de 1 cm de diâmetro cada. É uma espécie produtora de óleo em glândulas chamadas elaióforos que estão localizadas no labelo com intuito de atrair polinizadores (Gomiz *et al.*, 2013). É considerada uma planta CAM (Silveira *et al.*, 2014). Plantas CAM mostram uma grande variação em sua capacidade para aclimação à luz, sendo que algumas exibem alta plasticidade (Maxwell *et al.*, 1999; Haslam *et al.*, 2002).

O uso da técnica de cultivo de plantas *in vitro*, é uma ferramenta importante para a propagação e preservação de espécies de interesse econômico e ecológico (Resende *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2016; Palhares Neto *et al.*, 2018). No entanto, ela submete as plantas a baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos, altas concentrações de açúcar, sais e substâncias reguladoras de crescimento no meio de cultivo (Xiao *et al.*, 2011; Zobayd *et al.*, 2004), reduzindo as taxas de transpiração, fotossíntese, absorção de água, nutrientes e CO₂, ocasionando crescimento lento *in vitro*, além de reduzir a adaptação das plantas durante o período de aclimação (Xiao *et al.*, 2011).

A qualidade da luz, correspondente aos comprimentos de onda (Hartmann *et al.*, 2011), é um fator que pode alterar a morfogênese das plantas por meio de uma série de processos mediados por receptores, que absorvem a luz na região do vermelho e azul do espectro, sendo, portanto, uma maneira viável de aumentar a qualidade das mudas (Braga *et al.*, 2009).

O fato de permitirem o controle dos componentes do espectro faz com que luzes LEDs sejam tão vantajosas, sendo capazes de interferir nas respostas fisiológicas, morfológicas e morfogênicas das plantas *in vitro* (Vieira *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Batista *et al.*, 2016; Trivedi & Sengar, 2017; Ferreira *et al.*, 2017). Têm baixo consumo de energia e baixa produção de calor, tamanho reduzido, capacidade de selecionar comprimentos de onda específicos, intensidade e qualidade de luz ajustáveis, bem como alta eficiência de

conversão fotoelétrica (Yeh & Chung, 2009; Massa *et al.*, 2015; Morrow, 2008). Lâmpadas LEDs têm sido amplamente utilizadas para investigar as respostas fotobiológicas das plantas ao estresse abiótico, a fluorescência da clorofila *a* e a atividade fotossintética (Johkan *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2019; Miyashita *et al.*, 2005; Parrine *et al.*, 2018; D'Souza *et al.*, 2015; Yeh & Chung, 2009). Dessa forma, essas luzes oferecem oportunidades de manipular os vegetais e entender melhor sua fisiologia.

O aparato fotossintético das plantas é notável por sua elevada capacidade de adaptação a diferentes regimes de luz (Valladares & Pearcy, 2000). Mudanças ambientais repentinas durante a transferência de condições *in vitro* para *ex vitro* são um estresse para as plantas as quais têm que reparar anormalidades estruturais e funcionais causadas por ambientes *in vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999; Ziv & Chen, 2008) e adaptar-se a um novo ambiente.

Diferentes técnicas combinadas são capazes de investigar as mudanças nos parâmetros fisiológicos que ocorrem durante a transição com ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. A fluorescência da clorofila *a* associada às medições de troca gasosas, possibilitam a obtenção de uma imagem completa da resposta das plantas ao seu ambiente (Hanelt, 2018; Misra *et al.*, 2012; Kalaji *et al.*, 2014, 2016). Elas são ferramentas capazes de diagnosticar a integridade do aparato fotossintético frente às adversidades ambientais, sendo técnicas rápidas, precisas e não destrutivas (Strasser *et al.*, 2010; Stirbet *et al.*, 2018) e que podem ser utilizadas para identificar mudanças no estado fotossintético antes que mudanças morfológicas sejam observadas (Suassuna *et al.*, 2011).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi investigar como diferentes espectros luminosos de luzes LEDs aplicados durante o cultivo *in vitro* em plantas de *Gomesa flexuosa* podem afetar o padrão de desenvolvimento da espécie e conseqüentemente o sucesso da aclimatização.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Parâmetros Morfométricos

Quanto aos parâmetros morfométricos no 90º dia de cultivo *in vitro* para a espécie *Gomesa flexuosa*, somente a variável número de folhas apresentou diferença estatística significativa apenas entre os tratamentos azul e vermelho (Tabela 5). Plantas submetidas ao tratamento vermelho (12,66), apresentaram a maior média para número de folhas, mas não diferiram estatisticamente, quando comparadas àquelas dos tratamentos azul/vermelho (9,83) e branco (10,83). Plantas do tratamento azul (9,16) apresentaram menor média, porém, não diferindo estatisticamente das plantas dos tratamentos azul/vermelho (9,83) e branco (10,83). O tratamento vermelho (12,66) possui a média cerca de 40% maior que o tratamento azul (9,16).

No 45º dia de aclimatização das plantas da espécie *Gomesa flexuosa*, somente a variável altura foi estatisticamente significativa entre os tratamentos azul/vermelho e os demais (Tabela 5). Plantas submetidas ao tratamento branco (11,22 cm), apresentaram maior média, mas não diferiram estatisticamente daquelas submetidas aos tratamentos azul (10,25 cm) e vermelho (10,16 cm), sendo que plantas do tratamento azul/vermelho (8,25 cm) apresentaram menor média. O tratamento branco apresentou média 35 % maior que o tratamento azul/vermelho.

Tabela 5: Dados morfométricos de plantas de *Gomesa flexuosa* no 90º dia de cultivo *in vitro* e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

	Massa Fresca (g)		Massa Seca (g)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatização	<i>In vitro</i>	Aclimatização
Azul	1,35 ± 0,23 a	1,65 ± 0,55 a	0,18 ± 0,01 a	0,20 ± 0,08 a
Vermelho	1,83 ± 0,52 a	1,45 ± 0,21 a	0,23 ± 0,53 a	0,24 ± 0,06 a
Azul/Vermelho	1,95 ± 0,94 a	1,29 ± 0,56 a	0,17 ± 0,05 a	0,17 ± 0,05 a
Branco	1,84 ± 0,33 a	1,92 ± 0,25 a	0,18 ± 0,01 a	0,24 ± 0,06 a
CV (%)	32,83	26,91	19,95	31,49

	Número de Folhas		Altura (cm)	
	<i>In vitro</i> *	Aclimatização	<i>In vitro</i>	Aclimatização *
Azul	9,16 ± 1,61 b	9,16 ± 0,76 a	9,5 ± 1,09 a	10,25 ± 0,00 a
Vermelho	12,66 ± 1,75 a	8,50 ± 0,87 a	8,5 ± 1,52 a	10,16 ± 0,52 a
Azul/Vermelho	9,83 ± 0,76 ab	6,83 ± 0,29 a	9,5 ± 0,90 a	8,25 ± 0,75 b
Branco	10,83 ± 0,76 ab	9,00 ± 2,29 a	10,66 ± 0,94 a	11,22 ± 0,63 a
CV (%)	12,3	15,41	11,96	5,54

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. * significativo a 5% pelo teste t-student.

É importante destacar que aos 45 dias de aclimatização as plantas de *Gomesa flexuosa* apresentaram 100% de sobrevivência. As plantas ao final desse período estavam com aparência saudável, com pseudobulbos desenvolvidos e entumecidos e apresentavam novas raízes e folhas (Figura 8).

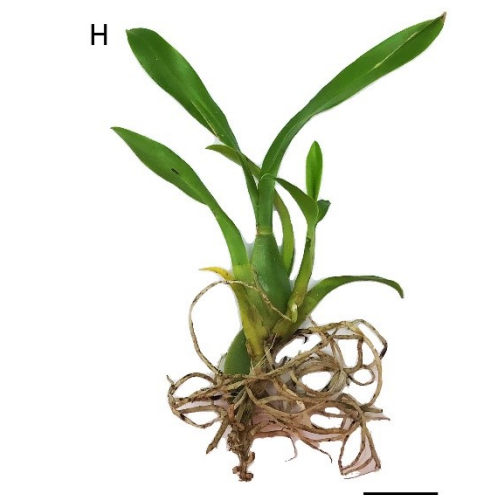
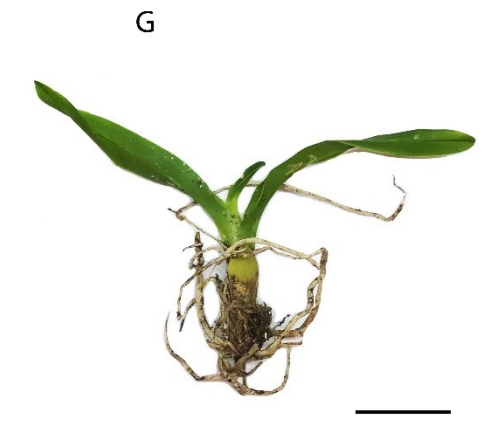
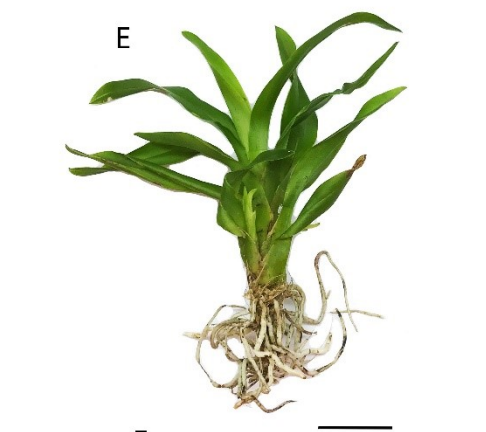


Figura 8: Plantas de *Gomesa flexuosa* no 90º dia de cultivo *in vitro* (A – Tratamento LED Azul, B – Tratamento LED Vermelho, C – Tratamento LED Luz Azul/Vermelho, D – Tratamento LED Branco) e no 45º dia de aclimatização (E – Tratamento LED Azul, F – Tratamento LED Vermelho, G – Tratamento LED Azul/Vermelho, H – Tratamento LED Branco). Barras: 2cm.

5.3.2 Parâmetros Bioquímicos

Quanto aos parâmetros bioquímicos para *Gomesa flexuosa* no 90º dia de cultivo *in vitro*, somente a variável clorofilas totais apresentou diferença estatística significativa apenas entre o tratamento vermelho e azul/vermelho (Tabela 6). Para essa variável plantas sob influência do tratamento vermelho apresentaram maior média (1,78 mg.g⁻¹ MF) mas não diferiram estatisticamente das submetidas aos tratamentos azul (1,12 mg.g⁻¹ MF) e branco (1,51 mg.g⁻¹ MF). Sob o tratamento azul/vermelho, as plantas apresentaram menor média (0,88 mg.g⁻¹ MF), mas também não se diferem dos tratamentos azul (1,12 mg.g⁻¹ MF) e branco (1,51 mg.g⁻¹ MF). O valor médio de plantas submetidas ao tratamento vermelho é 100% maior que as plantas submetidas ao tratamento azul/vermelho.

Para os parâmetros ao final do 45º dia de aclimatização, as variáveis clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais apresentaram diferença estatística significativa. Quanto a variável clorofila *a*, houve diferença significativa entre o tratamento vermelho (1,25 mg.g⁻¹ MF) e o azul/vermelho (0,86 mg.g⁻¹ MF). As plantas sob tratamento vermelho (1,25 mg.g⁻¹ MF) apresentaram a maior média, mas não diferiram estatisticamente dos tratamentos azul (1,02 mg.g⁻¹ MF) e branco (1,05 mg.g⁻¹ MF). As plantas sob tratamento azul/vermelho (0,86 mg.g⁻¹ MF) apresentaram menor média mas também não diferiram estatisticamente dos tratamentos azul (1,02 mg.g⁻¹ MF) e branco (1,05 mg.g⁻¹ MF).

Para clorofilas totais, plantas submetidas ao tratamento vermelho (1,43 mg.g⁻¹ MF), apresentaram a maior média mas não diferiram estatisticamente dos tratamentos azul (1,21 mg.g⁻¹ MF) e branco (1,23 mg.g⁻¹ MF). O tratamento azul/vermelho (1,01 mg.g⁻¹ MF) apresenta menor média (Tabela 6).

Para a variável clorofila *b* as plantas do tratamento azul (0,18 mg.g⁻¹ MF) apresentaram a maior média diferindo significativamente do azul/vermelho (0,13 mg.g⁻¹ MF), sendo considerada a menor média, mas mas ambos os tratamentos não diferem estatisticamente dos tratamentos vermelho (0,17 mg.g⁻¹ mf) e branco (0,16 mg.g⁻¹ mf).

Pode-se inferir que para *Gomesa flexuosa*, ao final do 45º dia de aclimatização, que os tratamentos vermelho, azul e branco foram responsáveis por apresentar plantas com as maiores médias para clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais.

Tabela 6: Dados bioquímicos de plantas de *Gomesa flexuosa* no 90º dia de cultivo *in vitro* e após o período de 45 dias de aclimatização, submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>	
	(mg.g ⁻¹ MF)		(mg.g ⁻¹ MF)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatização *	<i>In vitro</i>	Aclimatização *
Azul	1,02 ± 0,19 a	1,02 ± 0,10 ab	0,09 ± 0,05 a	0,18 ± 0,01 a
Vermelho	1,71 ± 0,34 a	1,25 ± 0,10 a	0,11 ± 0,04 a	0,17 ± 0,01 ab
Azul/Vermelho	0,74 ± 0,16 a	0,86 ± 0,09 b	0,13 ± 0,03 a	0,13 ± 0,01 b
Branco	1,38 ± 0,63 a	1,05 ± 0,14 ab	0,23 ± 0,12 a	0,16 ± 0,03 ab
CV(%)	31,14	10,56	52,19	12,13

	Clorofilas Totais		Razão Clorofila <i>a/b</i>	
	(mg.g ⁻¹ MF)		(mg.g ⁻¹ MF)	
	<i>In vitro</i> *	Aclimatização *	<i>In vitro</i>	Aclimatização
Azul	1,12 ± 0,25 ab	1,21 ± 0,09 ab	12,15 ± 3,50 a	5,73 ± 0,33 a
Vermelho	1,78 ± 0,25 a	1,43 ± 0,11 a	12,26 ± 5,57 a	6,96 ± 0,72 a
Azul/Vermelho	0,88 ± 0,13 b	1,01 ± 0,11 b	6,68 ± 1,76 a	6,02 ± 0,85 a
Branco	1,51 ± 0,48 ab	1,23 ± 0,18 ab	6,43 ± 7,67 a	5,96 ± 0,73 a
CV(%)	23,05	10,49	50,57	11,19

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. * significativo a 5% pelo teste t-student.

5.3.3 Parâmetros Fisiológicos

5.3.3.1 Fotossíntese e parâmetros relacionados

Quanto aos dados relacionados às trocas gasosas para plantas de *Gomesa flexuosa*, não houve diferença estatística para as duas fases, do cultivo *in vitro* e aclimatização, avaliadas (Tabela 7). Entretanto, pode-se perceber uma redução dos valores de taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E) no 45º dia de

aclimatização. Quanto à variável carbono interno (Ci), houve um aumento considerável no 45º dia de aclimatização, quando comparado com os valores no 90º dia de cultivo *in vitro*.

Tabela 7: Dados fisiológicos relativos a trocas gasosas no 90º dia de cultivo *in vitro* e após o período de 45 dias de aclimatização de plantas de *Gomesa flexuosa* submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs. A – taxa de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol de CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), g_s – condutância estomática ($\text{mol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), Ci – concentração interna de carbono ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) e E – transpiração ($\text{mmol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$).

	A ($\mu\text{mol de CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)		g_s ($\text{mol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatização	<i>In vitro</i>	Aclimatização
Azul	2,15 ± 0,23 a	1,34 ± 0,21 a	0,019 ± 0,001 a	- 0,00257 ± 0,002593 a
Vermelho	2,15 ± 0,05 a	1,21 ± 0,23 a	0,016 ± 0,001 a	- 0,00206 ± 0,003913 a
Azul/Vermelho	1,95 ± 0,21 a	1,36 ± 0,58 a	0,022 ± 0,003 a	- 0,00157 ± 0,003868 a
Branco	2,11 ± 0,43 a	1,06 ± 0,21 a	0,019 ± 0,001 a	- 0,00242 ± 0,001836 a
CV (%)	12,86	27,78	22,97	.

	Ci ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)		E ($\text{mmol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatização	<i>In vitro</i>	Aclimatização
Azul	149,06 ± 47,31 a	812,41 ± 66,84 a	0,29 ± 0,037 a	- 0,037 ± 0,037 a
Vermelho	150,10 ± 12,94 a	865,71 ± 63,44 a	0,25 ± 0,038 a	- 0,029 ± 0,055 a
Azul/Vermelho	175,72 ± 60,80 a	724,6 ± 119,83 a	0,29 ± 0,048 a	- 0,022 ± 0,057 a
Branco	199,56 ± 41,31 a	843,21 ± 138,91 a	0,26 ± 0,025 a	- 0,034 ± 0,026 a
CV (%)	26,2	12,65	13,86	.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. * significativo a 5% pelo teste t-student.

5.3.3.2 Parâmetros relacionados à Fluorescência da Clorofila *a* do Fotossistema II

Para os dados relativos à fluorescência basal (F_0) de plantas de *Gomesa flexuosa*, foi possível ajustar regressões para todos os tratamentos (Figura 9). Os valores de F_0 para o tratamento azul apresentaram uma regressão linear, enquanto para os tratamentos vermelho, azul/vermelho, e branco, regressão quadrática apresentou melhor ajuste.

Ao analisar a tendência dos dados, percebe-se decréscimo de F_0 para todos os tratamentos ao longo do período 45 dias de aclimatização analisado, até o ponto mínimo das

curvas. Para o tratamento vermelho, o ponto mínimo se apresenta do dia 30, com valor de F_o de 522 u.a. No tratamento azul/vermelho, o ponto mínimo é no dia 35 com um F_o de 520 u.a e para o tratamento branco no dia 31 com F_o de 489 u.a. A partir desses pontos há uma tendência de aumentos dos valores médios de F_o para a espécie.

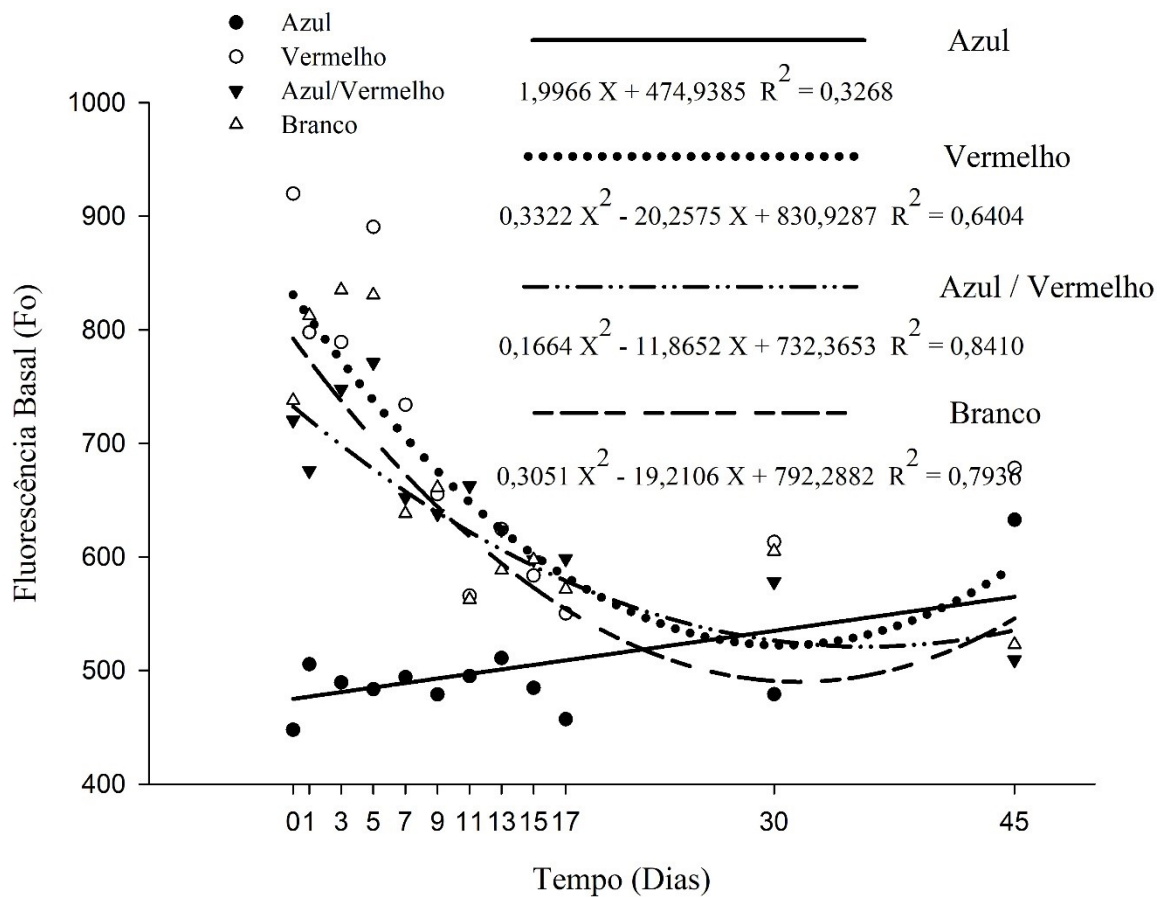


Figura 9: Dinâmica da fluorescência basal (F_o) – unidades arbitrárias – de plantas de *Gomesa flexuosa* durante o período de aclimatização *ex vitro* sob luz natural de plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

Com relação aos dados de fluorescência máxima (F_m), foi possível ajustar equações que representam o comportamento das plantas da espécie quando submetidas aos tratamentos vermelho e azul/vermelho (Figura 10). Para o tratamento vermelho foi possível ajustar uma equação linear. Para o tratamento azul/vermelho ajustou-se uma equação quadrática.

Ao comparar os valores de F_m ao final do 90º dia de cultivo *in vitro* com aqueles obtidos no 45º dia de aclimatização foi possível perceber que todos os tratamentos passaram

por aumento de valores de F_m . O tratamento azul tem como valor no 90° dia de cultivo *in vitro* 2000 u.a. de F_m e ao final do período de aclimatização alcança o valor de 2450 u.a. O tratamento vermelho, no primeiro ponto de análise, inicia com o valor de 1900 u.a. de F_m e ao final do período de aclimatização alcança 2300 u.a. O tratamento azul/vermelho parte do valor de 1950 u.a de F_m e no 45° dia, o valor foi de 2400 u.a. e, por fim, o tratamento branco parte do valor de 2300 u.a e alcança ao final do período de aclimatização o valor de 2450 u.a. de F_m (Figura 10). No entanto, quanto ao tratamento vermelho, as plantas submetidas a esse comprimento de luz sempre apresentaram valores menores que os demais tratamentos durante todo o período de aclimatização avaliado.

Ao final dos 45 dias de aclimatização nota-se que plantas de todos os tratamentos, com exceção do vermelho, apresentaram valores que se encontram próximos a um mesmo ponto em comum do gráfico, mostrando que, ao longo do período analisado os valores de F_m se aproximaram.

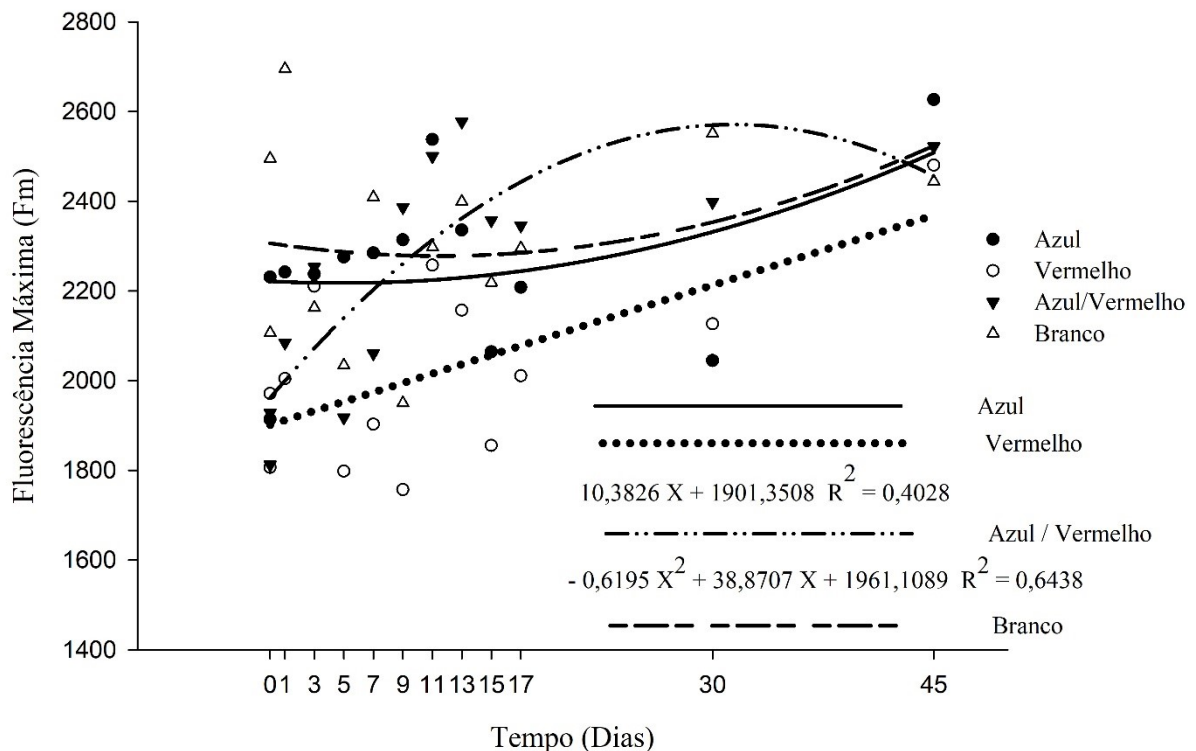


Figura 10: Dinâmica da fluorescência máxima (F_m) – unidades arbitrárias – de plantas de *Gomesa flexuosa* durante o período de aclimatização *ex vitro* sob luz natural de plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

Quanto aos valores de rendimento quântico máximo (F_v/F_m), foi possível ajustar regressões que expressam o comportamento das plantas, para todos os tratamentos (Figura 11). Para os tratamentos vermelho, azul/vermelho e branco, a equação ajustada é quadrática. Por sua vez, para o tratamento azul, os dados são representados por uma equação linear.

Observa-se que plantas submetidas ao tratamento azul sempre mostram valores de F_v/F_m elevados ao longo do período de aclimatização avaliado (Figura 11). Além disso, percebe-se que no ponto inicial das curvas (Figura 11 – Dia 0), os tratamentos apresentam valores consideravelmente diferentes, mas ao final do 45º dia de aclimatização, todos encontram-se no intervalo de 0,75 a 0,80. O tratamento azul tem 0,77 como valor inicial de F_v/F_m , que corresponde a primeira coleta de dados e esse valor cresce ao final do experimento para 0,80. O tratamento vermelho apresenta inicialmente 0,56 de F_v/F_m alcançando no 45º dia de aclimatização o valor de 0,77. O tratamento azul/vermelho apresenta 0,62 de valor inicial e o tratamento branco apresenta 0,67 e como valor final os dois tratamentos alcançam o valor de 0,77 de F_v/F_m (Figura 11).

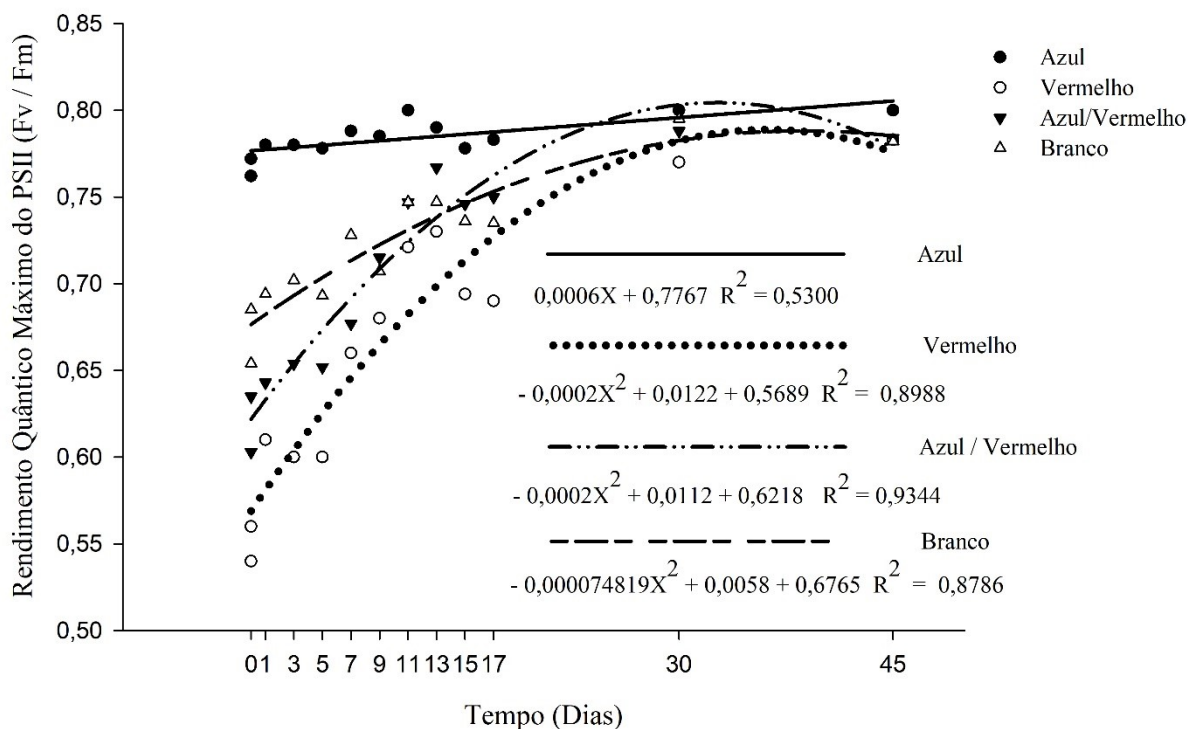


Figura 11: Dinâmica do rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de plantas de *Gomesa flexuosa* durante o período de aclimatização *ex vitro* sob luz natural de plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

Observa-se que plantas de *Gomesa flexuosa* estavam sob o efeito de variação da umidade relativa e uma variação mais sutil da temperatura ao longo do período de aclimatização avaliado (Figura 12). A temperatura mínima atingiu 17°C e a máxima 24°C. Em relação à umidade relativa do ar ela variou entre 68% e 83%. Detaca-se que o dia 0 se refere à umidade e à temperatura dentro da sala de crescimento onde estavam localizados os frascos com as plantas *in vitro*. O dia 1 se refere ao primeiro dia em que as plantas foram submetidas ao ambiente externo ao cultivo *in vitro*, estando então sujeitas as variações climáticas. Com isso, pode-se afirmar que as plantas estiveram sujeitas a variações ambientais durante o período de 45 dias aclimatização ao qual foram submetidas.

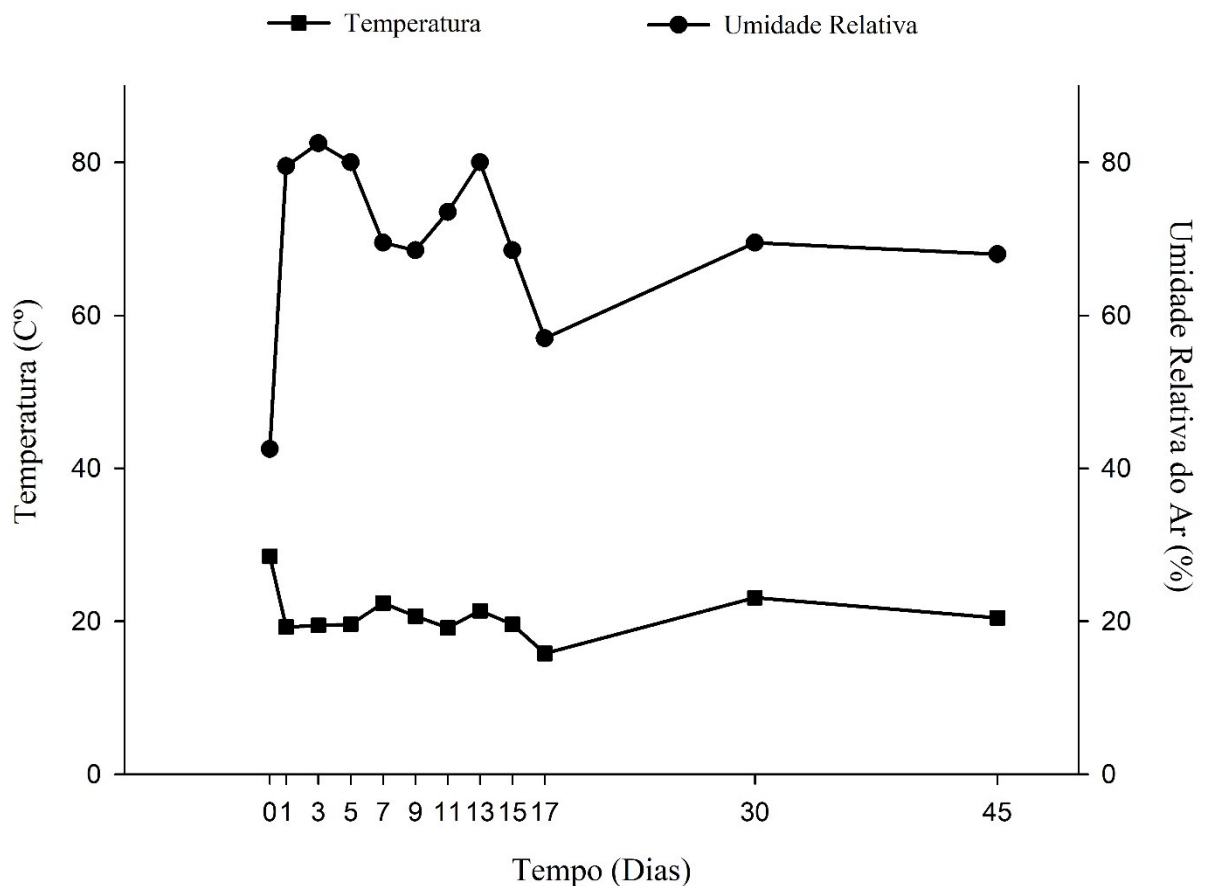


Figura 12: Temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) a que estavam submetidas plantas de *Gomesa flexuosa* no 90º dia de cultivo *in vitro* (dia 0 - umidade relativa do ar e a temperatura dentro da sala de crescimento onde estavam localizados os frascos com as plantas *in vitro*) e após o período de 45 dias de aclimatização (dia 1 ao dia 45), submetidas a diferentes qualidades espectrais de lâmpadas LEDs.

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Parâmetros morfológicos

Quanto aos parâmetros morfológicos, houve muita sobreposição de médias, o que torna difícil eleger um tratamento destaque. Observou-se diferença estatística entre o vermelho e o azul para número de folhas no 90º dia de cultivo *in vitro*, entretanto nenhum desses dois tratamentos se diferiu dos tratamentos azul/vermelho e branco (Tabela 5). A luz azul, a luz vermelha e a combinação entre esses dois comprimentos de onda impactam as plantas. A luz azul e a luz vermelha influenciam no crescimento das plantas, pois são as principais fontes de energia para assimilação fotossintética de CO₂, e os espectros de ação têm ação máxima nesses comprimentos de onda (Kasajima et al., 2008).

Para a altura no 45º dia de aclimatização somente o tratamento azul/vermelho foi diferente estatisticamente dos demais (Tabela 5), apresentando a menor média (8,25 cm).

Quanto aos efeitos da combinação dos comprimentos de onda azul/vermelho, alguns autores, afirmam que a combinação desses espectros luminosos induz nas plantas maior número de folhas, maior massa seca e maiores teores de clorofila do que quando se usam esses espectros separadamente (Naznin *et al.*, 2019; Chung *et al.*, 2010). Além disso, a combinação de luz vermelha e azul pode aumentar o rendimento das plantas quando comparado a tratamentos monocromáticos (Olle & Virsile, 2013). Isso por que provavelmente a combinação das luzes azul e vermelha excita de maneira mais eficaz fotorreceptores (Dou *et al.*, 2017; Sabzalian *et al.*, 2014), aumentando a fotossíntese e o crescimento das plantas (Sabzalian *et al.*, 2014; Spalholz *et al.*, 2020). No entanto, esse comportamento não foi percebido para a espécie de orquídea analisada.

5.4.2 Parâmetros bioquímicos

Para *Gomesa flexuosa* no 90º dia de cultivo *in vitro*, somente a variável clorofilas totais apresentou diferença estatística significativa apenas entre o tratamento vermelho (1,78 mg.g⁻¹ MF) e azul/vermelho (0,88 mg.g⁻¹ MF) (Tabela 6).

Pode-se inferir que para *Gomesa flexuosa*, ao final do 45º dia de aclimatização, que os tratamentos vermelho, azul e branco foram responsáveis por apresentar plantas com as maiores médias para clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais (Tabela 6).

Quando se analisa os resultados relacionados aos parâmetros bioquímicos, não é possível afirmar um tratamento destaque. Houve intensa sobreposição de médias entre os parâmetros analisados o que torna difícil a interpretação.

Conforme relatado por Botterweg-Paredes *et al.* (2020), a qualidade da luz tem efeitos importantes no crescimento e desenvolvimento da planta. A luz vermelha pode também afetar o número de folhas e o conteúdo de clorofila como estudado por Hamdani *et al.*, (2019) em arroz (*Oryza sativa* cv. XS134) e Su *et al.*, (2014) em pepino (*Cucumis sativus* L. cv. Jinchun No. 4). Esse comprimento de onda foi relatado como responsável por promover a formação de aparato fotossintético, a fotossíntese e o crescimento vegetativo, aumentando o conteúdo total de clorofila nas folhas, além de induzir a abertura estomática (Wang *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2019; Bondada & Syvertsen, 2003; Dou *et al.*, 2017). Quanto a luz azul ela desempenha papel importante na síntese de clorofila, fotomorfogênese e regulação da síntese de antocianina e pode efetivamente melhorar o alto adaptabilidade de plantas à luz (Walters, 2004; Li e Kubota, 2009).

As luzes vermelha e azul monocromáticas são as principais responsáveis por influenciar a fotossíntese e induzir a planta a produzir e acumular clorofilas (Saebo *et al.*, 1995; Mccree, 1972). Yang *et al.* (2018), estudando plantas de tomateiro cultivadas sob luzes vermelhas e azul/vermelha observaram maiores conteúdos de clorofila *a* e *b* e carotenoides quando comparado com outros comprimentos de luzes.

5.4.3 Parâmetros fisiológicos

Os valores da taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E) diminuíram ao final dos 45 dias da etapa de aclimatização, no entanto os valores da variável carbono interno (C_i) aumentaram, quando comparado com os valores ao final da fase *in vitro* (Tabela 7). Qualidade e intensidade de luz influenciam de forma direta a abertura estomática e, conseqüentemente, a taxa de CO_2 na cavidade estomática durante a fotossíntese (Kang *et al.*, 2016). Isso é um forte indicativo de que o metabolismo CAM da espécie começou a funcionar apenas depois que as plantas saíram da etapa *in vitro*.

Plantas com metabolismo CAM possuem uma característica marcante que é a separação de duas reações de carboxilação, facilitada pelo padrão invertido de movimento

estomático quando comparado à fotossíntese C3 e C4, com estômatos abrindo durante a noite e fechando durante o dia em plantas CAM (Borland *et al.*, 2014).

Plantas submetidas ao ambiente *in vitro* com frequência apresentam baixa taxa de fotossíntese e autotrofia incompleta (Faria *et al.*, 2004b). A capacidade de uso da água, de respostas a estresses e de realização de fotossíntese, durante e após o cultivo *in vitro* determina o desempenho final das mudas. Entretanto, é importante salientar que as plantas de *Gomesa flexuosa* apresentam metabolismo CAM e como as medições dos parâmetros fisiológicos foram realizadas durante a manhã era esperado que as taxas de fotossíntese, transpiração e condutância estomática encontradas fossem mais baixas. Em plantas CAM há uma flutuação diurna de ácidos orgânicos devido à descarboxilação como um mecanismo de concentração de CO₂, dentro da folha durante o dia. A condutância estomática é reduzida nesse período, suprimindo assim a fotorrespiração e mantendo a fixação fotossintética de carbono (Osmond, 1978; Griffiths, 1988 e Silvera *et al.*, 2010). A redução da condutância estomática (g_s) a qual ocorreu durante o dia para a espécie de orquídea epífita *Gomesa flexuosa*, pode ser percebida neste trabalho (Tabela 7).

Quanto aos valores de F_v/F_m o tratamento com luz LED azul teve destaque para *Gomesa flexuosa*, apresentando durante todo o período de aclimatização avaliado os valores mais altos de F_v/F_m (Figura 11). A luz azul é responsável por aumentar o conteúdo de clorofila e a proporção de clorofila *a/b*, promover abertura estomática, controlar a integridade da proteína do cloroplasto e melhorar F_v/F_m (Huché-Thélier *et al.*, 2016).

Quanto ao comportamento da fluorescência basal (F_o) com exceção do tratamento azul, todos os demais tratamentos apresentaram médias elevadas no início da etapa e aclimatização, com posterior redução (Figura 9). F_o representa a emissão de fluorescência pela molécula de clorofila *a* quando ela se encontra em estado de excitação anterior à dissipação da energia para os centros de reação do PSII, em que todos os aceptores de elétrons estão em estado oxidado, indicando iminência à ativação das reações fotoquímicas (Krause & Weiss, 1991; Tanyolac *et al.*, 2007).

Quando há aumento em F_o , como percebido para plantas de *Gomesa flexuosa* no início da etapa de aclimatização (Figura 9 - Dia 0), isso é um forte indício de destruição do centro de reação do PSII ou diminuição na capacidade de transferência da energia de excitação da antena do sistema coletor de luz para o centro de reação do PSII (Baker & Rosenqvist, 2004). A alteração

nos valores F_o é causada por estresses ambientais, como os diferentes espectros de luzes LEDs utilizados nesse trabalho por exemplo, que causam mudanças estruturais nos pigmentos fotossintéticos do PSII (Maxwell & Johnson, 2000).

A fluorescência máxima é quando a fluorescência atinge sua capacidade máxima, denotando uma condição totalmente reduzida pelos elétrons transferidos a partir do PSII (Baker & Rosenqvist, 2004). F_m apresentou comportamento oposto ao do F_o , no início do processo de aclimatização com valores baixos e ao final valores elevados em todos os tratamentos (Figura 10). Para F_m , o tratamento vermelho interferiu negativamente, pois plantas submetidas a esse tratamento apresentaram desempenho inferior quando comparado aos demais tratamentos. Incrementos nos valores de F_o associados a reduções nos valores de F_m podem ser interpretados como uma indicação do dano no complexo de coleta de luz de PSII (Fernandez *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2010).

Como observado neste trabalho, a relação F_v/F_m aumentou ao longo do período de aclimatização avaliado. No 90º dia de cultivo *in vitro* foram observados os menores valores, 0,55 de F_v/F_m , sugerindo fotoinibição. Os maiores valores de F_v/F_m foram de 0,80, ao final dos 45 dias de aclimatização (Figura 11). Entretanto, os menores valores encontrados neste trabalho não são considerados drásticos, já que em casos extremos de fotoinibição, o valor de F_v/F_m aproxima-se de zero (Björkman & Demming, 1987), o que sugere uma fotoinibição mais branda durante o período *in vitro*, em que as plantas estiveram submetidas aos estresses luminosos.

A relação F_v/F_m é uma medida que indica a eficiência fotoquímica potencial do fotossistema II, também chamada de rendimento quântico máximo do PSII. F_v/F_m reflete o efeito máximo da energia de excitação capturada por centros de reação abertos do PSII (Maxwell & Johnson, 2000). Essa relação é dependente da eficiência na captura e transferência de energia de excitação até o centro de reação. Em situações normais, não estressantes às plantas, a relação F_v/F_m , para a maioria das espécies, têm um valor aproximado de 0,83 (Bjorkman & Demming, 1987). Com o passar do período de aclimatização as plantas aumentam seus valores de F_v/F_m para todos os tratamentos, sendo esse um possível indício de que elas se recuperam dos estresses a que foram submetidas.

Quando a planta é exposta a uma iluminação prolongada sob luz vermelha pode ser que resulte na chamada “síndrome da luz vermelha”, a qual se caracteriza pela baixa

capacidade de fotossíntese, baixos valores de F_v/F_m e crescimento prejudicado (Miao *et al.*, 2019). Em plantas cultivadas sob luz vermelha de longa duração, observa-se geralmente uma diminuição na eficiência do PSII e na taxa de transporte de elétrons (Landi *et al.*, 2019). No presente estudo, os dados de F_v/F_m são os que demonstram essa provável síndrome da luz vermelha. Não há consenso sobre os efeitos da luz vermelha de longo período relacionada a esse parâmetro. Em alguns casos permaneceram constantes (Hamdani *et al.*, 2019), mas diminuíram em outros (Trouwborst *et al.*, 2016; Hogewoning *et al.*, 2010). A combinação de luz azul/vermelha nas plantas, quando se aumenta a proporção de luz azul sobre a vermelha, são revertidos parcialmente os efeitos negativos induzidos pela luz vermelha (Hogewoning *et al.*, 2010). A luz azul aumenta a capacidade do aparato fotossintético de se recuperar da “síndrome da luz vermelha”. Isso explica, por que a luz azul monocromática geralmente tem efeitos mais positivos do que a luz vermelha (Landi *et al.*, 2019).

A plasticidade é definida como a capacidade de um organismo de ajustar seu desempenho, alterando sua morfologia e/ou fisiologia em resposta a condições ambientais variáveis (Sultan, 2001; Navas & Garnier, 2002; Pigliucci, 2005). A plasticidade fisiológica está associada à capacidade de colonizar e crescer em ambientes com altas intensidades de luz (Montgomery & Chazdon, 2002; Niinemets & Valladares, 2004). No caso de *Gomesa flexuosa*, o parâmetro fisiológico que mais demonstra a plasticidade é o F_v/F_m (Figura 11).

As plantas de *Gomesa flexuosa*, apresentaram 100% de sobrevivência após o período de 45 dias de aclimatização. Um fato que pode estar relacionado a isso é o tamanho dessas plantas quando retiradas dos frascos, no 90º dia de cultivo *in vitro*, além das plantas apresentarem um sistema radicular bem desenvolvido *in vitro* (Figura 8). Segundo Nowak e Pruski (2004), as raízes *in vitro* mantêm sua função e crescimento durante a aclimatização. O enraizamento *in vitro* é um pré-requisito para adaptação das mudas ao ambiente *ex vitro* (Gantait *et al.*, 2009). Portanto, o fato de as plantas utilizadas terem um sistema radicular forte e robusto é um dos fatores que ajudou a garantir plena sobrevivência. As plantas apresentavam ao final do período de aclimatização avaliado, limbo foliar intacto, sem manchas cloróticas, raízes bem formadas e presença de novas raízes (Figura 8).

5.5 CONCLUSÃO

Considerando o conjunto de características analisadas nesse trabalho para *Gomesa flexuosa*, não houve um tratamento destaque para os parâmetros morfométricos e bioquímicos. Entretanto lâmpadas LEDs azuis destacam-se quanto à fluorescência da clorofila *a* pois plantas submetidas a elas apresentaram altos valores de F_v/F_m (0,79), enquanto LEDs vermelhos apresentaram valores mais baixos, durante os 45 dias de aclimatização, provavelmente devido a “síndrome da luz vermelha”.

Pode-se dizer, após a realização desse trabalho, que *Gomesa flexuosa* é uma espécie de orquídea que apresentou plasticidade, possuindo forte capacidade de adaptação e recuperação frente as condições estressantes sob às quais foi submetida. Ao final do experimento, obteve-se 100% de sobrevivência das plantas da espécie que apresentavam adequado desenvolvimento de folhas e raízes, independente tipo de lâmpada LED utilizado para a iluminação. Este estudo contribui para compressão do metabolismo de uma orquídea brasileira e ajudar a melhorar o processo de cultivo da espécie.

5.6 REFERÊNCIAS

BAKER, N. R.; ROSENQVST, E. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1607-1621, 2004.

BATISTA, D.S.; CASTRO, K.M.; SILVA, A.R.; TEIXEIRA, M.L.; SALES, T.A.; SOARES, L.I.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; OTONI, W.C. Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 52, p. 276-282, 2016.

BJÖRKMAN, O.; DEMMING, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v. 170, p. 489-504, 1987.

BONDADA, B.R.; SYVERTSEN, J.P. Leaf chlorophyll, net gas exchange and chloroplast ultrastructure in citrus leaves of different nitrogen status. **Tree Physiology**, v. 23, p. 553- 559, 2003.

BORLAND, A; *et al.* Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 327-228, 2014.

BOTTERWEG-PAREDES, E.; BLAAKMEER, A.; HONG, S.Y.; SUN, B.; MINERI, L.; KRUSVEE, V.; XIE, Y.K.; STRAUB, D.; MENARD, D.; PESQUET, E.; WENKEL, S. Light affects tissue patterning of the hypocotyl in the shade-avoidance response. **Plos Genetics**, v. 16, n. 3, 2020.

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

CHUNG, J.P.; HUANG, C.Y.; DAI, T.E. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.124, n.4, p.511-516, 2010.

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

D'SOUZA, C.; YUK, H. G.; KHOO, G. H.; ZHOU, W. Application of light-emitting diodes in food production, postharvest preservation, and microbiological food safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 719-740, 2015.

FARIA, Aparecida Donisete de. Sistemática filogenética e delimitação dos gêneros da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae) endêmicos do Brasil: *Baptistonia*, *Gomesa*, *Ornithophora*, *Rodriguezia* e *Oncidium*. 123p. **Tese (doutorado)** - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2004a.

FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA, L.V.R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 780-783, 2004b.

FERNANDEZ, R. T.; PERRY, R. L.; FLORE, J. A. Drought response of young apple trees on three rootstocks II. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, and leaf abscisic acid. **Journal American Society Horticulture Science**, v.122, p.841-848, 1997.

FERREIRA, L.T.; SILVA, M.M.A.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 1, p. 211-221, 2017.

GANTAIT. S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S. P. K.; NANDY, S. Mass multiplication of *Vanilla planifolia* with pure genetic identity confirmed by ISSR. **Journal of Plant Developmental Biology**, v.3, n.1, p.18-23, 2009.

GOMIZ, N. E.; TORRETTA, J.P.; ALISCIONI, S.S. Comparative anatomy of elaiophores and oil secretion in the genus *Gomesa* (Orchidaceae) **Turkish Journal of Botany**, v. 37, p. 859-871, 2013.

GRIFFITHS H. Crassulacean acid metabolism: a re-appraisal of physiological plasticity in form and function. **Advances in Botanical Research**, v. 15, p. 43-92, 1988.

HAMDANI S.; KHAN N.; PERVEEN S.; QU M.; JIANG J., GOVINDJEE; ZHU X.G. Changes in the photosynthesis properties and photoprotection capacity in rice (*Oryza sativa*) grown under red, blue, or white light. **Photosynthesis Research**, v.139, p.107-121, 2019.

HANELT, D. Photosynthesis assessed by chlorophyll fluorescence. In: HÄDER D.P., Erzinger G.S. (ed) **Bioassays Advanced Methods and Applications**, p.169-198, 2018.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, J.R., F.T., GENEVE, R.L. **Plant Propagation – Principles and Practices**. ed. 8., 915p, 2011.

HASLAM, R.; BORLAND, A.; GRIFFITHS, H. Short-term plasticity of crassulacean acid metabolism expression in the epiphytic bromeliad *Tillandsia usneoides* L. **Functional Plant Biology**, v. 29, 749-756, 2002.

HOGEWONING S.W.; TROUWBORST G.; MALJAARS H.; POORTER H.; VAN IEPEREN W.; HARBINSON J. Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 3107-3117, 2010.

HOSSAIN, M.M. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances - an overview. **Fitoterapia**, v.82, p.102-140, 2011.

HUCHÉ-THÉLIER, L., CRESPEL, L., LE GOURRIEREC, J., MOREL, P., SAKR, S., & LEDUC, N. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations - perspectives for applications in horticulture. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 22-38, 2016.

JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HASHIDA, S., YOSHIHARA, T. Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce. **Hortscience**, v. 45, 1809-1814, 2010.

JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HAHIDA, S.; YOSHIHARA, T. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, p. 128-133, 2012.

KALAJI, H.M.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I.A. *et al.* Chlorophylla fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, p. 102, 2016.

KALAJI, H.M.; SCHANSKER, G.; LADLE, R.J.; GOLTSEV, V.; BOSA, K.; ALLAKHVERDIEV S.I. *et al.* Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis Research**, v. 122, p. 121-158, 2014.

KANG, W.H.; PARK, J.S.; PARK, K.S.; SON, J.E. Leaf photosynthetic rate, growth, and morphology of lettuce under different fractions of red, blue, and green light from light-emitting diodes (LEDs). **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v. 57, n. 6, p. 573-579, 2016.

KASAJIMA, S.; INOUE, N.; MAHMUD, R.; KATO, M. Developmental responses of wheat cv: norin 61 to fluence rate of green light. **Plant Production Science**, v.11, p. 76-81, 2008.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Annual Review of Plant Biology**, v.42, p.313-349, 1991.

LANDI M.; ZIVCAK M.; SYTAR O.; BRESTIC M.; ALLAKHVERDIEV S.I. Plasticity of photosynthetic processes and the accumulation of secondary metabolites in plants in response to monochromatic light environments: A review. **Biochimica and Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1861, n. 2, 131-148, 2019.

LI, G.; WAN, S.; ZHOU, J.; YANG, Z.; QIN, P. Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. **Industrial Crops and Products**, v.31, p.13-19, 2010.

LI, Q., KUBOTA, C. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 59-64, 2009.

MASSA, G.; GRAHAM, T.; HAIRE, T.; FLEMMING, C.; NEWSHAM, G.; WHEELER, R. Light-emitting diode light transmission through leaf tissue of seven different crops. **HortScience**, v. 50, p. 501-506, 2015.

MAXWELL, K.; BORLAND, A.M.; HASLAM, R.P.; HELLIKER, B.R.; ROBERTS, A.; GRIFFITHS, H. Modulation of activity during the diurnal phases of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. **Plant Physiology**, v. 121, p. 849-856, 1999.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.

MCCREE, K.J. Test of current definitions of photosynthetically active radiation against leaf photosynthesis data. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 10, p.443-453, 1972.

MENG, Q., KELLY, N. AND RUNKLE, E.S. Substituting Green or Red Radiation for Blue Radiation Induces Shade Avoidance and Promotes Growth in Lettuce and Kale. **Environmental and Experimental Botany**, 162, 383-391, 2019.

MIAO, Y.; CHEN, Q.; QU, M.; GAO, L.; HOU, L. Blue light alleviates 'red light syndrome' by regulating chloroplast ultrastructure, photosynthetic traits and nutrient accumulation in cucumber plants. **Scientia Horticulturae**, v. 257, p. 108680, 2019.

MISRA A.N.; MISRA M.; SINGH R. Chlorophyll fluorescence in plant biology. In: Misra A.N., ed. **Biophysics**. Rijeka: IntechOpen, p. 171-192, 2012.

MIYASHITA, K.; TANAKAMARU, S.; MAITANI, T.; KIMURA, K. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 205-214, 2005.

MONTGOMERY, R.A.; CHAZDON, R.L. Light gradient partitioning by tropical tree seedlings in the absence of canopy gaps. **Oecologia**, v. 131, p. 165-174, 2002.

MORROW, R.C. LED lighting in horticulture. **HortScience** 43, 1947-1950, 2008.

MUNEER S.; KIM E.; PARK J.; LEE J. Influence of Green, Red and Blue Light Emitting Diodes on Multiprotein Complex Proteins and Photosynthetic Activity under Different Light Intensities in Lettuce Leaves (*Lactuca sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 4657-4670, 2014.

NAVAS, M.L.; GARNIER, E. Plasticity of whole plant and leaf traits in *Rubia peregrina* in response to light, nutrient and water availability. **Acta Oecologica**, v. 23, 375-383, 2002.

NAZNIN, M.T.; LEFSRUD, M.; GRAVEL, V.; AZAD, M.O.K. Blue light added with red LEDs enhance growth characteristics, pigments content, and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment. **Plants Basel**, v. 8, p.93, 2019.

NEUBIG K.M.; WHITTEN W.M.; WILLIAMS N.H.; BLANCO M.A.; ENDARA L.; BURLEIGH J.G.; SILVEIRA K.; CUSHMAN J.C.; CHASE M.W. Generic circumscriptions of Oncidiinae (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood

analysis of combined DNA datasets. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 168, p. 117-146, 2012.

NIINEMETS, Ü.; VALLADARES, F. Photosynthetic acclimation to simultaneous and interacting environmental stresses along natural light gradients: Optimality and constraints. **Plant Biology**, v. 6, p. 254-268, 2004.

NOWAK, J.; PRUSKI, K. Priming tissue cultured propagules, in: Low cost options for tissue culture technology in developing countries. **Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint 632 FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture**, v. 633, p. 68-81, 2004.

OLLE M.; VIRSILE A. The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. **Agriculture and Food Science**, v. 22, p. 223–234, 2013.

OSMOND C.B. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 29, p. 379-414, 1978.

PALHARES NETO, L.; SOUZA, L.M.; MORAIS, M.B.; ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; ULISSES, C. Controlling hyperhydricity in micropropagated plants of *Lippia grata* Schauer (Verbenaceae), a native species of a dry seasonal tropical forest with pharmacological potential. **Brazilian Journal of Botany**, v. 1, p. 1-10, 2018.

PARRINE, D., WU, B.-S., MUHAMMAD, B., RIVERA, K., PAPPIN, D., ZHAO, X., LEFSRUD, M. Proteome modifications on tomato under extreme high light induced-stress. **Proteome Science**, v. 16, p. 20, 2018.

PEREIRA O.L.; KASUYA M.C.M.; ROLLEMBERG C.L.; BORGES A.C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizotonióides. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 29, p. 199-206, 2005.

PIGLIUCCI, M. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, p.481-486, 2005.

POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLEČEK, P.; HASEL, D.; PLZAKOVA, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex-vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 481-497, 1999.

RESENDE, C.F.; BIANCHETTI, R.E.; OLIVEIRA, M.A.; BRAGA, V.F.; PEIXOTO, P.H. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, na endemic species of Brazilian Campos Rupestres. **Revista Ciência Agronômica**, v.46, p. 582-589, 2015.

SABZALIAN, M.R.; HEYDARIZADEH, P.; ZAHEDI, M.; BORROOMAND, A.; AGHAROKH, M.; SAHBA, M. R.; SCHOEFS, B. High performance of vegetables, flowers, and medicinal plants in a red-blue LED incubator for indoor plant production. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, p. 879-886, 2014.

- SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, p. 177-185, 1995.
- SILVA, M.A.; OLIVEIRA, A.L.B.; OLIVEIRA-FILHO, R.A.; CAMARA, T.; WILLADINO, L.; GOUVEIA-NETO, A. The effect of spectral light quality on *in vitro* culture of sugarcane. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 38, p. 157-161, 2016.
- SILVERA, K.; NEUBIG, K.M.; WHITTEN, M.; WILLIAMS, N.H.; WINTER, K.; CUSHMAN, J.C. Evolution along the Crassulacean acid metabolism continuum. **Functional Plant Biology**, v. 37: p. 995-1010, 2010.
- SILVEIRA, K.; WINTER, K.; RODRIGUEZ, B.L.; ALBION, R.L.; CUSHMAN, J. Multiple isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase in the Orchidaceae (subtribe Oncidiinae): implications for the evolution of crassulacean acid metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p.3623-3636, 2014.
- SPALHOLZ, H.; PERKINS-VEAZIE, P.; HERNANDEZ, R. Impact of sun-simulated white light and varied blue:red spectrums on the growth, morphology, development, and phytochemical content of green-and red-leaf lettuce at different growth stages. **Scientia Horticulturae**, v. 264, 2020.
- STIRBET, A.; LAZÁR, D.; KROMDIJK, J. et al. Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? **Photosynthetica**, v. 56, p. 86-104, 2018.
- STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fuorescence and 820-nm refection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1797, p. 1313-1326, 2010.
- SU N.; WU Q.; SHEN Z.; XIA K.; CUI J. Effects of light quality on the chloroplastic ultrastructure and photosynthetic characteristics of cucumber seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 73, p. 227-235, 2014.
- SUASSUNA, J. F. et al. Eficiência fotoquímica e produtiva de frutos de meloeiro cultivado sob diferentes lâminas de irrigação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1251-1262, 2011.
- SULTAN, S.E. Phenotypic plasticity for fitness components in Polygonum species of contrasting ecological breadth. **Ecology**, v.82, p. 328-343, 2001.
- TANYOLAÇ, D.; EKMEKÇI, Y.; ÜNALAN, S. Changes in photochemical and anti-oxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. **Chemosphere**, v. 6, p. 89-98, 2007.

TRIVEDI, A.; SENGAR, R.S.; SINGH, R.; SINGH, B.; KUMAR, M.; SINGH, S.K. Effect of various light-emitting diodes on growth and photosynthetic pigments of banana (*Musa Acuminata*) Cv. Grande Naine in vitro plantlets. **Biotech Today**, v. 7, n.1, 58, 2017.

TROUWBORST G.; HOGEWONING S.W.; VAN KOOTEN O.; HARBINSON J.; VAN IEPEREN W. Plasticity of photosynthesis after the 'red light syndrome' in cucumber. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 75-82, 2016.

VALLADARES, F., NIINEMETS, Ü. Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, p.237-257, 2008.

VALLADARES, F.; PEARCY, R. The role of crown architecture for light harvesting and carbon gain in extreme light environments assessed with a realistic 3-D model. **Anales Jadin Botanico De Madrid**, v. 58, n. 1, p. 3-16, 2000.

VIEIRA, L.N.; FRAGA, H.P.F.; ANJOS, K.G.; PUTTKAMMER, C.C.; SCHERER, R.F.; SILVA, D.A.; GUERRA, M.P. Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' in vitro plantlets. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, p. 91-98, 2015.

WALTERS, R.G. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n.411, p. 435-447, 2004.

WANG, J.; LU, W.; TONG, Y.; YANG, Q. Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. **Frontiers of Plant Science**, v. 7, p. 250, 2016.

WU M.-C.; HOU C.-Y.; JIANG C.-M.; WANG U.-T.; WANG C.-U.; CHEN H.-H.; CHANG H.-M. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1753-1758, 2007.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 149-158, 2011.

YANG, X.Y.; XU, X.M.; CUI, J. Response of photosynthetic capacity of tomato leaves to different LED light wavelength. **Environmental and Experimental Botany**, v. 150, p. 161-171, 2018.

YEH, N., & CHUNG, J. P. High-brightness LEDs - energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 2175-2180, 2009.

ZHU, M.; GENG, S.; CHAKRAVORTY, D.; GUAN, Q.; CHEN, S.; ASSMANN, S.M. Metabolomics of red-light-induced stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*: Coupling with abscisic acid and jasmonic acid metabolism. **Plant Journal**, v. 101, n. 6, p. 1331-1348, 2019.

ZIV, M.; CHEN, J. The anatomy and morphology of tissue cultured plants, in: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (Eds), **Plant propagation by tissue culture**, v. 1, p. 465-477, 2008.

ZOBAYD, S.M.A.; AFREEN, F.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 40, p. 450-545, 2004.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Este estudo é de considerável relevância para área de cultivo *in vitro* e propagação de orquídeas. Com esse trabalho foi possível perceber que as orquídeas estudadas apresentaram alta plasticidade fisiológica, resistindo e adaptando-se principalmente a estresses causados por diferentes espectros luminosos emitidos por luzes LEDs. Todas os diferentes comprimentos de onda de lâmpadas LEDs testados foram capazes de alterar a fisiologia das plantas e causar efeitos diferentes e específicos para cada espécie.

Esse trabalho surge de um desejo de compreender melhor como as plantas respondem fisiologicamente e bioquimicamente às luzes LEDs, concluindo que essas luzes realmente podem ser utilizadas no cultivo *in vitro* de orquídeas podendo ser uma alternativa vantajosa para o cultivo dessas espécies. Além disso, o trabalho ajuda na melhor compreensão de orquídeas brasileiras, ajudando a aperfeiçoar os protocolos de propagação que podem agora contar com uma nova alternativa luminosa. De maneira geral, o uso de espectros luminosos pode ser uma proposta para aumentar a eficiência no desenvolvimento de orquídeas brasileiras, entretanto, são necessários estudos que possam aprofundar as respostas encontradas neste trabalho.

Todos esses fatos ajudam a corroborar a ideia de que é preciso compreender a fisiologia vegetal para conservar de maneira efetiva esses recursos tão preciosos e enigmáticos. Quanto aos próximos passos a serem trilhados, estão o estudo da influência de diferentes combinações de luzes azuis e vermelhas no cultivo *in vitro* de orquídeas brasileiras além de continuar estudando o comportamento fisiológico dessas plantas e suas respostas frente aos estresses abióticos permitindo com isso, expandir o conhecimento sobre como os espectros de luz influenciam no padrão de desenvolvimento de orquídeas, otimizando o cultivo *in vitro*, principalmente na etapa de aclimatização, a qual foi o foco desse trabalho.

7 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.D. Impact of light-emitting diodes (LEDs) and its potential on plant growth and development in controlled environment plant production system. **Current Biotechnology**, v.5, p.28-43, 2016.
- BANTIS, F.; SMIRNAKOU, S.; OUZOUNIS, T.; KOUKOUNARAS, A.; NTAGKAS, N.; RADOGLU, K. Current status and recent achievements in the field of horticulture with the use of light-emitting diodes (LEDs). **Scientia Horticulturae**, v. 235, p. 437-451, 2018.
- BELLO-BELLO, J.J.; PÉREZ-SATO, J.A.; CRUZ-CRUZ, C.A.; MARTÍNEZ-ESTRADA, E. Light-emitting diodes: progress in plant micropropagation. **InTech**, v. 6, p. 93, 2017.
- BIAN, Z.H.; YANG, Q.C.; LIU, W.K. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. **Journal of the Science of Food Agriculture** v. 95, p. 869-877, 2015.
- BOURGET, C.M. An Introduction to Light-emitting Diodes, **HortScience**, v.43, p. 1944-1946, 2008.
- CASTRO, F.A.; CAMPOSTRINI, E.; TORRES NETTO, A.T.; VIANA, L.H. Relationship between photochemical efficiency (JIP-Test Parameters) and portable chlorophyll meter readings in papaya plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.23, n.4, p. 295-304, 2011.
- CENTOFANTE A.R. Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. 259, 2020.
- CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDMANEE, C. Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. **Australian Journal of Crop Science**. v. 4, p. 750-756, 2010.
- CHUGH S; GUHA S.; RAO I.U. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 507-520, 2009.
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 145-150, 2005.
- D'SOUZA, C.; YUK, H. G.; KHOO, G. H.; ZHOU, W. Application of light-emitting diodes in food production, postharvest preservation, and microbiological food safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.14, p. 719-740, 2015.
- FARIA, A. D. Sistemática filogenética e delimitação dos gêneros da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae) endêmicos do Brasil: *Baptistonia*, *Gomesa*, *Ornithophora*, *Rodriguezella* e

Oncidium. 2004. 123p. **Tese de doutorado** - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.

FETENE, M.; LEE, H.S.J.; LÜTTGE, U. Photosynthetic acclimation in a terrestrial CAM bromeliad, *Bromelia humilis* Jacq. **New Phytologist**. v. 114, p. 399-406, 1990.

GOMIZ, N. E.; TORRETTA, J.P.; ALISCIONI, S.S. Comparative anatomy of elaiophores and oil secretion in the genus *Gomesa* (Orchidaceae) **Turkish Journal of Botany**, v. 37, p. 859-871, 2013.

GOVAERTS R.; BERNET P.; KRATOCHVIL K.; GERLACH G.; CARR G.; ALRICH P.; PRIDGEON A.M.; PFAHL J.; CAMPACCI M.A.; BAPTISTA D.H.; TIGGES H.; SHAW J.; CRIBB P.; GEORGE A.; KREUZ K.; WOOD J. C. **World Checklist of Orchidaceae**, 2020. Disponível em: <https://wmsp.science.kew.org/qsearch.do>. Acesso em : 01 jul. 2021.

HÁGSATER, E.; SOTO ARENAS, M.A. *Epidendrum*. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. (Eds.) **Genera Orchidacearum, Epidendroideae 4**. Oxford University, p. 236-251, 2005.

HANELT, D. Photosynthesis assessed by chlorophyll fluorescence. In: HÄDER D.P., Erzinger G.S. (ed) **Bioassays Advanced Methods and Applications**, p.169-198, 2018

HASLAM, R.; BORLAND, A.; GRIFFITHS, H. Short-term plasticity of crassulacean acid metabolism expression in the epiphytic bromeliad *Tillandsia usneoides* L. **Functional Plant Biology**. v. 29, p. 749-756, 2002.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Science. Horticulturae**. v. 108, p. 105-120, 2006.

HEW, C.S., YONG, J.W.H. The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry. **World Scientific Pub Co**. NJ, USA, 2004.

JOHKAN, M., SHOJI, K., GOTO, F., HAHIDA, S., YOSHIHARA, T. Effect of green light wavelength and intensity- on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, p. 128-133, 2012.

KALAJI, H.M.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I.A. *et al*. Chlorophylla fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, p. 102, 2016.

KALAJI, H.M.; SCHANSKER, G.; LADLE, R.J.; GOLTSEV, V.; BOSA, K.; ALLAKHVERDIEV S.I. *et al*. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis Research**, v. 122, p. 121-158, 2014.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 51, p. 49-56, 1997.

LI, H.; XU, Z.; TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.103, n.2, p.155-163, 2010.

- LIN, M. J.; HSU, B. D. Photosynthetic of *Phalaenopsis* in response to different light environments. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1259-1268, 2004.
- LÜTTGE, U. Carbon dioxide and water demand: crassulacean acid metabolism (CAM), a versatile ecological adaptation exemplifying the need for integration in ecophysiological work. **New Phytologist**, v.106, 593-629, 1987.
- MARRARA, M. *et al.* Florística da família Orchidaceae em fragmento florestal semidecidual da fazenda Montevideo, município de Araras, SP, Brasil. **Anais do 8º Congresso de Ecologia do Brasil**, v. 8, p.1-2, 2007.
- MARTINEAU, V., LEFSRUD, M., NAZNIN, M.T., KOPSELL, D.A. Comparison of lightemitting diode and high-pressure sodium light treatments for hydroponics growth of Boston lettuce. **HortScience**, v. 47, p. 477-482, 2012.
- MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.A.; DONATO, V.M.T.S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p.1319-1324, 2001.
- MASSA G.D.; KIM H.H.; WHEELER R.M.; MITCHELL C.A. Plant productivity in response to LED lighting. **Hortscience**, v. 43, p.1951-1956, 2008.
- MAXWELL, K.; BORLAND, A.M.; HASLAM, R.P.; HELLIKER, B.R.; ROBERTS, A.; GRIFFITHS, H. Modulation of activity during the diurnal phases of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. **Plant Physiology**, v. 121, p. 849-856, 1999.
- MENG, Q.; KELLY, N.; RUNKLE, E.S. Substituting green or far-red radiation for blue radiation induces shade avoidance and promotes growth in lettuce and kale. **Environmental and Experimental Botany**, v. 162, p. 383-391, 2019.
- MISRA, A. N; MISRA, M.; ANDSINGH, R. Chlorophyll fluorescence in plant biology. **Biophysics**, (Ed. Misra A N), cap. 7, p. 171-192, 2012.
- MIYASHITA, K.; TANAKAMARU, S.; MAITANI, T.; KIMURA, K. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. **Environmental and experimental botany**, v. 53, p. 205-214, 2005.
- MOREL, G.; WETMORE, R.M. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, Colombia, v. 38, p. 141-143, 1951.
- MUNEER S.; KIM E.; PARK J.; LEE J. Influence of Green, Red and Blue Light Emitting Diodes on Multiprotein Complex Proteins and Photosynthetic Activity under Different Light Intensities in Lettuce Leaves (*Lactuca sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 4657-4670, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v.15, p. 473-497, 1962.

- MURRAY, J.R.; HACKETT, W.P. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. **Plant Physiology**, v.97, n.1, p.343-351, 1991.
- NAYAK, N.R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S.P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium alaiifolium* (L.) Sw and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Science Horticulturae**, v. 94, p. 107-116, 2002.
- NEUBIG K.M.; WHITTEN W.M.; WILLIAMS N.H.; BLANCO M.A.; ENDARA L.; BURLEIGH J.G.; SILVEIRA K.; CUSHMAN J.C.; CHASE M.W. Generic recircumscriptions of Oncidiinae (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood analysis of combined DNA datasets. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 168, p. 117-146, 2012.
- ORQUÍDEAS e BROMÉLIAS. **354 - Orquídea: Epidendrum denticulatum**. 2020. Disponível em: <http://www.orquideasbromelias.com/2020/05/354-orquidea-epidendrum-denticulatum.html>. Acesso em: 10 jul. 2021.
- PARRINE, D.; WU, B.-S.; MUHAMMAD, B.; RIVERA, K.; PAPPIN, D.; ZHAO, X.; LEFSRUD, M. Proteome modifications on tomato under extreme high light induced-stress. **Proteome Science** v.16, n. 1, 1-15, 2018.
- PECANHA, A.L. Metabolismo fotossintético, crescimento e estado nutricional do mamoeiro (*Carica papaya* L.) em resposta a condutividade elétrica da solução de cultivo. **Tese de Doutorado** – (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 131p, 2010.
- PINHEIRO F.; COZZOLINO S.; DE BARROS F.; GOUVEIA T.M.Z.M.; SUZUKI R.M.; FAY M.F.; PALMA-SILVA C. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the Neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. **Evolution**, v. 67, p. 2024-2039, 2013.
- PINHEIRO, F.; BARROS F. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua separação. **Hoehnea**, v. 34, p. 563- 570, 2007.
- ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, v. 18, n. 8. p. 325-329, 2008.
- SANTOS, R. P.; CRUZ, A. C. F. D.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, v.55, n.4, p.356-364, 2008.
- SÃO LEÃO, L.C. Estudos reprodutivos em duas espécies simpátricas de *Epidendrum* L. (Epidendroideae – Orchidaceae) em vegetação de restinga. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, 2012.
- SHUKLA M.R.; SINGH A.S.; PIUNNO K.; SAXENA P.K.; JONES A.M.P. Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. **Plant Methods**, v.13, p.6-15, 2017.
- STATSOFT, INC. STATISTICA (data analysis software system), version 10. 2010. www.statsoft.com.

STIRBET, A., LAZÁR, D., KROMDIJK, J., ET AL. Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? **Photosynthetica**, v.56, p. 86-104, 2018.

STRASSER R.J.; TSIMILLI-MICHAEL M.; GIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm refection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1313-1326, 2010.

SILVA, M.M.A; *et al.* Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets *in vitro*. **SPIE BiOS, International Society for Optics and Photonics**, p.894, 2014.

SKILLMAN, J.B.; WINTER, K. High photosynthetic capacity in a shade-tolerant CAM plant. **Plant Physiology**. v.113, p. 441-450, 1997.

TORRES NETTO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J. G. DE; BRESSAN- SMITH, R. E. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll *a* fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v.104, p.199-209, 2005

TORRES NETTO, A., CAMPOSTRINI, E., OLIVEIRA, J.G., YAMANISHI, O.K. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 3, p. 203-210, 2002.

VALLADARES, F.; PEARCY, R. The role of crown architecture for light harvesting and carbon gain in extreme light environments assessed with a realistic 3-D model. **Anales Jadin Botánico De Madrid**, v. 58, n. 1, p. 3-16, 2000.

VARELLA, Luiz Filipe Klen; KLEIN, Jacques. **Orquídeas do Rio Grande do Sul: Coppinsia flexuosa (Lodd.) Campacci. 2020. Disponível em: http://www.orquideasgauchas.net/P_foto.php?id_foto=1284&nome=. Acesso em: 19 jul. 2021.**

WELLBURN, A.R. Determination of chlorophyll-a and chlorophyll-b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v.144, p.307-313, 1994.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 149-158, 2011.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs - energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, 2175-2180, 2009.

YEH N.; DING T.J.; YEH P. Light-emitting diodes' light qualities and their corresponding scientific applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 55-61, 2015.

ZHANG S.; YANG Y.; LI J.; QIN J.; ZHANG W.; HUANG W.; HU H. Physiological diversity of orchids. **Plant Diversity**, v. 40, p. 196-208, 2018.

ZOBAYD, S.M.A.; AFREEN, F.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 40, p. 450-545, 2004.

ZOTZ, G.; HIETZ, P. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 2067-2078, 2001.