

INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DO MEIO DE CULTURA NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *LAELIA GLORIOSA* (ORCHIDACEAE)

INFLUENCE OF CULTURE MEDIUM COMPONENTS ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *LAELIA GLORIOSA* (ORCHIDACEAE)

Suzana Stefanello¹, Cassia Regina Passold², Victoria Urtado de Lion³,
Ana Luiza Nunes de Souza da Silva⁴ e Roberta Paulert⁵

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de fertilizante comercial, do cultivo em sistema dupla-fase com citocinina, bem como de concentrações de sacarose no crescimento da orquídea *Laelia gloriosa*. Primeiramente testou-se o efeito da adição de fertilizante comercial ao meio de cultura basal MS ½. Foi analisado o efeito de concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP): 0, 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ em meio semissólido e meio líquido em dupla-fase. Por fim, avaliou-se a suplementação ou não do meio de cultura com carvão ativado e sacarose (15; 30; 45 e 60 g L⁻¹), seguida da aclimatização. As variáveis de crescimento analisadas foram: comprimento de parte aérea e do sistema radicular, número de folhas e brotos adventícios, biomassa fresca e a quantificação dos pigmentos fotossintéticos. Como resultados obtidos, a suplementação do meio com o fertilizante não incrementou o crescimento das plantas. O sistema dupla-fase foi superior ao semissólido para a formação de brotos adventícios quando suplementado com 1,5 ou 3 mg L⁻¹ de BAP. As variáveis de crescimento foram significativamente influenciadas pela sacarose, a formação do sistema radicular foi favorecida nas doses mais elevadas (45 e 60 g L⁻¹) enquanto o número de folhas foi superior na ausência ou nas menores concentrações do carboidrato. Maiores teores de clorofila *a* e *b* foram obtidos com o cultivo *in vitro* das plantas com 45 g L⁻¹ de sacarose. Em condição *ex vitro*, a maior taxa de sobrevivência e teor de clorofilas foi observado em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose garantindo maior percentual de sobrevivência das plantas.

Palavras-chave: Orquídeas; 6-Benzilaminopurina; Pigmentos fotossintéticos; Micropropagação.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of commercial fertilizer, dual-phase cultivation with cytokinin and sucrose concentrations on the growth of the orchid Laelia gloriosa. Firstly, the effect of adding commercial fertilizer to the MS ½ basal culture medium was tested. The effect of concentrations of 6-Benzylaminopurine (BAP) was also analyzed: 0, 1.5 and 3.0 mg L⁻¹ in semi-solid medium and liquid medium in two phases. Finally, whether or not the culture medium was supplemented with activated charcoal and sucrose (15; 30; 45 and 60 g L⁻¹) was evaluated, followed by acclimatization. The growth variables analyzed were: aerial part

1 Docente do Departamento de Biodiversidade, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. E-mail: suzanastefanello@yahoo.com.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7744-0192>

2 Bióloga pela Universidade Federal do Paraná. E-mail: cassiapassold@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-2727-1751>

3 Bióloga pela Universidade Federal do Paraná. E-mail: victoriau@prof.educacao.sp.gov.br. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-7622-4227>

4 Bióloga pela Universidade Federal do Paraná. E-mail: luizanunes1229@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-1316-0737>

5 Docente do Departamento de Ciências Agrônômicas, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. E-mail: roberta@ufpr.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4909-6018>

and root system length, number of leaves and adventitious shoots, fresh biomass and the quantification of photosynthetic pigments. The results showed that supplementing the medium with fertilizer did not increase plant growth. The two-phase system was superior to the semi-solid system for the formation of adventitious shoots when supplemented with 1.5 or 3 mg L⁻¹ of BAP. The growth variables were significantly influenced by sucrose, the formation of the root system was favored at the highest doses (45 and 60 g L⁻¹) while the number of leaves was higher in the absence or at the lowest concentrations of the carbohydrate. Higher levels of chlorophyll a and b were obtained when the plants were grown *in vitro* with 45 g L⁻¹ of sucrose. In *ex vitro* conditions, the highest survival rate and chlorophyll content was observed in a medium containing 30 g L⁻¹ sucrose, guaranteeing a higher percentage of survival for plants.

Keywords: Orchid; 6-Benzylaminopurine; Photosynthetic Pigments; Micropropagation.

INTRODUÇÃO

As orquídeas são plantas com elevado valor ornamental e de mercado (CARDOSO; ZANELLO; CHEN, 2020). A coleta indiscriminada e a redução gradual dos ambientes naturais cada vez mais impactados pelas atividades humanas, têm colocado em risco as populações naturais destas plantas (FAY, 2018) e influenciaram o desenvolvimento e implementação de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* (KUMAR *et al.*, 2024). Como importante ferramenta de propagação, inclui-se o cultivo e a preservação em condições *in vitro* (KUMAR *et al.*, 2024).

A propagação *in vitro* de plantas permite a obtenção de mudas uniformes, sadias e em grande escala, sendo estas condições ideais para atender ao mercado de plantas ornamentais cada vez mais exigente, além da produção de mudas para conservação e repovoamento dos habitats naturais. Por outro lado, quando obtidas da germinação direta, ao contrário dos clones obtidos por micropropagação a partir de partes vegetativas, as mudas são geneticamente heterogêneas e são maiores as chances de sobrevivência e cruzamento (ZENG *et al.*, 2012).

As diferentes espécies de orquídeas apresentam variações morfológicas e fisiológicas e por responderem de maneira diferente, as distintas condições de cultivo são necessárias (TIWARI *et al.*, 2024). O sucesso no cultivo *in vitro* depende de diversos fatores dentre os quais podemos citar a presença de células competentes, o balanço nutricional, o conteúdo genético, os fitohormônios endógenos e exógenos, dentre outros (PASTERNAK; STEINMACHER, 2024).

O meio de cultivo pode ser suplementado com substâncias reguladoras de crescimento e, frequentemente, as citocininas são empregadas para potencializar o crescimento e desenvolvimento das plantas. O efeito benéfico do BAP tem sido descrito para a regeneração de diversas orquídeas (ANJOS *et al.*, 2021). Da mesma forma, compostos orgânicos e fertilizantes comerciais também podem incrementar a germinação e o crescimento de orquídeas (CAVALCANTE; BORIN; MORAES, 2018; MERCADO; DELGADO, 2020). A sacarose, fonte de carboidrato mais utilizada, é um importante componente do meio de cultura (YASEEN *et al.*, 2013) e sua concentração pode afetar o

crescimento da parte aérea, do sistema radicular, bem como a formação de brotações (FERREIRA *et al.*, 2011; LEMES *et al.*, 2016; KOENE; AMANO; RIBAS, 2019).

Outra alternativa que vem apresentando potencial para melhorar a eficácia de protocolos de produção de mudas é a utilização de um sistema de cultura em dupla-fase, ainda pouco explorado para orquídeas (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Nesse sistema, as plantas são cultivadas em meio de cultura semissólido, sobre o qual é adicionado, em intervalos de tempo determinados, meio de cultura líquido ao longo do cultivo, melhorando a difusão, a absorção e reposição de nutrientes (SENAPATI, 2015; SOTA *et al.*, 2021).

Laelia gloriosa (Rchb.f.) L.O.Williams (sinonímia *Schomburgkia crispa* Lindl., *Schomburgkia gloriosa* Rchb.f.) é uma orquídea (PERAZA-FLORES; CARNEVALI; van den BERG, 2016) que ocorre em todas as regiões do Brasil (van den BERG, 2020) e que possui elevado potencial ornamental, pois produz um longo escapo floral e muitas flores duráveis na inflorescência (SORGATO *et al.*, 2021). Alguns estudos com a espécie têm detalhado as condições para a germinação (HUNHOFF *et al.*, 2018, SOGATTO *et al.*, 2021), a utilização de meios de cultura alternativos e simplificados (DEZAN *et al.*, 2012; ASSIS *et al.*, 2020) e a indução de estruturas semelhantes a protocormos com *thidiazuron* (FERMINO JUNIOR; GUANAIS; NADAI, 2021). Como metodologia inovadora para esta espécie, o uso da dupla-fase de cultivo pode significar um avanço aumentando o crescimento e a produção de mudas que podem ser utilizadas tanto para o mercado quanto para a reintrodução em ambientes naturais.

Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito da adição de fertilizante comercial no meio de cultura, do cultivo em sistema dupla-fase com citocinina, bem como de concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* e aclimatização de *Laelia gloriosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Como explantes foram utilizadas plantas de *Laelia gloriosa* com 2 anos e 6 meses, medindo 1 cm e obtidas a partir da germinação *in vitro*.

O cultivo foi realizado em frascos de vidro (com capacidade para 500 mL) contendo 50 mL de meio de cultura basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos nutrientes e vitaminas (MS ½). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar e da autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 24 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes.

ADIÇÃO DE FERTILIZANTE COMERCIAL

O meio de cultura basal MS $\frac{1}{2}$ foi acrescido de quatro concentrações de um fertilizante orgânico adquirido comercialmente (Biokashi, Biomix[®]) e triturado: 1, 2, 3 e 4 g L⁻¹, além do controle (ausência do fertilizante). O fertilizante orgânico utilizado era composto por fosfato natural, termofosfato de magnésio, cinzas, farinha de osso, torta vegetal e condicionador de solo, com indicação para utilização para algumas plantas de jardim, incluindo as orquídeas.

O delineamento foi inteiramente casualizado sendo a unidade experimental constituída por um frasco contendo cinco explantes e seis repetições. Após 240 dias de cultivo, foram avaliadas as variáveis de crescimento: altura da parte aérea (cm), comprimento do sistema radicular (cm), número de brotos adventícios e biomassa fresca (g).

CULTIVO EM SISTEMA DUPLA-FASE COM CITOCININA

Inicialmente, as plantas foram cultivadas em meio de cultura basal MS $\frac{1}{2}$ acrescido de sacarose (30 g L⁻¹), carvão ativado (1,5 g L⁻¹), ágar (7,5 g L⁻¹) e suplementado com duas concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP): 1,5 e 3,0 mg L⁻¹, além do tratamento controle (na ausência desta citocinina).

Após 30 dias de cultivo, metade dos frascos foi utilizado para testar o efeito do cultivo em dupla-fase. Sobre o meio basal (com e sem a suplementação com BAP), foram adicionados 10 mL de meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ líquido de igual formulação. As plantas oriundas da outra metade dos frascos foram subcultivadas em meio basal semissólido também de igual formulação. Este procedimento foi repetido a cada 30 dias e foi realizado até se completarem 240 dias de cultivo, quando ocorreu a coleta das variáveis de crescimento: comprimento de parte aérea, do sistema radicular, número de folhas, raízes e brotos adventícios, além da biomassa fresca.

O delineamento foi inteiramente casualizado e a unidade experimental consistiu de um frasco contendo dez plantas. O desenho experimental constou de um bifatorial 2x3, dois meios de cultura (semissólido e líquido) e duas concentrações de BAP, incluindo o controle negativo (0, 1,5 e 3,0 mg L⁻¹) totalizando seis tratamentos, cada um com quatro repetições de dez plantas.

CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE

As plantas foram cultivadas em meio de cultura basal MS $\frac{1}{2}$ acrescido de carvão ativado (1,5 g L⁻¹), ágar (7,5 g L⁻¹) e suplementado com quatro concentrações de sacarose: 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹, além do tratamento controle sem sacarose, totalizando 5 tratamentos. As plantas permaneceram nessa condição durante 240 dias, sendo subcultivadas a cada 60 dias. O delineamento foi

inteiramente casualizado e a unidade experimental consistiu de um frasco contendo dez plantas, com cinco repetições.

Após esse período, foi efetuada a avaliação das variáveis de crescimento: comprimento de parte aérea e do sistema radicular, número de folhas e brotos adventícios, além da biomassa fresca. Também foi realizada a quantificação dos pigmentos fotossintéticos nas folhas através da verificação do conteúdo de clorofila total, clorofila *a* e *b* utilizando um clorofilômetro portátil (clorofiLOG® CFL1030 FALKER). Foram coletados dados de cinco folhas de cada tratamento, em três regiões foliares: ápice, região mediana e a base foliar.

ACLIMATIZAÇÃO

Para a avaliação da aclimatização, as plantas cultivadas foram transferidas para vasos contendo substrato comercial composto por casca de pinus, areia para substrato, material orgânico e vermiculita. Cada vaso recebeu 5 plantas de cada tratamento, com 3 repetições. Cada vaso permaneceu fechado, com tampa furada e transparente, por 30 dias. Após esse período, a tampa foi removida e as plantas mantidas por mais 30 dias. A irrigação foi diária e manual com o auxílio de um borrifador até molhamento completo do substrato. Após 60 dias, avaliou-se o percentual de sobrevivência e o conteúdo das clorofilas *a* e *b*, conforme metodologia descrita anteriormente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os experimentos, os dados coletados foram submetidos à análise da variância e, as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). Foram aplicadas curvas de regressão para as variáveis que apresentaram significância em relação a concentração de sacarose utilizando o Programa Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da formulação mais adequada dos meios de cultura, com suplementos orgânicos ou inorgânicos, é essencial para aumentar o crescimento, o desenvolvimento e a qualidade das mudas de orquídeas produzidas *in vitro*.

EFEITO DA ADIÇÃO DO FERTILIZANTE

A adição do fertilizante orgânico junto ao meio MS, reduziu significativamente a altura da parte aérea, comprimento do sistema radicular e biomassa fresca das plantas (Tabela 1) e as maiores

médias foram alcançadas quando o cultivo ocorreu na ausência do fertilizante orgânico. Desta forma, a utilização do fertilizante nas concentrações testadas afetou negativamente o crescimento e desenvolvimento *in vitro* das plantas de *Laelia gloriosa*.

Tabela 1 - Altura da parte aérea (APA), comprimento do sistema radicular (CSR), número de brotos (NB) e biomassa fresca (BF) de plantas de *Laelia gloriosa*, após 240 dias de cultivo, em meio de cultura MS ½ com a adição de diferentes concentrações de fertilizante orgânico comercial. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Fertilizante orgânico g L ⁻¹	APA (cm)	CSR (cm)	NB	BF (g)
0	4,25 A	2,60 A	15,50 A	4,12 A
1	1,98 B	1,78 B	24,60 A	2,83 B
2	1,82 B	1,74 B	21,00 A	2,26 B
3	1,78 B	1,24 C	20,00 A	2,10 B
4	1,66 B	1,19 C	21,00 A	1,93 B
CV %	53,71	21,81	30,24	26,43

Fonte: Autores.

Outros fertilizantes comerciais foram testados por Dezan *et al.* (2012) e de modo similar não incrementaram o cultivo *in vitro* da espécie, enfatizando que a utilização do meio de cultura MS com metade da concentração de macronutrientes foi considerada mais adequada para a cultura.

EFEITO DO CULTIVO EM SISTEMA DUPLA-FASE COM CITOCININA

Foi possível observar diferenças significativas para as concentrações de BAP e sistema de cultivo na avaliação da altura da parte aérea e da biomassa fresca bem como do sistema de cultivo para o número de brotos adventícios (Tabela 2). A adição de BAP no meio semissólido ou no sistema dupla-fase não aumentou a altura da parte aérea das plantas e da mesma forma, a suplementação do meio com BAP não favoreceu o acúmulo de biomassa fresca quando comparado ao tratamento controle, onde as plantas foram cultivadas sem a suplementação do meio.

Villa, Pasqual e Silva (2014) também não observaram diferenças significativas no cultivo *in vitro* de híbridos de *Cattleya* e *Brassavola* utilizando a suplementação com BAP em meio semissólido. Tais resultados diferem daqueles obtidos por Santos, Ferreira e Marques (2010) que observaram um maior crescimento da parte aérea de *Epidendrum ibaguense* de acordo com a maior suplementação de BAP. Nessa espécie, as plantas atingiram 3,74 cm de parte aérea com a suplementação de 3,6 mg L⁻¹ de BAP, após 60 dias de cultivo.

Tabela 2 - Avaliação do crescimento das plantas de *Laelia gloriosa*, após 240 dias de cultivo *in vitro*, em meio semissólido (SS) e em sistema dupla-fase (DF), associado à suplementação com BAP. APA= altura da parte aérea, CSR= comprimento do sistema radicular, NF= número de folhas, NR= número de raízes, NB= número de brotos e BF= biomassa fresca. Letras minúsculas iguais na vertical (coluna) e letras maiúsculas na horizontal (linha) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância.

Meio de cultura	BAP (mg L ⁻¹)		
	0	1,5	3
APA (cm)			
SS	5,55 aA	3,72 aA	4,65 aA
DF	4,42 aA	3,16 aB	2,70 bB
CV (%) = 17,4			
CSR (cm)			
SS	2,60 aA	2,70 aA	2,95 aA
DF	3,21 aA	2,76 aA	2,23 aA
CV (%) = 19,7			
NF			
SS	7,90 aA	7,70 aA	7,55 aA
DF	7,90 aA	7,56 aA	7,10 aA
CV (%) = 10,8			
NR			
SS	10,10 aA	9,07 aA	8,65 aA
DF	9,92 aA	8,73 aA	8,66 aA
CV (%) = 9,9			
NB			
SS	4,10 aA	3,83 bA	3,33 bA
DF	4,40 aA	5,85 aA	5,20 aA
CV (%) = 20,0			
BF (g)			
SS	1,05 aB	0,60 bA	0,47 aA
DF	0,83 aA	1,27 aA	0,71 aA
CV (%) = 20,1			

Fonte: Autores.

O cultivo em sistema dupla-fase, acrescido da concentração intermediária de BAP, favoreceu o acúmulo de biomassa fresca das plantas (1,27 g) em comparação com aquelas cultivadas em meio semissólido (0,60 g). Da mesma forma, o sistema dupla-fase foi superior ao semissólido em relação à formação de brotos adventícios, na presença de BAP (Tabela 2). Os efeitos observados podem ser atribuídos a ação dessa citocinina na indução de brotações, o que também foi observado por Anjos *et al.* (2021). Esses autores, inclusive, indicam o uso de BAP na fase de multiplicação *in vitro* da orquídea *Dryadella zebrina*. A maior proliferação de brotos também pode ser atribuída à suplementação líquida de meio MS, no sistema dupla-fase, facilitando e complementando a nutrição do material vegetal. O emprego do meio de cultura líquido aumenta a multiplicação em razão do aumento da superfície de contato dos explantes com os nutrientes, proporcionando o aumento na difusão e na absorção neste tipo de sistema *in vitro*.

Poniewozik, Parzymies e Szot (2020) também observaram efeito benéfico da adição de uma fase líquida sobre o meio de cultura semissólido frente a germinação de *Paphiopedilum insigne*.

Como resultado, a suplementação do meio de cultura com BAP, combinado com TDZ ou cinetina, permitiu a formação de microplantas de melhor qualidade.

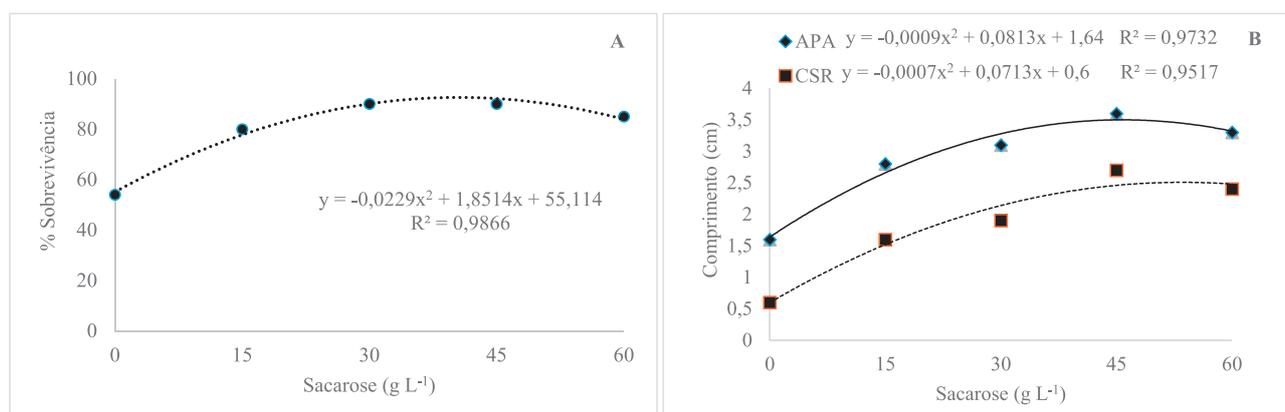
Vários são os desafios da cultura de tecidos nos tempos atuais e o aumento da taxa de proliferação pode ter vários benefícios (CARDOSO; SHENG GERALD; TEIXEIRA DA SILVA, 2018). Portanto, se faz necessário o investimento em estudos que busquem alternativas para este propósito. Resultados positivos com o sistema dupla-fase contribuem para a redução dos custos de produção, mas são importantes principalmente por aumentar a produtividade aliada a estabilidade genética dos clones formados. Outra estratégia importante para plantas ornamentais é o uso de meio líquido em sistema de imersão temporária.

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E ACLIMATIZAÇÃO

Transcorridos 240 dias de cultivo *in vitro*, as variáveis de crescimento das plantas foram significativamente influenciadas pelos tratamentos com as concentrações de sacarose, com exceção do número de brotos. O percentual de sobrevivência apresentou um comportamento quadrático crescente, onde conforme aumentou a concentração de sacarose no meio de cultura aumentou a sobrevivência, apresentando redução a partir de 45 g L⁻¹ (Figura 1A).

Para as variáveis altura da parte aérea e comprimento do sistema radicular (Figura 1B) houve diferença significativa entre as concentrações de sacarose testadas e os dados também apresentaram um comportamento quadrático crescente, em que, conforme aumentou a concentração de sacarose no meio de cultura, aumentou o crescimento até 45 g L⁻¹, vindo a cair com 60 g L⁻¹.

Figura 1 - Sobrevivência das plantas (%) (A), altura da parte aérea (APA) e comprimento do sistema radicular (CSR) (B) de *Laelia gloriosa*, após 240 dias de cultivo, em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose.



Fonte: Autores

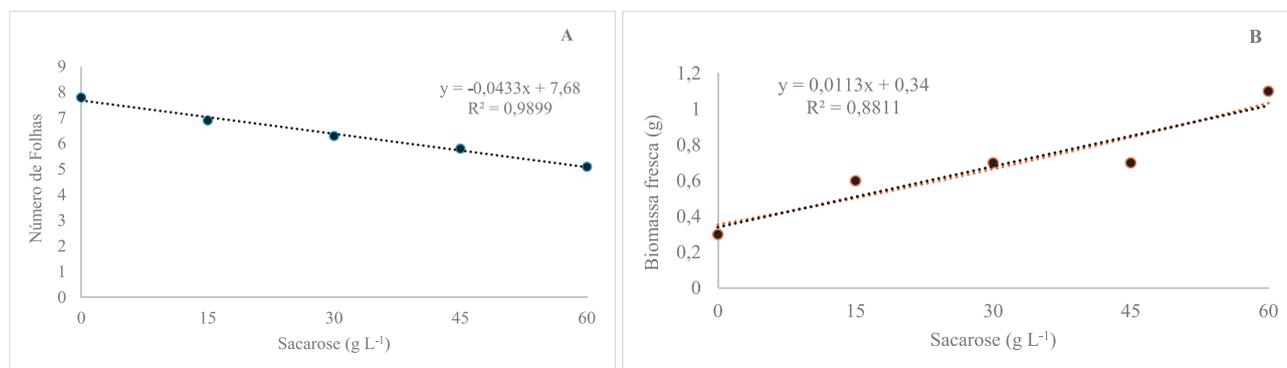
O comprimento do sistema radicular foi significativamente superior quando o cultivo ocorreu em meio de cultura com 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose e a altura da parte aérea foi significativamente superior em todas as concentrações, exceto na ausência desta fonte de carboidrato (Figura 1B).

Observa-se que a concentração de 45 g L⁻¹ foi a ideal para o cultivo de *L. gloriosa*. Besson *et al.* (2010), avaliando o efeito deste carboidrato no cultivo de *Miltonia flavescens*, em condições experimentais similares, relataram que as concentrações mais adequadas para o desenvolvimento dessa espécie foram 30 e 45 g L⁻¹.

A ausência de sacarose no meio de cultura ocasionou menor percentual de sobrevivência, bem como menores incrementos na altura da parte aérea e radicular, concordando com os dados obtidos por Galdiano Júnior *et al.* (2013a). Estes autores avaliaram o efeito da sacarose no crescimento de *Cattleya violacea* e evidenciaram a importância da sua suplementação no meio, sendo a concentração de 27 g L⁻¹ a mais adequada para a espécie. Recentemente, Soares *et al.* (2023) relataram que concentrações de sacarose de até 30 g L⁻¹, associadas a um sistema de vedação dos frascos com filtro de algodão, que permite as trocas gasosas, possibilitou incremento no crescimento aéreo e radicular de plantas de *Brassavola tuberculata*.

O número de folhas e a biomassa fresca apresentaram um comportamento linear significativo, sendo que, à medida em que aumentou a concentração de sacarose no meio de cultura, o número de folhas também aumentou (Figura 2A). Da mesma maneira, o aumento da concentração de sacarose favoreceu o acúmulo de biomassa fresca (Figura 2B).

Figura 2 - Número de folhas (A) e biomassa fresca (B) de plantas de *Laelia gloriosa*, após 240 dias de cultivo *in vitro*, em meio contendo diferentes concentrações de sacarose.



Fonte: Autores

Os resultados da quantificação da clorofila são apresentados na Tabela 3. As análises dos valores de clorofila total das folhas das plantas cultivadas em diferentes concentrações de sacarose não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Por outro lado, as concentrações do carboidrato adicionadas no meio alteraram o teor de clorofila *a* e *b*.

Tabela 3 - Valores médios da clorofila total e dos pigmentos fotossintéticos de clorofila *a* e *b* de plantas de *Laelia gloriosa*, em meio de cultura MS ½, com diferentes concentrações de sacarose, após 240 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra minúscula (na coluna) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância.

Sacarose g L ⁻¹	Clorofila total	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>
0	18,42 a	12,40 c	3,58 b
15	21,97 a	14,71 b	3,31 b
30	22,59 a	14,50 b	3,02 b
45	22,03 a	18,09 a	4,57 a
60	20,72 a	15,67 b	3,59 b
CV (%)	15,40	9,64	10,04

Fonte: autores.

O teor de clorofila *a* e *b* foi maior nas plantas onde o meio de cultura foi suplementado com 45 g L⁻¹ de sacarose, corroborando com os dados do comprimento do sistema radicular e da altura da parte aérea. Por outro lado, após a aclimatização os maiores valores médios destes pigmentos foram obtidos nas plantas provenientes do tratamento com 30 g L⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios dos pigmentos fotossintéticos de clorofila *a* e *b* de plantas de *Laelia gloriosa*, após 60 dias de aclimatização. Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância.

Sacarose g L ⁻¹	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Sobrevivência %
0	-	-	0
15	17,87 b	4,61 b	40
30	27,59 a	6,72 a	60
45	21,68 b	5,25 b	46
60	19,66 b	4,69 b	40
CV (%)	20,36	18,56	

Fonte: Autores.

As plantas quando cultivadas *in vitro* na ausência de carboidrato apresentaram taxa de 50% de sobrevivência (Figura 1A) e menor altura da parte aérea, comprimento do sistema radicular (Figura 1B), biomassa fresca (Figura 2B) e, conseqüentemente, menores teores de clorofila *a* e *b* (Tabela 3) e, não sobreviveram a fase de aclimatização, no período de 60 dias (Tabela 4). Estes resultados diferem dos obtidos no trabalho de Galdino Júnior *et al.* (2013b), onde as maiores médias de clorofila *a* foram obtidas com 20 g L⁻¹ de sacarose para o cultivo *in vitro* de *Cattleya loddigesii*.

A clorofila *a* atua com maior efetividade na atividade fotossintética, uma vez que, diferentemente da clorofila *b* e dos carotenóides, está envolvida no processamento de luz (TAIZ *et al.*, 2017) e pode apresentar, portanto, maior eficiência fotossintética. O manejo das condições *in vitro* como níveis de sacarose, nutrientes e umidade relativa, pode melhorar o desempenho fotossintético das

plantas em estágios iniciais após a transferência *ex vitro*, desempenhando um papel crucial na melhoria do estresse de adaptação (BARRALES-LÓPEZ *et al.*, 2015; SAÉZ *et al.*, 2015).

Quando as plantas foram transferidas para condição *ex vitro*, observou-se maior taxa de sobrevivência (60%) e teor de clorofilas naquelas plantas anteriormente cultivadas em meio de cultura suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 4). Estes resultados concordam parcialmente com os de Galdiano Júnior *et al.* (2013b), os quais obtiveram maior sobrevivência das plantas *in vitro* e *ex vitro* na concentração de 20 e 30 g L⁻¹. No meio de cultura, a sacarose além de atuar como fonte de energia e de precursores para a biossíntese de componentes estruturais, pode favorecer a aclimatização, bem como acelerar as adaptações fisiológicas.

CONCLUSÃO

O fertilizante comercial não promoveu o crescimento das plantas de *L. gloriosa* cultivadas *in vitro* por 240 dias. A adição de BAP no meio semissólido ou no sistema dupla-fase não aumentou a altura da parte aérea das plantas. O sistema dupla-fase foi similar ao sistema semissólido, entretanto foi superior na formação de brotações quando o meio de cultura foi suplementado com 1,5 e 3 mg L⁻¹ de BAP.

As concentrações de sacarose influenciaram no crescimento, na formação de pigmentos fotossintéticos e na sobrevivência das plantas de *Laelia gloriosa* cultivadas *in vitro* e também aclimatizadas.

REFERÊNCIAS

- ANJOS, J. S. *et al.* The cytokinin 6-Benzylaminopurine improves the formation and development of *Dryadella zebrina* (Orchidaceae) *in vitro* shoots. **Brazilian Journal of Botany**, v. 44, n. 4, p. 811-819, 2021.
- ASSIS, K. C. C. *et al.* Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindley em meio de cultura acrescido de *Salvia hispanica* L. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 14, n. 4, p. 342-350, 2020.
- BARRALES-LÓPEZ, A. *et al.* Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 3, p. 274-283, 2015.
- BESSON, J. C. F. *et al.* Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 09-13, 2010.

CARDOSO, J. C.; SHENH GERALD, L. T.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Micropropagation in the twenty-first century. In: LOYOLA-VARGAS, V., OCHOA-ALEJO, N. (eds). **Plant cell culture protocols**. New York: Human Press, 2018, p. 17-46.

CARDOSO, J. C.; ZANELLO, C. A.; CHEN, J. T. An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 985, 2020.

CAVALCANTE, V. R., BORIN, L., MORAES, C. P. Germinação e *crecimento in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em diferentes meios de cultivo e períodos de exposição a agentes desinfestantes seminais. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 2, p. 196-207, 2018.

DEZAN, L. F. *et al.* Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. **Idesia**, v. 30, n. 2, p. 53-58, 2012.

FAY, M. F. Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? **Botanical Studies**, v. 59, n. 16, p. 1-6, 2018.

FERMINO, J. P.; GUANAIS, D.; NADAI, M. Indução, proliferação e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (ESP) de *Schomburgkia crispa* Lindl. (Orchidaceae). **Agrarian Academy**, v. 8, n. 6, 2021.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011a.

FERREIRA, W. M. *et al.* Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, p. 420-427, 2011b.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. *et al.* Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 127-134, 2013a.

GALDINO JÚNIOR, R. F. *et al.* Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 583-592, 2013b.

HUNHOFF, V. L. *et al.* Nutritional requirements for germination and *in vitro* development of three Orchidaceae species in the Southern Brazilian Amazon. **Ornamental Horticulture**, v. 24, n. 2, p. 87-94, 2018.

KOENE, F. M.; AMANO, E.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 121, p. 83-91, 2019.

KUMAR, J. *et al.* A comprehensive review on threats and conservation status of orchids. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 43-47, 2024.

LEMES, C. S. R. *et al.* Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 499-505, 2016.

MERCADO, S. A. S.; DELGADO, E. A. B. Effect of the medium composition on the asymbiotic germination and *in vitro* development of the *Laeliocattleya* hybrid. **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 80-86, 2020.

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

OLIVEIRA, S. O. D. *et al.* A new procedure for *in vitro* propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 204-209, 2013.

PASTERNAK, T. P.; STEINMACHER, D. Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro*. **Plants**, v. 13, 327, 2024.

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

PONIEWOZIK, M.; PARZYMIES, M.; SZOT, P. The influence of disinfection methods and liquid phase media on *Paphiopedilum insigne* seeds germination and media supplements on morphological features of protocorms in tissue culture. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 19, n. 6, p. 7-14, 2020.

SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; MARQUES, M. G. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* Kunth. **Plant Cell Culture & Micropropagation.**, v. 6, n. 2, p. 90-98, 2010.

SENAPATI, S.K. A double phase culture system: na economic and time savind protocol for *in vitro* propagation of plant. **SAJ Biotechnol**, v. 2, n. 1, 2015.

SOARES, J.S. et al. *Brassavola tuberculata* Hook.: *in vitro* growth and *ex vitro* establishment as a function of the micropropagation system and sucrose. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, e270892. 2023.

SORGATO, J. C. Ornamental potential of *Schomburkia crispa* Lindl.. **Ornamental Horticulture**, v. 27, n.2, p. 155-161, 2021.

SOTA, V. et al. Effect of a double phase culture system and activated charcoal on *in vitro* propagation of *Malus sylvestris* (L.) Mill. **Advances in Horticultural Science**, v. 35, n. 4, p. 361-369, 2021.

SÁEZ, P. L. et al. Influence of *in vitro* growth conditions on the photosynthesis and survival of *Castanea sativa* plantlets during *ex vitro* transfer. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 3, p. 625-639, 2015.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre, Artmed, 2017.

TIWARI, P. et al. Advances in orchid biology: biotechnological achievements, translational success, and commercial outcomes. **Horticulturae**, v. 10, p. 152 , 2024.

van den BERG, C. 2020. *Laelia* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB37720>. Acesso em: 03 abr. 2024.

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

YASSEN, M. et al. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.

ZENG S. J. et al. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 198-209, 2012.