



MICHELE CARLA NADAL

**INDUÇÃO DE FLORESCIMENTO *in vitro* DE *Cattleya*
*walkeriana***

**LAVRAS - MG
2023**

MICHELE CARLA NADAL

INDUÇÃO DE FLORESCIMENTO *in vitro* DE *Cattleya walkeriana*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Prof. Dra. Michele Valquíria dos Reis
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Nadal, Michele Carla.

Indução de florescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* /
Michele Carla Nadal. - 2023.

80 p. : il.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

Coorientador(a): Michele Valquíria dos Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Orquídeas. 2. Florescimento *in vitro*. 3. Cultura de tecidos
vegetais. I. Pasqual, Moacir. II. Reis, Michele Valquíria dos. III.
Título.

MICHELE CARLA NADAL

INDUÇÃO DE FLORESCIMENTO *in vitro* DE *Cattleya walkeriana*

In vitro* FLOWERING INDUCTION OF *Cattleya walkeriana

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2023.
Dr. Moacir Pasqual - UFLA
Dra. Michele Valquíria dos Reis - UFLA
Dra. Joyce Dória - UFLA
Dra. Adriane Marinho de Assis - UFPEL
Dr. Ricardo Tadeu de Faria - UEL

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Profa. Dra. Michele Valquíria dos Reis
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2023**

Aos que dividiram esta caminhada comigo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Moacir Pasqual, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, pela pronta ajuda sempre que precisei. Aprendi muito com o senhor, com a equipe do laboratório, com meus colegas de pós-graduação. Sem seu aceite em me orientar isso não teria sido possível.

À professora Dra. Michele Valquíria dos Reis, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, aceitado me coorientar, me proporcionado tantas oportunidades de aprendizado, confiado alunos de graduação para coorientação. Me faltam palavras para agradecer. Você foi muito mais que uma orientadora, foi uma amiga, me tratou como colega de trabalho. Admiro muito seu empenho, comprometimento, a pessoa que você é.

Aos meus colegas do Horto Botânico que se tornaram-se amigos, Antônio Rodrigues Cunha Neto e Thalita Maciel Pereira, muito obrigada pelos momentos divididos. Pela ajuda no desenvolvimento dessa tese. Assim, como aos alunos de Iniciação Científica, meus amigos, Mateus Campos, Rodrigo Abreu e William Pereira. Obrigada pela parceria.

Aos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos, Mariana Ribeiro, Graciele Vidal, Ronilson Araújo, Victor Bruttós e Amanda Vilela, companheiros de mestrado e doutorado. Muito obrigada por tudo, pelas boas risadas, “informações sociais”, desabafos.

Ao Vantuil, incentivador deste trabalho, que sempre acreditou em mim como profissional. Vou levá-lo em meu coração para sempre.

A todos os demais membros do Horto Botânico e Laboratório de Cultura de Tecidos.

Aos meus pais, Leonir Nadal e Rozane Pietrobon Nadal, aos meus irmãos, Ariele Paula Nadal e Michel Nadal, as minhas amigas, Josiane Argenta e Eduarda de Oliveira. Obrigada pela amizade, eu por me fazerem saber que posso contar com vocês na minha vida.

Ao José Henrique Nunes Flores, meu melhor amigo, colega de trabalho, companheiro de muitas histórias de vida, por cada momento compartilhado, e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da UFLA, a todos professores, especialmente aos que fizeram parte da minha formação curricular: Dra. Joyce Dória, Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, Dra. Flavia Barbosa Silva Botelho, Dra. Heloísa Oliveira dos Santos, Dra. Edila Vilela de Resende Von Pinho, Dra. Fernanda Carvalho Lopes de Medeiros, Dr. Adriano Teodoro Bruzi, Dr. Sebastião Marcio de Azevedo, Dr. Filipe Almendagna Rodrigues. Agradeço imensamente o conhecimento e as experiências profissionais compartilhadas. A Marli, secretária do programa, e a todos os demais funcionários da Instituição.

A banca examinadora deste trabalho. Pela disposição de avaliação e contribuições realizadas.

A CAPES, pela concessão da minha bolsa de estudo.

A UFLA, pela possibilidade de realização deste estudo.

Muito obrigada!

*“Quero viver muito além das fronteiras, dos que só sabem ser
Pedras de atiradeira
Eu deveria saber, que de certa maneira, não seremos jamais
Mais que grãos de poeira no céu”*

Almir Sater

RESUMO

Orquídeas do gênero *Cattleya* L. são muito apreciadas pela variedade de cores, formas e tamanhos das suas flores, porém possuem um longo período de juvenilidade. Utilizar mecanismos que acelerem o processo de florescimento é desejável para o mercado, no entanto, o conhecimento dos fenômenos envolvidos nesse processo é incipiente. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento fisiológico e bioquímico da *Cattleya walkeriana* G. frente a fatores ambientais (experimento i), qualidade luminosa (experimento ii) e inibidor de giberelina (experimento iii), na indução do florescimento *in vitro*. As plantas de oriundas de sementeira *in vitro* foram submetidas as seguintes condições experimentais: (i) após 6 meses de cultivo foram transferidas para distintas condições de temperatura (26°C, 24°C, 20,5°C e 17°C), fotoperíodo (10, 12, 14 e 16 h), e disponibilidade hídrica (simulado com diferentes doses de ágar: 0, 2,75, 5,50, 8,25 e 11 g L⁻¹), e avaliadas após 3 meses; (ii) após 12 meses de cultivo *in vitro* foram transferidas para distintas cores de luz (vermelho, azul, roxo (simulado por 2 vermelhos : 1 azul) e branco), fornecidas por diodos emissores de luz (LED), e avaliadas após 6 meses; e, (iii) após 6 meses de cultivo foram transferidas para meio com distintas concentrações de paclobutrazol (PBZ) nas concentrações 0, 0,025, 0,05, 0,075 e 0,1 mg L⁻¹, e avaliadas após 3 meses. Nos três experimentos foram analisados parâmetros de crescimento, do aparelho fotossintético, do metabolismo antioxidante, e do metabolismo de carboidratos. Quanto aos fatores ambientais estudados observou-se que a temperatura média de 26°C, fotoperíodo de 12 a 14 horas de luz, e 0 mg L⁻¹ de ágar, promovem um crescimento mais expressivo para a espécie. A iluminação branca propiciou maior crescimento vegetativo e maior acúmulo de H₂O₂ compreendido como sinalizador de crescimento nesta condição, ao passo que, a roxa propiciou maior formação de clorofilas *a*, *b*, carotenoides e clorofilas totais, assim como, acúmulo equivalente de açúcares solúveis totais. Porém a iluminação com LEDs vermelho, azul, roxo e branco podem ser utilizadas sem prejuízos para espécie. O PBZ reduziu o número de folhas e raízes da espécie, bem como, o comprimento das raízes. Além disso, promoveu o aumento de parte aérea, brotos, acúmulo de carbono, e elevação das concentrações de superóxido dismutase, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e proteínas. Sendo que a concentração de 0,1 mgL⁻¹ de PBZ pode ser utilizada para manutenção da espécie *in vitro*. Por fim, a espécie não foi responsiva aos fatores estudados para florescimento *in vitro*.

Palavras-chave: Condições hídricas. Florescimento de plantas. Fotoperíodo. Luminosidade. Paclobutrazol. Temperatura. Orquídeas.

ABSTRACT

Cattleya L. orchids are highly appreciated for their variety of colors, shapes, and sizes of their flowers, but they have a long juvenile period. Using mechanisms that accelerate the flowering process is desirable for the market, but knowledge of the phenomena involved in this process is incipient. In this sense, the aim of this study was to investigate the physiological and biochemical behavior of *Cattleya walkeriana* G. in response to environmental factors (experiment i), light quality (experiment ii), and gibberellin inhibitor (experiment iii), in inducing *in vitro* flowering. Plants originating from *in vitro* seeding were subjected to the following experimental conditions: (i) after 6 months of cultivation, they were transferred to different conditions of temperature (26°C, 24°C, 20.5°C, and 17°C), photoperiod (10, 12, 14, and 16 h), and water availability (simulated with different agar doses: 0, 2.75, 5.50, 8.25, and 11 g L⁻¹), and evaluated after 3 months; (ii) after 12 months of *in vitro* cultivation, they were transferred to different colors of light (red, blue, purple (simulated by 2 reds : 1 blue), and white), provided by light-emitting diodes (LEDs), and evaluated after 6 months; and (iii) after 6 months of cultivation, they were transferred to media with different concentrations of paclobutrazol (PBZ) at concentrations of 0, 0.025, 0.05, 0.075, and 0.1 mg L⁻¹, and evaluated after 3 months. In all three experiments, growth parameters, photosynthetic apparatus, antioxidant metabolism, and carbohydrate metabolism were analyzed. Regarding the environmental factors studied, it was observed that an average temperature of 26°C, a photoperiod of 12 to 14 hours of light, and 0 mg L⁻¹ of agar promote more expressive growth for the species. White lighting provided greater vegetative growth and greater accumulation of H₂O₂, understood as a growth signal in this condition, while purple lighting provided greater formation of chlorophylls *a*, *b*, and total, and carotenoids, as well as equivalent accumulation of total soluble sugars. However, red, blue, purple, and white LED lighting can be used without damage to the species. PBZ reduced the number of leaves and roots of the species, as well as root length. Additionally, it promoted the increase of shoot, carbon accumulation, and elevation of concentrations of superoxide dismutase, total soluble sugars, reducing sugars, and proteins. The concentration of 0.1 mg L⁻¹ of PBZ can be used for *in vitro* maintenance of the species. Finally, the species was not responsive to the studied factors for *in vitro* flowering.

Keywords: Water conditions. Plant flowering. Photoperiod. Luminosity. Paclobutrazol. Temperature. Orchids.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1. Família Orchidaceae	16
2.2. Gênero <i>Cattleya</i> L. e a espécie nativa <i>Cattleya walkeriana</i> G.	16
2.3. Indução do florescimento em orquídeas.....	19
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
4. REFERENCIAS	23
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	26
ARTIGO I – FATORES AMBIENTAIS NA INDUÇÃO DO FLORESCIMENTO <i>in vitro</i> EM <i>Cattleya walkeriana</i> G.	27
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
Material vegetal	30
Delineamento experimental do ensaio de temperatura.....	31
Delineamento experimental do ensaio de fotoperíodo	32
Delineamento experimental do ensaio de estresse hídrico	33
Análises morfométricas	34
Conteúdo de clorofilas.....	34
Caracterização bioquímica não enzimática: quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	35
Caracterização bioquímica enzimática: Dismutase do superóxido (SOD); Catalase (CAT) e Peroxidase do ascorbato (APX)	35
Caracterização de macro e micromoléculas: proteínas, açúcar solúveis totais e açúcares redutores	36
Análise estatística	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46
ARTIGO II – COMPRIMENTOS LUMINOSOS COMO INDUTORES DE FLORESCIMENTO <i>in vitro</i> EM <i>Cattleya walkeriana</i> G.	49
RESUMO	49

1.	INTRODUÇÃO.....	49
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
	Material vegetal.....	52
	Delineamento experimental do ensaio.....	53
	Análises morfométricas.....	53
	Conteúdo de clorofilas.....	53
	Caracterização bioquímica não enzimática: quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	53
	Caracterização bioquímica enzimática: Dismutase do superóxido (SOD); Catalase (CAT) e Peroxidase do ascorbato (APX).....	54
	Caracterização de macro e micromoléculas: proteínas, açúcar solúveis totais e açúcares redutores.....	55
	Análise estatística.....	55
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.	CONCLUSÕES.....	61
	REFERENCIAS.....	61
	ARTIGO III – INIBIDOR DE GIBERELINA COMO INDUTORES DE FLORESCIMENTO <i>in vitro</i> EM <i>Cattleya walkeriana</i> G.....	64
	RESUMO.....	64
1.	INTRODUÇÃO.....	64
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
	Material vegetal.....	66
	Delineamento experimental do ensaio.....	67
	Análises morfométricas.....	67
	Conteúdo de clorofilas.....	67
	Caracterização bioquímica não enzimática: quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	67
	Caracterização bioquímica enzimática: Dismutase do superóxido (SOD); Catalase (CAT) e Peroxidase do ascorbato (APX).....	68
	Caracterização de macro e micromoléculas: proteínas, açúcar solúveis totais e açúcares redutores.....	69
	Análise estatística.....	69
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.	CONCLUSÕES.....	77

REFERENCIAS	77
-------------------	----

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

Dentre as plantas vasculares, a família Orchidaceae é a que possui maior número de espécies descritas na atualidade, aproximadamente 24.500 (REFLORA, 2020), e está entre as famílias com maior número de novas entradas (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016). As orquídeas são consideradas plantas cosmopolitas, possuindo distribuição geográfica ampla, porém, com maior número de espécies sendo encontradas em climas tropicais e úmidos. Deve-se considerar que a nível de gênero e espécie, alguns grupos são endêmicos e dependentes do clima (EVANS; JANSSENS; JACQUEMYN, 2020). O Brasil detém uma das maiores diversidades de orquídeas do mundo, sendo encontradas em todos os biomas, especialmente na formação da Mata Atlântica. Sendo que aproximadamente 10% do total de espécies mundial podem ser encontradas no Brasil (REFLORA, 2020).

Devido a sua característica cosmopolita, a família Orchidaceae é amplamente comercializada ao redor do mundo como flores de corte, flores de vaso (YUAN et al., 2021) e para a extração de substância medicinais (ŚLIWIŃSKI et al., 2022), e no paisagismo. Nesse sentido, a família Orchidaceae tem sido alvo de diversos estudos para entendimento do seu metabolismo a fim da promoção de avanços, especialmente no desenvolvimento de produtos (ZHANG et al., 2022).

Por outro lado, a demanda pelo mercado consumidor por algumas espécies que são pouco cultivadas, leva ao comércio ilegal das plantas, gerando um impacto ambiental grande na conservação das espécies (HINSLEY et al., 2018). Para além disto, diversos estudos têm demonstrado que as mudanças climáticas possuem impacto direto sobre esta família (EVANS; JACQUEMYN, 2022; EVANS; JANSSENS; JACQUEMYN, 2020; LI et al., 2022; SMALLWOOD; TRAPNELL, 2022). Desta forma a pressão do ser humano e as mudanças climáticas possuem efeito direto na sobrevivência da família Orchidaceae (LIU et al., 2021).

Dentre os gêneros de orquídeas encontrados no Brasil, o *Cattleya* L. é amplamente comercializado destacando-se no mercado devido a sua alta variabilidade genética e grande capacidade de recombinação, além de possuir flores com cores e formatos atraentes e duráveis (GALDIANO JUNIOR et al., 2017), outra característica deste gênero é o florescimento tardio.

De maneira geral, a grande maioria das orquídeas necessitam de vários anos para chegar à fase de maturidade para a floração. Gêneros como *Phalaenopsis*, *Dendrobiums* e *Oncidiums*, normalmente levam de 2 a 3 anos desde a germinação da semente até o florescimento (CHIU; CHANG, 2018), *Cattleyas* podem demorar mais de três anos para florescer. Este fator encarece

os custos de produção, pois o cultivo necessita de período maior em estufas até obtenção da haste floral para que as plantas possam ser comercializadas.

Nesse sentido, há uma escassez de informações sobre o processo de florescimento da maioria das espécies de *Cattleyas*. Segundo (SHEEHAN, 1992), o grupo *Cattleya* é dividido em dois tipos quanto ao hábito de floração, o primeiro chamado de *Cattleya gigas* e um segundo grupo de *Cattleyas* manipuladas fotoperiodicamente. O grupo de *Cattleya gigas* produz brotos na primavera e flores no verão, sendo que cada broto floresce separadamente. O grupo que pode ser manipulado fotoperiodicamente produz flores duas vezes por ano.

No entanto, nem todas as espécies de gênero seguem rigorosamente os padrões descritos, como é o caso da *Cattleya walkeriana*. Esta espécie produz brotos na primavera, os quais se desenvolvem durante o verão e florescem no início do outono. A *Cattleya walkeriana* é uma orquídea de pequeno porte, nativa e endêmica do Brasil, ocorrendo nos Biomas Cerrado e Amazônia, nas vegetações tipo Cerrado (*lato sensu*), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta de Terra Firme, Floresta Estacional Decidual e Floresta Estacional Semidecidual (REFLORA, 2020)

Esta espécie de orquídea é muito procurada, especialmente por colecionadores. Suas flores além de possuírem um perfume único, pouco ou ainda não explorado, apresentam tamanhos maiores em relação a outras *Cattleyas*. Além disso, por seu porte pequeno, se adapta ao cultivo em ambiente interno, desde que tenha boas condições de umidade e iluminação. Estudos que busquem acelerar o processo de florescimento dessas plantas são de extrema importância comercial, pois podem promover a redução de custos, visto a aceleração do tempo de comercialização; o aumento da qualidade do produto comercializado ao identificar produtos ou tecnologias que promovam flores em condições de maior interesse; e aumento da produtividade de espécies vendidas como flor corte, se identificado fatores que promovem o encurtamento do ciclo produtivo ou possibilitem de produção de mais um ciclo ao ano.

Do ponto de vista acadêmico, a floração de plantas *in vitro* é dos fenômenos mais fascinantes encontrados na biologia de plantas, e apesar do avanço em estudos sobre o tema, muitos fenômenos envolvidos nesse processo ainda são incipientes (PUJARI; SANKAR BABU, 2022). Estudos de indução de florescimento *in vitro* são utilizados para auxiliar na elucidação deste processo fisiológico. Além disso, esta técnica é empregada no melhoramento vegetal para acelerar gerações de espécies que possuem florescimento tardio, como as orquídeas.

Diante do exposto, esta tese tem como objetivo investigar se a disponibilidade hídrica, o fotoperíodo, a temperatura, a qualidade luminosa e o inibidor de giberelina influenciam na

indução do florescimento de *Cattleya walkeriana* G. *in vitro*, e como estes fatores influenciam os eventos fisiológicos e bioquímicos da espécie.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Família Orchidaceae

A família Orchidaceae apresenta-se como uma das maiores e mais diversificadas famílias do reino vegetal, sendo constituída por aproximadamente 24.500 espécies distribuídas em cerca de 800 gêneros (REFLORA, 2020). Apresenta distribuição cosmopolita, embora seja mais abundante nas regiões tropicais, especialmente na América Central e do Sul, bem como, regiões da Ásia equatorial. São plantas de hábitos terrestres, epífitas, rupícolas e saprófitas (PIVETTA et al., 2014). O Brasil detém uma das maiores diversidades de orquídeas do mundo, sendo encontradas em todos os biomas, especialmente na formação da Mata Atlântica. No total, são cerca de 2.419 espécies das quais 1.620 são endêmicas do país (BARROS; RODRIGUES; BATISTA, 2009; FORZZA et al., 2010).

As orquídeas estão entre as flores tropicais de maior valor agregado e as plantas envasadas mais comercializadas no país. Encantam pelo formato das flores, cores e perfumes. São plantas versáteis, podendo ser utilizadas como flores de corte e no paisagismo, além de serem muito procuradas por colecionadores.

Uma característica desta família é o florescimento tardio de alguns gêneros. A grande maioria das orquídeas necessitam de mais de um ano para chegar à fase de maturidade para a floração (HEW; YONG, 2004). Gêneros como *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, e *Oncidium*, normalmente levam de 2 a 3 anos desde a germinação da semente até o florescimento (CHIU; CHANG, 2018). Este fator, encarece os custos de produção, pois o cultivo de muitos gêneros necessita de período maior em estufas até obtenção da haste floral para que as plantas possam ser comercializadas.

Devido à alta atratividade existe a busca pelo desenvolvimento de novos híbridos e variedades, o que fomenta o mercado de plantas ornamentais. No que diz respeito a floração das orquídeas, as qualidades e características avaliadas para o melhoramento genético concentra-se na forma e armação da flor, tamanho, coloração, quantidade de flores e seu arranjo na haste, bem como, substância e textura (TAKANE; YANAGISAWA; PIVETTA, 2010).

2.2. Gênero *Cattleya* L. e a espécie nativa *Cattleya walkeriana* G.

Dentre os gêneros encontrados no Brasil, o *Cattleya* L. é amplamente comercializado na atualidade destaca-se no mercado devidos a sua alta variabilidade genética e grande capacidade de recombinação, além de possuir flores com cores atraentes e duráveis (GALDIANO JUNIOR et al., 2017). A maioria das pesquisas com plantas deste gênero referem-se a propagação vegetal pautada na produção de protocolos de germinação ou organogênese *in vitro* e desenvolvimento de plantas após a germinação (SCHNEIDERS et al., 2012).

O cultivo das espécies deste gênero é relativamente simples, a maioria suporta ambientes de alta temperatura, sendo ideais que as temperaturas diurnas estejam na faixa de 25°C a 35°C, e as noturnas, de 20°C a 30°C (PIVETTA et al., 2014). São cultivadas em diferentes substratos, desde que, bem aerados, como casca de pinus, casca de arroz carbonizada e fibra de coco (TAKANE; YANAGISAWA; GOIS, 2013).

Em relação às estruturas reprodutivas, o gênero possui uma espata ou bráctea (folha modificada), que protege a haste floral. No interior desta espata tem-se a formação da haste floral, que por sua vez, pode apresentar muitos botões dependendo do manejo, da espécie e variedade. Quando o botão floral atinge seu máximo tamanho, é necessário que a haste seja tutorada, pois apresenta uma espessura fina, podendo quebrar em alguns casos (TAKANE; YANAGISAWA; PIVETTA, 2010). No entanto, a primeira floração deste gênero é tardia, o que atrasa a comercialização e aumenta custos de produção (CARDOSO; ONO; RODRIGUES, 2010). Além disso, com algumas exceções, esse gênero apresenta floração exuberante apenas uma vez ao ano, com durabilidade das flores de 7 a 30 dias (CARDOSO; ISRAEL, 2005).

Existem poucas informações sobre o hábito de floração da maioria das espécies de *Cattleyas*, possivelmente devido à grande distribuição pelo mundo. Segundo Sheehan (1992), o grupo *Cattleya* é dividido em dois tipos quanto ao hábito de floração, o primeiro chamado de *Cattleya gigas* e um segundo grupo que pode ser manipulado fotoperiodicamente. O grupo de *Cattleya gigas* produzem brotos na primavera e flores no verão, sendo que cada broto floresce separadamente. O grupo de que pode ser manipulado fotoperiodicamente produz flores duas vezes por ano.

No entanto, nem todas as espécies do gênero seguem rigorosamente os padrões descritos, como a *Cattleya walkeriana* Gardner. Esta espécie produz brotos na primavera, os quais se desenvolvem durante o verão e não florescem antes do outono. A *Cattleya walkeriana* é uma orquídea de pequeno porte, nativa e endêmica do Brasil, ocorrendo nos Biomas Cerrado e Amazônia, nas vegetações tipo Cerrado (lato sensu), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta de

Terra Firme, Floresta Estacional Decidual e Floresta Estacional Semidecidual (Figura 1) (REFLORA, 2020).

Figura 1 - Regiões de ocorrência de *Cattleya walkeriana* G.



FONTE: (REFLORA, 2020)

Considerada vulnerável, devido a coleta excessiva para o comércio e a pressão sobre seu habitat natural (BRASIL, 2022). É uma planta rizomatosa, suas hastes possuem de 1 a 3 flores, com pétalas e sépalas rosa escuro/rosa claro/lilás, com labelos trilobados curtos entre lobos medianos e base dos lobos laterais ou lobos medianos sésseis de cores lilás/rosa claro/rosa escuro (REFLORA, 2020).

Observações realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, mostra que a espécie e seus híbridos necessitam de um período de 3 a 4 anos, desde a germinação das sementes, para florescer (Figura 2). Uma planta oriunda de semente no momento do florescimento possui em média nove folhas distribuídas em quatro bulbos com duas folhas cada, e um bulbo floral com uma folha. O diâmetro médio do bulbo floral é de 9,48 mm, com uma folha de 55,76 mm de comprimento por 21,92 mm de largura. O maior bulbo possui em média 16,55 mm de diâmetro, sendo que o comprimento da maior folha é de 94,84 mm e 32,85 mm de largura. Após o desenvolvimento do botão floral, o tempo médio para desabrochar das flores é de 14 dias.

Figura 2 - *Cattleya walkeriana* G. em diferentes estágios de desenvolvimento da haste floral.



Fonte: Da autora (2023)

2.3. Indução do florescimento em orquídeas

A plantas que habitam ambientes sazonais possuem capacidade de combinar o tempo anual das principais transições de vida com a estação de crescimento local (BLACKMAN, 2017). Os indivíduos percebem o comprimento do dia, a temperatura, as mudanças de estações do ano como sugestões ambientais, passando a coletar estas informações e integrá-las molecularmente para os processos de germinação, floração e outras transições importantes durante períodos favoráveis ao crescimento, reprodução e produção de sementes (BLACKMAN, 2017)

Segundo estudos de Blázquez; Koornneef; Putterill (2001) com *Arabidopsis thaliana*, a reprodução sexual bem-sucedida depende do reconhecimento de condições ambientais favoráveis e da integração dessas informações com sinais de desenvolvimento endógenos. Os dois principais fatores ambientais que promovem a floração em *Arabidopsis* são os dias longos (fotoperíodo) e a exposição a baixas temperaturas (vernalização). Além disso, a via autônoma promove a floração em todas as condições, e a giberelina (GA₃) é necessária para a floração em condições não indutivas de dias curtos. Estas últimas vias funcionam independentemente das condições ambientais em *Arabidopsis*.

Em orquídeas não é totalmente claro o efeito destes fatores no processo de florescimento. Por serem amplamente distribuídas no mundo, apresentam mecanismos de controle da floração distintos entre os gêneros, estes mecanismos podem ter se desenvolvido de acordo com habitats naturais das plantas (WANG et al., 2019). Para algumas espécies temperatura e vernalização são descritos como possíveis indutores do processo de floração (WANG et al., 2019). Porém, nem sempre são encontradas semelhanças entre os efeitos destes fatores em plantas cultivadas *in vitro* em relação as cultivadas *ex vitro* (SILVA et al., 2014).

A temperatura pode ser usada para controlar o tempo de floração em culturas comerciais como a *Phalaenopsis*. O florescimento desta espécie é promovido pela baixa temperatura ambiente 25°C/20°C (dia/noite) e pode ser revertido com o aumento da temperatura (28°C) (LEE; AN; KIM, 2015).

Em *Dendrobium*, de maneira geral, a floração é promovida em baixa temperatura ambiente. Para *Dendrobium nobile*, Wang; Wang; Ye (2009) relatam que temperatura de 25 C° constante promove o florescimento de flores não perfeitas, no entanto, quando regime de temperatura é menor (23°C/18°C – dia/noite) ocorre o desenvolvimento de flores perfeitas. Em híbridos da espécie, como o *Dendrobium Chao Praya Smile* e *Dendrobium Madame Thong-In*, o florescimento ocorre em ambientes com alta temperatura (CAMPOS; KERBAUY, 2004; SILVA et al., 2014). Para o florescimento de *Cypripedium*, se faz necessária um período de vernalização abaixo de 5°C ou temperatura negativa para a floração (ZHANG et al., 2014).

Em relação às mudanças no comprimento do dia, as plantas às detectam como uma sugestão confiável para regular as transições importantes do desenvolvimento. Integração de várias ligações externas permitem que as plantas consigam medir as alterações do fotoperíodo no ambiente circundante (SHIM; KUBOTA; IMAIZUMI, 2017). Orquídeas de dia longo precisam do período de menos luz para a floração e orquídeas de dia curto não podem exceder o ponto crítico da luz mais longo, tendo o fotoperíodo um efeito significativo também na floração *in vitro* (SILVA et al., 2014).

Experimentos conduzidos com as espécies *Cymbidium kanran* e *Cymbidium ensifolium* demonstraram que a indução de flores *in vitro* é afetada com o fornecimento de luz (SILVA et al., 2014). Em *Psychmorchis pusilla* foi observado que o aumento da duração da luz contribui para maior formação de hastes florais (VAZ; FIGUEIREDO-RIBEIRO; KERBAUY, 2004). No entanto, (WANG et al., 2019) relatam que o efeito do fotoperíodo na floração de diferentes espécies de orquídeas é bastante variável devido a diversidade de adaptação, além da maioria das orquídeas serem nativas de áreas tropicais, onde a duração do dia não muda drasticamente ao longo do ano.

Em relação as vias que funcionam de forma independente às condições ambientais, o uso não só de giberilina, mas de outros hormônios vegetais, como as auxinas e citocininas, demonstram impactar no florescimento de orquídeas. Estudos relatados por Chandler (2011) demonstram que os hormônios são os principais transdutores de informação genética para desenvolvimento floral, sendo que o desenvolvimento das flores resulta do equilíbrio entre tamanho do meristema e coordenação da organogênese. Hormônios como citocinina, giberilina e auxina regulam o tamanho do meristema floral e desempenham papel fundamental na iniciação de órgãos (CHANDLER, 2011).

Os efeitos de hormônios vegetais foram estudados em diferentes condições experimentais e em espécies de orquídeas das famílias *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Doritaenopsis*, *Spathoglottis* e *Cymbidium*. Os resultados relatam efeitos variados em relação a aplicação de hormônios (SILVA et al., 2014; WANG et al., 2019). Em orquídeas monopodiais e simpáticas como *Phalaenopsis* e *Dendrobium*, citocininas sintéticas como o BAP, TDZ, 2iP estimulam o florescimento, enquanto auxinas sintéticas como o ANA suprimem o efeito (SILVA et al., 2014; WANG et al., 2019). No entanto a promoção do florescimento pela aplicação de BAP em *Doritaenopsis* e *Phalaenopsis*, depende de certas condições e não é um substituto eficaz para uma baixa temperatura indutiva nas espécies (BLANCHARD; RUNKLE, 2008).

A giberelina não induz a floração quando aplicada isoladamente, no entanto, é necessária uma quantidade suficiente de giberelina para ocorrer a floração (SILVA et al., 2014; WANG et al., 2019). Goh; Yang, (1978) e Hew; Clifford (1993), relatam que o GA₃ quando adicionada em combinação a citocinina (BAP) parece acelerar um pouco o efeito do fitohormônios. No entanto, em espécies de *Doritaenopsis* e *Phalaenopsis* o GA₃ não estimulou o efeito do BAP (BLANCHARD; RUNKLE, 2008). Quando utilizado de forma isolada na concentração de 125 mg L⁻¹ pulverizado por 2 vezes, o GA₃ induz o florescimento de *Phalaenopsis* (CARDOSO; ONO; RODRIGUES, 2012). Além disso, quando usada em plantas

em situação de estresse hídrico mostrou-se eficaz para híbridos de *Brassocattleya*, no entanto, em híbridos de *Cattleya* nas mesmas condições não promoveu o florescimento (CARDOSO; ONO; RODRIGUES, 2010), sendo o único estudo encontrados para o gênero.

De maneira oposta, o paclobutrazol age reduzindo a biossíntese de giberelina, contribuindo assim para inibir o crescimento vegetativo, promovendo a maturação das gemas e, conseqüentemente, favorecendo a floração. O paclobutrazol atua na inibição da síntese do ácido giberélico, promovendo mudanças morfofisiológica no crescimento das plantas, associando-se, ainda com a diminuição da transpiração, altura, biomassa e área foliar além do aumento da quantidade de clorofila.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseados nos objetivos de investigar se a disponibilidade hídrica, o fotoperíodo, a temperatura, a qualidade luminosa e o inibidor de giberelina influenciam na indução do florescimento de *Cattleya walkeriana* G. *in vitro*, e como estes fatores influenciam os eventos fisiológicos e bioquímicos da espécie. Obtivemos quanto aos fatores ambientais estudados que cultivar espécie em temperatura média de 24 °C, com fotoperíodo de 12 a 14 horas de luz propicia um crescimento expressivo, o que pode ser favorável para novos testes de indução ao florescimento na espécie e em outras plantas do gênero *Cattleya*. As condições hídricas analisadas de estresse provem o crescimento da espécie. A iluminação LED branca propicia maior crescimento vegetativo para espécie, propiciando maior acúmulo de H₂O₂ compreendido como sinalizador de crescimento nesta condição. A luz roxa, a partir da combinação monocromática do vermelho e do azul, propicia maior formação de clorofilas *a*, *b*, carotenoides e clorofilas totais, assim como, acúmulo equivalente de açúcares solúveis totais. O PBZ reduziu o número de folhas e raízes da espécie, bem como, o comprimento das raízes. Além disso, promove o aumento de parte aérea, brotos, acúmulo de carbono e, elevação das concentrações de superóxido dismutase, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e proteínas. A espécie não é responsiva aos fatores estudados para florescimento *in vitro*.

REFERENCIAS

- BARROS, F.; RODRIGUES, V. T.; BATISTA, J. A. N. Orchidaceae. Em: STEHMANN, J. R. et al. (Eds.). **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. p. 372–403.
- BLACKMAN, B. K. Changing Responses to Changing Seasons: Natural Variation in the Plasticity of Flowering Time. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 16–26, 3 jan. 2017.
- BLANCHARD, M. G.; RUNKLE, E. S. Benzyladenine Promotes Flowering in *Doritaenopsis* and *Phalaenopsis* Orchids. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 27, n. 2, p. 141–150, 26 jun. 2008.
- BLÁZQUEZ, M.; KOORNNEEF, M.; PUTTERILL, J. Flowering on time: genes that regulate the floral transition. **EMBO reports**, v. 2, n. 12, p. 1078–1082, 12 dez. 2001.
- BRASIL. **Portaria do Ministério do Meio Ambiente Número 148. Diário Oficial da Uniao** <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>, 7 jun. 2022.
- CAMPOS, K. O.; KERBAUY, G. B. Thermoperiodic effect on flowering and endogenous hormonal status in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 12, p. 1385–1387, dez. 2004.
- CARDOSO, J. C.; ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 169–173, jun. 2005.
- CARDOSO, J. C.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Gibberellic acid and water regime in the flowering induction of *Brassocattleya* and *Cattleya* hybrid orchids. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 395–398, dez. 2010.
- CARDOSO, J. C.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Ácido giberélico na indução e qualidade do florescimento de orquídea *Phalaenopsis* ‘White Dream’. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 18, n. 2, p. 135, 17 jun. 2012.
- CHANDLER, J. W. The Hormonal Regulation of Flower Development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 2, p. 242–254, 12 jun. 2011.
- CHIU, Y.-T.; CHANG, C. *In Vitro* Flowering and Breeding of *Erycina pusilla*. Em: LEE, Y.-I.; YEUNG, E. C.-T. (Eds.). **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses - Methods and Protocols**. New York: Humana Press, 2018. p. 257–265.
- CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201, 20 maio 2016.
- EVANS, A.; JACQUEMYN, H. Range Size and Niche Breadth as Predictors of Climate-Induced Habitat Change in *Epipactis* (Orchidaceae). **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 338, 15 abr. 2022.

EVANS, A.; JANSSENS, S.; JACQUEMYN, H. Impact of Climate Change on the Distribution of Four Closely Related Orchid (Orchidaceae) Species. **Diversity**, v. 12, n. 8, p. 312, 13 ago. 2020.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil - Vol. 2**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 2

GALDIANO JUNIOR, R. F. et al. Seed cryopreservation, *in vitro* propagation and *ex vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner, a vulnerable ornamental orchid. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 04, p. 485–490, 20 abr. 2017.

GOH, C. J.; YANG, A. L. Effects of growth regulators and decapitation on flowering of *Dendrobium* orchid hybrids. **Plant Science Letters**, v. 12, n. 3–4, p. 287–292, ago. 1978.

HEW, C. S.; CLIFFORD, P. E. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. **Plant Growth Regulation**, v. 13, n. 3, p. 231–239, out. 1993.

HEW, C. S.; YONG, J. W. H. **The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry**. [s.l.] WORLD SCIENTIFIC, 2004.

HINSLEY, A. et al. A review of the trade in orchids and its implications for conservation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 186, n. 4, p. 435–455, 27 mar. 2018.

LEE, H. B.; AN, S. K.; KIM, K. S. Inhibition of premature flowering by intermittent high temperature treatment to young Phalaenopsis plants. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, n. 5, p. 618–625, 4 out. 2015.

LI, W.-N. et al. Predicting the Potential Distribution of the Endangered Plant *Cremastra appendiculata* (Orchidaceae) in China under Multiple Climate Change Scenarios. **Forests**, v. 13, n. 9, p. 1504, 16 set. 2022.

LIU, H. et al. The Impact of Human Pressure and Climate Change on the Habitat Availability and Protection of *Cypripedium* (Orchidaceae) in Northeast China. **Plants**, v. 10, n. 1, p. 84, 2 jan. 2021.

PIVETTA, K. F. L. et al. Orquídeas. Em: PAIVA, P. D. DE O.; ALMEIDA, E. F. A. (Eds.). **Produção de Flores de Corte**. 1. ed. Lavras: Editora UFLA, 2014. v. 2p. 454–510.

PUJARI, I.; SANKAR BABU, V. Precocious *in vitro* flowering in threatened ornamental orchid, *Dendrobium ovatum* – Decoding the causal factors. **Current Plant Biology**, v. 31, p. 100257, 1 set. 2022.

REFLORA. **Herbário Virtual**. Disponível em: <<https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

SCHNEIDERS, D. et al. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185–191, abr. 2012.

SHEEHAN, T. J. Orchids. Em: **Introduction to Floriculture**. [s.l.] Elsevier, 1992. p. 113–142.

- SHIM, J. S.; KUBOTA, A.; IMAIZUMI, T. Circadian Clock and Photoperiodic Flowering in *Arabidopsis*: CONSTANS Is a Hub for Signal Integration. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 5–15, 1 jan. 2017.
- SILVA, J. A. T. DA et al. *In vitro* flowering of orchids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 56–76, 24 mar. 2014.
- ŚLIWIŃSKI, T. et al. Orchidaceae-Derived Anticancer Agents: A Review. **Cancers**, v. 14, n. 3, p. 754, 31 jan. 2022.
- SMALLWOOD, P. A.; TRAPNELL, D. W. Species Distribution Modeling Reveals Recent Shifts in Suitable Habitat for Six North American *Cypripedium* spp. (Orchidaceae). **Diversity**, v. 14, n. 9, p. 694, 23 ago. 2022.
- TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S.; GOIS, E. DE A. **Técnicas em substratos para floricultura**. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2013.
- TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S.; PIVETTA, K. F. L. **Cultivo Moderno de Orquídeas – Cattleya e seus híbridos**. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2010.
- VAZ, A. P. A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. DE C. L.; KERBAUY, G. B. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 411–415, maio 2004.
- WANG, S.-L. et al. Floral Induction and Flower Development of Orchids. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 10 out. 2019.
- WANG, Z. H.; WANG, L.; YE, Q. S. High frequency early flowering from *in vitro* seedlings of *Dendrobium nobile*. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 2, p. 328–331, set. 2009.
- YUAN, S.-C. et al. The Global Orchid Market. p. 1–28, 2021.
- ZHANG, D. et al. Advances and prospects of orchid research and industrialization. **Horticulture Research**, v. 9, 5 jan. 2022.
- ZHANG, Y. et al. Flowering phenology and reproductive characteristics of *Cypripedium macranthos* (Orchidaceae) in China and their implication in conservation. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 4, p. 1303–1308, 2014.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO I – FATORES AMBIENTAIS NA INDUÇÃO DO FLORESCIMENTO *in vitro* EM *Cattleya walkeriana* G.

Resumo

Utilizar mecanismos que possam acelerar o período de florescimento é desejável para o mercado de orquídeas. Buscamos investigar o comportamento fisiológico e bioquímico da *Cattleya walkeriana* G. frente aos fatores ambientais relacionados à temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica, e se estes fatores influenciam na indução do florescimento da espécie *in vitro*. As plantas, oriundas de sementeira *in vitro*, após 6 meses de cultivo foram transferidas para condições de 26, 24, 20,5 e 17°C, 10, 12, 14 e 16 h de luz, e disponibilidade hídrica de 0, 2,75, 5,50, 8,25 e 11 g L⁻¹. Após 3 meses foram analisados os parâmetros de crescimento, do aparelho fotossintético, do metabolismo antioxidante, e do metabolismo de carboidratos. Temperaturas aproximadas de 24°C propiciaram melhor desenvolvimento geral de parte aérea e raiz, mensurados pelas análises fitotécnicas. Fortalecendo estes resultados, foi verificado que ocorreu um aumento na produção de clorofilas *a*, *b*, totais e carotenoides com o aumento da temperatura, e a redução do fotoperíodo e da disponibilidade hídrica. O conteúdo de H₂O₂ não apresentou valores significativos para as três situações estudadas. As plantas que estavam em fotoperíodo de 12 h de luz apresentaram maior conteúdo de SOD. Os teores desta enzima também foram maiores com o aumento da restrição hídrica. Os níveis de açúcares solúveis totais reduziram com o aumento de temperatura, e a concentração de açúcares redutores aumentou quanto maior a restrição hídrica. Com relação ao conteúdo de proteínas, houve um aumento com a maior quantidade de horas de luz. Por fim, os fatores ambientais estudados não foram suficientes para induzir o florescimento *in vitro* na espécie. No entanto, visando o crescimento mais expressivo, o que pode ser favorável para novos testes de indução ao florescimento da espécie, a orquídea *Cattleya walkeriana* pode ser mantida em sala de crescimento com temperatura média de 26°C, com fotoperíodo de 12 a 14 horas de luz, e em meio líquido (0 mg L⁻¹ de ágar).

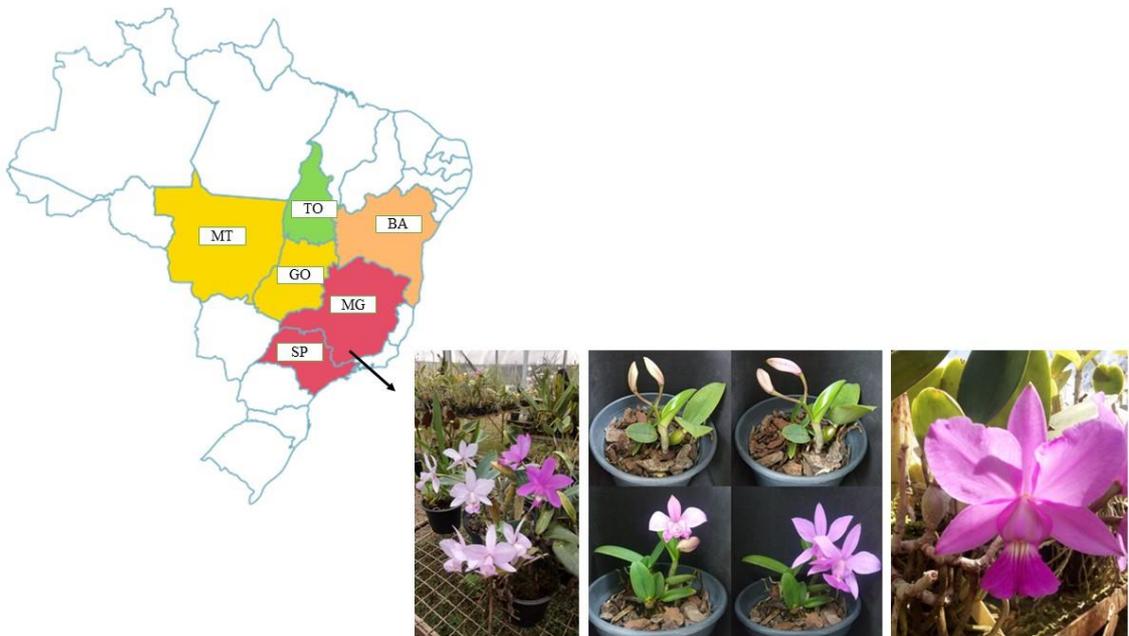
PALAVRAS-CHAVE: Disponibilidade Hídrica; Fotoperíodo; Temperatura; Orchidaceae; Plantas ornamentais.

1. Introdução

A família Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificadas do reino vegetal. Dentro desta família, inúmeras espécies possuem alto valor ornamental, sendo classificadas como flores tropicais nobres. As orquídeas do gênero *Cattleya* L. são flores muito apreciadas por sua variedade de cores, formas e tamanhos. Diversas espécies compõem este gênero, dentre elas, a *Cattleya walkeriana* G. (REFLORA, 2020)

Esta é uma orquídea de pequeno porte, espécie nativa e endêmica do Brasil, de alto potencial ornamental de ocorrência nos Biomas do Cerrado e Amazônia, nas vegetações tipo Cerrado (*lato sensu*), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta de Terra Firme, Floresta Estacional Decidual e Floresta Estacional Semidecidual (Figura 1) (REFLORA, 2020). Além disso, devido a grande procura por colecionadores, os impactos das mudanças climáticas sobre os biomas e o avanço do cultivo agrícola sobre estas localidades, a *C. walkeriana* encontra-se na lista de plantas vulneráveis (BRASIL, 2022).

Figura 1 - *Cattleya walkeriana* G. e suas regiões de ocorrência compreendendo os biomas da Amazônia (estado do Mato Grosso - MT), Cerrado (estados de Mato Grosso - MT, Goiás - GO, Tocantins - TO, Bahia - BA e Minas Gerais - MG), e Mata Atlântica (estados de Minas Gerais - MG e São Paulo - SP).



FONTE: (REFLORA, 2020)

Uma das maneiras de preservar as espécies de orquídeas, é disponibilizá-las ao mercado consumidor. Nesse sentido, protocolos de multiplicação *in vitro*, estudos de aclimatização e de desenvolvimento em vasos são desenvolvidos e ainda necessitam ser aprimorados. Outra demanda diz respeito ao fato que a grande parte das orquídeas possuem um longo período de juvenilidade, o que encarece a produção e conseqüentemente a comercialização destas plantas, além de afetar os processos tradicionais de melhoramento genético. Utilizar mecanismos que possam acelerar este período induzindo o processo de florescimento é desejável para o mercado. Apesar dos avanços nos estudos sobre o tema de florescimento e o uso de técnicas que promovam a indução floral, muitos fenômenos envolvidos nesse processo ainda são incipientes (PUJARI; SANKAR BABU, 2022), e para muitos gêneros comercializados não há estudos na literatura, como é o caso das *Cattleyas*.

Para diversas espécies que habitam ambientes sazonais a floração ocorre por meio da capacidade que as plantas possuem de combinar o tempo anual das principais transições de vida com a estação de crescimento local. Os indivíduos percebem o comprimento do dia, a temperatura, as mudanças de estações do ano como sugestões ambientais, passando a coletar estas informações e integrá-las molecularmente para os processos de germinação, floração e outras transições importantes durante períodos favoráveis ao crescimento, reprodução e produção de sementes (BLACKMAN, 2017).

As *Cattleyas* são orquídeas cosmopolitas, estando distribuídas em diversas partes do mundo. Por serem amplamente distribuídas no mundo, apresentam mecanismos de controle da floração distintos entre os gêneros, estes mecanismos podem ter se desenvolvido de acordo com habitats naturais das plantas (WANG et al., 2019). Para algumas espécies de orquídeas a temperatura e vernalização são descritos como possíveis indutores do processo de floração (WANG et al., 2019). Porém, nem sempre são encontradas semelhanças entre os efeitos destes fatores em plantas cultivadas *in vitro* em relação às cultivadas *ex vitro* (SILVA et al., 2014).

A temperatura pode ser usada para controlar o tempo de floração em culturas comerciais como a *Phalaenopsis*. O florescimento desta espécie é promovido pela baixa temperatura ambiente 25°C/20°C (dia/noite) e pode ser revertido com o aumento da temperatura (28°C) (LEE; AN; KIM, 2015).

Em *Dendrobium*, de maneira geral, a floração é promovida em baixa temperatura ambiente. Para *Dendrobium nobile*, Wang; Wang; Ye (2009) relatam que temperatura de 25 C° constante promove o florescimento de flores não perfeitas, no entanto, quando regime de temperatura é menor (23°C/18°C – dia/noite) ocorre o desenvolvimento de flores perfeitas. Em híbridos da espécie, como o *Dendrobium Chao Praya Smile* e *Dendrobium Madame Thong-In*,

o florescimento ocorre em ambientes com alta temperatura (CAMPOS; KERBAUY, 2004; SILVA et al., 2014). Para o florescimento de *Cypripedium*, se faz necessário um período de vernalização abaixo de 5°C ou temperatura negativa para a floração (ZHANG et al., 2014).

Em relação às mudanças no comprimento do dia, as plantas as detectam como uma sugestão confiável para regular as transições importantes do desenvolvimento. Integração de várias ligações externas permitem que as plantas consigam medir as alterações do fotoperíodo no ambiente circundante (SHIM; KUBOTA; IMAIZUMI, 2017). Orquídeas de dia longo precisam do período de menos luz para a floração e orquídeas de dia curto não podem exceder o ponto crítico da luz mais longo, tendo o fotoperíodo um efeito significativo também na floração *in vitro* (SILVA et al., 2014).

Experimentos conduzidos com as espécies *Cymbidium kanran* e *Cymbidium ensifolium* demonstraram que a indução de flores *in vitro* é afetada com o fornecimento de luz (SILVA et al., 2014). Em *Psychmorchis pusilla* foi observado que o aumento da duração da luz contribui para maior formação de hastes florais (VAZ; FIGUEIREDO-RIBEIRO; KERBAUY, 2004). No entanto, Wang et al., (2019) relatam que o efeito do fotoperíodo na floração de diferentes espécies de orquídeas é bastante variável devido à diversidade de adaptação, além da maioria das orquídeas serem nativas de áreas tropicais, onde a duração do dia não muda drasticamente ao longo do ano.

Outro fator que influencia no florescimento de orquídeas é a disponibilidade hídrica. Algumas espécies crescem em ambientes úmidos e, portanto, precisam de uma quantidade adequada de água para florescerem adequadamente. Outras espécies, passam por pequenos períodos de escassez hídrica, que são naturais do seu ambiente. Em resposta a esses estresses, as plantas podem aumentar a produção de hormônios vegetais que podem induzir o florescimento (TAIZ et al., 2017).

Diante destas diferenças, tivemos como objetivo investigar o comportamento fisiológico e bioquímico da *Cattleya walkeriana* G. frente aos fatores ambientais relacionados à temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica, e se estes fatores influenciam na indução do florescimento da espécie *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

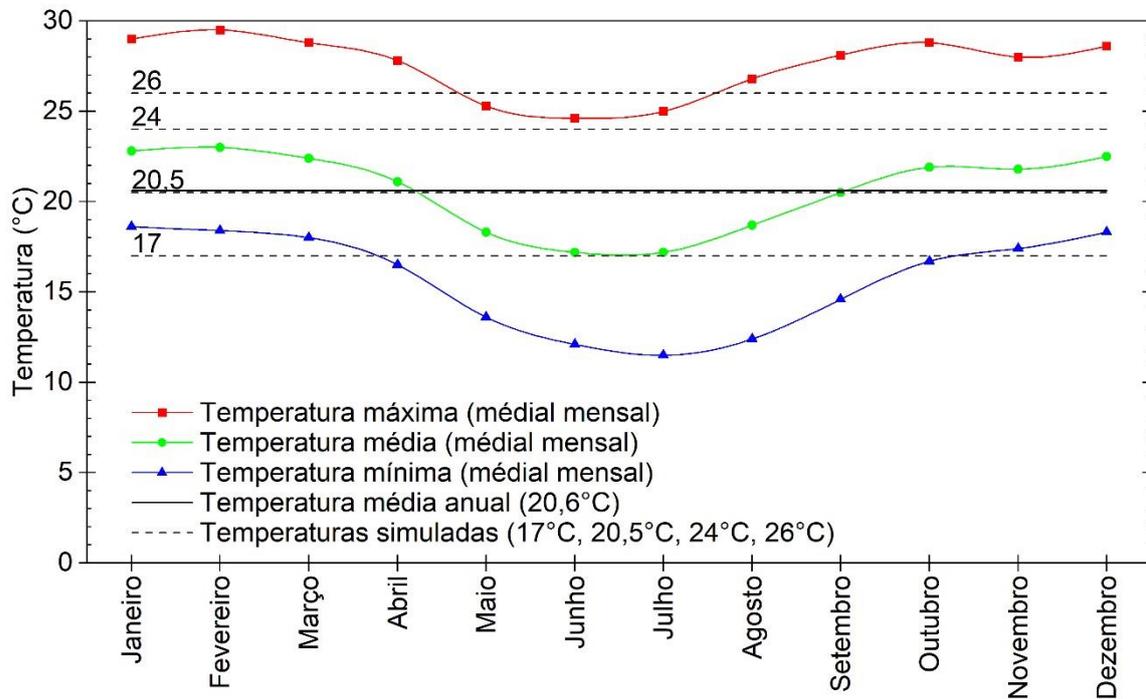
Material vegetal

Foram coletadas cápsulas de sementes de plantas matrizes com idade dez anos de *C. walkeriana*, mantidas no orquidário da Universidade Federal de Lavras. As sementes foram germinadas no meio de cultura Knudson (KNUDSON, 1946), acrescido com 20 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar, 1% de carvão ativado, e 100 mL L⁻¹ água de coco, com ajuste de pH 5,8. Após quatro meses, as plântulas com média de 1.5 ±1 cm foram transferidas para novo meio e cultivadas por seis meses em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 26°C e intensidade luminosa de 27 μmol m⁻² s⁻¹ para instalação dos experimentos. Ao final dos seis meses as plantas possuem, em média, 3 ±1 cm de comprimento de parte aérea.

Delineamento experimental do ensaio de temperatura

A partir das Normais Climatológicas de 1991 a 2020 (Figura 2) para a cidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET, 2022) foram definidas as quatro temperaturas para este estudo. Foram simuladas três temperaturas em BOD, que se assemelhassem a máxima e mínima temperatura média mensal (24°C e 17°C) e outra próxima a temperatura média anual (20,5°C). Além disto, foi utilizada como testemunha a temperatura usual de salas de crescimento (26°C). As plantas permaneceram por três meses as plantas permaneceram nestas temperaturas. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com 12 repetições de cada tratamento. Cada repetição foi composta por uma planta.

Figura 2 – Temperaturas máximas, médias e mínimas (médias mensais) ao longo do ano e temperatura média anual para Lavras, Minas Gerais, Brasil (Normais Climatológicas - 1991 - 2020) e temperaturas utilizadas no estudo.

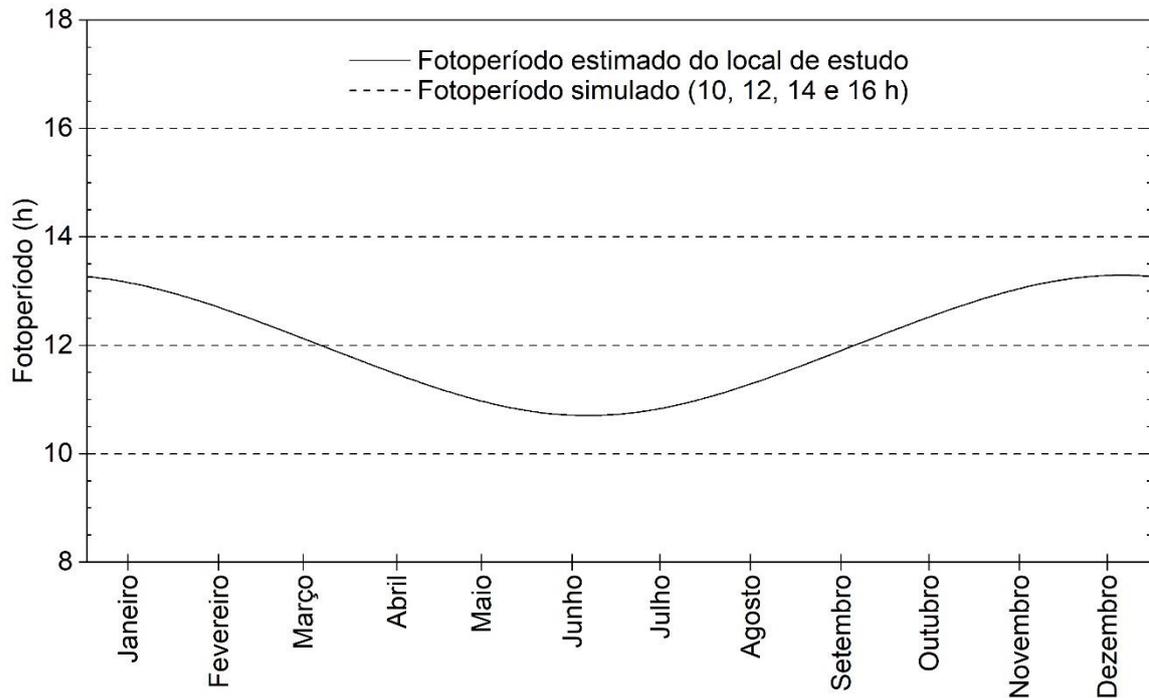


Fonte: (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET, 2022).

Delineamento experimental do ensaio de fotoperíodo

A partir da metodologia proposta por (LIGR; RON; NATR, 1995), foi estimulado o fotoperíodo para a região de ocorrência da espécie (Figura 3), sendo então definidos os fotoperíodos utilizados neste ensaio. Por três meses as plantas permaneceram em BOD nas condições de 10, 12 e 14 h de luz, a testemunha permaneceu em na sala de crescimento com 16 h de luz. A temperatura padrão utilizada foi de 26°C, temperatura padrão da sala de crescimento. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com 12 repetições de cada tratamento.

Figura 3 - Fotoperíodo em horas ao longo do ano para Lavras, Minas Gerais, Brasil.

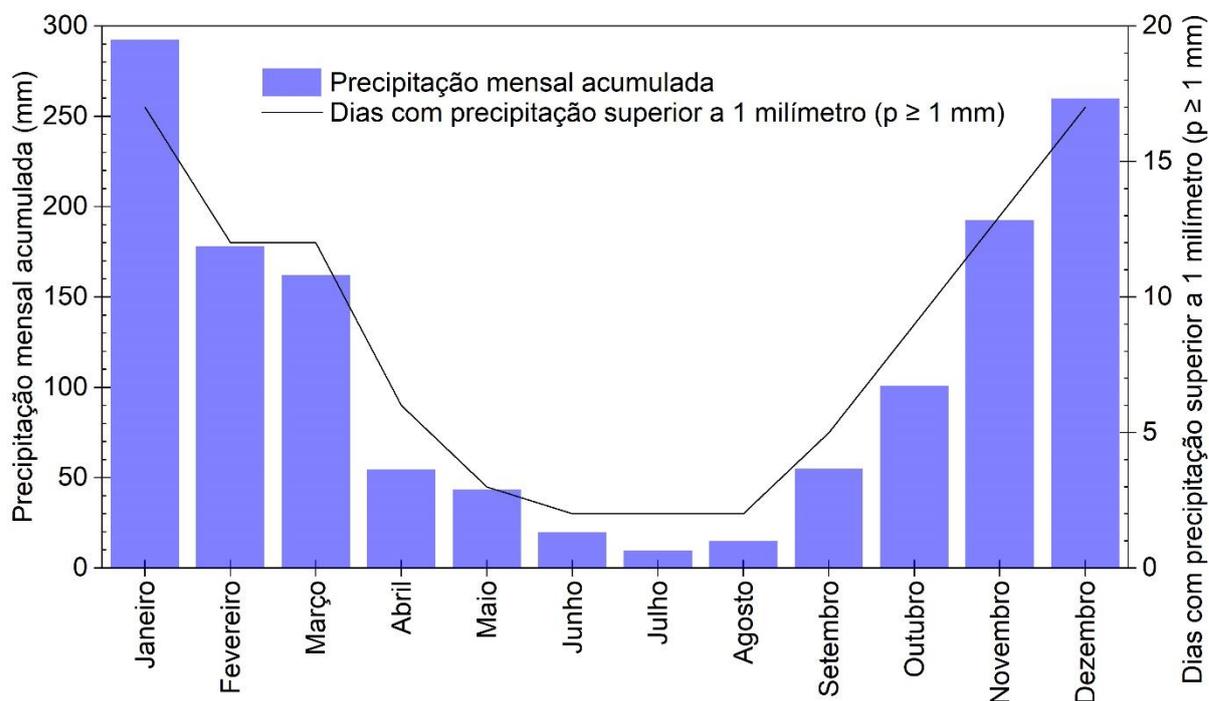


Fonte: Da Autora (2023)

Delineamento experimental do ensaio de estresse hídrico

A partir das Normais Climatológicas de 1991 a 2020 (Figura 4) para a cidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET, 2022) foram definidas as condições hídricas utilizadas no ensaio. As plantas foram cultivadas no meio Knudson (KNUDSON, 1946), acrescido com 20 g L⁻¹ de sacarose, 1% de carvão ativado, e 100 mL L⁻¹ água de coco, com ajuste de pH 5,8, como tratamentos foram utilizadas as concentrações de ágar de 0; 2,75; 5,50; 8,25 e 11 g L⁻¹ por três meses. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com 12 repetições de cada tratamento.

Figura 4 - Precipitação acumulada mensal e número de dias com precipitação efetiva ($p \geq 1$ mm) para Lavras, Minas Gerais, Brasil (Normais Climatológicas - 1991 - 2020).



FONTE: (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET, 2022)

Análises morfométricas

Foram avaliados a ocorrência de formação de estruturas florais (haste floral, botões e flores), o número de folhas, brotos e raízes; comprimento de parte aérea (mm), brotos (mm) e maior raiz (mm); massa fresca e seca de parte aérea e raízes (g). Foi utilizado um paquímetro digital para as medidas de comprimento. Para massa fresca e seca de parte aérea e de raiz utilizou-se uma balança de precisão, e a massa seca foi avaliada após secagem em estufa de ventilação forçada à temperatura de 65°C por 24 horas.

Conteúdo de clorofilas

Para determinar o teor de clorofila, foi realizada a extração conforme descrito por Engel e Poggiane (1991) a partir de 0,05 g de matéria fresca homogeneizada em 5 mL de acetona 80%, seguida de leitura em espectrofotômetro a 470, 645 e 652 nm para clorofila a e b e carotenoides, respectivamente.

Caracterização bioquímica não enzimática: quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para a análise utilizou-se três amostras biológicas, com três repetições técnicas, de cada tratamento empregado. As amostras eram compostas por todas as partes de uma planta inteira (folhas, bulbos e raiz).

Foram maceradas 0,2 g de material vegetal de cada amostra biológica em nitrogênio líquido. Estas amostras foram homogeneizadas em 1,5 mL de TCA e centrifugadas, a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. A partir do sobrenadante obtido, o H₂O₂ foi determinado medindo a absorvância a 390 nm em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

Caracterização bioquímica enzimática: Dismutase do superóxido (SOD); Catalase (CAT) e Peroxidase do ascorbato (APX)

Para a análise utilizou-se três amostras biológicas, com três repetições técnicas, de cada tratamento utilizado. As amostras eram compostas por todas as partes de uma planta inteira (folhas, bulbos e raiz).

Foram maceradas 0,2 g de material vegetal de cada amostra biológica em nitrogênio líquido. Estas amostras foram. Ao extrato obtido através da maceração, foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µL de EDTA 0,1M (pH 7,0), 6 µL de DDT 0,5 M, 12 µL de PMSF 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C para análises da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELET et al.,1998).

As atividades da enzima SOD foram avaliadas pela capacidade de inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazolio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A 100 µL do extrato enzimático foram adicionados 1,9 mL do meio de incubação: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NB 75 µM e riboflavina 2 µM.

As amostras foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W (o controle foi mantido no escuro e sem a adição do extrato). Após 10 minutos, as amostras foram lidas em 560 nm e o cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando a equação: % de inibição =

(A560 amostra com o extrato enzimático – A560 controle sem enzima) / A560 controle sem enzima.

A atividade da enzima CAT foi avaliada utilizando uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático onde será adicionado 950 μL de meio de incubação contendo: 500 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 μL de peróxido de hidrogênio 12,5 Mm, incubados a 28°C (HAVIR; MCHALE, 1987). A cada 15 segundos, durante três minutos, foram avaliados o decaimento da absorbância, a 240 nm, pelo consumo do peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar foi de 36 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

A atividade da enzima APX foi determinada utilizando uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático onde será adicionado 950 μL de meio de incubação contendo: 500 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 μL de ácido ascórbico 10 Mm e 50 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). A cada 15 segundos, durante três minutos, foi avaliada a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm onde foi determinado o coeficiente de extinção molar 2,8 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Caracterização de macro e micromoléculas: proteínas, açúcar solúveis totais e açúcares redutores

Foi utilizado protocolo descrito por (ZANANDREA et al., 2009). Foram utilizadas três repetições de 0,2 g de amostra seca de cada amostra biológica. O material foi triturado e colocado e serão adicionados 5 mL de tampão de potássio 0,1 M pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40°C. Posteriormente foi centrifugado a 10.000 g durante 20 minutos. Esse processo foi repetido uma vez e o sobrenadante combinado (obtendo um volume final de extrato de 10 mL). As alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para análise de açúcar solúveis totais, açúcares redutores, e proteínas. Para a análise utilizou-se três amostras biológicas, com três repetições técnicas, de cada tratamento empregado. As amostras eram compostas por todas as partes de uma planta inteira (folhas, bulbos e raiz).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk (ROYSTON, 1992), e os outliers foram identificados através do teste de Grubbs e eliminados do grupo de dados (GRUBBS, 1950). Foi realizada uma análise de regressão linear, determinando-se a significância da regressão em si e dos coeficientes do modelo de

regressão. O modelo de regressão (primeiro ou segundo grau) foi determinado através do teste de significância para variáveis extras (HOWELL, 2010). Para análise dos dados foi utilizado o software Microsoft Office Excel[®] com pacote de recursos Real Statistics - Release 8.4 (ZAIONTZ, 2020).

3. Resultados e Discussão

De maneira geral, os fatores ambientais estudados, nos tratamentos sugeridos, não foram suficientes para induzir o florescimento *in vitro* na espécie. No entanto, observações puderam ser feitas quanto ao comportamento da espécie frente às condições de temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica, o que pode auxiliar na otimização de protocolos de cultivo *in vitro* para novos testes de indução ao florescimento para espécie.

Em todos os tratamentos testados houve sobrevivência de 100% das plantas. Com relação ao número de brotos formados, a temperatura e o fotoperíodo tiveram uma influência significativa, com o aumento da temperatura e das horas de luz aumentou-se a formação dos brotos. A 26°C e a 16 horas de luz a formação de, em média, de 4 a 6 brotos, por planta. As variações de disponibilidade hídrica não foram significativas para a formação de brotações (Figura 2). As brotações são importantes em diversas espécies de orquídeas, não só para formação de novas mudas, como para formação das hastes florais (NADAL et al., 2022; PUJARI; SANKAR BABU, 2022). Observações em estufa realizadas com a espécie mostram a necessidade de um crescimento vegetativo vigoroso, com variações de 4 a 5 brotações, para então o surgimento de brotos florais, de onde se formam as hastes florais.

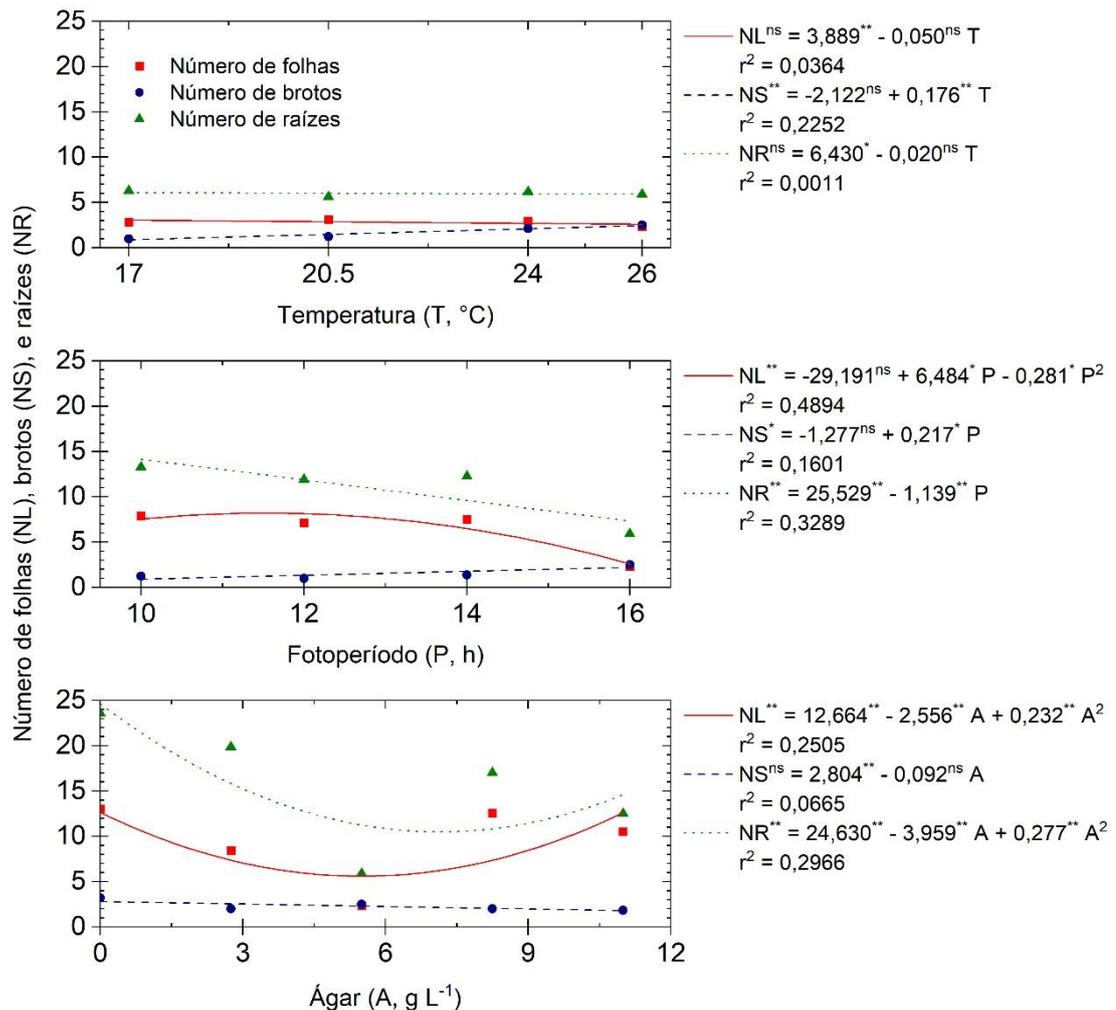
Com relação ao número de folhas e raízes, este não foi alterado significativamente pela temperatura. No entanto, com a variação de fotoperíodo observou-se um ponto de máxima eficiência para formação de folhas, entre 12 e 14 h de luz. Em contraponto, o número de raízes reduz com o aumento das horas de luz, sendo que 10 horas de luz propicia formação significativa de, em média, 13 raízes. Ao analisarmos a disponibilidade hídrica, observamos um ponto de mínima eficiência na concentração de ágar habitualmente utilizada nos protocolos (5,5 mg L⁻¹), os pontos de maior eficiência foram nas situações de excesso hídrico (0 mg L⁻¹ de ágar) e falta hídrica (cerca de 11 mg L⁻¹ de ágar) (Figura 5).

As duas situações, excesso e escassez hídrica, aumentaram os níveis de algumas moléculas sinalizadoras tendo como resultado o aumento de parte aérea e raiz nas situações extremas. Além disso, é amplamente reconhecida a influência da temperatura, do fotoperíodo e da disponibilidade hídrica para o desenvolvimento vegetal. Estes fatores desempenham papéis

de regulação de diversos processos ao longo do crescimento e desenvolvimento das plantas (TAIZ et al., 2017). Quando totalmente desenvolvidos, estes sinais passam a atuar na complexa rede regulatória das plantas, que integra sinais exógenos e endógenos convergindo-os para regular genes, os quais codificam estímulos necessários para a indução floral (BAO et al., 2019; LIU; ZHANG; YU, 2020).

Em laboratórios de cultura de tecidos vegetais, comumente são utilizados temperatura e fotoperíodo padrão para a maioria das espécies que são cultivadas e distribuídas pelo local. Ao analisarmos as condições para um crescimento ótimo desta orquídea, alguns ajustes poderiam ser realizados para expressão máxima do seu crescimento em menor tempo, talvez assim, acelerando o processo de juvenildade.

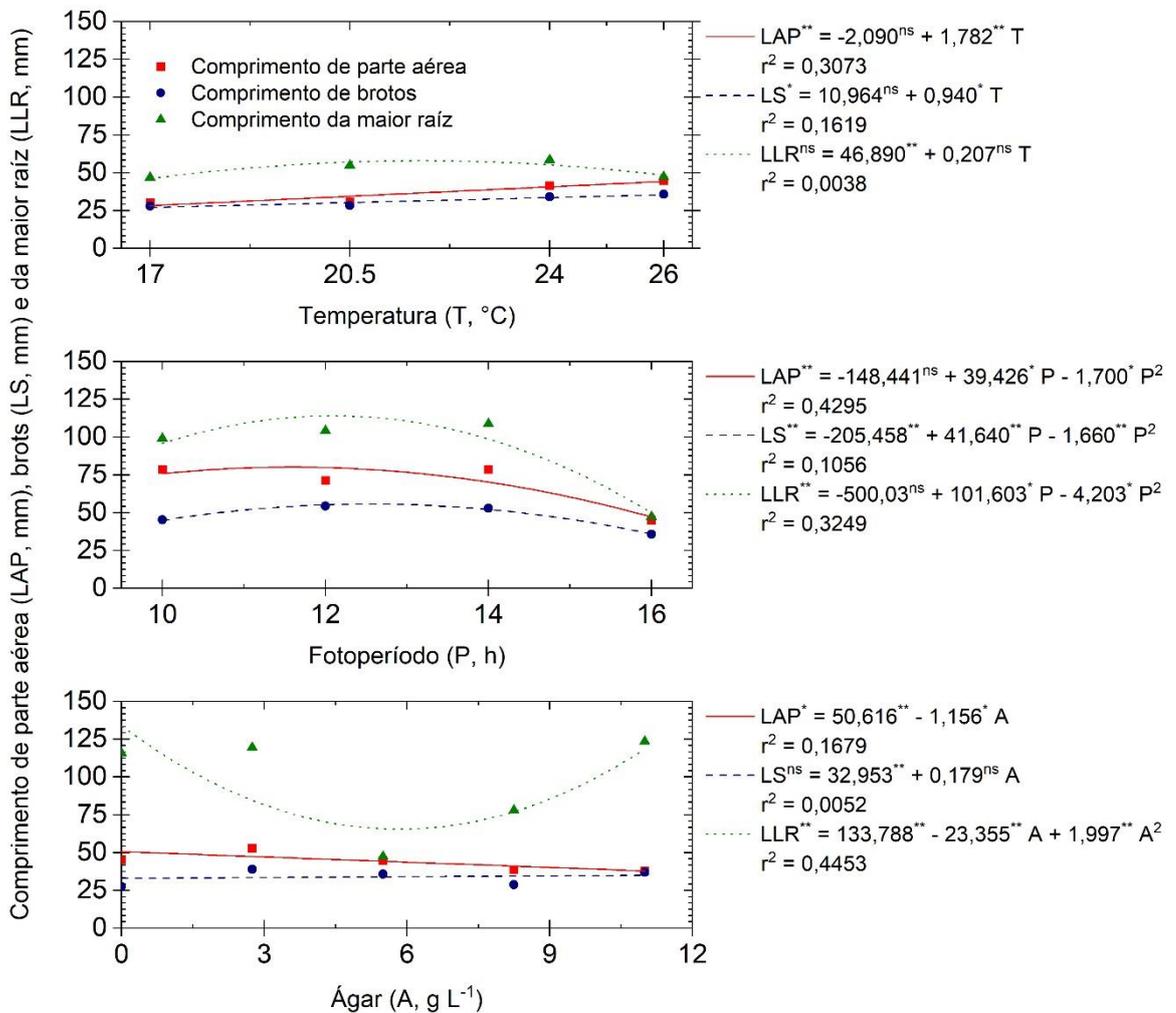
Figura 5 - Número de folhas (NL), brotos (NS) e raízes (NR) de *Cattleya walkeriana* cultivadas in vitro em função da variação de temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica (porcentagem de ágar).



Fonte: Da autora (2023)

Com o aumento de temperatura ocorreu o aumento do comprimento de parte aérea e brotos, sendo que 26 °C propiciaram um comprimento médio de 40 mm para estas variáveis. A temperatura não apresentou efeito significativo sobre o comprimento das raízes. O fotoperíodo também não apresentou efeito significativo para comprimento de parte aérea, no entanto, 12 h de luz propiciou máxima eficiência para maior comprimento de brotos e raízes. Quanto à disponibilidade hídrica, o comprimento de parte aérea reduziu com a restrição hídrica aumentou, e o comprimento de raiz aumenta com a restrição hídrica (Figura 6).

Figura 6 - Comprimento de parte aérea (LAP), brotos (LS) e da maior raiz (LLR) de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* em função da variação de temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica (porcentagem de ágar).



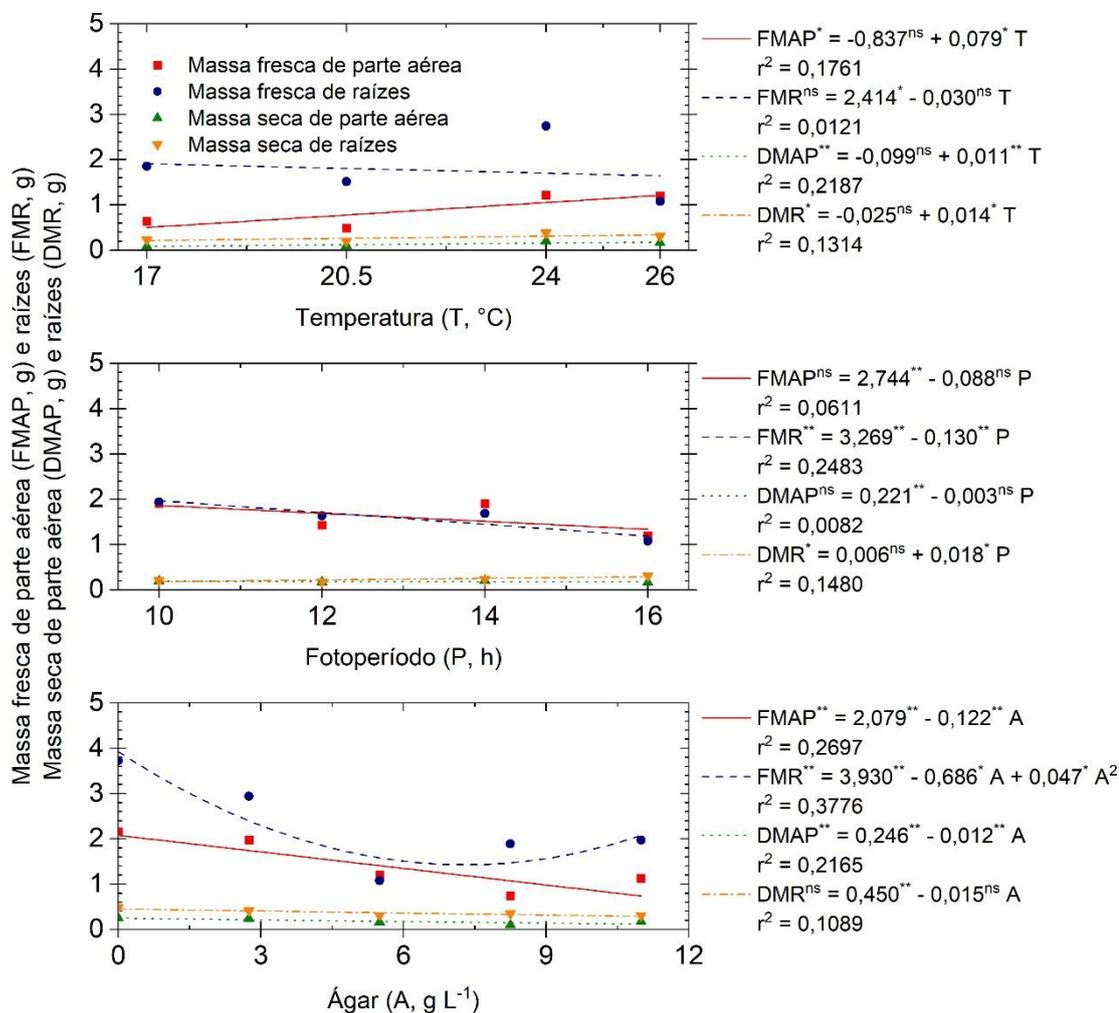
Fonte: Da autora (2023)

Quando observamos o conteúdo de água das plantas, através da massa fresca, e o acúmulo de carbono, através da massa seca, notamos que o aumento da temperatura propiciou maior acúmulo de massa fresca e seca de parte aérea e massa seca de raiz. No entanto, a redução da temperatura aumentou a massa fresca das raízes. Podemos inferir, por este resultado, que a temperatura de 26°C não é prejudicial à espécie, no entanto, o uso de temperaturas medianas, como 24°C propiciam resultados equilibrados de massa fresca e seca entre parte aérea e raiz.

Com relação ao fotoperíodo, o aumento do número de horas de luz promove maior acúmulo de massa seca de raiz, e a redução do acúmulo de massa fresca e seca de parte aérea, e de massa fresca de raiz. Nesse sentido, o ponto de equilíbrio entre parte aérea e raiz encontra-se entre 10 e 12 horas de luz. Outras espécies de orquídeas, como *Phalaenopsis*, fotoperíodos maiores aumentam o crescimento geral da planta, e apesar de fotoperíodos maiores não induzirem o início da floração, eles aumentam o número de inflorescências das plantas posteriormente (LEE et al., 2019).

A redução da disponibilidade hídrica diminui o acúmulo de massa fresca e seca de parte aérea e massa fresca de raiz. Para massa seca de raiz, ocorre um acúmulo maior nos pontos de máxima disponibilidade (0 mg L⁻¹ de ágar) e de mínima disponibilidade (11 mg L⁻¹ de ágar) (Figura 7). Algumas espécies vegetais florescem em respostas em situações de restrição hídrica, no entanto, apesar de na natureza a *C. walkeriana* florescer em um momento ambiental de seca, este fator em isolado, não induz o florescimento *in vitro*.

Figura 7 - Massa fresca de parte aérea (FMAP), massa fresca de raiz (FMR), massa seca de parte aérea (DMAP), massa seca de raiz (DMR) de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* em função da variação de temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica (porcentagem de ágar).

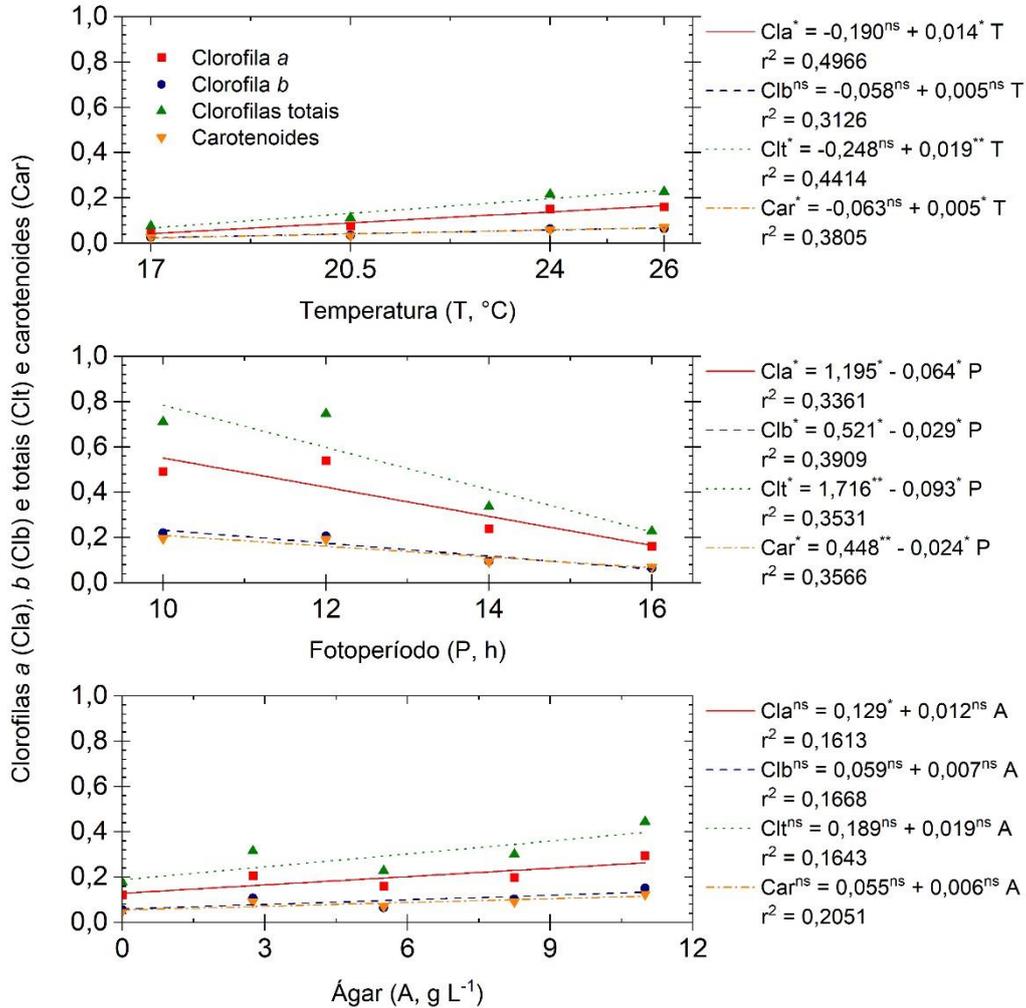


Fonte: Da autora (2023)

Quanto aos teores de clorofilas, houve um aumento na produção de clorofilas a, b, totais e carotenoides com o aumento da temperatura, e a redução do fotoperíodo e da disponibilidade hídrica (11 mg L⁻¹ de ágar) (Figura 8).

Corroborando com os demais resultados observados, o aumento da quantidade de pigmentos reflete no melhor desenvolvimento das plantas. Os pigmentos fotossintéticos possuem um papel fisiológico fundamental, pois são os receptores de luz, elemento básico para fotossíntese vegetal (TAIZ et al., 2017). Adequados índices de temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica contribuem para que a maquinaria vegetal funcione em harmonia e de maneira eficaz.

Figura 8 - Teor de clorofilas *a* (Cla), *b* (Clb), totais (Ct) e carotenoides (Car) de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* em função da variação de temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica (porcentagem de ágar).

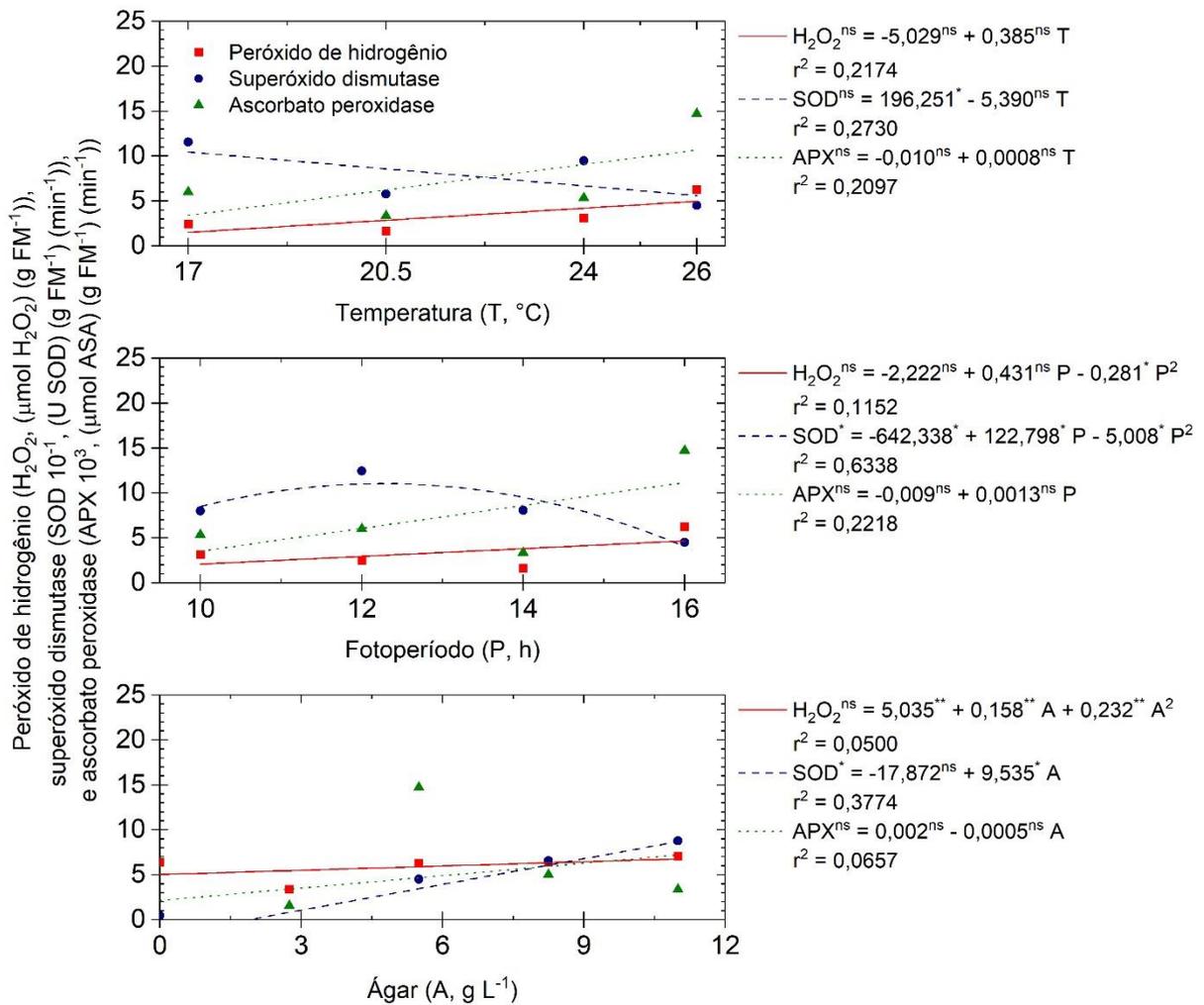


Fonte: Da autora (2023)

Ao observarmos o sistema antioxidante, o conteúdo de H₂O₂ não apresentou valores significativos para as três situações estudadas (Figura 9). Portanto, pode-se dizer que as plantas não estavam em situação de estresse. Geralmente a formação de EROs é prejudicial aos vegetais, podendo causar danos a diferentes biomoléculas. Nesse sentido, o sistema antioxidante desempenha um papel fundamental na manutenção e no equilíbrio entre a produção e erradicação de radicais livres através de enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e APX. No entanto, o peróxido de hidrogênio é a molécula mais estável deste sistema, podendo atuar como sinalizadora, visto que é capaz de percorrer longas distâncias até o seu alvo (TAIZ

et al., 2017). Entendemos que este resultado corrobora com o mensurado pelas análises de crescimento.

Figura 9 - Teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido dismutase (SOD), Ascorbato peroxidase (APX) de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* em função da variação de temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica (porcentagem de ágar).



Fonte: Da autora (2023)

As diferentes temperaturas não foram significativas para concentração de SOD. No entanto, as plantas que estavam em fotoperíodo de 12 h de luz apresentaram maior conteúdo desta enzima. O conteúdo de SOD também ficaram mais elevados com o aumento da restrição hídrica. Para a enzima APX, não foram significativos os valores de concentração nos distintos tratamentos propostos (Figura 9).

Na floração, o estresse oxidativo ocorre nas mitocôndrias e nos plastídeos (MUÑOZ; MUNNÉ-BOSCH, 2018). Nas mitocôndrias ocorre a carbonilação de proteínas, levando ao

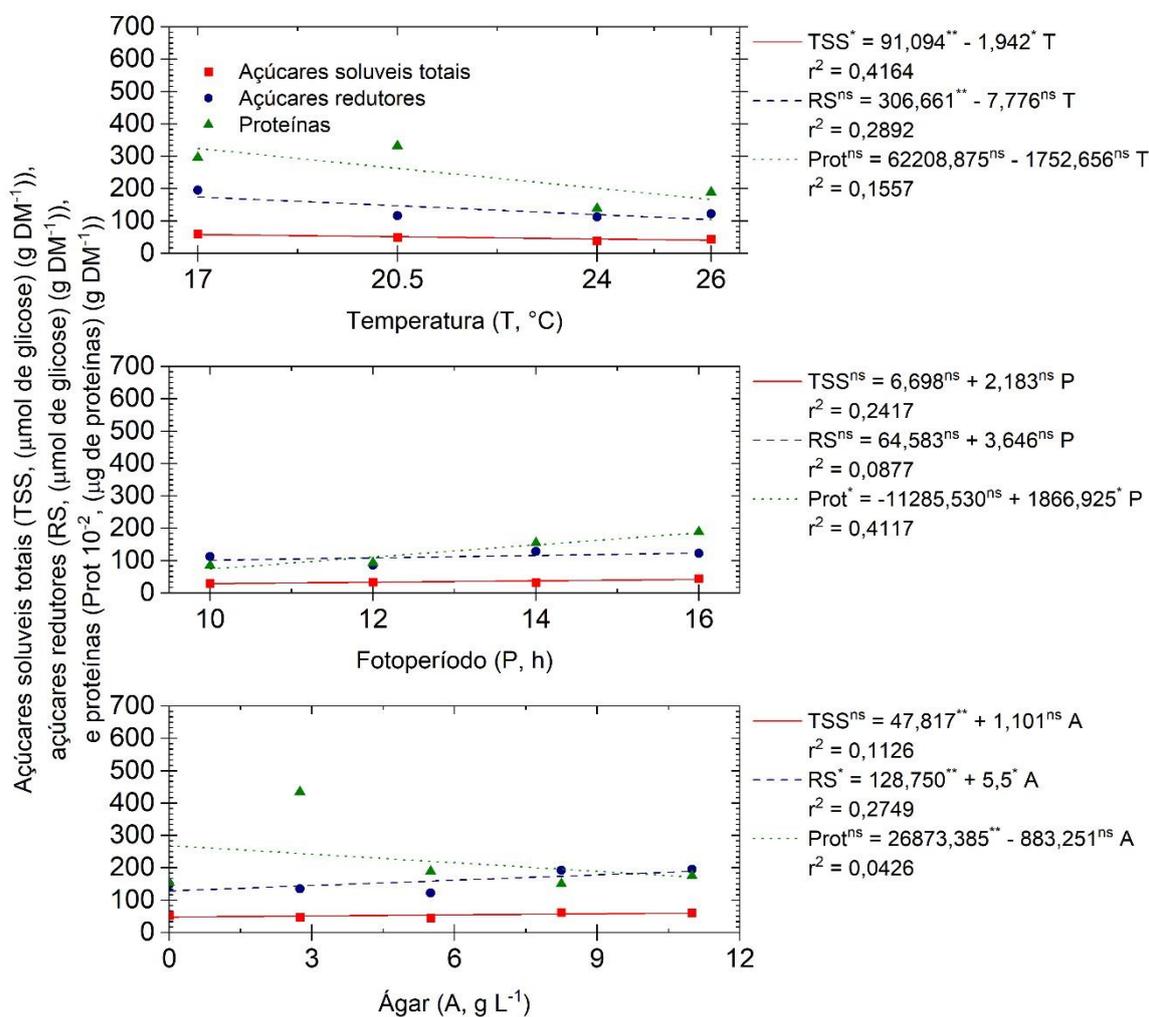
aumento da taxa respiratória, afetando o estado redox uma vez que os açúcares se tornam um fator limitante (KAN et al., 2010; QIN et al., 2009; TIAN; QIN; LI, 2013). Já nos plastídeos o estresse oxidativo ocorre durante a transição de cloroplasto para cromoplasto (MUÑOZ; MUNNÉ-BOSCH, 2018).

As enzimas antioxidantes possuem um papel importante como moléculas sinalizadoras envolvidas na abertura das flores. Em Feijoa (*Acca sellowiana*), no primeiro estágio da floração, quando as pétalas começaram a se abrir, os radicais superóxidos são gerados por uma alta atividade de SOD. Posteriormente, quando as pétalas já estão totalmente abertas, com anteras, filamentos e carpelos da coloração tradicional da espécie, a atividade dessa enzima diminui, aumentando a atividade de CAT e APX. Com o passar dos dias, as enzimas CAT e APX diminuem até atingir um platô entre as fases de alteração de cor, até a deiscência (MAGRI; ADILETTA; PETRICCIONE, 2020).

Além das moléculas antioxidantes, carboidratos e proteínas estão intimamente ligados ao processo de florescimento. Estas moléculas são sintetizadas especialmente nas folhas através da fotossíntese e translocadas os demais tecidos. Este processo é fundamental para o metabolismo de crescimento e desenvolvimento vegetal (DURAND et al., 2018).

Em *C. walkeriana*, observamos que os níveis de açúcares solúveis totais reduziram com o aumento de temperatura, e não foram significativos para os tratamentos de fotoperíodo e disponibilidade hídrica. A concentração de açúcares redutores aumentou a partir do aumento da restrição hídrica, não sendo significativos para os tratamentos de temperatura e fotoperíodo. Com relação ao conteúdo de proteínas, houve um aumento com a maior quantidade de horas de luz, e não foram significativos para os tratamentos de temperatura e disponibilidade hídrica (Figura 10).

Figura 10 - Teores de açúcar solúveis totais (TSS), açúcares redutores (RS), proteínas (Prot) de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* em função da variação de temperatura, fotoperíodo e disponibilidade hídrica (porcentagem de ágar).



Fonte: Da autora (2023)

A atividade sinalizadora para distribuição dos carboidratos em ornamentais foi estudada em Lirio (*Lilium* sp.). Durante o período de diferenciação e desenvolvimento dos botões florais, o teor de açúcar solúvel diminuiu ligeiramente, comportamento este, relacionado à distribuição de carboidratos fonte-dreno (GU et al., 2020). Em *Arabidopsis thaliana* foram identificadas duas famílias de transportadores, AtSUCs e AtSWEETs, que estão envolvidas no transporte de sacarose a longa distância (DURAND et al., 2018). No entanto, ainda pouco é sabido sobre a relação entre estas moléculas e os mecanismos que regulam o processo de florescimento em plantas (GU et al., 2020).

4. Conclusão

Os fatores ambientais estudados não foram suficientes para induzir o florescimento *in vitro* na espécie.

No entanto, visando o crescimento mais expressivo, o que pode ser favorável para novos testes de indução ao florescimento da espécie, a orquídea *Cattleya walkeriana* pode ser mantida em sala de crescimento com temperatura média de 26°C, com fotoperíodo de 12 a 14 horas de luz, e em meio líquido (0 mg L⁻¹ de ágar).

REFERÊNCIAS

- BAO, S. et al. Molecular Basis of Natural Variation in Photoperiodic Flowering Responses. **Developmental Cell**, v. 50, n. 1, p. 90- 101.e3, 1 jul. 2019.
- BLACKMAN, B. K. Changing Responses to Changing Seasons: Natural Variation in the Plasticity of Flowering Time. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 16–26, 3 jan. 2017.
- BRASIL. **Portaria do Ministério do Meio Ambiente Número 148. Diário Oficial da União**<https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>, , 7 jun. 2022.
- CAMPOS, K. O.; KERBAUY, G. B. Thermoperiodic effect on flowering and endogenous hormonal status in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 12, p. 1385–1387, dez. 2004.
- DURAND, M. et al. Carbon source–sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. **Planta**, v. 247, n. 3, p. 587–611, 14 mar. 2018.
- ENGEL, V. L.; POGGIANI, F., 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1 fev. 1977.
- GRUBBS, F. E. Sample Criteria for Testing Outlying Observations. **The Annals of Mathematical Statistics**, v. 21, n. 1, p. 27–58, 1 mar. 1950.
- GU, J. et al. Transcriptome Analysis of Carbohydrate Metabolism Genes and Molecular Regulation of Sucrose Transport Gene LoSUT on the Flowering Process of Developing Oriental Hybrid Lily ‘Sorbonne’ Bulb. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3092, 27 abr. 2020.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–455, 1 jun. 1987.

HOWELL, D. C. **Statistical Methods for Psychology**. Wadsworth: [s.n.]. Disponível em: <<https://labs.la.utexas.edu/gilden/files/2016/05/Statistics-Text.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. **Normais Climatológicas de 1991 a 2020**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<portal.inmet.gov.br/normais>>. Acesso em: 8 jan. 2023.

KAN, J. et al. Changes of Reactive Oxygen Species and Related Enzymes in Mitochondria Respiratory Metabolism During the Ripening of Peach Fruit. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 1, p. 138–146, jan. 2010.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, n. 14, p. 214–217, 1946.

LEE, H. B. et al. Growth characteristics and flowering initiation of *Phalaenopsis* Queen Beer ‘Mantefon’ as affected by the daily light integral. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 637–645, 13 out. 2019.

LEE, H. B.; AN, S. K.; KIM, K. S. Inhibition of premature flowering by intermittent high temperature treatment to young *Phalaenopsis* plants. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, n. 5, p. 618–625, 4 out. 2015.

LIGR, M.; RON, C.; NATR, L. Calculation of the photo period length. **Bioinformatics**, v. 11, n. 2, p. 133–139, 1 abr. 1995.

LIU, L.; ZHANG, Y.; YU, H. Florigen trafficking integrates photoperiod and temperature signals in Arabidopsis. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 62, n. 9, p. 1385–1398, 22 set. 2020.

MAGRI, A.; ADILETTA, G.; PETRICCIONE, M. Evaluation of Antioxidant Systems and Ascorbate-Glutathione Cycle in Feijoa Edible Flowers at Different Flowering Stages. **Foods**, v. 9, n. 1, p. 95, 16 jan. 2020.

MENEZES-SÁ, T. S. A. et al. *In vitro* propagation and conservation of *Cattleya tigrina* A. Rich. **Ciência Rural**, v. 52, n. 5, 2022.

MUÑOZ, P.; MUNNÉ-BOSCH, S. Photo-Oxidative Stress during Leaf, Flower and Fruit Development. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p. 1004–1014, 6 fev. 2018.

NADAL, M. C. et al. Grape-based residue as a substrate in *Oncidium baueri* Lindl. acclimatization. **Ornamental Horticulture**, v. 28, n. 2, p. 239–245, 8 abr. 2022.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1 ago. 1981.

PUJARI, I.; SANKAR BABU, V. Precocious *in vitro* flowering in threatened ornamental orchid, *Dendrobium ovatum* – Decoding the causal factors. **Current Plant Biology**, v. 31, p. 100257, 1 set. 2022.

QIN, G. et al. Oxidative Damage of Mitochondrial Proteins Contributes to Fruit Senescence: A Redox Proteomics Analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 5, p. 2449–2462, 1 maio 2009.

REFLORA. **Herbário Virtual**. Disponível em: <<https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

ROYSTON, P. Approximating the Shapiro-Wilk W-test for non-normality. **Statistics and Computing**, v. 2, n. 3, p. 117–119, set. 1992.

SANTANA COSTA SOUZA, D. M. et al. Activated charcoal application for the micropropagation of *Cattleya crispata* (Thunb.) Van den Berg. **Nativa**, v. 9, n. 4, p. 352–358, 21 set. 2021.

SASAMORI, M. H.; ENDRES JÚNIOR, D.; DROSTE, A. Optimal conditions for *in vitro* culture of *Cattleya cernua*, a small orchid native of Atlantic Forest and Cerrado. **Rodriguésia**, v. 72, 9 jul. 2021.

SHIM, J. S.; KUBOTA, A.; IMAIZUMI, T. Circadian Clock and Photoperiodic Flowering in *Arabidopsis*: CONSTANS Is a Hub for Signal Integration. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 5–15, 1 jan. 2017.

SILVA, J. A. T. DA et al. *In vitro* flowering of orchids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 56–76, 24 mar. 2014.

TAIZ, L. et al. **Plant Physiology and Development**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TIAN, S.; QIN, G.; LI, B. Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity. **Plant Molecular Biology**, v. 82, n. 6, p. 593–602, 21 ago. 2013.

VAZ, A. P. A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. DE C. L.; KERBAUY, G. B. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 411–415, maio 2004.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59–66, 7 fev. 2000.

WANG, S.-L. et al. Floral Induction and Flower Development of Orchids. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 10 out. 2019.

WANG, Z. H.; WANG, L.; YE, Q. S. High frequency early flowering from *in vitro* seedlings of *Dendrobium nobile*. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 2, p. 328–331, set. 2009.

ZAIONTZ, C. **Real Statistics Using Excel**. 2020. Disponível em: <<https://www.real-statistics.com/>>. Acesso em: 8 jan. 2023

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 8, p. 661, 8 fev. 2009.

ZHANG, Y. et al. Flowering phenology and reproductive characteristics of *Cypripedium macranthos* (Orchidaceae) in China and their implication in conservation. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 4, p. 1303–1308, 2014.

ARTIGO II – COMPRIMENTOS LUMINOSOS COMO INDUTORES DE FLORESCIMENTO *in vitro* EM *Catleya walkeriana* G.

Resumo

Sabe-se que a luz é um fator intrinsecamente ligado ao processo de floração das espécies vegetais. Neste trabalho, tivemos como objetivo investigar os eventos fisiológicos e bioquímicos do efeito de diferentes comprimentos luminosos como indutores de florescimento *in vitro* em *Catleya walkeriana*. As plantas, oriundas de sementes, foram cultivadas por 12 meses *in vitro*. Após o período foram expostas as irradiâncias média fornecidas por LEDs das cores vermelho - $31,1 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$; azul - $67,7 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$; 2 vermelhos: 1 azul - $42,1 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (Roxo); e branco - $76,9 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, pelo período de seis meses. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com 12 repetições, com 1 planta, de cada tratamento. Foram analisados os parâmetros de crescimento, do aparelho fotossintético, do metabolismo antioxidante, e do metabolismo de carboidratos. Com relação aos parâmetros de crescimento, o comprimento de parte aérea, comprimento da raiz principal, massa seca e fresca de parte aérea e raiz não diferiram com o uso dos distintos comprimentos luminosos. Para o número de brotos a luz branca destacou-se das demais, propiciando a formação média de 4 brotos por planta. A luz roxa, a partir da combinação monocromática do vermelho e do azul, propiciou maior formação de clorofilas *a*, *b*, carotenóides e clorofilas totais, assim como, acúmulo equivalente de açúcares solúveis totais. A iluminação LED branca propiciou maior acúmulo de H_2O_2 compreendido como sinalizador de crescimento nesta condição. Conclui-se que os comprimentos luminosos respectivos às cores vermelho, azul, roxo e branco não promovem indução de florescimento *in vitro* em *Catleya walkeriana*.

PALAVRAS-CHAVE: Fotossíntese; Metabolismo antioxidante; Metabolismo de carboidratos; Orquídeas; Plantas Ornamentais; Qualidade luminosa; Resposta vegetal a luz.

1. Introdução

A floração *in vitro* é dos fenômenos mais fascinantes encontrados na biologia de plantas, e apesar do avanço em estudos sobre o tema, muitos fenômenos envolvidos nesse processo ainda são incipientes (PUJARI; SANKAR BABU, 2022). Estudos de indução de florescimento *in vitro* são utilizados para auxiliar na elucidação deste processo fisiológico. Além disso, esta

técnica é empregada no melhoramento vegetal para acelerar gerações de espécies que possuem florescimento tardio, como as orquídeas.

O Brasil detém uma das maiores diversidades de espécies de orquídeas do mundo, aproximadamente 10% de todas as espécies são encontradas nas florestas do país (REFLORA, 2020). A *Cattleya walkeriana* é uma espécie importante do gênero *Cattleya* L. nativa e endêmica do Brasil. Uma orquídea de pequeno porte, com ocorrência no Bioma do Cerrado (REFLORA, 2020). Possui flores com cores cor-de-rosa de formato muito atraente para comercialização, além de ser muito apreciada por colecionadores. Esta planta encontra-se entre as espécies consideradas vulneráveis, devido a coleta excessiva para o comércio e a pressão sobre seu habitat natural (BRASIL, 2022).

Atualmente existem poucas informações sobre o florescimento de espécies do gênero *Cattleya* em geral. Para a espécie *Cattleya walkeriana*, em média, o florescimento ocorre após 5 anos da germinação de suas sementes. Este fator, encarece os custos de produção comercial da espécie, pois o cultivo necessita de um período maior em estufas até obtenção da haste floral, momento em que as flores são comercializadas. O maior número de informações encontra-se em trabalhos desenvolvidos, são com espécies do gênero *Dendrobium*. No entanto, apesar do significativo número de trabalhos com este gênero, a causa dos fatores indutores da floração é de difícil correlação, devido a grande diferença em seus padrões de floração (HE et al., 2020) tornando o processo bastante ambíguo (PUJARI; SANKAR BABU, 2022).

De maneira geral, na natureza, os indivíduos que habitam regiões sazonais percebem o comprimento do dia, a temperatura, as mudanças de estações do ano como sugestões ambientais, passando a coletar estas informações e integrá-las molecularmente para os processos de transições durante períodos favoráveis ao crescimento e desenvolvimento (BLACKMAN, 2017). Além disso, é amplamente estudado, a existência de grupos de plantas de resposta fotoperiódica e respostas à vernalização. Além disso, é amplamente estudado, a existência de grupos de plantas de resposta fotoperiódica e respostas à vernalização. Outro tipo de resposta também estudada, é o florescimento induzido por estresse, considerado como a terceira categoria de resposta ao florescimento, juntamente com o fotoperíodo e com a vernalização (TAKENO, 2016).

Nesse sentido, diferentes mecanismos podem ser utilizados para induzir florescimento em plantas quando é sabido a forma que a espécie vegetal responde a este processo, como exemplo, o uso de fitormônios vegetais, uso artificial de calor ou frio, fornecimento luminoso controlado, e a combinação destes fatores (AL MURAD et al., 2021; SHARATHKUMAR et al., 2021). Recentemente, estão sendo estudados como diferentes comprimentos luminosos,

combinados ou não com interrupção luminosa, podem induzir o florescimento em plantas, ou afetar a produção de flores, tanto em espécies que respondem a luminosidade quanto as que são consideradas neutras ao fotoperíodo (AL MURAD et al., 2021; PARK et al., 2017).

As plantas captam diferentes comprimentos de onda através de receptores, especialmente as clorofilas *a* e *b* e carotenoides. Além destes, as plantas possuem outros receptores de luz como os β -carotenos, zeaxantina, luteína e licopeno (TAIZ et al., 2017). Para o processo de crescimento vegetal o espectro mais útil é de 400 a 700 nm conhecido como radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Estudos indicam que a absorção nos comprimentos de 315 a 400 nm apresentando efeitos sobre o fotoperíodo das plantas, de 400 a 520 nm um forte efeito na fotossíntese, de 520 a 610 nm pouco efeito no crescimento, de 610 a 720 nm no crescimento vegetativo, fotossíntese e floração, e no comprimento de 720 a 1000 nm efeitos significativos importante para a germinação de sementes e floração (DERAM; LEFSRUD; ORSAT, 2014; REHMAN et al., 2017; SINGH et al., 2015).

Para fornecer diferentes comprimentos luminosos no cultivo *in vitro* de plantas atualmente são utilizadas lâmpadas do tipo LEDs (Diodos emissores de luz). Os LEDs coloridos podem ser usados sozinhos ou combinados entre si, podendo ser controlada também a intensidade do comprimento luminoso fornecido. Segundo Al Murad et al. (2021), se faz necessário testar como o comportamento de espécies vegetais responde a quantidade de luz para identificar o regime de luz que melhore o crescimento, o desenvolvimento, a nutrição, a floração, e outros mecanismos de defesa das plantas, e até o sabor de frutas.

Vários efeitos benéficos dos LEDs nas plantas são demonstrados na literatura. Na figura 1, estão os principais efeitos benéficos relacionados às cores vermelha, azul e roxa segundo Al Murad et al. (2021). Acrescentamos que os resultados existentes na literatura trazem poucas informações de como os comprimentos luminosos fornecidos por LED afetam o crescimento e desenvolvimento, especialmente o comportamento do metabolismo antioxidante e de carboidratos em *Cattleyas*.

Figura 1 - Diagrama esquemático da eficiência do diodo emissor de luz (LED) no crescimento e desenvolvimento de plantas.



FONTE: Adaptado de (AL MURAD et al., 2021)

Somado a estas informações, outros estudos mostram que os comprimentos nas cores vermelhas são estudados por estimularem o crescimento do caule, floração e produção de frutas. A luz azul é conhecida por estimular o crescimento vegetativo, proporcionando forte crescimento radicular e intensa atividade fotossintética. Já a luz LED monocromática vermelha ou azul ou sua combinação, pode melhorar a atividade fotossintética para apoiar a produção de plantas e regular a morfogênese (PARK et al., 2017; REHMAN et al., 2017).

Neste trabalho, tivemos como objetivo investigar os eventos fisiológicos e bioquímicos do efeito de diferentes comprimentos luminosos como indutores de florescimento *in vitro* em *Catleya walkeriana* L.

2. Materiais e Métodos

Material vegetal

Foram coletadas cápsulas de sementes de plantas matrizes de *C. walkeriana*, mantidas no orquidário da Universidade Federal de Lavras. As sementes foram germinadas no meio de cultura Knudson (KNUDSON, 1946), acrescido com 20 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar, 1% de carvão ativado, e 100 mL L⁻¹ água de coco, com ajuste de pH 5,8. Após quatro meses, as plântulas foram transferidas para novo meio de cultura, individualizadas e dispostas em frascos de vidro de 300 mL, onde foram cultivadas durante 12 meses. O meio de cultura foi

renovado a cada três meses. A sala de crescimento em que plantas foram mantidas, possuía fotoperíodo de 16 h, temperatura de 26°C e intensidade luminosa de 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para instalação dos experimentos. As plantas possuíam em média 6 ± 1 cm de parte aérea.’

Delineamento experimental do ensaio

As plantas foram expostas as irradiâncias média fornecidas pelos LEDs vermelho - 31,1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, LED azul - 67,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 2 vermelhos: 1 azul - 42,1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Roxo), LED branco - 76,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas permaneceram pelo período de seis meses nos tratamentos. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com 12 repetições de cada tratamento. Cada repetição foi composta por uma planta.

Análises morfométricas

Foram avaliados a ocorrência de formação de estruturas florais (haste floral, botões e flores), o número de folhas, brotos e raízes; comprimento de parte aérea (mm), brotos (mm) e maior raiz (mm); massa fresca e seca de parte aérea e raízes (g). Foi utilizado um paquímetro digital para as medidas de comprimento. Para massa fresca e seca de parte aérea e de raiz utilizou-se uma balança de precisão, e a massa seca foi avaliada após secagem em estufa de ventilação forçada à temperatura de 65°C por 24 horas.

Conteúdo de clorofilas

Para determinar o teor de clorofila, foi realizada a extração conforme descrito por Engel e Poggiane (1991) a partir de 0,05 g de matéria fresca homogeneizada em 5 mL de acetona 80%, seguida de leitura em espectrofotômetro a 470, 645 e 652 nm para clorofila a e b e carotenóides, respectivamente.

Caracterização bioquímica não enzimática: quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para a análise utilizou-se três amostras biológicas, com três repetições técnicas, de cada tratamento empregado. As amostras eram compostas por todas as partes de uma planta inteira (folhas, bulbos e raiz).

Foram maceradas 0,2 g de material vegetal de cada amostra biológica em nitrogênio líquido. Estas amostras foram homogeneizadas em 1,5 mL de TCA e centrifugadas, a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. A partir do sobrenadante obtido, o H₂O₂ foi determinado medindo a absorvância a 390 nm em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

Caracterização bioquímica enzimática: Dismutase do superóxido (SOD); Catalase (CAT) e Peroxidase do ascorbato (APX)

Para a análise utilizou-se três amostras biológicas, com três repetições técnicas, de cada tratamento utilizado. As amostras eram compostas por todas as partes de uma planta inteira (folhas, bulbos e raiz).

Foram maceradas 0,2 g de material vegetal de cada amostra biológica em nitrogênio líquido. Estas amostras foram. Ao extrato obtido através da maceração, foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µL de EDTA 0,1M (pH 7,0), 6 µL de DDT 0,5 M, 12 µL de PMSF 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C para análises da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELET et al.,1998).

As atividades da enzima SOD foram avaliadas pela capacidade de inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazolio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A 100 µL do extrato enzimático foram adicionados 1,9 mL do meio de incubação: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NB 75 µM e riboflavina 2 µM.

As amostras foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W (o controle foi mantido no escuro e sem a adição do extrato). Após 10 minutos, as amostras foram lidas em 560 nm e o cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando a equação: % de inibição = (A560 amostra com o extrato enzimático – A560 controle sem enzima) / A560 controle sem enzima.

A atividade da enzima CAT foi avaliada utilizando uma alíquota de 50 µL do extrato enzimático onde será adicionado 950 µL de meio de incubação contendo: 500 µL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 µL de peróxido de hidrogênio 12,5 Mm, incubados a 28°C (HAVIR; MCHALE, 1987). A cada 15 segundos, durante três minutos, foram avaliados o

decaimento da absorvância, a 240 nm, pelo consumo do peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar foi de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da enzima APX foi determinada utilizando uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático onde será adicionado 950 μL de meio de incubação contendo: 500 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 μL de ácido ascórbico 10 M e 50 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). A cada 15 segundos, durante três minutos, foi avaliada a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm onde foi determinado o coeficiente de extinção molar $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Caracterização de macro e micromoléculas: proteínas, açúcar solúveis totais e açúcares redutores

Foi utilizado protocolo descrito por (ZANANDREA et al., 2009). Foram utilizadas três repetições de 0,2 g de amostra seca de cada amostra biológica. O material foi triturado e colocado e serão adicionados 5 mL de tampão de potássio 0,1 M pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40°C . Posteriormente foi centrifugado a 10.000 g durante 20 minutos. Esse processo foi repetido uma vez e o sobrenadante combinado (obtendo um volume final de extrato de 10 mL). As alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para análise de açúcar solúveis totais, açúcares redutores, e proteínas. Para a análise utilizou-se três amostras biológicas, com três repetições técnicas, de cada tratamento empregado. As amostras eram compostas por todas as partes de uma planta inteira (folhas, bulbos e raiz).

Análise estatística

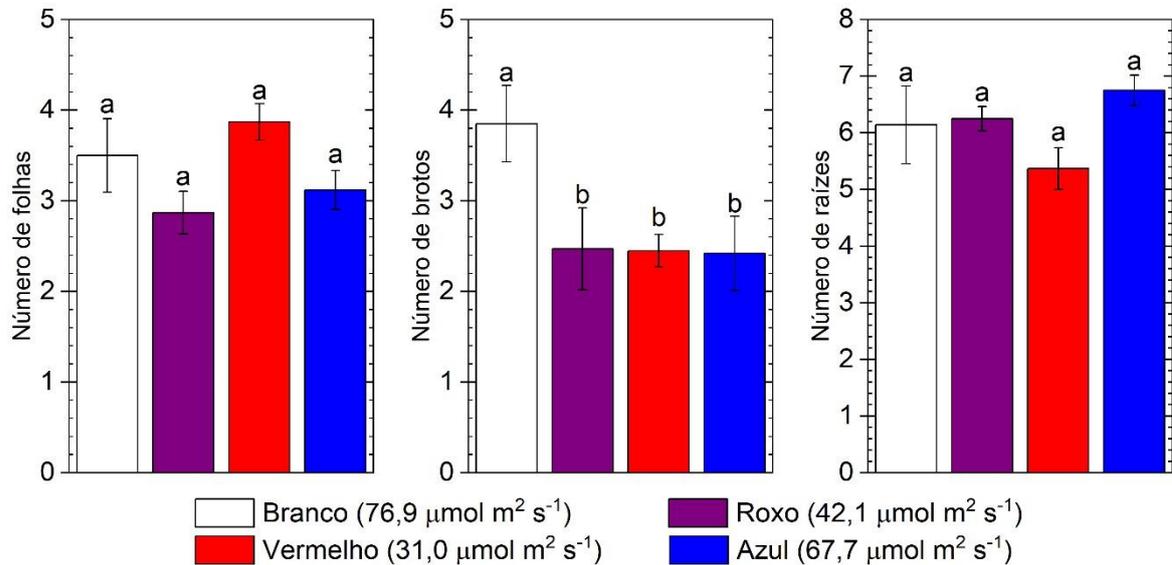
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e possuindo diferenças significativas ($p > 0,05$), tiveram suas médias comparadas através do teste de Tukey com 5% de probabilidade. O software R foi utilizado.

3. Resultados e Discussão

Com relação aos parâmetros de crescimento comprimento de parte aérea e comprimento da raiz principal, não houve diferenças estatísticas no uso dos diferentes comprimentos luminosos (Figura 2). Esse padrão confirmou-se em orquídeas como *Phalaenopsis amabilis*,

onde as cores de luz vermelha, azul e branca não apresentaram diferenças no número de raízes, e a luz branca propiciou a maior número de folhas para esta espécie (MASSARO et al., 2019).

Figura 2 - Número de parte aérea, brotos e da raiz principal de *Cattleya walkeriana*, após 6 meses de cultivo *in vitro*, sob distintas condições luminosas.



FONTE: Da autora (2023)

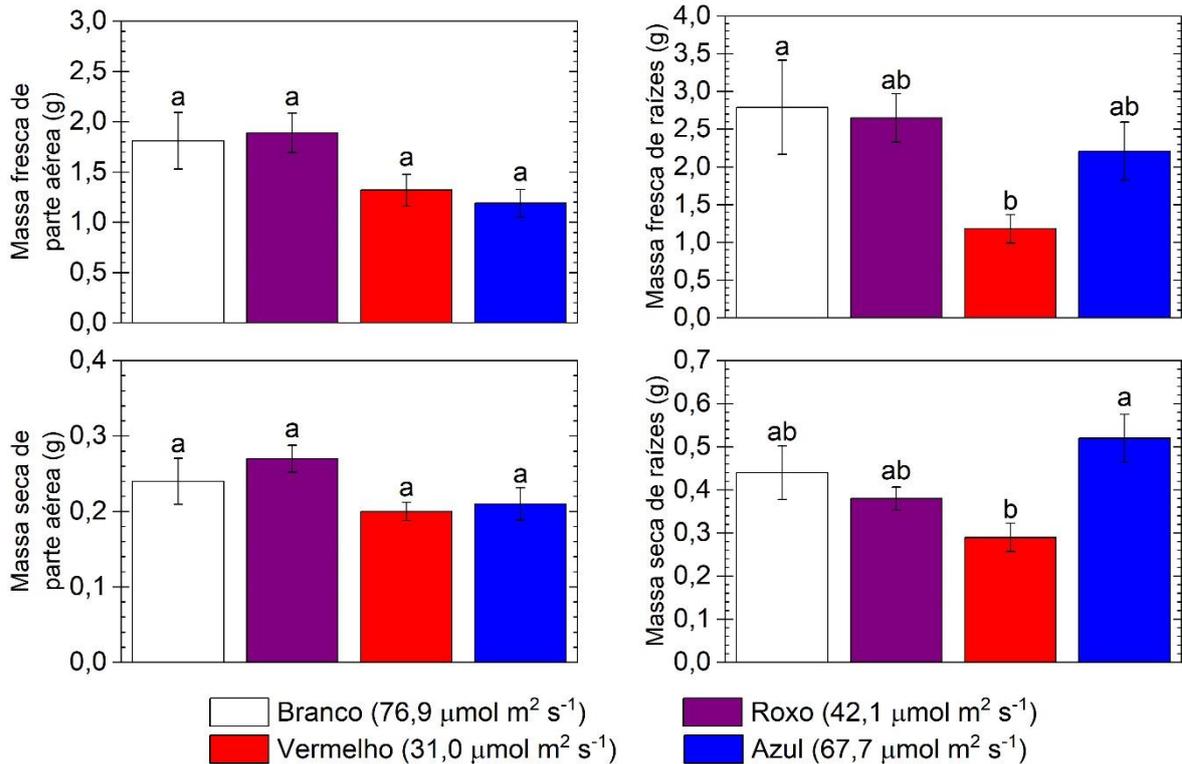
Para o número de brotos a luz branca destacou-se das demais, propiciando a formação média de 4 brotos por planta, enquanto os demais comprimentos luminosos propiciaram uma formação média de 2,5 brotos por plantas (Figura 2). Este resultado possivelmente se explica visto que as plantas ao absorverem quase todas as radiações na gama do visível tendem a ter um crescimento maior. A quantidade de clorofila *a* e *b* são naturalmente maiores e preparadas para essa absorção que posteriormente é utilizada como fomento para produção de energia. No caso das orquídeas, há uma distribuição de carboidratos para formação dos brotos, que ao se desenvolverem a pseudobulbos, passam a acumular reservas e água.

Com relação a massa fresca e seca de parte aérea não houve diferença entre os comprimentos luminosos testados. No entanto, para a massa fresca de raiz o comprimento de luz na cor branca propiciou maior assimilação de carbono e acúmulo de água, não diferindo das cores azul e roxa. Para massa seca de raiz a comprimento luminoso na cor azul propiciou maior acúmulo de carbono, não diferindo dos comprimentos nas cores branca e vermelha (Figura 3).

O comportamento de crescimento, acúmulo de água e carbono é distinto entre as espécies de orquídeas. A exemplo, em *Oncidium tigrinum* a maior porcentagem de massa seca foi obtida em luz roxa (1:2 vermelho e azul), já em *Laelia autumnalis*, a luz branca propiciou

maior acúmulo de massa seca nas plantas (MURILLO-TALAVERA et al., 2016) e em *Phalenopsis* a luz LED vermelha monocromática aumentou a massa fresca (WONGNOK et al., 2008). Apesar das quatro espécies serem orquídeas epífitas, incluindo a *C. walkerina*, os resultados da maior eficiência do uso da luz para o crescimento de orquídeas não são unânimes.

Figura 3 - Massa fresca e massa seca de parte aérea e de raiz de *Cattleya walkeriana*, após 6 meses de cultivo *in vitro*, sob distintas condições luminosas.



FONTE: Da autora (2023).

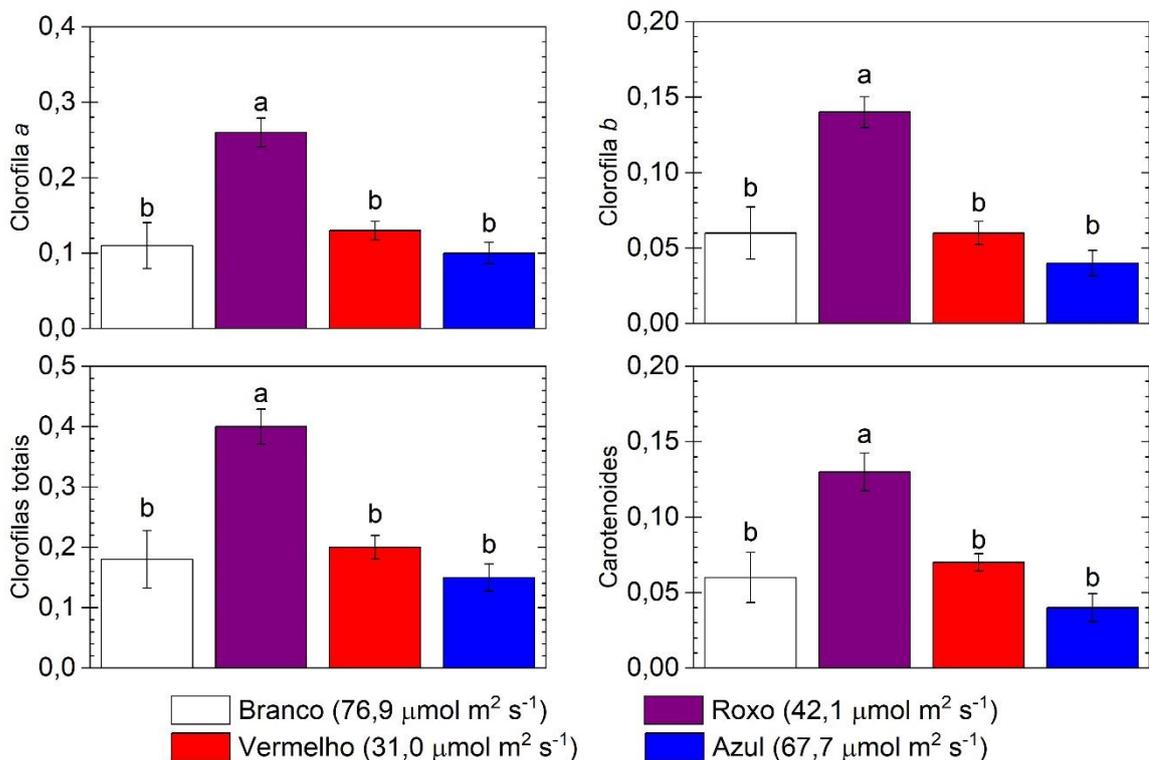
A luz roxa propiciou um aumento do número de clorofilas *a*, *b*, carotenoides e clorofilas totais, diferindo dos demais tratamentos. Os demais espectros luminosos não diferiram entre si. Os pigmentos fotossintéticos possuem um papel fisiológico importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, visto que são os receptores da luz, fonte de energia vital para o processo de fotossíntese e outros processos metabólicos. Além disso, a biossíntese dos pigmentos vegetais é dependente da luz. As clorofilas, principais pigmentos fotossintéticos, são produzidas pela redução de seu precursor, protoclorofilida, apenas na ocorrência de luz (TAIZ et al., 2017).

A luz vermelha compreende fótons de menor energia que são prontamente utilizados pelas plantas durante a fotossíntese (MASSA et al., 2008). Já a luz azul, além de fornecer energia aos fotossistema, promove a fotossíntese estimulando a abertura estomática e regulando

a relocação e transcrição do cloroplasto (MASSA et al., 2008; ROELFSEMA; HEDRICH, 2005). Por outro lado, a alta intensidade de luz apenas vermelha e azul pode causar danos foto oxidativos nas folhas de algumas espécies vegetais (AL MURAD et al., 2021).

Nesse sentido, a luz roxa utilizada neste experimento, 2 LEDs vermelhos: 1 azul, em uma intensidade de $42,1 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, quando comparada ao vermelho ($31,1 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) e ao azul ($67,7 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) apresentou uma intensidade intermediária a estes dois espectros. Ao correlacionar estas informações com a literatura supracitada, a luz roxa pode ter promovido um desempenho maior na produção de pigmentos fotossintéticos em *C. walkeriana*, por ocasionar menores estresses foto oxidativos ao sistema fotossintético da espécie. Esta orquídea, como epífita, tende a se desenvolver melhor em locais que passam parte do dia mais sombreados, não diretamente a sol pleno. Corroborando com o resultado obtido neste trabalho, outros estudos mostram que diferentes combinações de LEDs vermelhos e azuis também aumentam teores de clorofila em outras espécies vegetais, como hortaliças (AL MURAD et al., 2021).

Figura 4 - Teores de clorofilas *a*, *b*, totais e carotenoides de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* sob distintas condições luminosas.



FONTE: Da autora (2023).

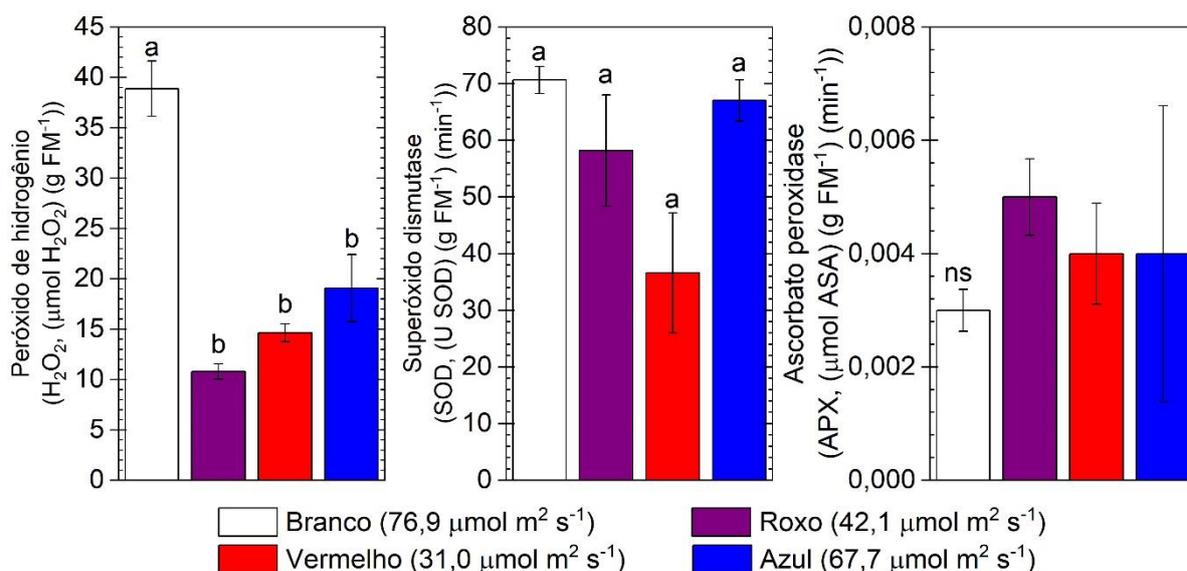
Ademais, apesar de existir um esforço significativo para estudar os efeitos da iluminação LED colorida na fotossíntese vegetal, as informações concentram-se especialmente em

hortaliças, e nas cores de LED vermelha, azul e verde. Al Murad et al. (2021), citam que trabalhos futuros são necessários sobre as correlações entre a qualidade da luz e as condições de crescimento, especialmente em outras culturas hortícolas importantes, a fim de padronizar receitas de luz ideais.

Com relação ao metabolismo antioxidante, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apresentou-se em maior quantidade na luz branca. Não houve expressão da enzima catalase (CAT). Para as enzimas superóxido dismutase (SOD) os resultados não diferiram estatisticamente. Já os resultados da ascorbato peroxidase (APX) não foram estatisticamente significativos (Figura 5). Esta EROs é uma das mais estáveis, isto porque não apresenta um radical livre, possuindo um longo tempo de meia-vida. Esta característica faz com que o H_2O_2 atue como uma molécula sinalizadora, sendo capaz de percorrer longas distâncias até o seu alvo. Portanto, é um componente vital para o desenvolvimento, metabolismo e homeostase dos vegetais (TAIZ et al., 2017).

Possivelmente o fato de o peróxido de hidrogênio encontrar-se em maior quantidade na luz branca está atribuído ao processo de crescimento destas plantas. Ao relacionarmos os dados de fitotécnicos de crescimento, as plantas que estavam sob esse regime luminoso cresceram mais com relação às demais. Além disso, pode-se dizer que os tecidos não estavam sofrendo significativo estresse oxidativo, visto que os mecanismos de desintoxicação das plantas analisados, apresentaram valores não significativos estatisticamente.

Figura 5 - Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) em *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* sob distintas condições luminosas.

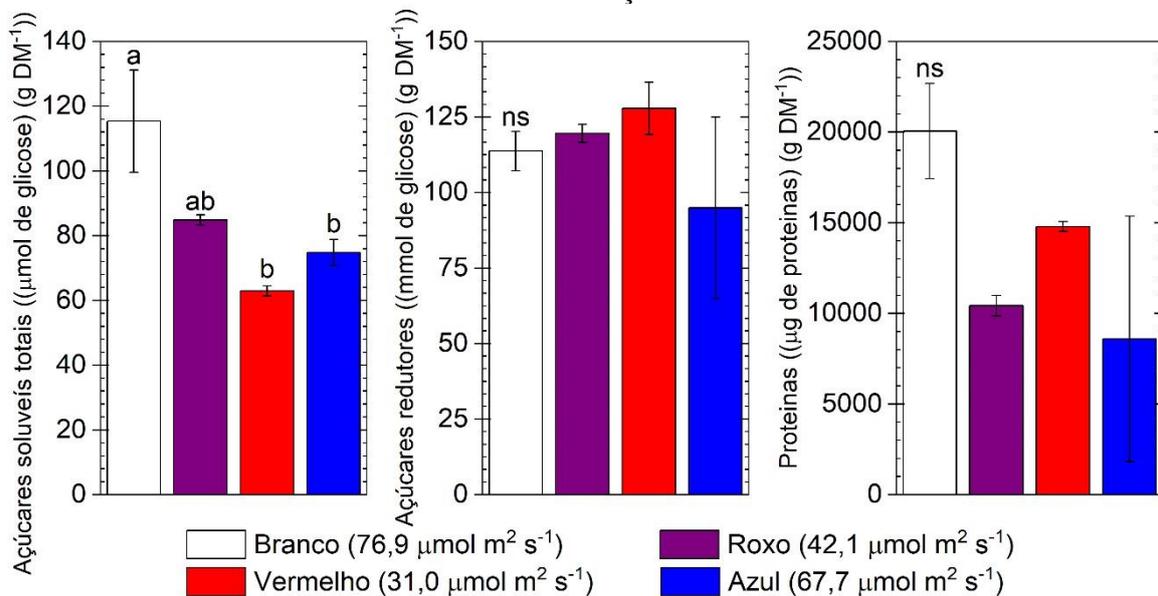


FONTE: Da autora (2023)

Somado às análises posteriores, alguns parâmetros do metabolismo de carboidratos foram analisados. A luz branca propiciou maior acúmulo de açúcares solúveis totais nas plantas, não diferindo estatisticamente da luz roxa. Para os açúcares redutores e proteínas os resultados não foram significativos estatisticamente (Figura 6).

Os níveis de carboidratos endógenos estão associados à assimilação do carbono fotossintético. Nesse sentido, ao observarmos os parâmetros fitotécnicos de crescimento, fotossíntese e sistema antioxidante, os resultados de acúmulo de açúcares totais mais elevados nas plantas expostas a luz branca e roxa, condizem com uma taxa de crescimento maior.

Figura 6 - Açúcares solúveis totais, açúcares redutores e proteínas de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* sob distintas condições luminosas.



FONTE: Da autora (2023).

Apenas com o tempo realizado por esse estudo, não é possível afirmar que essa taxa de crescimento mais elevado culminaria em um processo de floração mais rápido das orquídeas. No entanto, estudos realizados com *Arabidopsis* averiguaram que os sinais fotossintéticos e fotoperiódicos estão interligados por meio de proteínas (AtIDD8-SUS4) para regulação da floração fotoperiódica na espécie modelo (SEO et al., 2011), sendo demonstrado também que a fotossíntese em folhas expostas à alta irradiância acelera a floração por meio da via dependente de FLOWERING LOCUS T (FT) (KING et al., 2008).

Além disso, há uma escassez de informações sobre o uso ideal de vermelho/azul sob uma combinação de diodos emissores de luz (LEDs) vermelho e azul, permanecendo uma

demanda significativa sobre como otimizar a qualidade espectral para o crescimento, desenvolvimento, nutrição mineral e metabolismo das plantas (AL MURAD et al., 2021). Para espécies ornamentais como as orquídeas são necessárias investigações, especialmente moleculares, que auxiliam as descobertas dos mecanismos de florescimento.

Por fim, apesar das plantas submetidas às condições luminosas já possuírem um período de desenvolvimento *in vitro* de 12 meses o que as garantia previamente um desenvolvimento vegetativo significativo, onde as plantas encontravam-se enraizadas e com brotações, não houve o florescimento *in vitro* da espécie nas condições investigadas neste experimento.

4. Conclusões

As irradiâncias média fornecidas pelos LEDs vermelho ($31,1 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), azul ($67,7 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), 2 vermelhos: 1 azul ($42,1 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ - roxo), e branco ($76,9 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) podem ser utilizadas sem prejuízos para *Cattleya walkeriana*.

A iluminação LED branca propicia maior acúmulo de H_2O_2 compreendido como sinalizador de crescimento nesta condição, e a iluminação LED roxa, a partir da combinação monocromática do vermelho e do azul, propicia maior formação de clorofilas *a*, *b*, carotenoides e clorofilas totais, assim como, acúmulo equivalente de açúcares solúveis totais.

Os comprimentos luminosos respectivos às cores vermelho, azul, roxo e branco não promovem indução de florescimento *in vitro* na espécie.

REFERENCIAS

AL MURAD, M. et al. Light Emitting Diodes (LEDs) as Agricultural Lighting: Impact and Its Potential on Improving Physiology, Flowering, and Secondary Metabolites of Crops. **Sustainability**, v. 13, n. 4, p. 1985, 12 fev. 2021.

BLACKMAN, B. K. Changing Responses to Changing Seasons: Natural Variation in the Plasticity of Flowering Time. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 16–26, 3 jan. 2017.

BRASIL. **Portaria do Ministério do Meio Ambiente Número 148. Diário Oficial da União** <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>, 7 jun. 2022.

DERAM, P.; LEFSRUD, M. G.; ORSAT, V. Supplemental Lighting Orientation and Red-to-blue Ratio of Light-emitting Diodes for Greenhouse Tomato Production. **HortScience**, v. 49, n. 4, p. 448–452, 1 abr. 2014.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F., 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1 fev. 1977.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–455, 1 jun. 1987.

HE, C. et al. Transcriptome sequencing and metabolite profiling analyses provide comprehensive insight into molecular mechanisms of flower development in *Dendrobium officinale* (Orchidaceae). **Plant Molecular Biology**, v. 104, n. 4–5, p. 529–548, 2 nov. 2020.

KING, R. W. et al. The nature of floral signals in Arabidopsis. I. Photosynthesis and a far-red photoresponse independently regulate flowering by increasing expression of FLOWERING LOCUS T (FT). **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 14, p. 3811–3820, out. 2008.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orquid Society Bulletin**, n. 14, p. 214–217, 1946.

MASSA, G. D. et al. Plant Productivity in Response to LED Lighting. **HortScience**, v. 43, n. 7, p. 1951–1956, 1 dez. 2008.

MASSARO, R. et al. Light quality *in vitro* growth and acclimatization of two varieties of *Phalaenopsis amabilis* alba Blume (Orchidaceae). **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 2, p. 208–215, 11 jan. 2019.

MURILLO-TALAVERA, M. M. et al. Led light quality and *in vitro* development of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis* (orchidaceae). **Agrociencia**, v. 50, n. 8, p. 1065–1080, 2016.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1 ago. 1981.

PARK, Y. G. et al. Light quality during night interruption affects morphogenesis and flowering in geranium. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 212–217, 14 jun. 2017.

PUJARI, I.; SANKAR BABU, V. Precocious *in vitro* flowering in threatened ornamental orchid, *Dendrobium ovatum* – Decoding the causal factors. **Current Plant Biology**, v. 31, p. 100257, 1 set. 2022.

REFLORA. **Herbário Virtual**. Disponível em:
<<https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

REHMAN, M. et al. Light-emitting diodes: whether an efficient source of light for indoor plants? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 32, p. 24743–24752, 4 nov. 2017.

ROELFSEMA, M. R. G.; HEDRICH, R. In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. **New Phytologist**, v. 167, n. 3, p. 665–691, 17 set. 2005.

SEO, P. J. et al. Modulation of sugar metabolism by an INDETERMINATE DOMAIN transcription factor contributes to photoperiodic flowering in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 65, n. 3, p. 418–429, 1 fev. 2011.

SHARATHKUMAR, M. et al. Floral Induction in the Short-Day Plant *Chrysanthemum* Under Blue and Red Extended Long-Days. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 2323, 25 jan. 2021.

SINGH, D. et al. LEDs for energy efficient greenhouse lighting. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 139–147, 1 set. 2015.

TAIZ, L. et al. **Plant Physiology and Development**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAKENO, K. Stress-induced flowering: the third category of flowering response. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 17, p. 4925–4934, 1 set. 2016.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59–66, 7 fev. 2000.

WONGNOK, A. et al. Effects of light emitting diodes on micropropagation of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Horticulturae**, n. 788, p. 149–156, abr. 2008.

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 8, p. 661, 8 fev. 2009.

ARTIGO III – INIBIDOR DE GIBERELINA COMO INDUTORES DE FLORESCIMENTO *in vitro* EM *Cattleya walkeriana* G.

Resumo

O paclobutrazol (PBZ) age reduzindo a biossíntese de giberelina, contribuindo para inibir o crescimento vegetativo favorecendo a floração em diversas culturas. O objetivo deste trabalho foi estudar os eventos fisiológicos e bioquímicos do efeito do PBZ na indução de florescimento *in vitro* em *Cattleya walkeriana*. As plantas oriundas de semeadura *in vitro*, após seis meses de cultivo foram transferidas para meio de cultura contendo PBZ nas concentrações de 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 mg L⁻¹. Após três meses foram analisados os parâmetros de crescimento, do aparelho fotossintético, do metabolismo antioxidante, e do metabolismo de carboidratos. O PBZ reduziu o número de folhas e raízes, e manteve constante o número de brotos. Ocorreu um aumento no comprimento da parte aérea, e no comprimento dos brotos, bem como uma redução no comprimento da raiz principal. Houve um aumento das massas secas de parte aérea e de raiz conforme aumento da concentração do PBZ. Quanto ao sistema antioxidante, os níveis de peróxido de hidrogênio e ascorbato peroxidase se mantiveram constantes nas diferentes concentrações utilizadas. Houve uma elevação das concentrações de superóxido dismutase com o aumento das concentrações. Os açúcares solúveis totais, açúcares redutores e proteínas também aumentam de acordo com o aumento das concentrações do inibidor de GA₃. Por fim, o PBZ não induziu florescimento *in vitro* para *Cattleya walkeriana* nas condições estudadas, porém, a concentração de 0,1 mg L⁻¹ pode ser utilizada para manutenção da espécie *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: GA₃; Hormônios vegetais; Metabolismo antioxidante vegetal; Orquídeas; Paclobutrazol; Plantas Ornamentais.

1. Introdução

Aproximadamente 10% de todas as espécies de orquídeas do mundo são encontradas nas florestas do Brasil (REFLORA, 2020). Dentre inúmeros gêneros, existe uma variedade muito grande de espécies dentro do gênero *Cattleya* L., sendo a *Cattleya walkeriana* G. uma representante deste gênero, uma orquídea de pequeno porte, de ocorrência no Bioma do Cerrado, com cores cor-de-rosa de formato muito atraente para comercialização. Devido às mudanças climáticas, coletas excessivas e especialmente a pressão sobre seu habitat natural,

esta planta encontra-se entre as espécies consideradas vulneráveis a mais de 10 anos (BRASIL, 2022).

Introduzir espécies nativas com potencial ornamental no mercado, pode ser entendida como uma maneira de também as preservar, visto que aumentando a disponibilidade de acesso se reduz a procura por exemplares na natureza. Dentro dos tratos culturais estudados para uma espécie, o manejo da floração, especialmente para plantas ornamentais, é de suma importância. Orquídeas de maneira geral possuem um longo período de juvenilidade, o que encarece o custo de produção, visto que necessitam de longo tempo sendo cultivadas antes da venda. Nesse sentido, técnicas para indução floral *in vitro* podem ser empregadas para auxiliar na elucidação fisiológica de florescimento das espécies (PUJARI; SANKAR BABU, 2022), podendo ser utilizada também no melhoramento vegetal, acelerando gerações.

Algumas plantas podem responder à estímulos da natureza como comprimento do dia, temperatura, mudanças de estações do ano como sugestões ambientais e integrar estas informações molecularmente para os processos de transições durante períodos favoráveis ao crescimento e desenvolvimento, conhecidas como vias dependentes, outras respondem a vias que funcionam de forma independente às condições ambientais (BLACKMAN, 2017). Nesse sentido, o uso de giberelina e de outros hormônios vegetais, como as auxinas e citocininas, demonstram impactar no florescimento das plantas, dentre elas as orquídeas.

Estudos relatados por Chandler (2011), demonstram que os hormônios são os principais transdutores de informação genética para desenvolvimento floral, sendo que o desenvolvimento das flores resulta do equilíbrio entre tamanho do meristema e coordenação da organogênese. Hormônios como citocinina, giberelina e auxina regulam o tamanho do meristema floral e desempenham papel fundamental na iniciação de órgãos.

Além disso, os efeitos de hormônios vegetais foram estudados em diferentes condições experimentais e em espécies de orquídeas das famílias *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Doritaenopsis*, *Spathoglottis* e *Cymbidium*. Os resultados relatam efeitos variados em relação a aplicação de hormônios (SILVA et al., 2014; WANG et al., 2019). Em orquídeas monopodiais e simpáticas como *Phalaenopsis* e *Dendrobium*, citocininas sintéticas como o BAP, TDZ, 2iP estimulam o florescimento, enquanto auxinas sintéticas como o ANA suprimem o efeito (SILVA et al., 2014; WANG et al., 2019). No entanto, a promoção do florescimento pela aplicação de BAP em *Doritaenopsis* e *Phalaenopsis* depende de certas condições e não é um substituto eficaz para uma baixa temperatura indutiva nas espécies (BLANCHARD; RUNKLE, 2008).

Os ácidos giberélicos são outros importantes hormônios vegetais envolvidos na floração de plantas (JUNG et al., 2020). Em *Phalaenopsis*, os teores de GA nas inflorescências aumentam simultaneamente durante o desenvolvimento da inflorescência e a injeção exógena de GA pode induzir primórdios florais em situações específicas (SILVA et al., 2014; WANG et al., 2019). Quando usada em plantas em situação de estresse hídrico mostrou-se eficaz para híbridos de *Brassocattleya*, no entanto, em híbridos de *Cattleya* nas mesmas condições não promoveu o florescimento (CARDOSO; ONO; RODRIGUES, 2010). Portanto, a injeção de GA isoladamente não induz a iniciação da inflorescência, porém, estes ácidos são requeridos para ocorrer a floração, visto que a via de GA desempenha um papel na regulação da iniciação floral, como análises de transcriptômica demonstram (HUANG et al., 2016).

De maneira oposta, reguladores como o paclobutrazol agem reduzindo a biossíntese de giberelina, contribuindo assim para inibir o crescimento vegetativo, promovendo a maturação das gemas e, conseqüentemente, favorecendo a floração. O paclobutrazol (PBZ) atua na inibição da síntese do ácido biverelico, promovendo mudanças morfofisiológicas no crescimento das plantas, associando-se, ainda com a diminuição da transpiração, altura, biomassa e área foliar além do aumento da quantidade de clorofila. O PBZ é usado para aumentar a força da floração de muitas culturas, além de controlar o florescimento das flores e o vingamento de frutos (ABDALLA et al., 2021).

Em culturas de tecidos vegetais tem sido relatada como uma das substâncias inibitórias mais importantes, que retardam o crescimento e diminuem o número de subcultivos. Além disso, tem sido aplicado *in vitro* para reduzir o crescimento, conservação *in vitro*, e para induzir o florescimento (ABDALLA et al., 2021; BISHT et al., 2018; MENDES et al., 2021).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar os eventos fisiológicos e bioquímicos do efeito do paclobutrazol na indução de florescimento *in vitro* em *Cattleya walkeriana* L.

2. Materiais e Métodos

Material vegetal

Foram coletadas cápsulas de sementes de plantas matrizes de *C. walkeriana*, mantidas no orquidário da Universidade Federal de Lavras. As sementes foram germinadas no meio de cultura Knudson (KNUDSON, 1946), acrescido com 20 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar, 1% de carvão ativado, e 100 mL L⁻¹ água de coco, com ajuste de pH 5,8. Após quatro meses,

as plântulas foram transferidas para novo meio e cultivadas por seis meses em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 26°C e intensidade luminosa de 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para instalação dos experimentos.

Delineamento experimental do ensaio

Foi testado como inibidor de giberilina, o paclobutrazol (PBZ) nas concentrações de 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 mg L^{-1} no meio descrito para espécie. As plantas permaneceram expostas aos tratamentos por três meses.

Análises morfométricas

Foram avaliados a ocorrência de formação de estruturas florais (haste floral, botões e flores), o número de folhas, brotos e raízes; comprimento de parte aérea (mm), brotos (mm) e maior raiz (mm); massa fresca e seca de parte aérea e raízes (g). Foi utilizado um paquímetro digital para as medidas de comprimento. Para massa fresca e seca de parte aérea e de raiz utilizou-se uma balança de precisão, e a massa seca foi avaliada após secagem em estufa de ventilação forçada à temperatura de 65°C por 24 horas.

Conteúdo de clorofilas

Para determinar o teor de clorofila, foi realizada a extração conforme descrito por Engel e Poggiane (1991) a partir de 0,05 g de matéria fresca homogeneizada em 5 mL de acetona 80%, seguida de leitura em espectrofotômetro a 470, 645 e 652 nm para clorofila a e b e carotenóides, respectivamente.

Caracterização bioquímica não enzimática: quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para a análise utilizou-se três amostras biológicas, com três repetições técnicas, de cada tratamento empregado. As amostras eram compostas por todas as partes de uma planta inteira (folhas, bulbos e raiz).

Foram maceradas 0,2 g de material vegetal de cada amostra biológica em nitrogênio líquido. Estas amostras foram homogeneizadas em 1,5 mL de TCA e centrifugadas, a 12.000 g

por 15 minutos, a 4°C. A partir do sobrenadante obtido, o H₂O₂ foi determinado medindo a absorvância a 390 nm em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

Caracterização bioquímica enzimática: Dismutase do superóxido (SOD); Catalase (CAT) e Peroxidase do ascorbato (APX)

Para a análise utilizou-se três amostras biológicas, com três repetições técnicas, de cada tratamento utilizado. As amostras eram compostas por todas as partes de uma planta inteira (folhas, bulbos e raiz).

Foram maceradas 0,2 g de material vegetal de cada amostra biológica em nitrogênio líquido. Estas amostras foram. Ao extrato obtido através da maceração, foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µL de EDTA 0,1M (pH 7,0), 6 µL de DDT 0,5 M, 12 µL de PMSF 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C para análises da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELET et al.,1998).

As atividades da enzima SOD foram avaliadas pela capacidade de inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazolio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A 100 µL do extrato enzimático foram adicionados 1,9 mL do meio de incubação: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NB 75 µM e riboflavina 2 µM.

As amostras foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W (o controle foi mantido no escuro e sem a adição do extrato). Após 10 minutos, as amostras foram lidas em 560 nm e o cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando a equação: % de inibição = (A560 amostra com o extrato enzimático – A560 controle sem enzima) / A560 controle sem enzima.

A atividade da enzima CAT foi avaliada utilizando uma alíquota de 50 µL do extrato enzimático onde será adicionado 950 µL de meio de incubação contendo: 500 µL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 µL de peróxido de hidrogênio 12,5 Mm, incubados a 28°C (HAVIR; MCHALE, 1987). A cada 15 segundos, durante três minutos, foram avaliados o decaimento da absorvância, a 240 nm, pelo consumo do peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar foi de 36 mM⁻¹ cm⁻¹.

A atividade da enzima APX foi determinada utilizando uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático onde será adicionado 950 μL de meio de incubação contendo: 500 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 μL de ácido ascórbico 10 M e 50 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). A cada 15 segundos, durante três minutos, foi avaliada a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm onde foi determinado o coeficiente de extinção molar $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Caracterização de macro e micromoléculas: proteínas, açúcar solúveis totais e açúcares redutores

Foi utilizado protocolo descrito por (ZANANDREA et al., 2009). Foram utilizadas três repetições de 0,2 g de amostra seca de cada amostra biológica. O material foi triturado e colocado e serão adicionados 5 mL de tampão de potássio 0,1 M pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40°C . Posteriormente foi centrifugado a 10.000 g durante 20 minutos. Esse processo foi repetido uma vez e o sobrenadante combinado (obtendo um volume final de extrato de 10 mL). As alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para análise de açúcar solúveis totais, açúcares redutores, e proteínas. Para a análise utilizou-se três amostras biológicas, com três repetições técnicas, de cada tratamento empregado. As amostras eram compostas por todas as partes de uma planta inteira (folhas, bulbos e raiz).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e possuindo diferenças significativas ($p > 0,05$), tiveram suas médias comparadas através do teste de Tukey com 5% de probabilidade.

3. Resultados e discussão

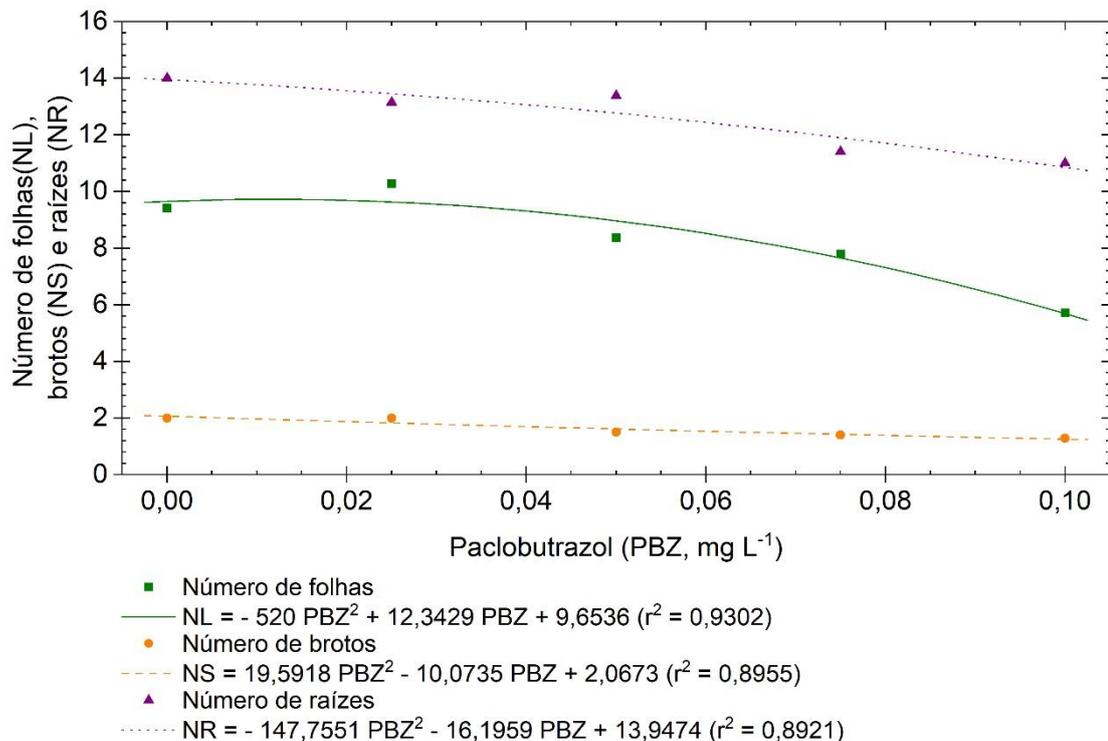
Tradicionalmente o PBZ é utilizado para estimular a floração de espécies frutíferas, olerícolas e plantas ornamentais. Para orquídeas, apresentou resultados positivos na indução do florescimento de *Phalaenopsis* (LEE; KIM, 2020). Além disso, o PBZ também é utilizado um agente de rustificação de algumas plantas ornamentais, auxiliando no processo de aclimatização como em *Zygopetalum crinitum* (GIMENES et al., 2018) e *Dendrobium 'Sonia Jo Daeng'*

(OBSUWAN et al., 2021). O inibidor de giberelina utilizado nas condições investigadas neste experimento, não induziu a formação de flores na espécie.

Apesar de não ter ocorrido a indução floral, os efeitos diferenciais do paclobutrazol no crescimento da espécie *in vitro* foram analisados, a partir do comportamento do crescimento, capacidade antioxidante, e metabolismo dos carboidratos. Com relação ao comportamento de crescimento *in vitro*, podemos observar que o PBZ reduziu o número de folhas e raízes, e manteve constante o número de brotos. A média de raízes das plantas variava entre 12 e 13, o número de folhas entre 7 e 10, e as plantas possuíam entre 1 a 2 brotos (Figura 1).

O PBZ pode induzir várias modificações morfológicas em plantas, essas alterações dependem da espécie vegetal, estágio de crescimento, taxa e método de aplicação (DESTA; AMARE, 2021). Em estudos com *Phalaenopsis*, utilizando o PBZ para crescimento e iniciação de inflorescência, os autores observaram que os tratamentos com PBZ diminuíram o número de folhas novas e o comprimento e a largura das folhas (LEE; KIM, 2020). Em outras espécies ornamentais o tratamento com PBZ também reduziu a área foliar, como em vinca (*Catharanthus roseus*) e zínia (*Zinnia sp.*) (DESTA; AMARE, 2021).

Figura 1 - Número de folhas (NL), brotos (NS) e raízes (NR) de *Cattleya walkeriana*, após 3 meses cultivadas *in vitro*, sob distintas concentrações de paclobutrazol (PBZ).



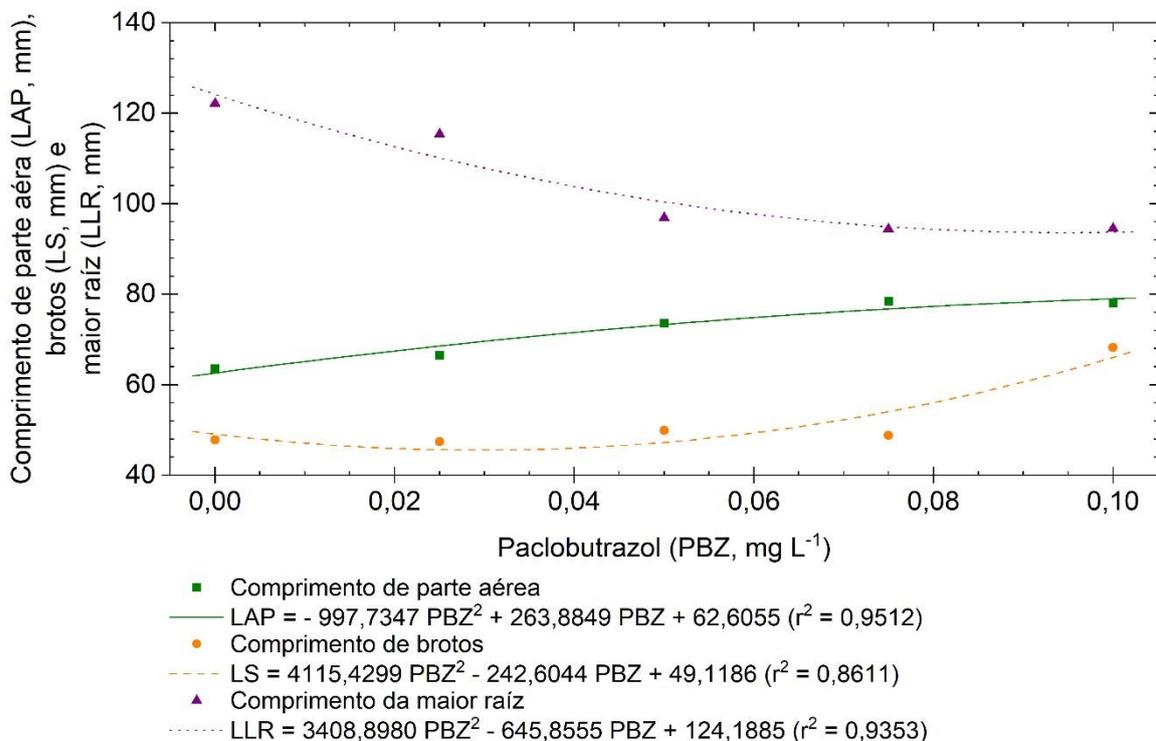
FONTE: Da autora (2023)

Ocorreu uma redução do comprimento da raiz com o aumento das concentrações de PBZ, houve também um aumento da parte aérea e dos brotos com o aumento das concentrações (Figura 2). Possivelmente este comportamento está relacionado a compensação entre parte aérea e raiz.

Ao PBZ bloquear as vias de produção de terpenóides para produção de giberelina ocorre um efeito oposto ao promovido pelo GA. Com relação a parte aérea, o GA promove divisão celular estimulando o alongamento de parte aérea, o PBZ comprime os entrenós das plantas, promovendo plantas menores, porém mais robustas (TAIZ et al., 2017).

Além disso, inibidores de giberelina podem inibir ou até mesmo remover a dominância apical, favorecendo a formação de brotações (ROGACH et al., 2020). Nesse estudo, houve um aumento de parte aérea, além disso, a tendência de maior formação de brotações. Resultado similar foi observado em *Stevia rebaudiana*, onde o PBZ promoveu melhores parâmetros de crescimento e formação de brotações (LUCHO et al., 2021).

Figura 2 - Comprimento de parte aérea (LAP), brotos (LS) e da maior raiz (LLR) de *Cattleya walkeriana*, após 3 meses cultivadas *in vitro*, sob distintas concentrações de paclobutrazol (PBZ).

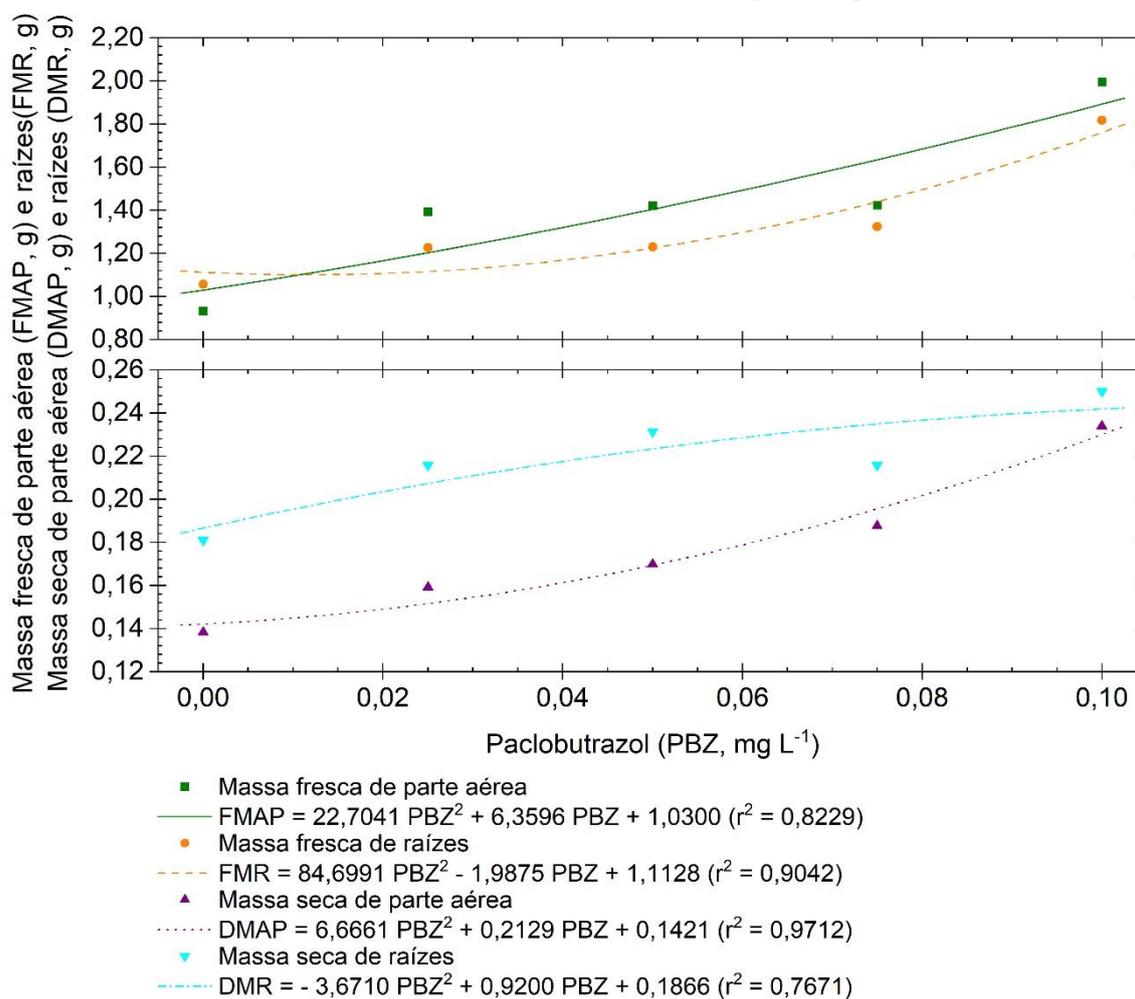


FONTE: Da autora (2023)

A aplicação de PBZ proporciona o aumento de raízes de diversas espécies vegetais. Em olerícolas como o pepino, tomate aplicações de concentrações baixas de PBZ estimulam o comprimento das raízes, especialmente de raízes laterais, assim como em algumas frutíferas como a manga e abacate, e em plantas arbóreas como *Pinus massoniana* cultivadas *in vitro* (DESTA; AMARE, 2021; WANG; YAO, 2020). O aumento da formação de raízes laterais promovidas pelo PBZ ocorre por um aumento na largura do córtex, o que favorece a formação dos vasos secundários do xilema (DESTA; AMARE, 2021). Essa modificação do córtex pode ser atribuída à expansão radical das células devido à redução das atividades endógenas de giberelina (TEKALIGN; HAMMES, 2005).

Apesar do comprimento da raiz reduzir com o aumento das concentrações neste estudo, houve um incremento na formação de raízes laterais, observados a partir dos resultados de massa fresca e seca. Com o aumento das concentrações de PBZ ocorreu um aumento de incremento de massa fresca e seca, tanto da parte aérea como das raízes (Figura 3). Portanto, os resultados observados para *Cattleya walkeriana* com relação ao desenvolvimento de parte aérea e de raiz, condizem com o comportamento de outras espécies vegetais. Como vantagens deste processo, ocorre o aumento da massa e o aumento de raízes laterais.

Figura 3 - Massa fresca de parte aérea (FMAP), massa fresca de raiz (FMR), massa seca de parte aérea (DMAP), massa seca de raiz (DMR) de *Cattleya walkeriana*, após 3 meses cultivadas *in vitro*, sob distintas concentrações de paclobutrazol (PBZ).



FONTE: Da autora (2023)

Quanto ao sistema antioxidante, os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ascorbato peroxidase (APX) se mantiveram constantes nas diferentes concentrações utilizadas. Houve um aumento no superóxido dismutase (SOD) com o aumento das concentrações (Figura 4). Este resultado nos mostra que possivelmente o PBZ está atuando como um sinalizador para espécies reativas de oxigênio. Neste estudo não ocorreu a formação de CAT para a espécie.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas em diferentes momentos do desenvolvimento e crescimento vegetal. Na floração o estresse oxidativo ocorre nas mitocôndrias e nos plastídeos (MUÑOZ; MUNNÉ-BOSCH, 2018). Nas mitocôndrias ocorre a carbonilação de proteínas e ao aumento da taxa respiratória o afetando o estado redox uma vez que os açúcares se tornam um fator limitante (KAN et al., 2010; QIN et al., 2009; TIAN; QIN;

LI, 2013). Já nos plastídeos o estresse oxidativo ocorre durante a transição de cloroplasto para cromoplasto (MUÑOZ; MUNNÉ-BOSCH, 2018).

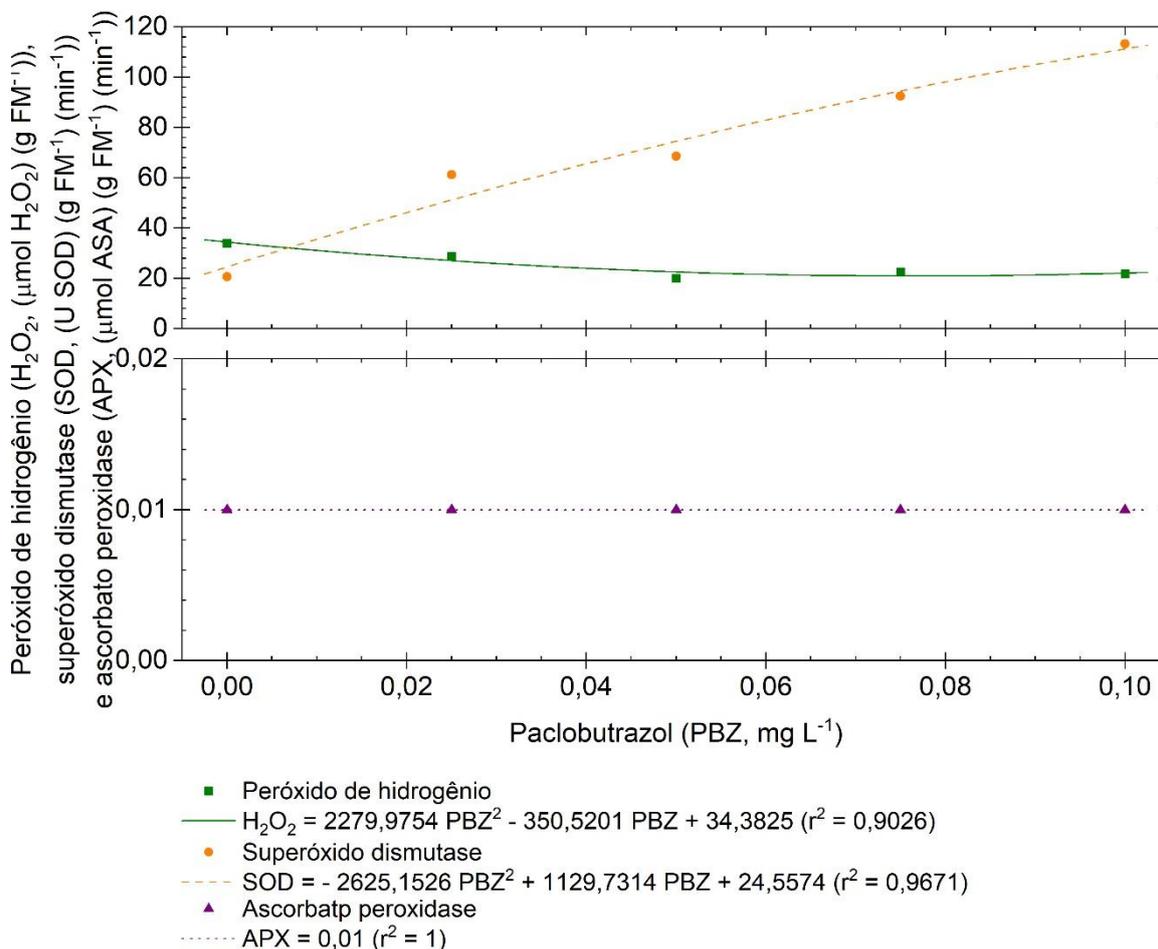
A formação de EROs é geralmente prejudicial aos vegetais, podendo causar danos a diferentes biomoléculas. Nesse sentido, o sistema antioxidante desempenha um papel fundamental na manutenção e no equilíbrio entre a produção e erradicação de radicais livres. As enzimas SOD, CAT e APX são fundamentais no processo de desintoxicação. A SOD é uma importante enzima que ativa a dismutação de radicais superóxidos (O_2^-) com muita eficiência resultando na produção de água (H_2O) e oxigênio (O_2), reduzindo, portanto, o acúmulo de radicais destrutivos. A CAT é a principal enzima que atua na conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, sendo que a eficiência de remoção do H_2O_2 da célula é aumentada na presença do APX. CAT e APX são enzimas extremamente importantes na desintoxicação celular e são responsáveis por manter o equilíbrio do peróxido de hidrogênio intracelular (TAIZ et al., 2017).

Em avaliação de sistema antioxidante e do ciclo ascorbato-glutationa em flores comestíveis, Magri; Adiletta; Petriccione (2020) observaram que as EROs têm um papel importante como moléculas sinalizadoras envolvidas na abertura das flores da espécie de Feijoa (*Acca sellowiana*). No primeiro estágio da floração, quando as pétalas começaram a se abrir, os radicais superóxidos são gerados por uma alta atividade de SOD. Posteriormente, quando as pétalas estão totalmente abertas, com anteras, filamentos e carpelos da coloração tradicional da espécie, a atividade dessa enzima diminui, aumentando a atividade de CAT e APX. Com o passar dos dias, as enzimas CAT e APX diminuem até atingir um platô entre as fases de alteração de cor, e a deiscência.

Há relatos na literatura que a aplicação de PBZ aumenta as atividades das enzimas antioxidantes em diversas espécies vegetais (SOUMYA; KUMAR; PAL, 2017), porém, no sentido de melhorar a tolerância de plantas a estresses ambientais. Em gramados ornamentais mostrou que PBZ melhorou a capacidade antioxidante de aumentar a tolerância ao estresse luminoso em *Festuca arundinacea*. A aplicação de PBZ eleva significativamente a atividade antioxidante total, o conteúdo fenólico total e a oxidação de proteínas, eliminando o excesso de ERO, enquanto o aumento do conteúdo de ABA ativa o sistema antioxidante (LIU et al., 2022).

Não há estudos que investigaram a relação das enzimas antioxidantes e o PBZ no processo de florescimento *in vitro* de orquídeas. Nossos resultados apontam para uma possível sinalização ao sistema antioxidante, porém sem a necessidade de degradação, visto a baixa atividade da SOD e não expressão da CAT.

Figura 4 - Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ascorbato peroxidase (APX) e Superóxido dismutase (SOD) de *Cattleya walkeriana*, após 3 meses cultivadas *in vitro*, sob distintas concentrações de paclobutrazol (PBZ).



FONTE: Da autora (2023).

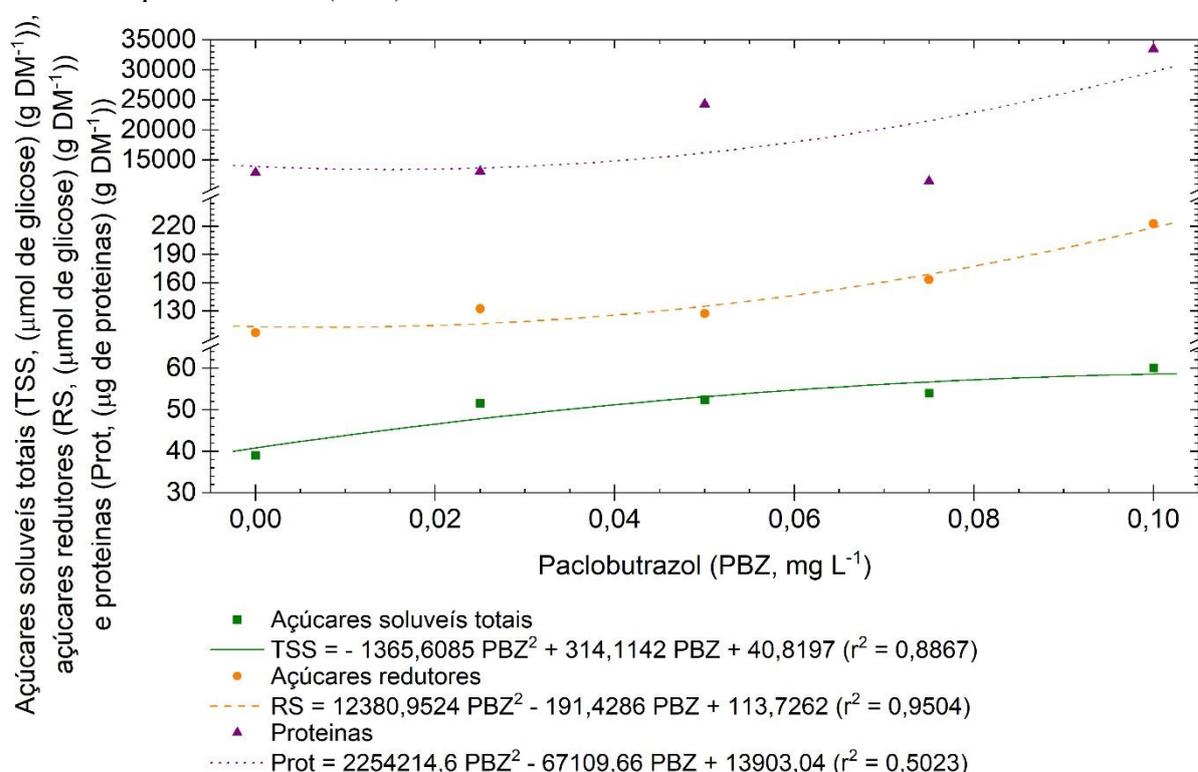
Outras moléculas envolvidas nos processos de florescimento das plantas são os carboidratos e as proteínas. Os carboidratos são sintetizados nas folhas através da fotossíntese e translocados para tecidos na forma de sacarose. Este processo é fundamental para sustentar o metabolismo e crescimento, além disso, os carboidratos também participam do processo de transdução de sinal nas plantas como uma substância sinalizadora (DURAND et al., 2018). Nesse sentido, a sinalização dos carboidratos pode ocorrer em relação ao estado metabólico celular e em resposta biótica e abiótica ao estresse (LASTDRAGER; HANSON; SMEEKENS, 2014; XALXO et al., 2020) e em relação a transição floral, especialmente reguladas pelos ritmos circadianos (MOGHADDAM; ENDE, 2013).

A atividade sinalizadora para distribuição dos carboidratos foi estudada em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (DURAND et al., 2018), em frutíferas como pera (*Pyrus*

bretschneideri) (LI et al., 2015), e em ornamentais como lírio (*Lilium* sp.) (GU et al., 2020). No entanto, ainda pouco é sabido sobre a relação entre estas moléculas e os mecanismos que regulam o processo de florescimento em plantas (GU et al., 2020).

Na orquídea *C. walkeriana*, observamos que os açúcares solúveis totais e açúcares redutores aumentam de acordo com o aumento das concentrações do inibidor de GA₃. Além disso, ocorreu um aumento das proteínas com o aumento da concentração de PBZ (Figura 5).

Figura 5 - Teores de açúcar solúveis totais (TSS), açúcares redutores (RS), proteínas (Prot) de *Cattleya walkeriana*, após 3 meses cultivadas *in vitro*, sob distintas concentrações de paclobutrazol (PBZ).



FONTE: Da autora (2023).

Em *Arabidopsis thaliana* as concentrações de carboidratos foram verificadas em folhas, caules e raízes, os autores observaram que houve uma variação conforme as respostas aos ritmos circadianos. Foram observadas que durante o dia as partes vegetais translocam mais açúcares do que no período noturno, o que está intimamente relacionado à fotossíntese (DURAND et al., 2018). Nos bulbos de lírio, o teor de açúcar solúvel aumentou significativamente, durante a vernalização, atingindo o máximo de acúmulo no final deste período. Durante o período de diferenciação e desenvolvimento dos botões florais, o teor de

açúcar solúvel diminuiu ligeiramente, comportamento relacionado à distribuição de carboidratos fonte-dreno (GU et al., 2020).

Os níveis de carboidratos relacionados à aplicação de PBZ, não foram estudados em orquídeas. Em plantas frutíferas, aparentemente a resposta é dependente da espécie. Em oliveira (*Olea europaea*), foi observado um maior teor de carboidratos acumulado nas folhas nas plantas submetidas à aplicação de PBZ, estas mesmas plantas apresentaram no número de racimos florais (OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, para mangueira (*Mangifera indica*), ocorreu a redução dos teores de açúcares solúveis totais nas folhas na época de intumescimento das gemas florais (OLIVEIRA et al., 2018). Diante dos nossos resultados, possivelmente o acúmulo de carboidratos propiciado pelo PBZ pode ter sido direcionado a formação de novas brotações, as quais são importantes para o florescimento da espécie.

4. Conclusões

O PBZ nas condições deste estudo não induziu florescimento *in vitro* para *Catleya walkeriana*. A concentração de 0,1 mgL⁻¹ pode ser utilizada para manutenção da espécie *in vitro*.

REFERENCIAS

- ABDALLA, N. et al. Paclobutrazol Applications in Agriculture, Plant Tissue Cultures and Its Potential as Stress Ameliorant: A mini Review. **Environment, Biodiversity and Soil Security**, v. 5, n. 1, p. 1–2, 1 fev. 2021.
- BISHT, T. S. et al. A Recent Advances in Use of Plant Growth Regulators (PGRs) in Fruit Crops - A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 05, p. 1307–1336, 20 maio 2018.
- BLACKMAN, B. K. Changing Responses to Changing Seasons: Natural Variation in the Plasticity of Flowering Time. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 16–26, 3 jan. 2017.
- BLANCHARD, M. G.; RUNKLE, E. S. Benzyladenine Promotes Flowering in *Doritaenopsis* and *Phalaenopsis* Orchids. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 27, n. 2, p. 141–150, 26 jun. 2008.
- BRASIL. **Portaria do Ministério do Meio Ambiente Número 148. Diário Oficial da União** <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>, 7 jun. 2022.

- CARDOSO, J. C.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Gibberellic acid and water regime in the flowering induction of *Brassocattleya* and *Cattleya* hybrid orchids. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 395–398, dez. 2010.
- CHANDLER, J. W. The Hormonal Regulation of Flower Development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 2, p. 242–254, 12 jun. 2011.
- ENGEL, V. L.; POGGIANI, F., 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.
- DESTA, B.; AMARE, G. Paclobutrazol as a plant growth regulator. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 1, 7 dez. 2021.
- DURAND, M. et al. Carbon source–sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. **Planta**, v. 247, n. 3, p. 587–611, 14 mar. 2018.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1 fev. 1977.
- GIMENES, R. et al. Paclobutrazol on *in vitro* growth and development of *Zygopetalum crinitum* orchid, and on seedling acclimatization. **American Journal of Plant Sciences**, v. 09, n. 05, p. 1029–1036, 12 abr. 2018.
- GU, J. et al. Transcriptome Analysis of Carbohydrate Metabolism Genes and Molecular Regulation of Sucrose Transport Gene LoSUT on the Flowering Process of Developing Oriental Hybrid Lily ‘Sorbonne’ Bulb. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3092, 27 abr. 2020.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–455, 1 jun. 1987.
- HUANG, J.-Z. et al. The genome and transcriptome of *Phalaenopsis* yield insights into floral organ development and flowering regulation. **PeerJ**, v. 4, n. 5, p. e2017, 12 maio 2016.
- JUNG, H. et al. Gibberellin Promotes Bolting and Flowering via the Floral Integrators RsFT and RsSOC1-1 under Marginal Vernalization in Radish. **Plants**, v. 9, n. 5, p. 594, 7 maio 2020.
- KAN, J. et al. Changes of Reactive Oxygen Species and Related Enzymes in Mitochondria Respiratory Metabolism During the Ripening of Peach Fruit. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 1, p. 138–146, jan. 2010.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orquid Society Bulletin**, n. 14, p. 214–217, 1946.
- LASTDRAGER, J.; HANSON, J.; SMEEKENS, S. Sugar signals and the control of plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 3, p. 799–807, 1 mar. 2014.

- LEE, H. B.; KIM, K. S. Growth and Inflorescence Initiation of *Phalaenopsis* Orchids by Paclobutrazol Treatment. **Flower Research Journal**, v. 28, n. 4, p. 250–258, 30 dez. 2020.
- LI, J. et al. Genome-Wide Function, Evolutionary Characterization and Expression Analysis of Sugar Transporter Family Genes in Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd). **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1721–1737, set. 2015.
- LIU, B. et al. Paclobutrazol Ameliorates Low-Light-Induced Damage by Improving Photosynthesis, Antioxidant Defense System, and Regulating Hormone Levels in Tall Fescue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9966, 1 set. 2022.
- LUCHO, S. R. et al. Gibberellin reverses the negative effect of paclobutrazol but not of chlorocholine chloride on the expression of SGs/GAs biosynthesis-related genes and increases the levels of relevant metabolites in *Stevia rebaudiana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 146, n. 1, p. 171–184, 9 jul. 2021.
- MAGRI, A.; ADILETTA, G.; PETRICCIONE, M. Evaluation of Antioxidant Systems and Ascorbate-Glutathione Cycle in *Feijoa edible* Flowers at Different Flowering Stages. **Foods**, v. 9, n. 1, p. 95, 16 jan. 2020.
- MENDES, M. I. DE S. et al. *In vitro* conservation of citrus rootstocks using paclobutrazol and analysis of plant viability and genetic stability. **Scientia Horticulturae**, v. 286, p. 110231, 25 ago. 2021.
- MOGHADDAM, M. R. B.; ENDE, W. VAN DEN. Sugars, the clock and transition to flowering. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. FEB, p. 22, 14 fev. 2013.
- MUÑOZ, P.; MUNNÉ-BOSCH, S. Photo-Oxidative Stress during Leaf, Flower and Fruit Development. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p. 1004–1014, 6 fev. 2018.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1 ago. 1981.
- OBSUWAN, K. et al. Influence of paclobutrazol on growth of *Dendrobium* ‘Sonia Jo Daeng’ under salt stress condition in tissue culture. **Science, Engineering and Health Studies**, v. 15, p. 21030001–21030001, 16 jan. 2021.
- OLIVEIRA, D. L. et al. Teores de carboidratos e indução do florescimento em mudas de oliveira submetida à aplicação de paclobutrazol. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p. 221–226, 30 set. 2013.
- OLIVEIRA, G. P. et al. Teores de carboidratos em mangueira Ubá submetida a diferentes doses de paclobutrazol. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 3, p. 749–756, 18 jul. 2018.
- PUJARI, I.; SANKAR BABU, V. Precocious *in vitro* flowering in threatened ornamental orchid, *Dendrobium ovatum* – Decoding the causal factors. **Current Plant Biology**, v. 31, p. 100257, 1 set. 2022.
- QIN, G. et al. Oxidative Damage of Mitochondrial Proteins Contributes to Fruit Senescence: A Redox Proteomics Analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 5, p. 2449–2462, 1 maio 2009.

REFLORA. **Herbário Virtual**. Disponível em:

<<https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

ROGACH, V. V. et al. Morphogenesis, pigment content, phytohormones and productivity of eggplants under the action of gibberellin and tebuconazole. **Regulatory Mechanisms in Biosystems**, v. 11, n. 1, p. 116–122, 27 fev. 2020.

SILVA, J. A. T. DA et al. *In vitro* flowering of orchids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 56–76, 24 mar. 2014.

SOUMYA, P. R.; KUMAR, P.; PAL, M. Paclobutrazol: a novel plant growth regulator and multi-stress ameliorant. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 3, p. 267–278, 1 set. 2017.

TAIZ, L. et al. **Plant Physiology and Development**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TEKALIGN, T.; HAMMES, P. S. Growth and biomass production in potato grown in the hot tropics as influenced by paclobutrazol. **Plant Growth Regulation**, v. 45, n. 1, p. 37–46, jan. 2005.

TIAN, S.; QIN, G.; LI, B. Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity. **Plant Molecular Biology**, v. 82, n. 6, p. 593–602, 21 ago. 2013.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59–66, 7 fev. 2000.

WANG, S.-L. et al. Floral Induction and Flower Development of Orchids. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 10 out. 2019.

WANG, Y.; YAO, R. Increased endogenous gibberellin level inhibits root growth of *Pinus massoniana* Lamb. plantlets during long-term subculture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 56, n. 4, p. 470–479, 10 ago. 2020.

XALXO, R. et al. Alteration in Carbohydrate Metabolism Modulates Thermotolerance of Plant under Heat Stress. Em: **Heat Stress Tolerance in Plants**. [s.l.] Wiley, 2020. p. 77–115.

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 8, p. 661, 8 fev. 2009.