

SOUSA GG; ROSA YBCJ; MACEDO MC; SOARES JS. 2015. Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. *Horticultura Brasileira* 33: 208-2015. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000200012>

Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos

Gisele G Sousa; Yara BCJ Rosa; Marichel C Macedo; Jackeline S Soares

UFGD-FCA, Rod. Dourados-Itahum km 12, 79804-970 Dourados-MS; giselesousa@terra.com.br; yararosa@ufgd.edu.br; marichelcanazza@hotmail.com; jacke.schultz@gmail.com

RESUMO

Um dos fatores limitantes da produção de mudas *in vitro* de orquídeas é a fase de aclimatização. Foi objetivo desse trabalho avaliar a sobrevivência e o crescimento inicial de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) utilizando ácido naftaleno acético (ANA) e diferentes substratos durante a fase de aclimatização. Para tanto, foram utilizadas plantas provenientes de cultivo *in vitro*, cujo sistema radicular foi previamente imerso por 10 segundos nas soluções de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 mg/L de ANA e posteriormente plantadas em recipientes plásticos contendo como substrato esfagno, fibra de coco ou a mistura de esfagno + fibra de coco 1:1 (v:v). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 3x10, sendo três substratos e 10 concentrações de ANA, com 10 repetições de uma planta por tratamento. Após a permanência por 210 dias em viveiro telado (83 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) as plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência, número de folhas, raízes e perfilhos, comprimento da maior folha e raiz, à massa fresca e seca da parte aérea e das raízes. Também foram calculados os incrementos dessas variáveis em relação aos valores observados no plantio. Os substratos foram avaliados quanto à porosidade, capacidade máxima de retenção de água, densidade do substrato, densidade real, condutividade elétrica e pH. A maior sobrevivência (67,7%) foi obtida com a utilização da dose calculada de 1,8 mg/L de ANA que promoveu a formação de sistema radicular eficiente para o desenvolvimento da espécie. O esfagno é o substrato mais indicado para a sobrevivência e crescimento inicial de plantas de *B. tuberculata*, na fase de aclimatização.

Palavras-chave: Orchidaceae, cultivo *in vitro*, espécie nativa, floricultura, regulador vegetal.

ABSTRACT

Acclimatization of *Brassavola tuberculata* submitted to immersion in NAA on different substrates

One of the most limiting factors of orchid *in vitro* culture is the acclimatization. Thus the aim of this study was to evaluate the survival and initial growth of the *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) using naphthalene acetic acid (NAA), and different substrates during acclimatization. Plants were obtained from *in vitro* culture, previously immersed for 10 seconds in NAA solutions (0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0 or 4.5 mg/L), and planted in plastic containers containing as substrate sphagnum, coconut fiber or a mix of sphagnum + coconut fiber 1:1 (v:v). The experiment was carried out in a completely randomized design, and the treatments were arranged in factorial 3x10, three substrates and 10 NAA concentrations, with 10 replications of one plant. After staying for 210 days in the greenhouse (83 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) the plants were evaluated according to their survival, number of leaves, roots and offshoots, the length of the longest leaf and the longest root, fresh and dry mass of shoot and root. Increments of these variables in relation to the observed values during planting were also calculated. The substrates were evaluated according to their porosity, maximum water retention, substrate density, real density, electric conductivity and pH. The highest survival (67.7%) was obtained using the calculated concentration of 1.8 mg/L NAA which promotes the formation of efficient root system for the development of the species. The sphagnum is the most suitable substrate for the survival and early growth of *B. tuberculata*, in acclimatization phase.

Keywords: Orchidaceae, *in vitro* culture, native species, floriculture, phytoregulator.

(Recebido para publicação em 13 de março de 2013; aceito em 18 de fevereiro de 2015)

(Received on March 13, 2013; accepted on February 18, 2015)

A família Orchidaceae é composta por grande número de gêneros, espécies e híbridos. *Brassavola* se destaca entre os principais gêneros encontrados no Brasil (Faria *et al.*, 2012) e, devido à beleza de suas inflorescências, é um dos mais ameaçados pelas coletas predatórias (Hering & Putzke, 2007). Aliado a esse fator, esse gênero apresenta também interesse econômico, pois se intercrusa com *Cattleya*, *Laelia* e *Sophranitis* e *Epidendrum* (Soares *et al.*, 2012) originando híbridos com

características morfológicas de maior interesse do que as dos progenitores.

Grande tem sido o interesse por orquídeas nativas brasileiras, visando não apenas os colecionadores, mas também os programas de melhoramento e de reintrodução das espécies em seus habitats (Soares *et al.*, 2012). Entre as orquídeas com este potencial, destaca-se *Brassavola tuberculata*, conhecida popularmente como “chuva de prata, cebolinha, rabo de rato e orquídea dama-da-noite”, que possui elevado valor or-

namental, pois além da sua rusticidade, apresenta floração abundante e duradoura, produzindo inflorescências contendo de cinco a sete flores, de coloração branca levemente amarelada, que exalam odor levemente adocicado, ao anoitecer (Rech *et al.*, 2010). A espécie é nativa dos estados de Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe e Tocantins (Barros *et al.*, 2013) ocorrendo também no Mato Grosso do Sul (Rech *et al.*, 2010).

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a semeadura de espécies de orquídeas nativas é utilizada tanto em estudos de bioprospecção, visando à obtenção de produtos com valor econômico agregado, quanto para sua conservação por meio da manutenção de bancos de germoplasma, já que possibilita alta porcentagem de germinação sem que as sementes precisem de relação simbiótica. Além disso, essas espécies apresentam crescimento lento e, conseqüentemente, a produção de novas mudas é bastante demorada e, ainda, as plantas necessitam de um longo período para atingir o estágio reprodutivo. Portanto, sob o ponto de vista preservacionista, a utilização desse tipo de cultivo é importante, uma vez que possibilita a obtenção de um grande número de plantas em tempo relativamente curto, com alta qualidade fitossanitária e elevada variabilidade genética, contribuindo para a diminuição do risco de extinção (Ferreira & Suzuki, 2008).

Hermann *et al.* (2011) e Soares *et al.* (2012) obtiveram sucesso na germinação *in vitro* de *B. tuberculata* em meio de cultura alternativo, contendo componentes orgânicos como banana, tomate e carvão ativado. Entretanto, o sucesso da propagação *in vitro* de orquídeas, está condicionado à sobrevivência das plantas produzidas quando em condições *ex vitro* (Lone *et al.*, 2008), sendo este um fator limitante tanto para produções comerciais quanto para aquelas que visam a reintrodução.

Um dos fatores bióticos que interfere no sucesso da aclimatização das plantas oriundas de cultivo *in vitro* é a baixa eficiência do sistema radicular, que somada à reduzida competência vascular, à pequena ou não funcionalidade dos estômatos e à mal formação da cutícula, são responsáveis pela reduzida sobrevivência das plantas expostas a ambiente com elevada demanda evaporativa (Faria *et al.*, 2012).

As plantas provenientes de cultivo *in vitro*, de modo geral apresentam raízes quebradiças e pouco funcionais na absorção de água e nutrientes (Pasqual, 2001). Um sistema radicular vigoroso é vital para a sobrevivência e adaptação de plantas cultivadas *in vitro* quando submetidas às condições *ex vitro* (Liu

et al., 2013).

O uso de fitorreguladores objetivando a formação de raízes adventícias em estacas é uma técnica bastante utilizada. Vilela *et al.* (2010) constataram que a imersão em 1,0 g/L de ANA, por três minutos, promoveu maior número de raízes em estacas oriundas da porção mediana do pseudobulbo de *Dendrobium nobile*. Para a mesma espécie, Moraes *et al.* (2011) observaram que a imersão de estacas, por cinco minutos, em 100 mg/L de ácido indol acético propiciou incremento no comprimento da maior raiz.

Embora com inquestionáveis resultados benéficos no enraizamento de estacas de plantas das mais diferentes famílias botânicas, entre as quais se podem citar espinheira-santa (Lima *et al.*, 2008), azaléia (Lone *et al.*, 2008) e figueira (Sousa *et al.*, 2013), a utilização de auxinas como forma de promover incrementos em sistemas radiculares já estabelecidos é pouco estudada.

É importante salientar que, durante a aclimatização, além da temperatura, umidade relativa e luminosidade, o substrato também influencia a sobrevivência das mudas provenientes do cultivo *in vitro*, uma vez que, além de exercer função de suporte, deve apresentar atributos químicos e físicos adequados que possibilitem a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas aclimatizadas (Kämpf, 2005).

Atualmente, inúmeros materiais de origem orgânica, mineral ou sintética (Kämpf, 2005) tais como a fibra de coco, casca de arroz carbonizada, casca de pinus (Yamakami *et al.*, 2006), sementes de amendoeira (Santos & Teixeira, 2010), vermiculita (Venturieri & Arbieto, 2011) e isopor (Yamamoto *et al.*, 2009), vêm sendo avaliados para o cultivo de orquídeas, podendo ser usados isoladamente ou em misturas de forma a apresentar as características recomendadas, tais como permitir troca gasosa pelas raízes, garantir que a relação ar/água não sofra alterações durante o cultivo, apresentar capacidade de sustentação e de retenção de nutrientes para as plantas, apresentar pH adequado e ainda estar isento de agentes causadores de doenças, pragas e propágulos de plantas daninhas (Kämpf,

2005). Além disso, o substrato utilizado deve ser de fácil acesso, em quantidade suficiente e apresentar custo acessível, não comprometendo o valor final das mudas produzidas.

Em vista do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência *ex vitro* e o desenvolvimento inicial de plantas de *B. tuberculata*, utilizando o ácido naftaleno acético e diferentes substratos durante a fase de aclimatização.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na área de Jardinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) (22°11'S, 54°56'O, altitude 446 m), de setembro de 2011 a abril de 2012. O clima é do tipo Am de Köppen (Tropical Monçônico), com temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C e no mais quente superior a 22°C (Souza, 2012) e precipitação total anual entre 1.250 e 1.500 mm.

Para o estudo, foram utilizadas plantas de *Brassavola tuberculata*, obtidas a partir de germinação assimbiótica de sementes. Essas sementes foram provenientes de frutos, oriundos de polinização cruzada manual, colhidos em plantas adultas do orquidário da UFGD, sete meses após a identificação do sucesso na fecundação. Após serem colhidos, os frutos foram lavados com água e detergente neutro e desinfetados com álcool (70%). A seguir foram abertos, com auxílio de estilete e as sementes foram removidas, homogeneizadas, acondicionadas em recipiente desprovido de tampa e revestido internamente com papel alumínio e transferidas para dessecador, com sílica gel, por 14 dias, em condições ambientais.

Após esse período, 5 mg de sementes foram submetidas ao teste de tetrazólio que resultou em 388 sementes viáveis por miligrama de sementes. Uma vez identificada a viabilidade, sob condições assépticas, 20 mg de sementes foram imersas em água destilada estéril por 15 minutos. Na seqüência, a água foi descartada e as sementes foram desinfestadas, por 15 minutos, com uma so-

lução composta de 3 mL de hipoclorito de sódio (2,5%) e 6 mL de água destilada estéril (Campos, 2002). Após esse período as sementes receberam tríplice lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Após o descarte da água de lavagem as sementes receberam 120 mL de água destilada estéril e 2000 μ L dessa suspensão de sementes foram inoculados nos frascos de cultivo.

Foram utilizados como frascos de cultivo recipientes de vidro, com capacidade para 600 mL, providos de tampa metálica, contendo 60 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com 5,5 g/L de ágar bacteriológico (Himedia, Índia) e 20 g/L de sacarose ($C_6H_{12}O_6$) P.A. (Dinâmica, Brasil), e pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ com KOH (1 M), antes da esterilização em autoclave, a 120°C e à pressão de $1,05 \text{ kg/cm}^2$, por 20 minutos. Após a esterilização o meio de cultura apresentou pH 4,5.

Após a semeadura, os frascos foram tampados e as culturas acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética de $20,0 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada. Decorridos três meses, as plântulas foram repicadas para frascos de igual volume contendo o mesmo meio de cultura, permanecendo por mais três meses sob as mesmas condições.

Após esse período, as plantas com aproximadamente $3,0 \pm 0,5$ cm de altura, foram retiradas dos frascos de cultivo, lavadas com água corrente para remoção do excesso de meio de cultura e avaliadas quanto ao número de folhas (8,39), raízes (3,52) e perfilhos (2,46), comprimento da maior folha (1,31 cm) e da maior raiz (1,60 cm) e massa fresca (0,20 g). Na sequência, o sistema radicular das plantas foi imerso em 40 mL de uma das soluções de ácido naftaleno acético (ANA), nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 mg/L de ANA, por 10 segundos e plantadas em recipientes de polietileno descartáveis com capacidade para 50 cm^3 apresentando diâmetro médio de 5,0 cm e altura de 4,0 cm, provido de furo para drenagem em sua base e preenchidos com os substratos 1) esfagno rosa (Agrolink, Holambra-SP); 2) fibra de

coco (Golden-Mix Chips, Amafibra) e 3) esfagno rosa + fibra de coco (1:1, v:v).

Após o plantio, os recipientes contendo uma planta cada, foram apoiados em bandejas de polipropileno, com 40 células, permanecendo em sala de crescimento, nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e radiação fotossintética, por 30 dias, durante os quais receberam duas pulverizações com água destilada utilizando-se pulverizadores manuais.

Após este período, as bandejas contendo as plantas foram acondicionadas em viveiro coberto pela sobreposição de três telas de sombreamento de 50% cada (que propiciaram luminosidade média diária de $83 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$), sob condições médias de temperatura e umidade relativa de $22,6 \pm 5^\circ\text{C}$ e $73,9 \pm 10\%$, respectivamente. Para a irrigação durante o período experimental utilizou-se difusores, posicionados um metro acima das plantas, acionados automaticamente por temporizador digital e válvula solenóide. Foram realizadas duas irrigações diárias, que totalizaram uma lâmina de água de 1 mm/dia.

As plantas foram adubadas quinzenalmente, via foliar, com 2,0 mL/L de NPK 10-10-10, acrescido dos micronutrientes: 0,025% de magnésio, 0,02% de boro, 0,05% de cobre, 0,10% de ferro, 0,05% de manganês, 0,0005% de molibdênio e 0,05% de zinco, com teor máximo de cloro de 0,025%. A cada 30 dias as plantas foram desinfestadas, preventivamente, com O-S-dimetil-N-acetil-fosforamidotioato (4 mg/L) e Mancozeb (4 mg/L). Tanto para a adubação foliar, quanto para a desinfestação, foi utilizado pulverizador costal com capacidade para 5 L.

Decorrido este período as plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência e, a seguir, as plantas vivas foram retiradas dos substratos e lavadas em água corrente até total remoção dos substratos. Após este procedimento, as plantas foram separadas em parte aérea e sistema radicular, com auxílio de um bisturi, e avaliadas quanto ao número de folhas (7,34), de raízes (5,71) e de perfilhos (3,58), comprimento da maior folha (3,26 cm) e da maior raiz (3,61 cm), massa fresca de parte aérea (0,19 g) e das raízes (0,27 g) e massa seca de

parte aérea (0,02 g) e das raízes (0,02 g). Para a avaliação da massa seca da parte aérea e raízes os materiais foram mantidos em estufa de circulação forçada a 68°C até massa constante.

Dado o interesse em investigar a hipótese de aumento no número de folhas, de raízes e de perfilhos, no comprimento de parte aérea e raízes e na massa fresca das plantas aclimatizadas em relação aos seus valores iniciais, foram calculados seus incrementos, em relação aos valores iniciais por meio da expressão $I = (VF/VI)$, onde VI é o valor da variável antes da planta ser aclimatizada e VF é o valor da mesma variável após o período de aclimatização.

Também foram calculadas as relações entre massa fresca e seca da parte aérea e das raízes e a massa fresca e seca total. Os valores dos incrementos e dessas relações também foram submetidos à análise de variância.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 3×10 (três substratos e dez concentrações de ANA), com 10 repetições constituídas por uma planta. Os dados decorrentes de variáveis discretas ou de porcentagem foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e submetidos à análise de variância utilizando o programa SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010). Havendo significância, os fatores qualitativos foram comparados por teste de médias (Tukey a 5% de probabilidade) e os quantitativos por análise de regressão.

Também, foram realizadas avaliações quanto às principais características físicas e químicas dos substratos. A caracterização física dos substratos (macroporosidade; microporosidade; porosidade total; capacidade máxima de retenção de água; densidade do substrato e densidade real) foi realizada utilizando-se tubetes de polipropileno para produção de mudas florestais, com capacidade volumétrica de 50 cm^3 , com a abertura inferior provida de quatro furos, com 2 mm de diâmetro cada, preenchidos com os substratos a serem analisados seguindo-se metodologia proposta por Guerrini & Trigueiro (2004).

Os atributos químicos avaliados foram a condutividade elétrica e o pH

(em água). Para a determinação do pH foram utilizadas suspensões de substrato e água deionizada utilizando-se 20 mL de cada substrato (calculados segundo a densidade) e 50 mL de água deionizada. Para a determinação da condutividade elétrica foram preparadas suspensões utilizando-se 50 mL de cada substrato (calculados segundo sua densidade) e 250 mL de água deionizada. Os frascos contendo as suspensões foram agitados por 30 minutos em agitador mecânico. Logo após, as amostras foram filtradas, e as determinações, feitas no extrato aquoso com o auxílio de um pHmetro/condutivímetro digital HANNA, modelo HI 8314, seguindo-se a metodologia proposta por Guerrini & Trigueiro (2004).

Para avaliação dos atributos físicos e químicos dos substratos, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos, constituídos dos substratos analisados, e cinco repetições de três amostras de cada substrato. As variáveis foram submetidas à análise de variância e as médias, foram comparadas pelo teste Tukey até 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sobre nenhuma das variáveis analisadas foram observadas interações ($p > 0,05$) dos fatores estudados (concentração de ANA x substrato).

Respostas de *Brassavola tuberculata* em relação à imersão do sistema radicular em ANA - As concentrações de ANA interferiram isoladamente ($p < 0,05$) na porcentagem de sobrevivência e nos incrementos em massa fresca e número de folhas das plantas. Para os demais incrementos, independentemente das concentrações do fitorregulador, os valores médios observados foram incremento no número de raízes (1,62), no comprimento da maior raiz (1,60), no número de perfilhos (1,45) e no comprimento da maior folha (2,48).

A maior sobrevivência (67,7%) foi obtida com a utilização da dose calculada de 1,8 mg/L de ANA (Figura 1). A resposta das plantas em relação à

aplicação exógena de fitorreguladores varia muito em função da espécie e da concentração utilizada (Pasqual, 2001). Para *B. tuberculata*, concentrações diferentes de 1,8 mg/L propiciaram decréscimos na porcentagem de sobrevivência das plantas. Em relação a essa concentração, a utilização de 4,5 mg/L propiciou uma redução de 24,3% na sobrevivência, enquanto que a ausência do fitorregulador resultou em 11,3% de decréscimo, indicando que a planta é mais suscetível a maiores concentrações do fitorregulador do que à ausência do mesmo.

Embora a concentração de 1,8 mg/L de ANA tenha resultado na maior sobrevivência de *B. tuberculata*, não foi essa a concentração que proporcionou os melhores resultados para as características que responderam significativamente à ação desse fitorregulador, uma vez que o maior incremento em massa fresca foi observado na ausência de ANA (Figura 2A) enquanto que a dose de 4,5 mg/L propiciou incremento em número de folhas igual a 1,0 (Figura 2B).

As plantas cultivadas na ausência do fitorregulador apresentaram, no final da aclimatização, massa fresca de 0,48 g e um incremento em relação às plantas iniciais de 2,2 vezes. Quando cultivadas com a dose máxima de ANA as plantas apresentaram, no mesmo período, massa fresca de 0,32 g e um incremento de 1,2 vezes. Esses valores apontam para um decréscimo de 0,26 g na massa fresca das plantas cultivadas na presença do

fitorregulador em relação àquelas cultivadas na ausência do mesmo (Figura 2A), o que indica efeito negativo do fitorregulador sobre essa variável.

O número de folhas observado no final do período experimental foi inferior ao apresentado pelas plantas no início do período de aclimatização gerando incremento no número de folhas (INF) inferior a 1,0 (Figura 2B), independentemente se as plantas foram ou não submetidas ao ANA. Este resultado pode ser decorrente do estresse ocasionado pela aclimatização. Plantas, aparentemente vigorosas *in vitro*, podem apresentar uma série de mudanças morfológicas, anatômicas e fisiológicas nessas condições. Além disso, a camada de cera sobre as folhas é mínima ou inexistente, e a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias ainda é frágil para permitir um fluxo transpiratório adequado (Faria *et al.*, 2012).

Como resposta às novas condições de cultivo, a abscisão foliar é uma das formas de minimizar as perdas pela evapotranspiração (Taiz & Zeiger, 2008). Entretanto, as plantas submetidas às maiores concentrações de ANA apresentaram as menores perdas de folhas (Figura 2B), indicando o efeito benéfico dessa auxina sobre o INF, o que pode ser decorrente da ação do ANA tanto na iniciação, formação e morfologia foliar, quanto na constituição das redes vasculares (Scarpella *et al.*, 2010).

Sabe-se que a eficiência, no processo de aclimatização, pode ser aumentada

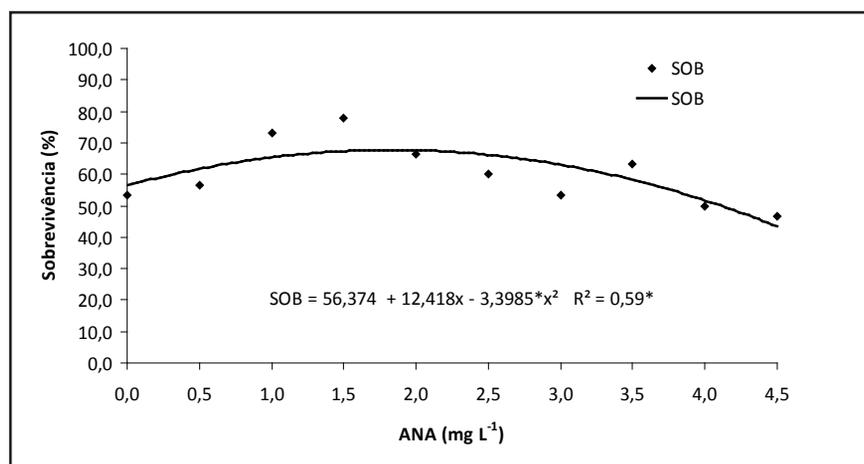


Figura 1. Sobrevivência (SOB) de plantas de *Brassavola tuberculata*, aos 210 dias de aclimatização, em função das concentrações de ANA (survival of *Brassavola tuberculata* plants, 210 days under acclimatization, depending on NAA concentrations); *significativo a 5% de probabilidade pelo teste F (significant at 5% probability by F test). Dourados, UFGD, 2012.

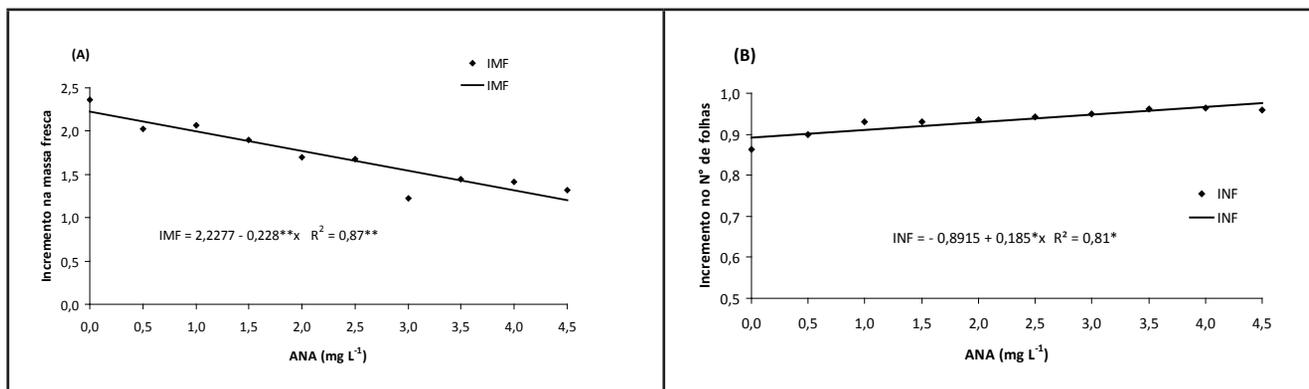


Figura 2. (A) IMF= incremento em massa fresca (fresh mass increment); (B) INF= incremento no número de folhas (increment of the number of leaves) de *Brassavola tuberculata* aos 210 dias de aclimatização, em função das doses de ANA (of *Brassavola tuberculata*, 210 days under acclimatization, depending on NAA concentrations); **, *significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F (**, *significant value by F test, 1 and 5%, respectively). Dourados, UFGD, 2012.

com o estímulo da formação de raízes (Dewir *et al.*, 2005) em plantas oriundas do cultivo *in vitro*. As raízes das orquídeas além de serem responsáveis pela fixação no substrato (Taiz & Zeiger, 2008), também possibilitam a absorção de água, reduzindo, assim, os efeitos da dessecação e aumentando a probabilidade de sobrevivência das plantas (Souto *et al.*, 2010).

Nesse trabalho, a relação entre massa seca das raízes e massa seca total (R2) aumentou (Figura 3B), enquanto que a relação entre massa seca da parte aérea e a massa seca total (R1) decresceu com o aumento das concentrações de ANA (Figura 3A). Esses resultados indicam que a auxina utilizada participa na formação de primórdios radiciais.

A literatura científica apresenta relatos distintos em relação à ação do ANA como promotor de massa seca radicial em Orchidaceae. Souto *et al.* (2010) relatam que a utilização de 2,0 mg/L de ANA, em meio de cultura Knudson C, propiciou maior valor de massa seca de raízes em *Cattleya bicolor*, sendo essa concentração significativamente superior às demais estudadas. Em contrapartida, Ori (2006) verificou que a maior massa seca de raízes de *Phalaenopsis amabilis* foi obtida com a utilização de 0,2 mg/L de ANA, menor concentração estudada pelo autor.

Na literatura, as concentrações de ANA mais utilizadas variam de 0,5 a 3,0 mg/L, podendo ser aplicadas em brotações ou em substratos. A concentração e o modo de aplicação variam conforme o genótipo, e devem ser determinados de

acordo com a espécie estudada (Pasqual *et al.*, 2001).

Enquanto Sorace *et al.* (2007) constataram que o maior número e comprimento de raízes de *Oncidium baueri*, aos 210 dias de aclimatização, foram obtidos com a imersão das plantas, por 10 segundos, em 200 mg/L de ANA, para *B. tuberculata*, a imersão em 1,8 mg/L propiciou a maior sobrevivência. Para as plantas de *B. tuberculata* que sobreviveram, a ausência do regulador promoveu o maior incremento em massa fresca, assim como a imersão em 4,5 mg/L de ANA promoveu o maior incremento no número de folhas e maior relação entre a massa seca de raízes e a massa seca total.

Esses resultados confirmam a necessidade de estudos futuros para cada genótipo a ser analisado.

Resposta de *Brassavola tuberculata* em relação aos substratos - Os substratos influenciaram ($p < 0,05$) a sobrevivência, os incrementos no comprimento de folhas e o número de perfilhos obtidos.

Em relação aos substratos estudados para a aclimatização, os maiores valores de sobrevivência de *B. tuberculata* foram observados no substrato esfagno (SF). A utilização da fibra de coco (FC) ou da combinação de SF+FC ocasionou uma redução de 21% e 17%, respectivamente, na sobrevivência das plantas em relação ao esfagno (Tabela 1).

Provavelmente, a maior porcentagem de sobrevivência das plantas, foi devido às características físicas do esfagno. Esse substrato apresentou a

maior capacidade de retenção hídrica e porosidade (Tabela 2). Esses atributos, segundo Schmitz *et al.* (2002), proporcionam durante a fase de aclimatização, suprimento hídrico adequado para sobrevivência das plantas. Além disso, as plantas *ex vitro* apresentam maior taxa de transpiração do que quando mantidas *in vitro*, estando sujeitas a maior estresse hídrico (Grattapaglia & Machado, 1998).

As orquídeas são classificadas como plantas sensíveis aos teores totais de sais solúveis (TTSS) tolerando, segundo Kämpf (2005), de 0,5 a 1,0 g/L. Nesse trabalho, os valores médios calculados de TTSS dos substratos em função da condutividade elétrica (Tabela 2) foram de 0,01 g/L para o esfagno, 0,4 g/L para a mistura de esfagno e fibra de coco e de 0,7 g/L para a fibra de coco. Embora todos os substratos apresentem TTSS compatíveis com os relatos de Kämpf (2005), os menores teores registrados no esfagno podem ter contribuído para a maior sobrevivência da espécie no mesmo.

Relatos científicos permitem inferir que genótipos de Orchidaceae respondem diferentemente à condutividade elétrica dos substratos de cultivo. Yamakami *et al.* (2006) verificaram que condutividade elétrica entre 73,3 e 98,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ foi benéfica ao desenvolvimento de *Brassocattleya pastoral* Rosa e *Miltonidium*. Para *Dendrobium nobile*, esse valor deve ser de 144,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Bernardi *et al.*, 2004). Para *Phalaenopsis* sp., valores entre 63 e 380 $\mu\text{S}/\text{cm}$ não interferiram no seu desen-

volvimento (Wang & Gregg, 1994) e, para *Cattleya intermedia* x *Hadrolaelia purpurata*, substratos com condutividade elétrica entre 202,48 e 254,24 $\mu\text{S}/\text{cm}$ podem ser utilizados em seu cultivo (Sorace *et al.*, 2009).

Em relação aos valores de pH obser-

vados no extrato aquoso dos substratos avaliados, o da FC foi 6,0, enquanto que o do SF e do SF+FC foi 5,0 (Tabela 2). Segundo Kämpf (2005), a faixa de pH recomendada para cultivo de orquídeas se encontra entre 4,5 e 5,5. O pH é um atributo químico importante, pois valo-

res inadequados afetam a disponibilidade de nutrientes, podendo causar desequilíbrios fisiológicos nas plantas (Taiz & Zeiger, 2008). É importante salientar que o pH do meio de cultura utilizado, após a esterilização em autoclave foi de 4,5, estando mais próximo aos observados nos substratos constituídos por SF. Esse fator, aliado à condutividade elétrica, pode ter colaborado para a melhor adaptação das plantas ao esfagno.

Embora para *B. tuberculata* o esfagno tenha apresentado boas características à aclimatização de suas plantas isso não é regra geral, uma vez que Yamamoto *et al.* (2009) não obtiveram diferenças significativas na sobrevivência de *Miltonia regnellii* x *Oncidium concolor* crescidas no esfagno e no pó de coco, permitindo inferir que cada espécie responde diferentemente a essa fase do seu crescimento e outras condições que não apenas o substrato influenciam a sobrevivência.

Em relação às demais características avaliadas, o incremento no número de folhas e no comprimento da maior folha (Tabela 1) foi inferior a um, decorrente da senescência e posterior queda das folhas no início da aclimatização. Além disso, as folhas formadas não atingiram, durante este período, o mesmo comprimento daquelas produzidas *in vitro*. No entanto, as menores alterações no comprimento da maior folha produzida *ex vitro* em relação àquelas produzidas *in vitro* foram registradas com a utilização de esfagno estatisticamente iguais àquelas produzidas em SF+FC (Tabela 1).

Tabela 1. SOB= sobrevivência (survival), IMF= incrementos na massa fresca das plantas (fresh mass increment of plants), INF= incremento do número de folhas (increment of number of leaves), ICF= comprimento da maior folha (length of the longest leaf), INP= número de perfilhos (number of tillers), INR= número de raízes (number of roots), ICR= comprimento da maior raiz (root length); R1= razão de massa fresca da parte aérea/total (ratio of fresh mass shoots/total), R2= massa fresca de raiz/total (fresh mass root/total), R3= massa seca da parte aérea/total (dry mass shoots/total), R4= massa seca de raiz/total (dry mass root/total) de plantas de *Brassavola tuberculata*, obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes, aos 210 dias de aclimatização, em função dos substratos utilizados (of *Brassavola tuberculata* obtained from *in vitro* germination of seeds, 210 days under acclimatization, depending on substrates). Dourados, UFGD, 2012.

Substrato	SOB (%)	IMF	INF	ICF	INP	INR
SF	74,00a	2,46a	0,95a	0,97a	1,53b	2,01a
FC	53,00b	2,39a	0,83a	0,84b	1,63ab	1,69a
SF+FC	57,00b	3,46a	1,03a	0,88ab	1,96a	1,78a
F	5,5**	2,7 ^{ns}	2,2 ^{ns}	3,1*	3,3*	1,8 ^{ns}
CV (%)	65,45	26,8	12,1	7,4	16,9	16,4
Média geral	61,30	2,75	0,94	0,90	1,69	1,85
	ICR (%)	R1	R2	R3	R4	
SF	1,85a	41,65a	58,35a	0,43a	0,57a	
FC	2,43a	38,83a	61,17a	0,42a	0,58a	
SF+FC	1,70a	41,80a	58,20a	0,44a	0,56a	
F	2,7 ^{ns}	1,2 ^{ns}	1,4 ^{ns}	0,5 ^{ns}	0,4 ^{ns}	
CV (%)	23,5	12,55	9,86	4,55	4,16	
Média geral	1,97	40,90	59,10	0,43	0,57	

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade (means followed by the same letter in the column, did not differ from each other by Tukey test 5%); SF= esfagno (sphagnum), FC= fibra de coco (coconut fiber), SF+FC= esfagno + fibra de coco (sphagnum + coconut fiber); **, *significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F (significant value by F test 1 and 5%, respectively); ^{ns}não significativo pelo teste F (not significant by F test).

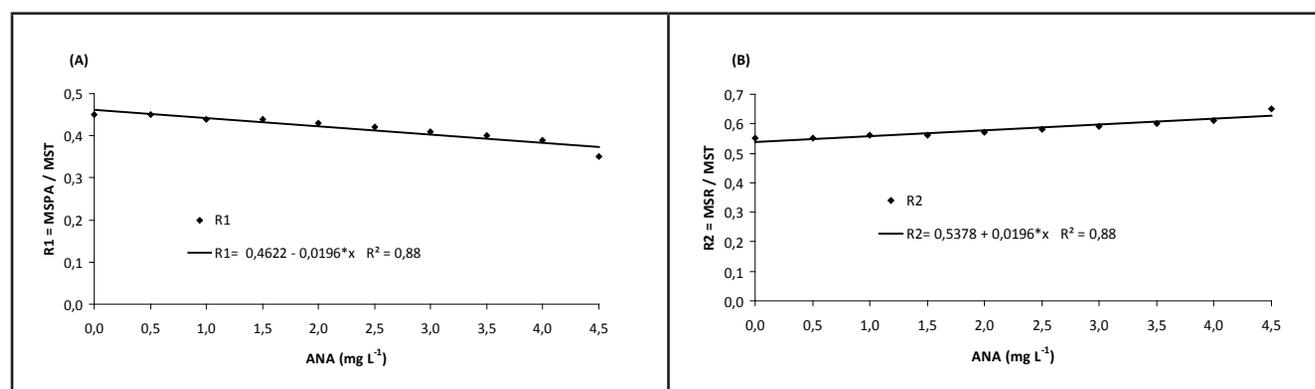


Figura 3. (A) R1= razão de massa seca da parte aérea/total (ratio of dry mass of shoots/total); (B) R2= razão de massa seca de raiz/total (ratio of dry mass of root/total) de plantas de *Brassavola tuberculata*, obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes, em função das doses de ANA, 210 dias após aclimatização em diferentes substratos (of *Brassavola tuberculata* obtained from *in vitro* germination of seeds, depending on NAA concentrations, 210 days under acclimatization on different substrates); *significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F (significant by F test, 5%). Dourados, UFGD, 2012.

Tabela 2. Ma= Macroporosidade (macroporosity), Mi= microporosidade (microporosity), PT= porosidade total (total porosity), Cm= capacidade de máxima de retenção de água (maximum water retention capacity), Ds= densidade do substrato (substrate density), Dr= densidade real do substrato (real density), pH= potencial hidrogeniônico (hydrogen potential), CE= condutividade elétrica (electrical conductivity) dos substratos utilizados na aclimatização de plantas de *Brassavola tuberculata* (of substrates used in the acclimatization of *Brassavola tuberculata*). Dourados, UFGD, 2012.

Substrato	Ma (%)	Mi (%)	PT (%)	Cm (mL/50 cm ³)
SF	10,92a	71,47a	82,40a	35,73a
FC	4,64b	13,05c	17,69c	6,52c
SF+FC	5,21b	43,66b	48,88b	21,83b
F	31,9**	526,6**	1028,2**	526,6**
CV (%)	19,84	6,66	4,54	6,66
Média geral	6,92	42,73	49,65	21,36
	Ds (kg/L)	Dr (kg/L)	pH	CE (µS/cm)
SF	0,068a	0,036a	5,00b	194,80c = 0,01 g/L
FC	0,028b	0,010b	6,00a	1263,20a = 0,7 g/L
SF+FC	0,033b	0,016b	5,00b	730,00b = 0,4 g/L
F	29,6**	53,4**	1.E+***	592,8**
CV (%)	20,58	19,98	0,01	6,73
Média geral	0,043	0,021	5,33	729,33

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade (means followed by the same letter in the column, did not differ from each other by Tukey test 5%); SF= esfagno (sphagnum), FC= fibra de coco (coconut fiber), SF+FC= esfagno + fibra de coco (sphagnum + coconut fiber); **, *significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F (significant value by F test 1 and 5%, respectively); ^{ns}não significativo pelo teste F (not significant by F test).

Esses resultados devem-se ao fato de que a aclimatização é uma etapa bastante crítica e delicada uma vez que as plantas ainda são heterotróficas, apresentam baixa eficiência do sistema radicular, reduzida competência vascular, pouca quantidade de estômatos funcionais e mal formação da cutícula (Faria *et al.*, 2012). A senescência foliar é uma das respostas fisiológica que possibilita a sobrevivência das plantas (Taiz & Zeiger, 2008).

De todas as características estudadas, o esfagno só não foi o mais eficaz na promoção do maior número de perfilhos. O substrato constituído por SF+FC apresentou o maior valor no incremento do número de perfilho (1,96), sendo estatisticamente igual ao substrato constituído por apenas FC (1,63) e maior que o constituído por SF (1,53) (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados por Lone *et al.* (2008), que obtiveram menor número de perfilhos de *Cattleya intermedia* no esfagno em relação à fibra de coco.

A mistura de derivados de coco

com outros materiais é amplamente utilizada em todas as etapas do cultivo de orquídeas apresentando, na maioria das vezes, resultados satisfatórios para o acréscimo no número de perfilhos. Assis *et al.* (2011), obtiveram maior número de perfilhos do híbrido (*C. forbesii* x *C. labiata*) x *C. labiata*, com o uso de fibra de coco ou coco em pó em mistura com casca de café. Em contrapartida, Yamakami *et al.* (2009) não observaram diferenças significativas no número de perfilhos em híbridos de orquídeas *Brassocattleya pastoral* ‘Rosa’ e *Miltonia regnelli* x *Oncidium crispum* com o uso de diversos substratos entre os quais fibra de coco isolada ou em combinação com casca de *Pinus*, casca de arroz ou carvão vegetal.

O menor número de perfilhos observados no SF deve-se provavelmente às condições favoráveis desse substrato à aclimatização dessa espécie. Orchidaceae quando submetidas a qualquer tipo de estresse, tendem a emitir novos perfilhos, pois os mesmos são órgãos de reserva de água e nu-

trientes que podem ser disponibilizados para as plantas em condição de déficit hídrico ou nutricional, garantindo-lhe a sobrevivência (Assis *et al.* 2003).

A média geral da maioria dos incrementos das variáveis foi positiva, indicando que as condições de aclimatização estudadas foram satisfatórias, uma vez que a média de sobrevivência foi superior a 50%. As relações entre massa fresca e seca das plantas indicam que, independentemente dos substratos utilizados, nesta fase, os fotoassimilados foram direcionados para o aumento do sistema radicular, que é responsável pela fixação da planta ao substrato e absorção de água e nutrientes. Isso permite inferir que um sistema radicular bem desenvolvido é fundamental para a sobrevivência *ex vitro* de *B. tuberculata*.

Desta forma conclui-se que o substrato esfagno, é o mais indicado para a sobrevivência e crescimento inicial de plantas de *Brassavola tuberculata*, na fase de aclimatização e que a aplicação de 1,8 mg/L de ANA promove a maior porcentagem de sobrevivência da espécie e a formação de sistema radicular eficiente para o seu desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

À FUNDECT pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro ao projeto e a AGRAER pelo incentivo à obtenção do título de doutor.

REFERÊNCIAS

- ASSIS AD; UNEMOTO LK; YAMAMOTO LY; LONE AB; SOUZA GRB; FARIA RT; ROBERTO SR; TAKAHASHI LSA. 2011. Cultivo de orquídea em substratos à base de casca de café. *Bragantia* 70: 544-549.
- ASSIS AM; COLOMBO LA; FARIA RT; FONSECA ICB. 2003. Longevidade pós-colheita de pseudobulbos com flores de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 9: 85-87.
- BARROS F; VINHOS F; RODRIGUES VT; BARBERENA FFVA; FRAGA CN; PESSOA EM; FORSTER W; MENINI NETO L; FURTADO SG; NARDY C; AZEVEDO CO; GUIMARÃES LRS. 2013. *Orchidaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/>>

- floradobrasil/FB11230> Acessado em 25 de outubro de 2013.
- BERNARDI AC; FARIA RT; CARVALHO JRP; UNEMOTO KL; ASSIS AM. 2004. Desenvolvimento vegetativo de plantas de *Dendrobium nobile* fertirrigadas com diferentes concentrações de solução nutritiva de Sarruge. *Semina* 25: 11-18.
- CAMPOS DM. 2002. *Orquídeas*: manual prático da cultura. 3. ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura. 143p.
- DEWIR YH; CHAKRABARTY D; ALI MB; HAHN EJ; PAEK KY. 2005. Effects of hydroponic solution EC, substrates, PPF and nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. *Plant Growth Regulation* 46: 241-251.
- FARIA RT; ASSIS AM; UNEMOTO LK; CARVALHO JFRP. 2012. *Produção de orquídeas em laboratório*. Londrina: Mecenas. 124p.
- FERREIRA DF. 2010. *SISVAR*: a computer statistical analysis system. Versão 5.3. Lavras: DEX/UFLA.
- FERREIRA WM; SUZUKI RM. 2008. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA MIB; BASEIA IG; LICHSTON JE (org) *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Natal: Imagem Gráfica. p. 67-68.
- GRATTAPAGLIA D; MACHADO MA. 1998. Micropropagação. In: TORRESAC; CALDAS LS; BUSO JA (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa Produção de Informação/Embrapa/Embrapa Hortaliças. p. 183-260.
- GUERRINI IA; TRIGUEIRO RM. 2004. Atributos físicos e químicos de substratos compostos por biossólidos e casca de arroz carbonizada. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 28: 1069-1076.
- HERING M; PUTZKE MTL. 2007. *Cattleya*, *Brassavola* and *Sophrontis* (Orchidaceae) distribution and habitat characterization in Estrela Municipality, southern Brazil. *Caderno de Pesquisa* 19: 24-28.
- HERMANN MH; FREITAS EM; PÉRICO E. 2011. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. *Revista Brasileira de Agrociência* 17: 162-166.
- KÄMPF AN. 2005. *Produção comercial de plantas ornamentais*. 2.ed. Guaíba: Agrolivros. 256 p.
- LIMA DM; SILVA CL; RITTER M; BIASI LA; ZANETTE F; ZUFFELLATO-RIBAS KC. 2008. Substratos e auxinas no enraizamento de estacas caulinares de espinheira-santa. *Scientia Agraria*, 9: 85-89.
- LIU H; LUO YB; LIU ZJ. 2013. Using guided commercialized cultivation models to promote species conservation and sustainable utilization: an example from the Chinese medicinal orchids. *Biodiversity Science* 21: 132-135.
- LONE AB; BARBOSA CM; TAKAHASHI LSA; FARIA RT. 2008. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. *Acta Scientiarum* 30: 465-469.
- MORAES CP; SOUZA-LEAL T; PEDRO NP; MARTINE GA; MORO AM. 2011. AIA no estímulo de brotos laterais em estacas de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). *Ensaios e Ciência* 15: 111-119.
- MURASHIGE T; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- ORI SS. 2006. Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* (Orchidaceae) cultivada *in vitro*. São Paulo: IBot/SP. 133p. (Dissertação mestrado).
- PASQUAL M. 2001. Meios de cultura. In: PASQUAL M (org). *Cultura de tecidos vegetais*. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 74p.
- PASQUAL M; CHALFUN NNJ; RAMOS JD. 2001. *Cultura de tecidos*: Tecnologia e aplicações - aplicações na propagação de plantas. Lavras: UFLA/FAEPE, 81 p.
- RECH AR; ROSA YBCJ; MANENTE-BALESTIERI FCL. 2010. Aspects of the reproductive biology of *Brassavola cebolleta* (Orchidaceae). *Acta Scientiarum* 32: 335-341.
- SANTOS MN; TEIXEIRA MLF. 2010. Semente de amendoeira (*Terminalia catappa*) (Combretaceae) como substrato para o cultivo de orquídeas epífitas. *Acta Scientiarum* 32: 339-343.
- SCARPELLA E; BARKOULAS M; TSANTIS M. 2010. Control of leaf and vein development by auxin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: 1-17.
- SCHMITZ JAK; SOUZA PVD; KÄMPF AN. 2002. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. *Ciência Rural* 32: 937-944.
- SOARES JS; ROSA YBCJ; MACEDO MC; SORGATO JC; ROSA DBCJ; ROSA CBCJ. 2012. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. *Magistra* 24: 226-233.
- SORACE M; FARIA RT; YAMAMOTO LY; SCHNITZER JA; TAKAHASHI LSA. 2007. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). *Semina* 28: 195-200.
- SORACE M; FARIA, RTF; FONSECA ICB; YAMAMOTO LY; SORACE MAF. 2009. Substratos alternativos ao xaxim no cultivo do híbrido *Cattleya intermedia* x *Hadrolaelia purpurata* (Orchidaceae). *Semina* 30: 771-778.
- SOSA CM; BUSQUET RN; VASCONCELLOS MAS; MIRANDARM. 2013. Effects of auxin and misting on the rooting of herbaceous and hardwood cuttings from the fig tree. *Revista Ciência Agronômica* 44: 334-338.
- SOUTO JS; MORIMOTO, JM; FERREIRA WM; NAKABASHI M; SUZUKI RM. 2010. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 8: 179-185.
- SOUZA FR. 2012. *Influência da intensidade do tráfego e de sistemas de manejo nas propriedades físicas do solo e nas culturas de soja e girassol*. Dourados: UFGD. 78p. (Tese doutorado).
- TAIZ L; ZEIGER E. 2008. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed. 819p.
- VENTURIERI GA; ARBIETO EAM. 2011. *Ex-vitro* establishment of *Phalaenopsis amabilis* seedlings in different substrates. *Acta Scientiarum* 33: 495-501.
- VILELA XMS; PASQUAL M; VILLA F; ARAÚJO AG. 2010. Tipos de pseudobulbos e número de nós no enraizamento e brotação de *Dendrobium nobile*. *Agrarian* 3: 1-7.
- WANG YT; GREGG LL. 1994. Medium and fertilizer affect the performance of *Phalaenopsis* during two flowers cycles. *Horticulture Science* 29: 269-270.
- YAMAKAMI JK; FARIA RT; ASSIS AM; REGO-OLIVEIRA LV. 2006. Cultivo de *Cattleya Lindley* (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. *Acta Scientiarum* 28: 523-526.
- YAMAKAMI JK; FARIA RT; STENZEL NMC. 2009. Desenvolvimento vegetativo de *Brassocattleya pastoral* 'Rosa' e *Miltonia regnelli* x *Oncidium crispum* (Orchidaceae) em substratos alternativos à fibra de xaxim. *Científica* 37: 32-38.
- YAMAMOTO LY; STEGANI V; FARIA RT; FONSECA ICB; ANGELIS BLD. 2009. Aclimatização do híbrido de orquídea em substratos a base de pó de bagaço de cana-de-açúcar. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 5: 60-64.