

Eficiência de substratos na aclimação de plântulas de *Aspasia variegata* Lindl. (Orchidaceae) obtidas *in vitro**Efficiency of substrates in the acclimatization of plantlets of *Aspasia variegata* Lindl. (Orchidaceae) obtained in vitro*Maicon Douglas Arenas-de-Souza^{1,3}; Isane Vera Karsburg²¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Botânica, Rio de Janeiro – RJ.²Universidade do Estado de Mato Grosso, Departamento de Ciências Biológicas, Alta Floresta – MT.³Autor para correspondência (*Author for correspondence*): m.arenasbot@gmail.com**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de diferentes substratos no cultivo de *Aspasia variegata*. Os seguintes substratos foram comparados: Musgo do Chile; Musgo do Chile + Carvão + Bolinhas de Isopor; Musgo do Chile + Vermiculita + Bolinhas de Isopor; Musgo do Chile + Material Vegetal em Decomposição + Bolinhas de Isopor e Musgo do Chile + Carvão + Bolinhas de Isopor + Vermiculita + Material Vegetal em Decomposição. Após 90 dias de cultivo, foram avaliados os parâmetros vegetativos. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Durante a aclimação, apenas a variável número de folhas não obteve diferenças significativas entre os tratamentos. No comprimento da maior raiz, peso da massa fresca, presença de pseudobulbos, tamanho das plantas e número de raízes, o melhor tratamento foi o 5 (musgo do Chile, carvão, bolinhas de isopor, vermiculita e material vegetal em decomposição) sendo este o mais indicado para o cultivo da espécie; enquanto que os tratamentos 1 (musgo do Chile) e 2 (musgo do Chile, carvão e bolinhas de isopor, respectivamente) foram os que obtiveram os menores valores para a maioria dos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Aclimação, Orquídeas, Micropropagação.**Abstract**

The objective of this study was to test different substrates in the cultivation of *Aspasia variegata*. The following substrates were compared: Moss Chile; Moss Chile + Coal + Styrofoam Balls; Moss Chile + Vermiculite + Styrofoam Balls; Moss Chile + Plant material decomposition + Styrofoam Balls and Moss Chile + Coal + Styrofoam Balls + Vermiculite + Plant material decomposition. After 90 days of cultivation, vegetative parameters were evaluated. Data were subject to analysis of variance and comparing the averages with the Tukey test at 5% level of significance. During the acclimation, only the number of sheets got no significant differences between the treatments. In length of roots, fresh weight mass, presence of pseudobulbs, plant size and number of roots, the best treatment was 5 (moss of Chile, coal, styrofoam balls, vermiculite, plant material decomposition), which is the most suitable for the cultivation of the species; while treatments 1 and 2 (moss of Chile and moss of Chile, coal, styrofoam balls, respectively) were the ones with the lowest values for most of the parameters evaluated.

Key-words: Acclimatization, Orchids, Micropropagation.

INTRODUÇÃO

A floricultura é um dos segmentos mais dinâmicos e avançados do agronegócio contemporâneo (IBRAFLOR, 2014). Sabe-se que a família Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificadas dentre as Angiospermas, com cerca de 850 gêneros e aproximadamente 25 mil espécies distribuídas em praticamente todos os continentes, com maior concentração e diversidade nas regiões tropicais e subtropicais (Kerbauy, 2011). No Brasil, são listadas 2.440 espécies, das quais 1.630 são endêmicas do país (Barros et al., 2016).

O cultivo e comércio de orquídeas no mundo e no Brasil, se detém do extrativismo predatório que, aliado à contínua urbanização e ao aumento das fronteiras agrícolas, contribuíram para que diversas espécies entrassem em um iminente perigo de extinção (Galdiano Junior et al., 2013). Portanto, o cultivo *in vitro* é utilizado como instrumento para multiplicação de espécies vegetais, incluindo as orquídeas, sendo considerado uma ferramenta importante na obtenção de plantas, visando tanto a preservação das espécies ameaçadas ou não de extinção, quanto para a produção em escala comercial (Sorgato et al., 2014; Soares et al., 2012).

Porém, após o processo *in vitro* há uma fase delicada às plantas; a aclimação. Durante esta fase, é de suma importância a escolha do substrato, bem como fertilizantes que ajudem a promover o crescimento da planta. No caso das orquídeas, a aclimação é crítica e delicada, uma vez que, no cultivo *in vitro* as plantas ainda são heterotróficas, apresentando baixa eficiência do sistema radicular, reduzida competência vascular, pouca quantidade de estômatos funcionais e má formação da cutícula (Faria et al., 2012). Sendo assim, substratos que incrementem o desenvolvimento de orquídeas são imprescindíveis para o sucesso dessa etapa.

O gênero *Aspasia* foi descrito por John Lindley em 1832. É um gênero de ampla distribuição geográfica, cujas espécies ocorrem na faixa tropical da América do Sul, da Nicarágua ao Brasil. Atualmente o gênero

Aspasia apresenta seis espécies válidas e uma obscura, sendo *Aspasia silvana*, *Aspasia luneta* e *Aspasia variegata* conhecidas no Brasil (Silva & Silva, 2010).

Aspasia variegata é uma espécie que ocorre no Brasil e na Venezuela, apresenta 25 cm de altura, que forma tufos de pseudobulbos comprimidos com duas folhas finas e alongadas, com até 3 flores de até 5 cm e solitárias. Suas peças florais são manchadas, pintalgadas e rajadas de castanho e seu labelo trilobado é listrado de púrpura. Normalmente, esta espécie prefere maior sombreamento que as demais do gênero, além de muita umidade no ambiente e substrato bem drenado (Rocha, 2008).

OBJETIVO

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi testar a eficiência de cinco substratos no cultivo de plântulas de *Aspasia variegata* obtidas por meio de propagação *in vitro* durante a fase de aclimação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais e no Orquidário Altaflorestense da universidade.

Para a realização do mesmo, foram utilizadas plântulas de *Aspasia variegata* germinadas *in vitro* com aproximadamente 3±1 cm. A germinação e o cultivo *in vitro* realizado nesse período foram feitos em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura alternativo (água de coco, ágar, água, sacarose, fertilizante B&G[®], presença de carvão ativado), e com pH ajustado para 5,5 (Rodrigues et al., 2012). As plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente, eliminando-se o meio de cultura aderido às raízes, e transferidas para potes plásticos com capacidade de 100 mL.

Foram testados 5 diferentes substratos, sendo eles: S1- Musgo do Chile, S2- Musgo do Chile

+ Carvão + Bolinhas de Isopor (1:1:1 v/v/v); S3- Musgo do Chile + Vermiculita + Bolinhas de Isopor (1:1:1 v/v/v); S4- Musgo do Chile + Material Vegetal em Decomposição + Bolinhas de Isopor (1:1:1 v/v/v) e S5- Musgo do Chile + Carvão + Bolinhas de Isopor + Vermiculita + Material Vegetal em Decomposição (1:1:1:1:1 v/v/v/v/v), com vinte repetições para cada tipo de substrato e/ou combinações dos mesmos; sendo que havia uma planta por pote plástico, totalizando 20 plantas por tratamento. As plantas ficaram no Orquidário do *campus*, com temperatura de 27±1 °C, recebendo regas diárias por meio de aspersão manual.

Noventa dias posterior ao transplântio foram avaliadas as características fitotécnicas: comprimento total da planta, número e comprimento das folhas e das raízes, presença ou não de pseudobulbo e peso fresco, com o auxílio de um paquímetro digital e uma balança semianalítica. Com os dados foi efetuada a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de

probabilidade, utilizando o Programa Estatístico Sisvar[®] (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nota-se que os substratos agiram de maneiras distintas durante o processo *ex vitro*, sendo que apenas para a variável número de folhas não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos testados (Tabela 1). Baseado nisso, é provável que este resultado tenha sido decorrente devido ao próprio estresse ocasionado pela aclimação. Plantas cultivadas *in vitro*, aparentemente vigorosas, podem apresentar uma série de mudanças morfológicas, anatômicas e fisiológicas quando transferidas para a fase de aclimação. Além do mais, nestas condições, a camada de cera sobre as folhas é praticamente 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; Taiz & Zeiger, 2013).

Tabela 1. Número de folhas, comprimento da maior raiz, peso da massa fresca e presença de pseudobulbo de *A. variegata* após 90 dias de aclimação em diferentes substratos. S1- Musgo do Chile, S2- Musgo do Chile + Carvão + Bolinhas de Isopor (1:1:1 v/v/v); S3- Musgo do Chile + Vermiculita + Bolinhas de Isopor (1:1:1 v/v/v); S4- Musgo do Chile + Material Vegetal em Decomposição + Bolinhas de Isopor (1:1:1 v/v/v) e S5- Musgo do Chile + Carvão + Bolinhas de Isopor + Vermiculita + Material Vegetal em Decomposição (1:1:1:1:1 v/v/v/v/v).

Table 1. Number of leaves, length of largest root, weight of fresh mass and presence of pseudobulb of *A. variegata* after 90 days of acclimatization on different substrates. S1- Moss of Chile; S2- Moss of Chile + Coal + Styrofoam Balls (1:1:1 v/v/v); S3- Moss of Chile + Vermiculite + Styrofoam Balls (1:1:1 v/v/v); S4- Moss of Chile + Decomposition Vegetable Material + Styrofoam Balls (1:1 v/v/v) and S5- Moss of Chile + Coal + Styrofoam Balls + Vermiculite + Decomposition Vegetable Material (1:1:1:1:1 v/v/v/v/v).

Substratos	Nº de Folhas	Comprimento da Maior Raiz (mm)	Peso da Massa Fresca (g)	Presença de Pseudobulbo
S1	4,40 ± 0,60 a	2,12 ± 0,51 b	0,03 ± 0,01 c	0,00 ± 0,00 b
S2	3,40 ± 0,51 a	7,56 ± 1,57 a	0,04 ± 0,01 c	0,00 ± 0,00 b
S3	3,50 ± 0,37 a	9,33 ± 1,21 a	0,08 ± 0,02 bc	0,30 ± 0,11 ab
S4	3,65 ± 0,14 a	10,39 ± 0,70 a	0,10 ± 0,02 b	0,45 ± 0,12 a
S5	3,55 ± 0,34 a	12,47 ± 1,40a	0,18 ± 0,02 a	0,60 ± 0,11 a
C.V. (%)	28,68	25,58	26,34	30,43

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si, no nível de 5% de significância pelo teste de Tukey (média ± erro padrão). C.V. (%), Coeficiente de Variação.

Na avaliação dos dados referentes ao comprimento da maior raiz, verificou-se que a menor média foi obtida no tratamento 1, constituído por musgo do Chile, enquanto que

a maior média foi observada no tratamento 5, formado por musgo do Chile, carvão, bolinhas de isopor, vermiculita e material vegetal em decomposição nas mesmas proporções.

Possivelmente, este substrato apresentou maior aeração, oferecendo melhores condições para o desenvolvimento radicular e ainda, oferecendo suporte para as plântulas. Assis et al. (2011), estudando um híbrido de *Cattleya*, não obtiveram diferença para esta variável no substrato de casca de café e suas misturas.

Em relação ao peso da massa fresca, nota-se novamente que o melhor tratamento foi o 5 (musgo do Chile, carvão, bolinhas de isopor, vermiculita e material vegetal em decomposição), diferindo estatisticamente dos demais. Em seguida, os tratamentos 3 (musgo do Chile, vermiculita, bolinhas de isopor) e 4 (musgo do Chile, material vegetal em decomposição, bolinhas de isopor). Os valores mais baixos foram observados nos tratamentos 1 (musgo do Chile) e 2 (musgo do Chile, carvão e bolinhas de isopor). Tais valores podem estar atrelados ao desenvolvimento vegetativo em relação ao número de raízes, bem como ao comprimento radicular e foliar apresentado pelas plântulas, além do aparecimento de pseudobulbos. Estes dados indicam o incremento que houve no ganho de massa destas plântulas, sendo importantes para o vigor das mesmas.

Para a variável presença de pseudobulbo, percebe-se outra vez que a maior média foi obtida no tratamento 5 (musgo do Chile, carvão, bolinhas de isopor, vermiculita e material vegetal em decomposição), enquanto que nos tratamentos 1 (musgo do Chile) e 2 (musgo do Chile, carvão e bolinhas de isopor) os pseudobulbos foram ausentes. Assis et al. (2003) citam que os pseudobulbos exercem importante função na demanda energética da planta, pois armazenam água e carboidratos, portanto, permitem maiores chances de sobrevivência das plântulas.

Analisando o tamanho médio das plantas, verifica-se que o tratamento 5 (musgo do Chile, carvão, bolinhas de isopor, vermiculita

e material vegetal em decomposição) proporcionou o melhor desenvolvimento vegetativo para as plântulas de *A. variegata*; seguido pelos tratamentos 3 (musgo do Chile, vermiculita e bolinhas de isopor) e 4 (musgo do Chile, material vegetal em decomposição, bolinhas de isopor). Já os valores mais inferiores, foram observados nos tratamentos 1 (musgo do Chile) e 2 (musgo do Chile, carvão e bolinhas de isopor), mostrando-se os mais inviáveis para o cultivo desta espécie (Tabela 2). Normalmente, a formulação de substratos combinados é recomendada por diversos autores, uma vez que as mesmas proporcionam melhores resultados em relação à utilização de materiais isolados, como observado no substrato 1 (musgo do Chile) deste experimento, onde apenas um elemento não possibilitou maiores êxitos para o desenvolvimento de *A. variegata*.

Os dados referentes à variável comprimento médio foliar evidenciaram que o substrato 5 (musgo do Chile, carvão, bolinhas de isopor, vermiculita e material vegetal em decomposição) foi o mais eficaz na fase de aclimação da espécie, seguido pelos tratamentos 3 (musgo do Chile, vermiculita, bolinhas de isopor) e 4 (musgo do Chile, material vegetal em decomposição, bolinhas de isopor), que também mostraram-se muito eficientes. Os resultados mais inferiores foram, novamente, verificados nos substratos 1 (musgo do Chile) e 2 (musgo do Chile, carvão e bolinhas de isopor).

Quanto ao número de raízes, foi observado que os substratos 4 (musgo do Chile, material vegetal em decomposição, bolinhas de isopor) e 5 (musgo do Chile, carvão, bolinhas de isopor, vermiculita e material vegetal em decomposição) obtiveram os melhores resultados, sendo os mais benéficos para o desenvolvimento radicular da espécie.

Tabela 2. Tamanho médio das plantas, comprimento médio foliar e número médio de raízes de *A. variegata* após 90 dias de aclimação em diferentes substratos. S1- Musgo do Chile, S2- Musgo do Chile + Carvão + Bolinhas de Isopor (1:1:1 v/v/v); S3- Musgo do Chile + Vermiculita + Bolinhas de Isopor (1:1:1 v/v/v); S4- Musgo do Chile + Material Vegetal em Decomposição + Bolinhas de Isopor (1:1:1 v/v/v) e S5- Musgo do Chile + Carvão + Bolinhas de Isopor + Vermiculita + Material Vegetal em Decomposição (1:1:1:1:1 v/v/v/v/v).

Table 2. Average plant size, mean leaf length and average number of roots of *A. variegata* after 90 days of acclimatization on different substrates. S1- Moss of Chile; S2- Moss of Chile + Coal + Styrofoam Balls (1:1:1 v/v/v); S3- Moss of Chile + Vermiculite + Styrofoam Balls (1:1:1 v/v/v); S4- Moss of Chile + Decomposition Vegetable Material + Styrofoam Balls (1:1 v/v/v) and S5- Moss of Chile + Coal + Styrofoam Balls + Vermiculite + Decomposition Vegetable Material (1:1:1:1:1 v/v/v/v/v).

Substratos	Tamanho Médio das Plantas (mm)	Comprimento Médio Foliar (mm)	Número Médio de Raízes
S1	26,69 ± 1,75 c	9,35 ± 0,66 c	0,95 ± 0,19 c
S2	31,03 ± 4,04 bc	12,72 ± 1,58 c	1,50 ± 0,38 c
S3	41,06 ± 4,68 bc	18,52 ± 2,00 bc	2,05 ± 0,36 bc
S4	51,11 ± 2,75 ab	26,55 ± 1,91 ab	2,55 ± 0,17 a
S5	68,87 ± 4,67a	29,19 ± 2,40 a	3,55 ± 0,40 a
C.V. (%)	29,12	26,79	28,06

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si, no nível de 5% de significância pelo teste de Tukey (média ± erro padrão). C.V. (%), Coeficiente de Variação.

Schnitzer et al. (2010), também obtiveram resultados satisfatórios para o desenvolvimento das raízes com a combinação de substratos (casca de pinus, fibras de coco, casca de arroz carbonizada e carvão vegetal), ainda incrementado com extrato piro lenhoso, para as duas espécies estudadas, o que significa para Costa et al. (2009), que uma maior quantidade de raízes é essencial e deve ser estimulada para atingir o máximo de sobrevivência das plantas durante a aclimatização de orquídeas. Sasamori et al. (2014) também verificaram que o uso de mais de um substrato diferente incrementou o desenvolvimento do sistema radicular das plântulas de *Cattleya intermedia*. Em detrimento disso, o uso de esfagno, por exemplo, e casca de pinus utilizadas isoladamente, possibilitaram um menor número e menor comprimento de raízes por plântula para esta mesma espécie em trabalho realizado por Dorneles & Trevelin (2011).

CONCLUSÃO

O substrato mais indicado para o desenvolvimento de *Aspasia variegata* na fase de aclimação é o composto pela combinação de musgo do Chile, carvão, bolinhas de isopor, vermiculita e material vegetal em decomposição nas mesmas proporções.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMAT - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto e a SECITEC - Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia pela concessão de bolsas de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; YAMAMOTO, L. Y.; LONE, A. B.; SOUZA, G. R. B.; FARIA, R. T.; ROBERTO, S. R.; TAKAHASHI, L. S. A. Cultivo de orquídea em substratos à base de casca de café. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 3, p. 544-549, 2011.
- ASSIS, A. M.; COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B. Longevidade pós-colheita de pseudobulbos com flores de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 9, p. 85-87, 2003.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N., PESSOA, E. M.; FORSTER, W. Orchidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 15 de nov. 2016.
- COSTA, M. A. P. C.; PEREIRA, M. J.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídeas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA MFT, v. 1, p. 351-370, 2009.
- DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimação e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia, Série Botânica**, v. 66, p. 167- 174, 2011.
- FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P.. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. Londrina: Mecenaz, 124p. 2012.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistic alanalysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T.; LEMOS, E. G. M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34 n. 2, p. 583-592, 2013.
- IBRAFLOR. 2014. **Números do setor: Mercado interno**. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com>>. Acesso em: 20 de nov. de 2016.
- KERBAUY, G. B. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 383p. 2011.
- ROCHA, J. R. **ABC do Orquidófilo**. 1. ed. Agronômica Ceres LTDA, São Paulo, 424p. 2008.
- RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; DIAS J. M. M.; OTONI, W. C.; VILLANI, E. M. A. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. **Revista Ceres**, v. 59, n. 1, p. 1-8, 2012.
- SASAMORI, M. H.; ENDRES JÚNIOR, D.; DROSTE, A. Sobrevivência e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) micropropagadas e aclimatadas em substratos com fibra de coco. **Pesquisas, Botânica**, v. 65, p. 293-303, 2014.
- SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T.; VENTURA, M. U.; SORACE, M. Substratos e extrato pirolenhoso no cultivo de orquídeas brasileiras *Cattleya intermedia* (John Lindley) e *Miltonia clowesii* (John Lindley) (Orchidaceae) **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 139-143, 2010.
- SILVA, M. F. F.; SILVA, J. B. F. **Orquídeas Nativas da Amazônia Brasileira II**. 2. ed. Rev. Belém, 526p. 2010.
- SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; ROSA, C. B. C. J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, v. 24, n. 3, p. 226-233, 2012.
- SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R.; RAMOS, W. B.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Ácido naftalenoacético no enraizamento *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzgerald. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 72-79, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 954p. 2013.