

EFICIÊNCIA DE SUBSTRATOS NA ACLIAMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Miltonia flavescens* LINDL. PROPAGADAS *IN VITRO*

Suzana Stefanello*
Edvandro Vinicius Silveira**
Lana Karina Oliveira***
Jean Carlos Fernando Besson****
Gesiani Mosa Neves Dutra*****

RESUMO: A aclimatização, que envolve a transferência das plantas cultivadas *in vitro* para condições *ex vitro*, é uma fase crítica e importante no processo de micropropagação. A escolha de um substrato adequado pode interferir na taxa de sobrevivência das plantas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* propagadas *in vitro*. Plantas oriundas de cultura *in vitro* foram transferidas para vasos de polipropileno contendo cinco substratos: pó de coco, fibra de coco, casca de *Pinus* sp, pó de coco + casca de *Pinus* sp. e Plantmax®. A unidade experimental consistiu de um vaso contendo duas plantas, com dez repetições, totalizando 20 plantas por tratamento. Aos 30, 60 e 90 dias após o transplântio, as plantas foram avaliadas quanto à taxa de sobrevivência e após 90 dias foram avaliados os comprimentos da parte aérea e da raiz. Não houve diferença significativa entre os tratamentos na avaliação realizada aos 30 dias de cultivo. Aos 60 dias após o transplântio, observou-se uma queda acentuada na taxa de sobrevivência em todos os substratos e os maiores valores foram obtidos quando o substrato utilizado foi a fibra de coco, ocorrendo diferença significativa apenas quanto ao substrato pó de coco, desempenho mantido aos 90 dias de cultivo. O maior crescimento vegetativo das plantas foi observado quando o substrato utilizado foi a

* Doutora em Genética e Melhoramento; Docente da Universidade Paranaense - UNIPAR, Campus Toledo. E-mail: sstefanello@unipar.br

** Biólogo pela Universidade Paranaense - UNIPAR, Campus Toledo. E-mail: edvandro_vinicius@hotmail.com

*** Discente do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense – UNIPAR, Campus Toledo. E-mail: lana_809@hotmail.com

**** Discente do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense – UNIPAR, Campus Toledo. E-mail: jeanbesson_biologo@hotmail.com

***** Discente do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense – UNIPAR, Campus Toledo. E-mail: gesianimosa@hotmail.com

casca de *Pinus* sp.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae; *Miltonia flavescens*; Transplântio; Substratos.

EFFICIENCY OF SUBSTRATES ON ACCLIMATIZATION OF *IN VITRO* PROPAGATED *Miltonia flavescens* LINDL

ABSTRACT: Acclimatization, which involves the transfer of *in vitro* cultivated plants to *ex vitro* conditions, is a critical stage in micropropagation. The choice of an appropriate substrate can affect plant survival rates. The objective of this study was to evaluate the efficiency of different substrates on the acclimatization of *in vitro* propagated *Miltonia flavescens*. Plantlets obtained from *in vitro* culture were transferred to polypropylene pots containing five different substrates: coconut fiber powder, coconut fiber, *Pinus* sp. bark, coconut fiber powder blended with *Pinus* sp. bark and Plantmax[®]. The experimental unit consisted of one pot containing two plants, with ten repetitions, totalizing 20 plants per treatment. At 30, 60 and 90 days after transplanting the plants were evaluated for survival rates, and after 90 days, shoot and root lengths were evaluated. No significant difference was found among treatments after 30 days of cultivation. At 60 days after transplanting, a marked decrease in survival rate was recorded for all substrates. The highest rates were obtained with coconut fiber, with significant difference only in relation to coconut fiber powder and this performance was sustained at 90 days of cultivation. The highest vegetative growth was recorded for the substrate *Pinus* sp. bark.

KEYWORDS: Orchidaceae; *Miltonia flavescens*; Transplanting; Substrates.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é composta por aproximadamente 35.000 espécies, totalizando 7% das plantas ornamentais do planeta (ALTAFIN et al., 2003). As orquídeas são plantas muito apreciadas pela beleza de suas flores e pelo seu alto valor comercial. Entretanto, muitas espécies brasileiras estão ameaçadas de ex-

tinção devido ao desmatamento e a coleta indiscriminada. Dentre estas espécies encontra-se a *Miltonia flavescens* Lindl., uma orquídea nativa da região sul do Brasil (IMES, 1997).

A cultura *in vitro* tem se mostrado uma ótima opção na multiplicação e preservação de plantas, permitindo a produção de um grande número de mudas, em curto espaço de tempo e em condições controladas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A propagação *in vitro* é uma técnica bastante utilizada na multiplicação de plantas, possuindo capacidade produtiva elevadíssima de plantas uniformes e por isto vem sendo bastante utilizada em viveiros comerciais (FIGUEIREDO et al., 2008). Protocolo de regeneração *in vitro* tem sido obtido para a espécie através do cultivo em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) e BAP (benziladeninopurina), utilizando ápices radiculares e segmentos foliares como explantes (STEFANELLO et al., 2009).

Após o crescimento *in vitro*, há necessidade de retirar as plantas dos vidros para que as mesmas se adaptem as condições externas, através de mudanças que podem ser de natureza morfológica, anatômica e fisiológica (SUTTER; SHACKEL; DÍAZ, 1992).

Nesse processo de aclimatização, que envolve a transferência das plantas do cultivo *in vitro* para a casa-de-vegetação, alguns fatores são de extrema importância para o sucesso do processo de micropropagação, como resistência ao estresse hídrico, realização da fotossíntese de forma mais eficiente e absorção de nutrientes (MORAIS; DIAS; FARIAS, 2002).

Geralmente, a maior dificuldade encontrada no processo de aclimatização é o estresse hídrico. Uma planta que parece perfeita *in vitro* pode apresentar deficiências anatômicas que podem comprometer a transpiração, fazendo com que a mesma perca água rapidamente (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Ela passa de uma condição heterótrofa onde o meio de cultura oferece todo suprimento externo necessário, para uma condição autotrófica, precisando realizar a fotossíntese de forma mais eficiente para sobreviver (GEORGE, 1993). A planta precisa rapidamente incrementar a absorção de sais, além de passar de um ambiente asséptico para um susceptível ao ataque de microrganismos patogênicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O substrato utilizado na fase de aclimatização pode facilitar ou impedir o crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas, influenciando diretamente no seu sucesso (COUTO; WAGNER JÚNIOR; QUEZADA, 2003). O substrato de transplante deve ter boas condições para reter a umidade, além de não sofrer compactação demasiada, o que dificultaria as trocas gasosas na raiz

da planta (KÄMPF, 2000).

Vários estudos têm sido realizados com vistas à utilização de fontes alternativas de substratos para o cultivo de orquídeas, uma vez que o xaxim – substrato mais utilizado por produtores e colecionadores – encontra-se em situação de extinção (ASSIS et al., 2005; YAMAKAMI et al., 2006).

Além dos substratos que são comumente utilizados, como vermiculita, areia, turfa, casca curtida de eucalipto ou *Pinus*, palha de arroz carbonizada e pó de carvão (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), derivados do coco, como o pó e fibra de coco, também têm apresentado bons resultados na substituição do xaxim no cultivo de diferentes espécies de orquídeas (ASSIS et al., 2005; YAMAKAMI et al., 2006; ASSIS et al., 2008).

O pó de coco tem sido utilizado como substrato para a formação de mudas, por apresentar uma estrutura física vantajosa, proporcionando alta porosidade, alto potencial de retenção de umidade, e por ser biodegradável, indicado para a germinação de sementes e propagação de plantas (ROSA et al., 2001; CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes substratos alternativos ao xaxim na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* Lindl.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Paranaense, Campus Toledo, Toledo, Paraná, no período de junho a setembro de 2008.

Para a realização do experimento foram utilizadas plantas de orquídea germinadas *in vitro*, com aproximadamente 3 ± 1 cm e dois anos de idade. A germinação e o cultivo *in vitro* nesse período foram realizados em frascos de vidro (capacidade 250 mL) contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais, suplementado com vitaminas do MS, sacarose (30 g L^{-1}), agar ($6,5 \text{ g L}^{-1}$) e com pH ajustado para 5,8.

As plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente, eliminando-se o meio de cultura aderido às raízes e transferidas para vasos de polipropileno (nº 2) contendo 6 furos na parte inferior, onde foi depositada uma camada de pedra brita.

Foram testados cinco substratos: pó de coco, fibra de coco, casca de *Pinus* sp., pó de coco + casca de *Pinus* sp. (1:1) e Plantmax®. As plantas permaneceram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, temperatura

de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, recebendo regas diárias por meio de aspersão manual e aplicações de solução nutritiva do MS a cada 30 dias. Os vasos com as plantas foram cobertos com papel celofane com 100% de transparência até 45 dias após o transplântio, com a finalidade de manutenção da alta umidade do ar para as plantas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. A unidade experimental consistiu de um vaso contendo duas plantas, com dez repetições, totalizando 20 plantas por tratamento.

Aos 30, 60 e 90 dias após o transplântio foi avaliada a percentagem de sobrevivência das plantas. Aos 90 dias procedeu-se a avaliação de características morfológicas, altura da parte aérea (cm), comprimento da maior raiz (cm) e número de brotos formados por planta. Estes dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, utilizando o Programa Estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados coletados aos 30 dias após o transplântio indicaram que as plantas cultivadas no substrato fibra de coco apresentaram a maior taxa de sobrevivência (100%), enquanto as cultivadas no substrato pó de coco apresentaram a menor taxa de sobrevivência (80%), entretanto, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos para esse período de cultivo (Tabela 1).

Decorridos 60 dias após o transplântio, observou-se uma queda acentuada na taxa de sobrevivência das plantas cultivadas em todos os substratos e os maiores valores foram obtidos quando o substrato utilizado foi a fibra de coco (Tabela 1). Porém, o substrato fibra de coco não diferiu significativamente do Plantamax®, da casca de *Pinus* sp. e da mistura de pó de coco e casca de *Pinus* sp.

Tabela 1. Porcentagem média de sobrevivência em plantas de *Miltonia flavescens* Lindl. cultivadas em diferentes substratos aos 30, 60 e 90 dias de transplântio

Substratos	30 dias	60 dias	90 dias
Fibra de Coco	100 a	40 a	30 a
Plantmax®	90 a	30 a	20 a
Casca de <i>Pinus</i> sp.	85 a	20 a	20 a
Pó de coco + Casca de <i>Pinus</i> sp.	85 a	20 a	15 a
Pó de coco	80 a	10 b	5 b

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Resultados similares foram observados após 90 dias de cultivo, onde a taxa de sobrevivência diferiu e foi inferior apenas quando o substrato empregado foi o pó de coco. Esses resultados diferem dos obtidos por Colombo e colaboradores (2005) em trabalho realizado com um híbrido de *Cattleya* cultivado em substratos à base de pó de coco, fibra de coco, xaxim desfibrado e esfagno. O pó de coco propiciou a maior taxa de sobrevivência, 90 dias após o transplântio, sem diferir, entretanto, dos demais substratos testados pelos autores quando utilizaram sistema de irrigação manual.

A redução acentuada na taxa de sobrevivência observada entre os períodos de 30 e 60 dias pode ser atribuída à retirada gradual do plástico transparente que envolvia os vasos com as plantas e mantinha a umidade elevada. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a manutenção da alta umidade relativa do ar no ambiente de cultivo durante a fase de aclimatização, é um fator chave para a sobrevivência das plantas. Colombo e colaboradores (2005) atribuíram à irrigação manual a menor porcentagem de sobrevivência de plântulas do híbrido *Cattleya guttata* Lindl. x *Laelia tenebrosa* Lindl., visto que as plântulas que receberam irrigação intermitente, utilizando aparelho temporizador programado para acionar a cada 10 minutos durante 5 segundos, apresentaram maior sobrevivência após 90 dias de cultivo.

Durante o cultivo *in vitro* as plantas são mantidas em ambiente com alta umidade relativa do ar, baixa luminosidade e trocas gasosas restritas, o que resulta em reduzida taxa de transpiração, e quando são expostas ao meio *ex vitro* sofrem estresse hídrico que pode levá-las à morte (SHACKEL; NOVELLO; SUTTER, 1990). As principais causas da mortalidade de plantas transferidas de um ambiente *in vitro* para um *ex vitro* são o desenvolvimento de estômatos não funcionais, a presença de cutícula delgada e parênquima paliçádico pouco desenvolvido (DÍAZ-PÉRES; SUTTER; SHACKEL, 1995).

Mayer e colaboradores (2008) compararam a estrutura anatômica de folhas e raízes de plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis' cultivadas *in vitro* e *ex vitro* objetivando verificar se a estrutura anatômica das plantas *in vitro* influenciava no processo de aclimatização em substrato contendo pó de coco combinado com fibra de coco por um período de 45 dias. A sobrevivência de 100% das mudas levou os autores a concluir que a estrutura anatômica apresentada *in vitro* não influenciou a sobrevivência durante a aclimatização devido à plasticidade fenotípica desse cultivar, em virtude da grande capacidade de aclimatização ao ambiente.

Em trabalho realizado por Araújo e colaboradores (2007), onde foi avaliado o efeito de substratos alternativos ao xaxim na aclimatização de *Cattleya loddgesii* "Alba" x *C. loddgesii* "Atibaia", foi observado que um dos melhores substratos para esta orquídea foi a fibra de piaçava, por possuir baixa retenção de água e alta

porosidade, possibilitando a boa relação entre o ar e a água, evitando o apodrecimento das raízes.

A fibra de coco possui características similares à fibra de piaçava. As boas propriedades físicas da fibra de coco, a sua não reação com os nutrientes da adubação, sua longa durabilidade sem alteração das características físicas, a possibilidade de esterilização, a abundância da matéria prima que é renovável e o baixo custo fazem da fibra de coco um excelente substrato para o cultivo sem solo de hortaliças e flores (CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002).

Os dados médios referentes à altura da parte aérea (APA) e ao comprimento da maior raiz (CMR) das plantas de *M. flavescens* coletados aos 90 dias após o transplântio para os diferentes substratos são apresentados na Tabela 2. As plantas que apresentaram maior altura da parte aérea (5,9 cm) e maior crescimento da raiz (2,4 cm) foram as cultivadas utilizando como substrato a casca de *Pinus* sp., diferentemente do que foi observado para a taxa de sobrevivência das plantas, onde os maiores valores foram obtidos com o cultivo no substrato fibra de coco. O menor crescimento das plantas ocorreu com o cultivo na presença de pó de coco. No período de cultivo não foi observada a formação de brotos nas plantas em nenhum dos tratamentos.

Tabela 2. Valores médios para a altura da parte aérea (APA) e comprimento da maior raiz (CMR) de plantas de *M. flavescens* após 90 dias de aclimatização em diferentes substratos.

Substratos	APA (cm)	CMR (cm)
Fibra de Coco	4,7	1,5
Plantmax®	5,5	1,5
Casca de <i>Pinus</i> sp.	5,9	2,4
Pó de coco + Casca de <i>Pinus</i> sp.	4,1	1,7
Pó de coco	5,0	0,6

Em estudo realizado por Assis e colaboradores (2005), que avaliou substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl., os autores verificaram que os melhores substratos para a altura da planta foram o coco desfibrado e o pó de coco misturado com coco em cubos. Entretanto, os mesmos não diferiram significativamente do xaxim.

Yamakami e colaboradores (2006), trabalhando com substratos alternativos para o cultivo de *C. labiata* x *C. forbesii*, não encontraram diferença significativa entre o xaxim e a fibra de coco para a variável massa da matéria fresca total e os autores apontaram a fibra de coco como boa alternativa na substituição ao xaxim.

Menegue, Oliveira e Faria (2004), estudando a propagação vegetativa em diferentes substratos de *Epidendrum ibaguense* Lindl., uma orquídea terrestre que cresce em grandes touceiras, verificaram que a mistura de areia e Plantmax® proporcionou a maior taxa de sobrevivência das plantas dessa espécie, sendo considerada um ótimo substituto ao xaxim.

Este trabalho não abordou fatores comerciais como o ônus dos substratos utilizados ou a melhor disponibilidade destes. Entretanto, estes devem ser levados em consideração a fim de se estabelecer uma melhor relação custo/benefício na escolha do substrato para a aclimatização das plantas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os substratos testados mostraram ser possíveis alternativas ao xaxim na aclimatização de *Miltonia flavescens*, principalmente a fibra de coco e a casca de *Pinus* sp., entretanto o controle da umidade do ar e do substrato nos primeiros meses de aclimatização devem merecer uma atenção especial para que melhores resultados possam ser obtidos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Paranaense, pelo financiamento das pesquisas.

REFERÊNCIAS

ALTAFIN, R. L. M. et al. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal**. Espírito Santo do Pinhal, SP: Unipinhal, 2003. (Boletim Técnico, n. 7).

ARAUJO, A. G. et al. Substratos alternativos ao xaxim e adubação de plantas de orquídea na fase de aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 569-571, 2007.

ASSIS, A. M. et al. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 255-260, 2005.

ASSIS, A. M. et al. Cultivo de *Oncidium baueri* Lindley (Orchidaceae) em substratos a base de coco. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 981-985, 2008.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 533-535, 2002.

COLOMBO, L. A. et al. Aclimação de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-150, 2005.

COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto Mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* EHRH.) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 29, n. 2, p. 125-128, 2003.

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SUTTER; E. G.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 95, n. 2, p. 225-232, 1995.

FERREIRA, D. F. **Programa Estatístico Sisvar**. Lavras, MG: UFLA, 2003. [Software].

FIGUEIREDO, M. A. et al. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 255-257, 2008.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2. ed. England: Exegetics, 1993.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1998. p. 183-260.

IMES, R. **Orchids: the illustrated identifier to over 100 cultivated varieties**. London: Apple, 1997.

KÄMPF, A. N. Seleção de materiais para uso como substrato. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre, RS: Gênese, 2000. p. 139-145.

MAYER, J. L. S. et al. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 223-232, 2008.

MENEGUCE, B.; OLIVEIRA, R. D.; FARIA, R. T. Propagação vegetativa de *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 2, p. 101-106, 2004.

MORAIS, L. M.; DIAS, L. C.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1397-1400, 2002.

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

ROSA, M. F. et al. **Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. (Comunicado Técnico, n. 54).

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E. G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Beltsville, v. 115, n. 3, p. 468-472, 1990.

STEFANELLO, S. et al. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 53-59, 2009.

SUTTER, E. G.; SHACKEL, K.; DÍAZ, J. C. Acclimatization of tissue cultured plants. **Acta Horticulturae**, v. 314, p. 115-119, 1992.

YAMAKAMI, J. K. et al. Cultivo de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 523-526, 2006.

Recebido em: 21 Setembro 2009

Aceito em: 01 Outubro 2009