



ARTIGO

Imersão em solução nutritiva e ácido giberélico promovem a aclimatização intermediária de *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree

José Carlos Sorgato^{1*}, Jackeline Schultz Soares², Yara Brito Chaim Jardim Rosa¹,
Camila Soares Rosa Lemes¹, Suzana Targanski Sajovic Pereira¹ e Luciano Souza de Rezende¹

Recebido: 26 de fevereiro de 2015 Recebido após revisão: 10 de julho de 2015 Aceito: 25 de julho de 2015

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3321>

RESUMO: (Imersão em solução nutritiva e ácido giberélico promovem a aclimatização intermediária de *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree). A aclimatização das plantas cultivadas *in vitro* é um fator limitante na micropropagação, pois quando transferidas para condições *ex vitro*, apresentam alta mortalidade das plantas produzidas. Objetivou-se avaliar o efeito do período de imersão em solução nutritiva, acrescida de GA₃, na aclimatização intermediária de *Dendrobium phalaenopsis*. As plantas utilizadas foram divididas em conjuntos de 20, sendo cada conjunto imerso em 250 mL de solução nutritiva constituída pelo meio ½ MS, sem adição de sacarose e ágar, e suplementada com 30 mg L⁻¹ de GA₃, por um período de 0; 12; 24; 36 ou 48 horas. A seguir, as plantas foram transplantadas para recipientes contendo o substrato e transferidas para sala de crescimento onde permaneceram, para a aclimatização intermediária, por 30 dias. Na sequência, as plantas foram acondicionadas em viveiro telado por 10 meses. As plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência, quanto à massa fresca (g), número de folhas, número de pseudobulbos, comprimento do maior pseudobulbo (cm), diâmetro do maior pseudobulbo (cm), número de raízes e comprimento da maior raiz (cm). De maneira geral, houve um aumento de todas as características avaliadas, exceto para o número de folhas que no final do período experimental apresentaram número menor do que no plantio. Com base nos resultados, as plantas de *D. phalaenopsis* podem ser transplantadas imediatamente (sem a imersão) ou serem imersas em solução nutritiva acrescida de 30 mg L⁻¹ de GA₃ por até 24 horas, e devem ser mantidas em sala de crescimento para aclimatização intermediária.

Palavras chaves: Orchidaceae, cultivo *in vitro*, imersão de plantas, giberelina.

ABSTRACT: (Immersion in nutrient solution and gibberellic acid promote intermediate acclimatization in *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree). The acclimatization of *in vitro* grown plants is a limiting factor in micropropagation, as high mortality rates are observed after the transfer to *ex vitro* conditions. We aimed to evaluate the effect of the period of immersion in nutrient solution supplemented with GA₃ on the intermediate acclimatization of *Dendrobium phalaenopsis*. Plants were divided in 20 lots, immersed in 250 mL nutrient solution composed of agar- and sucrose-free ½ MS medium with 30 mg L⁻¹ GA₃, for periods of 0, 12, 24, 36 or 48 hours. Then, they were transplanted to pots containing substrate and transferred to a growth room for intermediate acclimatization. After 30 days, plants were placed in a net-shaded plant nursery for 10 months. Survival rate, fresh weight (g), number of leaves, number of pseudobulbs, length and diameter of the largest pseudobulb (cm), number of roots and length of largest root (cm) were evaluated. Overall, an increase in all evaluated characteristics was observed, except for the number of leaves, which at the end of the experiment was lower than at transplantation. Our results suggest that *D. phalaenopsis* plants can either be transplanted immediately (without immersion) or be immersed in nutrient solution supplemented with 30 mg L⁻¹ GA₃ for 24 hours, and should be kept in a growth room for intermediate acclimatization.

Keywords: Orchidaceae, *in vitro* cultivation, plant immersion, gibberellin.

INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificada família botânica, despertando interesse pelo elevado valor ornamental, principalmente das flores, que apresentam variações na forma, cor, tamanho e fragrância (Kerbauy & Chaer 2011).

O gênero *Dendrobium* Sw. é constituído por aproximadamente 1.500 espécies, quase todas epífitas. Por sua grande quantidade de espécies e de híbridos, adaptáveis a todos os tipos de clima, larga distribuição geográfica, crescimento em diferentes habitats e valor florístico, é um dos gêneros mais produzidos e comercializados, tanto no Brasil como no exterior (Lorenzi & Souza 2008, Faria 2010).

As orquídeas são usualmente multiplicadas por técnicas de cultivo *in vitro*, sendo possível produzir grandes

quantidades de plantas durante todo ano sem a influência das variações climáticas (Rocha 2009). Apesar do sucesso das técnicas na propagação *in vitro* observa-se alta mortalidade das plantas produzidas por esse método quando transferidas para a condição *ex vitro*. Esta fase é considerada bastante crítica e delicada, pois as plantas oriundas de cultivo *in vitro* possuem baixa eficiência do sistema radicular, que somada à reduzida competência vascular, à pequena ou não funcionalidade dos estômatos e à má formação da cutícula, são responsáveis pela reduzida sobrevivência das plantas expostas a ambiente com elevada demanda evaporativa (Hazarika 2006, Chandra *et al.* 2010).

Para tentar minimizar esses efeitos, pode ser utilizada uma estratégia de ajuste gradativo, denominada aclimatização intermediária, que consiste de uma fase compre-

1. Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Faculdade de Ciência Agrárias (FCA). CEP 79804-970, Dourados, MS, Brasil.

2. Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS). CEP 79804-970, Dourados, MS, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: jc_sorgato@hotmail.com

endida entre o cultivo asséptico e a transferência para o ambiente externo, com a finalidade de elevar a taxa de sobrevivência das plantas produzidas *in vitro*. Sorgato et al. (2015) relataram que a aclimatização intermediária em sala de crescimento por 30 dias, utilizando luz vermelha ou luz vermelha + branca, elevou a porcentagem de sobrevivência das plantas e o incremento na massa fresca de *Dendrobium phalaenopsis*.

A giberelina (GA₃) é um regulador vegetal que atua como estimulante de crescimento, originando plantas de maior tamanho em consequência da sua ação na divisão e expansão celulares (Taiz & Zeiger 2009). Espera-se que a imersão das plantas em solução nutritiva acrescida de GA₃ possibilite menor desidratação e maior vigor das plantas, minimizando o estresse decorrente da transferência do ambiente *in vitro* para o substrato de aclimatização e contribuindo para ativação de respostas morfofisiológicas que propiciem maior sobrevivência e desenvolvimento *ex vitro*.

Diante do exposto, objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito do período de imersão em solução nutritiva, acrescida de GA₃, na aclimatização intermediária de *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree (Fig. 1), com 180 dias, oriundas de sementeira *in vitro*, cultivadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) com 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e 20 g L⁻¹ de sacarose P.A. (Dinâmica®, Brasil), e pH ajustado para 5,8 ± 0,1 com KOH (1M), antes da esterilização em autoclave, a 120 °C e à pressão de 1,05 kg.cm⁻², por 20 minutos. Após a esterilização, o meio de cultura apresentou pH igual a 4,5. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossinteticamente ativa de 20 μmol m⁻² s⁻¹, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

As plantas foram retiradas dos frascos de cultivo, lavadas em água corrente, até total remoção do meio de cultura, e padronizadas quanto à massa fresca (0,7 g), número de folhas (7,8), número de pseudobulbos (2,6), comprimento do maior pseudobulbo (0,9 cm), diâmetro do maior pseudobulbo (0,3 cm), número de raízes (2,8) e comprimento da maior raiz (3,1 cm), sendo considerados como valores das variáveis no plantio (VP).

Na sequência, as plantas foram divididas aleatoriamente em conjuntos de 20 plantas cada. Cada conjunto de plantas foi imerso em 250 mL de solução nutritiva constituída pelo meio ½MS, isento de sacarose e ágar e de 30 mg L⁻¹ de GA₃, por um período de 12; 24; 36 ou 48 horas. Os béqueres, contendo a solução nutritiva e as plantas, foram acondicionados na sala de crescimento, nas condições anteriormente descritas. A solução nutritiva de cada conjunto de plantas foi trocada a cada 12 horas.

Após cada período de imersão as plantas foram trans-

feridas para recipientes de polietileno descartáveis com capacidade para 50 cm³ com diâmetro médio de 5 cm e altura de 4 cm e preenchidos com uma mistura de esfagno rosa (Agrolink, Holambra-SP) e fibra de coco (Golden-Mix Chips, Amafibra®) (1:1 v v⁻¹). Um conjunto de plantas, considerado como controle, não foi submetido à imersão, sendo as plantas acondicionadas diretamente no substrato.

Após o plantio, os recipientes contendo uma planta cada, foram apoiados em bandejas de polipropileno, permanecendo em aclimatização intermediária por 30 dias, em sala de crescimento, nas mesmas condições anteriores de temperatura e de radiação fotossintética. Durante esse período, o substrato de cada planta recebeu, diariamente, 5 mL de água destilada estéril.

Após 30 dias, as plantas foram acondicionadas em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50% cada (luminosidade média diária de 160 μmol m⁻² s⁻²), sob condições médias de temperatura e umidade relativa de 22,6 ± 5 °C e 73,9 ± 10%, respectivamente. O sistema de irrigação utilizado durante o período experimental foi constituído de difusores, posicionados 1 m 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⁻¹.

As plantas foram adubadas via foliar, quinzenalmente, com 2,0 mL L⁻¹ de NPK 10-10-10, acrescido dos seguintes 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-fosforamidotoato (4 mg L⁻¹) e Mancozebe (4 mg L⁻¹). Tanto para a adubação, quanto para a desinfestação, foi utilizado pulverizador costal com capacidade para 5 L.



Figura 1. Flor de *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree. Foto: José Carlos Sorgato (2014).

Após 10 meses de cultivo em viveiro, 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. As plantas foram avaliadas quanto à massa fresca, número de folhas, número de pseudobulbos, comprimento do maior pseudobulbo, diâmetro do maior pseudobulbo, número de raízes e comprimento da maior raiz apresentando os seguintes valores finais (VF): 2,9 g; 7,0; 3,7; 1,8 cm; 0,8 cm; 10,8 e 8,1 cm, respectivamente.

Dado o interesse em investigar a hipótese de aumento nos valores de massa fresca, número de folhas, número de pseudobulbos, comprimento do maior pseudobulbo, diâmetro do maior pseudobulbo, número de raízes e comprimento da maior raiz observados no final do período experimental (VF), em relação àqueles registrados no plantio (VP), foram calculadas suas relações (R), por meio da expressão $R = VF/VP$, sendo estes os valores considerados nas análises estatísticas, juntamente com a porcentagem de sobrevivência. Para a determinação do comprimento e diâmetro do maior pseudobulbo e

do comprimento da maior raiz foi utilizado paquímetro digital graduado em milímetros.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 20 repetições de uma planta. Os resultados decorrentes de porcentagem foram transformados para $\sqrt{x + 1}$ e, a seguir, foram submetidos à análise de variância pelo teste F até 5% de probabilidade. Havendo diferenças significativas, às médias foram ajustadas equações de regressão com a utilização do aplicativo computacional SISVAR 5.3 (Ferreira 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de imersão das plantas sobre a porcentagem de sobrevivência, e sobre as relações de massa fresca, comprimento do pseudobulbo e número de folhas (Fig. 2). Para as demais relações estudadas, não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) do tempo de imersão (Tab. 1).

De todas as relações estudadas, apenas a relação entre

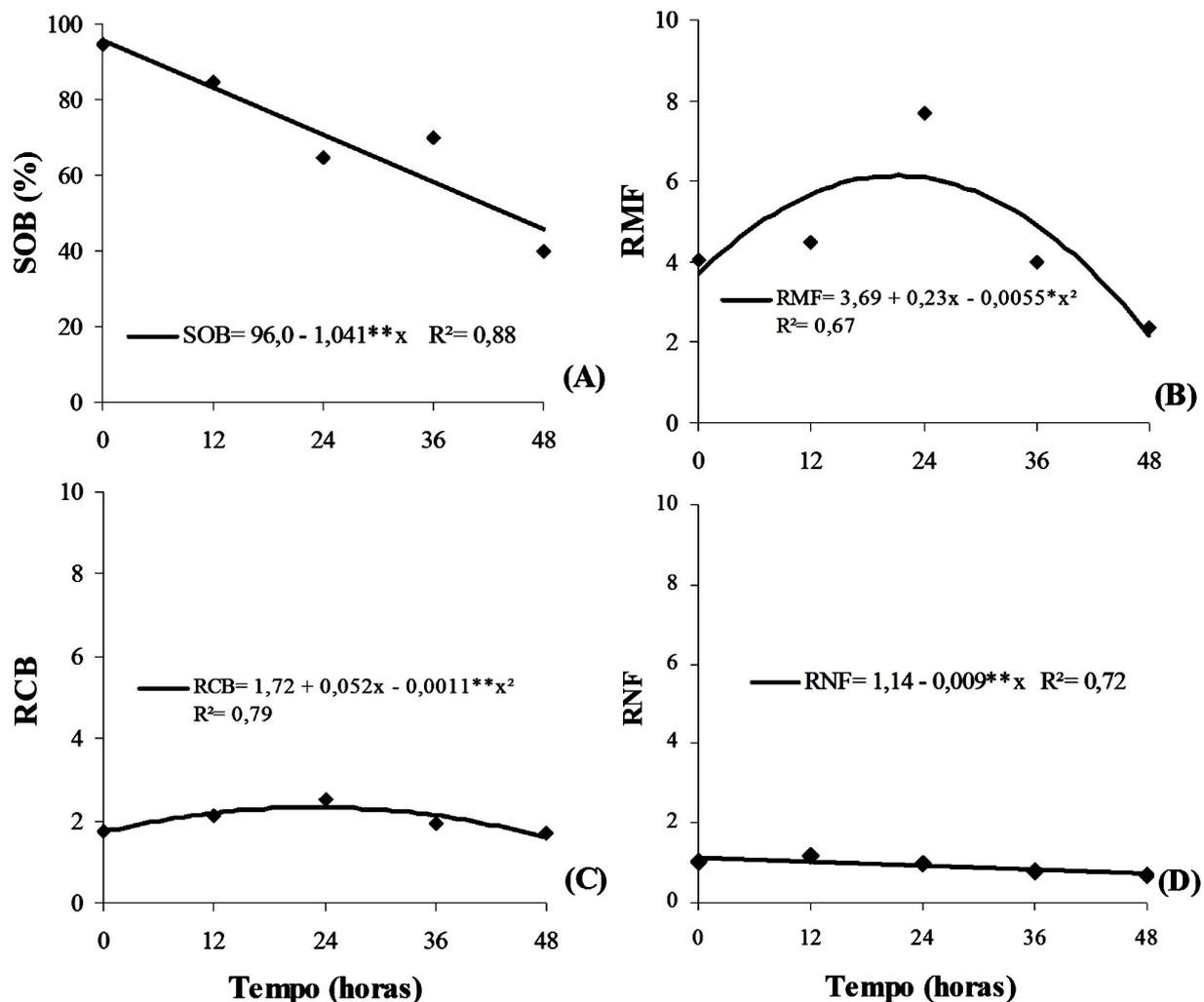


Figura 2. A. Porcentagem de sobrevivência (SOB %) e relações entre os valores finais e iniciais de *Dendrobium phalaenopsis* em função do tempo de imersão das plantas com GA_3 . B. Relação entre massa fresca (RMF). C. Relação entre o comprimento de pseudobulbos (RCB). D. Relação entre o número de folhas (RNF). *, significativo a 5%; **, significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 1. Relação de massa fresca (RMS), do comprimento de pseudobulbo (RCB), do número de folhas (RNF), do número de pseudobulbos (RNB), do diâmetro dos pseudobulbos (RDB), do número de raízes (RNR) e do comprimento da maior raiz (RCMR) de plantas de *Dendrobium phalaenopsis*.

| F.V. | G.L. | RMF | RCB | RNF | RNB | RDB | RNR | RCMR |
|-------|------|--------|-------|-------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Tempo | 4 | 1,30** | 0,11* | 0,06* | 0,11 ^{ns} | 0,029 ^{ns} | 0,10 ^{ns} | 0,08 ^{ns} |
| Erro | 66 | 0,34 | 0,04 | 0,02 | 0,06 | 0,021 | 0,06 | 0,18 |
| CV(%) | | 25,8 | 12,1 | 11,1 | 16,0 | 7,8 | 11,2 | 22,1 |
| Média | | 4,60 | 2,00 | 0,97 | 1,59 | 2,43 | 4,09 | 2,88 |
| DP | | 4,10 | 0,79 | 0,47 | 0,86 | 0,54 | 1,12 | 1,93 |

** , significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F; * , significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F; ns, não significativo pelo teste F; DP, Desvio Padrão.

o número de folhas foi inferior a 1,00 (Tab. 1), indicando que no final do período experimental as plantas apresentaram número de folhas menor do que no plantio. Esse resultado é decorrente da senescência e posterior queda das folhas durante a aclimatização, mecanismo utilizado pelas plantas como forma de adaptação a essa fase, que é bastante crítica e delicada (Dietrich *et al.* 1992, Tombolato & Costa 1998, Faria 2012). Plantas oriundas de cultivo *in vitro* apresentam baixa eficiência do sistema radicular, reduzida competência vascular, estômatos pouco ou não funcionais e cutícula mal formada (Chandra *et al.* 2010), a resposta fisiológica que pode garantir sua sobrevivência é a senescência e abscisão foliar.

É importante salientar que as demais relações (Tab. 1) foram superiores a 1 e ocorreram em pseudobulbos, que são órgãos de reserva, responsáveis pela sobrevivência das plantas em condições adversas, uma vez que armazenam nutrientes e água e nas raízes, responsáveis pela captação de nutrientes e água (Tab. 1). Os valores dessas relações também indicam que, embora o período de aclimatização tenha propiciado uma condição de estresse, caracterizado pela senescência e posterior queda das folhas. De maneira geral, as condições fornecidas às plantas foram favoráveis, pois propiciaram o aumento de todas as características avaliadas.

A maior porcentagem de sobrevivência (96%) (Fig. 2A) e a maior relação de número de folhas (1,14) (Fig. 2D) ocorreram quando as plantas não foram submetidas à imersão. Entretanto, nessa condição a relação de massa fresca foi de 3,69 (Fig. 2B) e a de comprimento do pseudobulbo foi de 1,72 (Fig. 2C).

A maior relação de massa fresca foi observada em plantas imersas em solução nutritiva por 21 horas (Fig. 2B) e a maior relação entre o comprimento dos pseudobulbos naquelas submetidas à imersão por 24 horas (Fig. 2C).

Apesar de Keithly *et al.* (1991) relatarem que a perda na aclimatização de orquídeas obtidas *in vitro* pode exceder a 50% durante os primeiros seis meses em casa de vegetação, neste trabalho as plantas submetidas à imersão por até 24 horas apresentaram porcentagem de sobrevivência superior a 70% após 10 meses de aclimatização, valor este considerado satisfatório em processos de aclimatização (Sorgato *et al.* 2015).

A imersão das plantas por 21 horas apresentaram relação de massa fresca igual a 6,10, representando 1,65 vezes superior ao observado em plantas não submetidas

à imersão. As plantas submetidas à imersão por 24 horas apresentaram relação de comprimento de pseudobulbo (RCB) igual a 2,33 (Fig. 2C), ou seja, 1,35 vezes maior ao observado nas plantas não submetidas a esse processo.

Considerando que as demais relações analisadas foram todas positivas, recomenda-se a imersão em solução nutritiva com GA₃, por um período não superior a 24 horas, como forma de propiciar aumento nas relações de massa fresca, comprimento, número e diâmetro de pseudobulbos e comprimento e número de raízes de *D. phalaenopsis* em fase de aclimatização. Com base nos resultados, conclui-se que as plantas de *D. phalaenopsis* podem ser transplantadas imediatamente (sem a imersão) ou serem imersas em solução nutritiva acrescida de 30 mg L⁻¹ de GA₃ por até 24 horas, e devem ser mantidas em sala de crescimento por 30 dias para aclimatização intermediária.

REFERÊNCIAS

- CHANDRA, S., BANDOPADHYAY, R., KUMAR, V. & CHANDRA, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32: 1199-1205. <<http://dx.doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>>
- DIETRICH, B., MERTINAT, H. & LUCKNER, M. 1992. Reduction of water loss during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Digitalis lanata* clone plants. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 188: 23-31.
- FARIA, R. T., ASSIS, A. M. & CARVALHO, J. F. R. P. 2010. *Cultivo de orquídeas*. Londrina: Mecenias. 208 p.
- FARIA, R. T., ASSIS, A. M., UNEMOTO, L. K. & CARVALHO, J. F. R. P. 2012. *Produção de orquídeas em laboratório*. Londrina: Mecenias. 124 p.
- FERREIRA, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039-1042. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>>
- HAZARIKA, B. N. 2006. Morphophysiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108: 105-120. <<http://doi:10.1016/j.scienta.2006.01.038>>
- KEITHLY, J. H., JONES, D. P., & YOKOYAMA, H. 1991. Survival and growth of transplanted orchid seedlings enhanced by DCPTA. *HortScience*, 26: 1284-1286.
- KERBAUY, G. B. & CHAER, L. 2011. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L.T.S. (Org.). *Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro*. (Ed.) (p.178-205). São Paulo: Antiqua. 1120 p.
- LORENZI, H. & SOUZA, H. M. 2008. *Plantas Ornamentais no Brasil*. 4ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 1088 p.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

- ROCHA, H. S. 2009. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T.G. & SOUZA, A. da S. (Ed.). *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p.121-152.
- SORGATO, J. C., ROSA, Y. B. C. J., SOARES, J. S., LEMES, C. S. R. & SOUSA, G. G. D. 2015. Light in intermediate acclimatization of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree. *Ciência Rural*, 45: 231-237. <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131619>>
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2009. *Fisiologia Vegetal*. 4ed. Porto Alegre: Artmed. 819 p.
- TOMBOLATO, A. F. C. & COSTA, A. M. M. 1998. *Micropropagação de Plantas Ornamentais*. Campinas: Instituto Agronômico. 72 p.