

Uso de diferentes fontes de carboidratos em meio MS na germinação de *Cattleya labiata* (ORCHIDACEAE).

Paulino, Patricia Maria de Souza¹; Melo, Gemima Manço de¹; Souto, Nise de Fátima Coutinho²; Ulisses, Cláudia³; Willadino, Lilia⁴; Camara, Terezinha Rangel⁵.

¹ Aluna de Licenciatura em Ciências Biológicas, Bolsista PIBIC/CNPq; Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro de Dois Irmãos, CEP 55296-190 Recife, Pernambuco, fone (81) 3320-6364, email: patriciaso_1@hotmail.com; gemimamelo81@yahoo.com.br. ² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Botânica (UFRPE), email: nise_souto@hotmail.com; ³ Professora da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UFRPE), Avenida Bom Pastor, s/n, CEP 55296-901, Garanhuns, Pernambuco, fone (87) 3761-0969, email: claudia@nlink.com.br; ⁴ Professora do Departamento de Biologia – Área de Botânica (UFRPE), email: lilia@truenet.com.br; ⁵ Professora do Departamento de Química – Área de Química Agrícola (UFRPE), email: tkrcamara@bol.com.br.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das mais numerosas entre as fanerógamas, sendo encontrada em quase todas as regiões do planeta, com exemplares até nas regiões boreais. Atualmente, muitas orquídeas em estado silvestre encontram-se em extinção, tendo-se, portanto, a importância de seu cultivo (Moura, 1979).

O gênero *Cattleya* destaca-se no Brasil na maioria das espécies, tanto pela coloração belíssima, como pelo grande tamanho das flores (Silva, 1986).

As plantas propagadas *in vitro* necessitam de uma fonte de energia externa pois, nesta fase são praticamente heterotróficas não encontrado as condições favoráveis para realizar fotossíntese. Assim, fontes de carboidratos são adicionadas ao meio nutritivo fornecendo energia metabólica e esqueletos carbônicos para a síntese de compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (Caldas; Haridasam; Ferreira, 1998).

A sacarose é o carboidrato mais utilizado em meio de cultura, visando a propagação de plantas ornamentais, sendo que no meio Murashige & Skoog (1962) sua concentração é de 30g.L⁻¹. Na propagação *in vitro* de orquídeas, outras fontes também têm sido utilizadas com menos frequência como a glicose, frutose, maltose, entre outros (Tombolato; Costa, 1998).

O tipo e a concentração dos açúcares são importantes para promover a germinação e o crescimento das plântulas *in vitro*, assim como a própria manutenção de crescimento radicular (Arditti, 1967; Ernest, 1967; Kraus; Kerbauy, 1992; Collins; Dixon, 1992; Kerbauy 1993).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes fontes de carboidratos na germinação *in vitro* de *Cattleya labiata*.

MATERIAL E MÉTODO

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFRPE. As sementes foram obtidas a partir de cápsula madura de planta adulta de *Cattleya labiata* proveniente do assentamento Mochila situado no município de Garanhuns.

Antes da sementeira, a cápsula foi lavada com detergente e água corrente, em seguida, dentro da câmara de fluxo laminar, foi imersa por 1 minuto em álcool 70%, e em solução de hipoclorito de cálcio a 3% contendo 3 gotas de tween, durante um período de 30 minutos. Posteriormente foram realizadas 3 lavagens com água destilada esterilizada para remover o excesso de desinfetantes. Após abrir a cápsula, as sementes foram retiradas com a ajuda de pinça e bisturi. Uma parte das sementes foi separada para ser feito o teste de poder germinativo das sementes com 2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio.

Para realização do teste, as sementes foram embebidas durante 24 horas em água e colocadas na solução de 2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio a 1% durante 24 horas a 25°C. Em seguida foram observadas no microscópio estereoscópio (lupa), e as sementes que apresentaram coloração vermelha foram consideradas viáveis (devido a respiração do

embrião). A outra parte das sementes passaram por uma desinfestação gasosa de 1 hora com pastilha de formol em placa de Petri. A semente se deu em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), em frascos com capacidade para 250ml contendo 40ml de meio com o pH ajustado para 5,8. Foram testadas três fontes de carboidratos: sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), glicose ($C_6H_{12}O_6$) e frutose ($C_6H_{12}O_6$). Separados em quatro tratamentos: (F0) com $30g.L^{-1}$ de sacarose (concentração usual em meio MS utilizada como controle), (F1) com $30g.L^{-1}$ glicose, (F2) com $30g.L^{-1}$ frutose e (F3) com uma combinação de $15g.L^{-1}$ de frutose e $15g.L^{-1}$ glicose. Em seguida, após a semente, os frascos foram levados para a sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ C$, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $50\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

O experimento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento, sendo avaliado a cada 15 dias após a inoculação; constando como unidade experimental um frasco com 8mg de sementes. Os parâmetros avaliados foram: percentagem de contaminação, germinação e formação de plântulas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste realizado com 2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio mostrou que nem todas as sementes presentes no interior da cápsula são viáveis, ou seja, não contém o embrião dentro de sua rede ou testa. Portanto, a percentagem de germinação foi realizada dentro da unidade experimental utilizada de 8mg por frasco, sabendo que nesta unidade contém sementes com e sem embrião. Quando comparadas as concentrações, aos 15 dias após a semente, foi observado que não houve efeito significativo no meio suplementado com $30g.L^{-1}$ glicose (F1), nem na interação frutose + glicose (F3), pois apresentaram apresentando baixa intensidade de coloração verde, demonstrando lentidão no processo inicial da germinação, porém, mostrando o intumescimento dos embriões (Figura 1B e 1C). Contudo, o tratamento com $30g.L^{-1}$ de sacarose (F0), a maioria das sementes apresentou coloração verde intenso, revelando o início da germinação de uma forma mais eficaz com o intumescimento dos embriões no estágio de esférula, estando ainda o embrião dentro de uma testa reticulada (Figura 1D). Resultado semelhante apresentou os tratamentos com $30g.L^{-1}$ de frutose (F2) (Figura 1E). Arditti (1992) relata que o desenvolvimento dos cloroplastos em embriões de *Cattleya aurantiaca*, cultivados *in vitro*, tornou-se claramente visível após os 14-20 dias.

Aos 30 dias de inoculação observou-se que os tratamentos F0, F2 e F3 apresentavam melhor índice de germinação (Figura 2). Porém os tratamentos F2 e F3 mesmo tendo melhor índice de germinação, apresentavam oxidação em alguns dos embriões, estando muitos ainda dentro da testa (Figura 3A e 3B). O contrário ocorreu no tratamento F0, que não mostrou nenhum sinal de oxidação e os embriões apresentavam-se mais desenvolvidos já formando corpos de protocormos (Figura 3C). O tratamento F1 apresentou menor índice de germinação com um baixo desenvolvimento dos embriões, estando muitos oxidados e não passando do estágio de esférula, permanecendo dentro da testa (Figura 3D).

A necessidade de adição de sacarose no meio para o cultivo de embriões tem sido observada por vários autores, em distintas espécies de plantas (Rietsema et al., 1953; Raghavan; Torrey, 1963; Hu e Ferreira, 1998), principalmente em cultura de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento (pró-embriões). Nas células, carboidratos são necessários como fonte de energia nos processos biossintéticos (Gösslová et al., 2001) e servindo também, como agentes osmóticos (Tremblay; Tremblay, 1991).

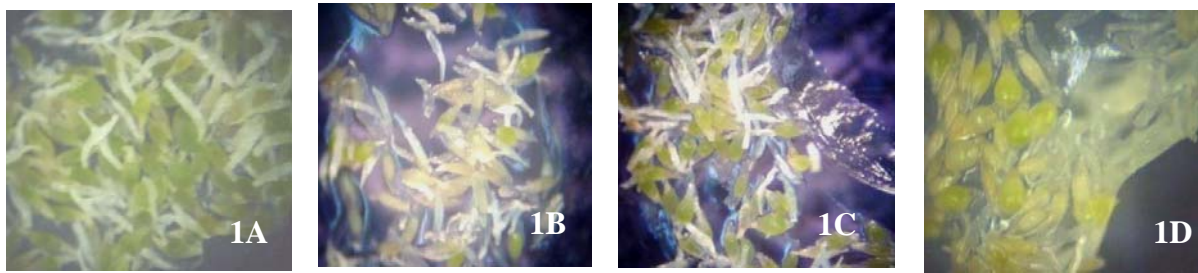
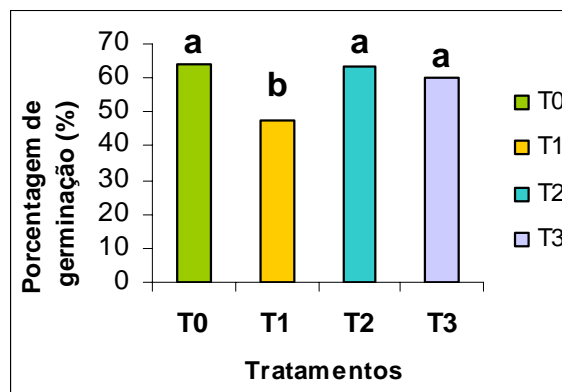


Figura 1: Sementes de *Cattleya labiata* aos 15 dias de cultivo: Meio MS com 30g.L⁻¹ de sacarose (F0) (1A); Meio MS com 30g.L⁻¹ de glicose (F1) (1B); Meio MS com 30g.L⁻¹ de frutose (F2) (1C); Meio MS com 15g.L⁻¹ de frutose + 15g.L⁻¹ de glicose (F3) (1D). (Aumento de 45X).



As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 2: Percentagem de germinação das sementes de *Cattleya labiata* aos 30 dias após a inoculação nos tratamentos: Meio MS com 30g.L⁻¹ de sacarose (F0), Meio MS com 30g.L⁻¹ de glicose (F1), Meio MS com 30g.L⁻¹ de frutose (F2) e Meio MS com 15g.L⁻¹ de frutose + 15g.L⁻¹ de glicose (F3).

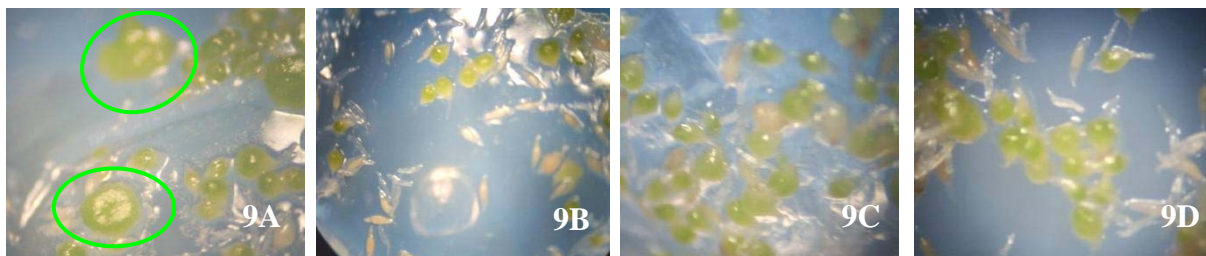


Figura 3: Sementes de *Cattleya labiata* aos 30 dias de cultivo: Meio MS com 30g.L⁻¹ de sacarose (F0) (3A), destacando em verde a formação dos protocormos; Meio MS com 30g.L⁻¹ de glicose (F1) (3B); Meio MS com 30g.L⁻¹ de frutose (F2) (3C); Meio MS com 15g.L⁻¹ de frutose + 15g.L⁻¹ de glicose (F3) (3D). (Aumento de 45X).

Aos 45 dias após a inoculação notou-se que o tratamento F0 mostrou melhor germinação e desenvolvimento dos protocormos, estando estes já com os primórdios foliares (Figura 4). E nos tratamentos F1, F2 e F3 podemos notar um estacionamento no desenvolvimento dos protocormos e também uma maior oxidação dos mesmos quando comparados com o tratamento F0, o qual mostrou menor oxidação dos protocormos (Figura 5).

O uso da sacarose como a mais usual fonte de carbono para o cultivo in vitro, visando aos mais variados propósitos, tem sido observado para muitas espécies vegetais. Sul & Korban (1998), testando três fontes de carbono (sacarose, glicose e frutose) na indução de gemas adventícias de embriões de *Pinus sylvestris* L., observaram que os explantes cultivados na meio Gresshoff e Doy contendo sacarose produziram a mais alta frequência de regeneração (81%), bem como ausência de hiperhidricidade das brotações adventícias.

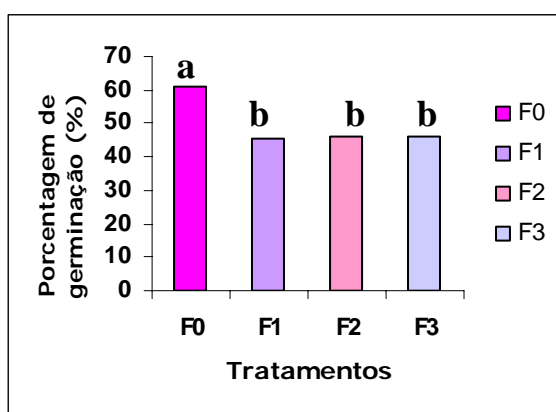


Figura 4: Percentagem de germinação nos tratamentos com diferentes fontes de carboidratos aos 45 dias após a inoculação.

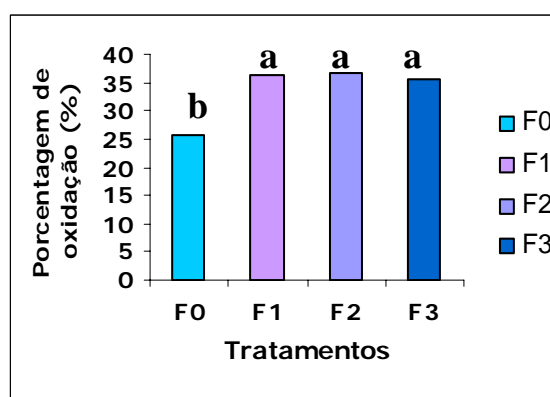


Figura 5: Percentagem de oxidação nos tratamentos com diferentes fontes de carboidratos aos 45 dias após a inoculação.

Aos 60 dias de cultivo ocorreu um aumento da oxidação dos protocormos nos tratamentos F1, F2 e F3, ocorrendo uma maior afirmação da germinação no tratamento F0 (Figura 6).

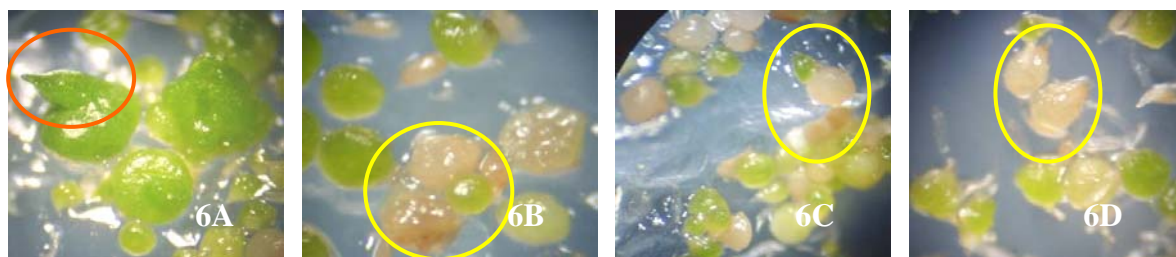


Figura 6: Semente de *Cattleya labiata* aos 60 dias de cultivo: Meio MS com 30g.L⁻¹ de sacarose (F0), (6A) destacando em vermelho a formação dos primórdios foliares; Meio MS com 30g.L⁻¹ de glicose (F1) (6B); Meio MS com 30g.L⁻¹ de frutose (F2) (6C) e Meio MS com 15g.L⁻¹ de frutose + 15g.L⁻¹ de glicose (F3) (6D) destacando em amarelo os protocormos oxidados. (Aumento de 45x).

CONCLUSÃO

A melhor fonte de carbono para germinação *in vitro* das sementes de *Cattleya labiata* é a sacarose na concentração de 30g.L⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review*, Bronx, v.33, p. 1967.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAM, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/SPI, 1998. v.1, p.87-132.
- COLLINS, M. T.; DIXON, K. W. Micropropagation of an Australian terrestrial orchid *Diuris longifolia* R Br. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Melbourne, v.32, p.131-135, 1992.
- GÖSSLOVÁ, M.; SVOBODOVÁ, H.; LIPAVSKÁ, H.; ALBRECHTOVÁ, J.; VREUGDENHIL, D. Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v.37, p.24-28, 2001.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. T.; CALDAS, L. S.; BUSO, S. A. (eDS). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI, 1998. v.1, p. 371-393.
- KERBAUY, G. B. The effects of sucrose and agar on the formation of protocorm-like bodies in recalcitrant root tip meristems of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae). *Lindleyana*, West Palm Beach, v.8, p.149-154, 1993.
- MOURA, V. *Natureza violentada: Flora e fauna agredidas*. Porto Alegre: Leal, 1979
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- RAGHAVAN, V.; TORREY, J. G. Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture. ***American Journal of Botany***, v. 50, n. 6, p. 540-551, 1963.
- RIETSEMA, J.; SANTINAS, S.; BLACKESLEE, A. F. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro*. ***American Journal of Botany***, v. 40; p. 538-545, 1953.
- SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil**. São Paulo: Nobel, 1986.
- SUL, I.; KORBAN, S. S. Effects of media, carbon sources and cytokinins on shoot organogenesis in the Christmas tree Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). ***Journal of Horticultural Science and Biotechnology***, Ashford, v.73, n.6, p.822-827, 1998.
- TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. *Micropropagação de plantas ornamentais*. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 1998. (Boletim Técnico, n.174).
- TREMBLAU, L.; TREMBLAY, F. M. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P) and red spruce (*P. rubens* Sarg) somat, embryos. *Plant cell, tissue and Organ Culture*, v.27, p.95-103, 1991.