

CRESCIMENTO *in vitro* DE PLÂNTULAS DE ORQUÍDEA (*Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya warneri* T. Moore alba) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E FRUTOSE.

Bruna Manuelli Teles Moreira¹

Ethiene Cristina Tomba¹

Patricia da Costa Zonetti²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de plântulas de orquídeas híbrido *Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya warneri* T. Moore alba, utilizando o meio de cultura "C" de Knudson acrescentado com diferentes concentrações de sacarose e frutose (10, 15, 20 e 25 g/L). Após 180 dias de transferência das plântulas para os diferentes meios de cultivo foram avaliados: número de folhas, de brotações e de raízes; tamanho médio da raiz dado pelo comprimento e diâmetro da raiz maior; comprimento e biomassas fresca e seca da plântula. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Com o aumento da concentração de frutose, houve queda nas características avaliadas. O meio "C" de Knudson tradicional (20 g/L de sacarose) apresentou melhores resultados no crescimento do híbrido *Laelia purpurata* var *venosa* X *Cattleya warneri* alba. A concentração de frutose que promoveu melhorias no desenvolvimento foi de 10 e 15 g/L.

Palavras-chave: *Carboidrato, Orchidaceae; Laelia purpurata Lindl var venosa X Cattleya warneri T. Moore alba.*

In vitro ORCHID SEEDLINGS (*Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya warneri* T. Moore alba) GROWTH UNDER DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SACCHAROSE AND FRUCTOSE

ABSTRACT

Current study aimed to evaluate the development of hybrid orchid seedlings of *Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya warneri* T. Moore alba in Knudson "C" culture medium. Different concentrations of sucrose and fructose (10, 15, 20 and 25 g/L) were added to culture medium. Following criteria were assessed 180 days after seedlings transferes to different culture medium: number of leaves, number of buddings and roots, root size average (root's length/diameter), seedlings length and, fresh and dry biomass. Data were submitted to variance analysis and averages were compared by Scott-Knott's test with a significance of 5%. Reduction of evaluated characteristics was observed when fructose's concentration was increased. Knudson traditional "C" medium (20 g/L sucrose) has improved results in hybrid *Laelia purpurata* var *venous* X *Cattleya warneri* alba growth. Superior development was observed in 10 g/L and 15 g/L Fructose's concentrations.

Key words: *Carbohydrate; orchidaceae; Laelia purpurata Lindl var venosa X Cattleya warneri T. Moore alba.*

INTRODUÇÃO

As orquídeas exibem características altamente especializadas que servem para atrair insetos e propiciar a polinização cruzada (1). Apresentam uma alta distribuição mundial, desde regiões polares a desertos equatoriais. Por sua beleza apresentam alto valor comercial,

sendo considerado o mais antigo grupo cultivado entre as ornamentais. Apesar da grande diversidade de orquídeas, as mesmas estão ameaçadas, principalmente devido à diminuição de seu habitat natural e coleta e comercialização indiscriminadas.

Estas plantas podem se propagar tanto por meio vegetativo quanto por

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR.

² Professora Doutora do Colegiado de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR.

sementes. Na natureza, a propagação de orquídeas por meio de sementes é um processo lento e ocorre somente na presença de fungos micorrízicos (2). Tal simbiose torna-se necessária devido ao fato das sementes não possuírem reservas nutritivas suficientes para promover a germinação (3).

O cultivo *in vitro* de orquídeas surge como uma alternativa de propagação, visto que não é necessária a presença de fungos, a perda de plântulas é menor, e as chances da semente germinar são maiores, ocorrendo assim uma maior produção de mudas para suprir o mercado de plantas ornamentais, evitando a retirada dessas plantas da natureza. Além do que, a taxa de germinação das sementes de orquídea no ambiente é muito baixa. Estima-se que apenas aproximadamente 5% das sementes destas plantas possam germinar sob condições naturais (2, 4). Desta forma, a técnica de sementeira de orquídeas *in vitro* torna possível o aproveitamento máximo de sementes, pois quase 100% das sementes germinam (5).

O cultivo *in vitro* de sementes de orquídeas e o desenvolvimento inicial das plântulas só foi possível com os trabalhos de Lewis Knudson em 1922, o qual propôs uma composição de meio de cultura utilizando sais minerais (6). Os meios nutritivos possuem capacidade de dar suporte ao crescimento e desenvolvimento das plantas sendo formados não só por sais inorgânicos, mais por uma fonte de carboidrato, por aminoácidos, vitaminas e proteínas específicas (7, 8). O carboidrato adicionado ao meio de cultivo fornece energia metabólica e estruturas carbônicas para a síntese de compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (9). A sacarose tem sido o açúcar mais utilizado nos meios visando a propagação de plantas ornamentais (10). Além deste, no entanto, podem ser utilizados a frutose, a maltose, a glucose, entre outros (11).

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 da raiz (12). Para que o desenvolvimento de plântulas obtenha sucesso, as concentrações do açúcar devem ser observadas, pois estas influenciam diretamente nas reações fisiológicas das plantas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes concentrações de sacarose e

frutose de forma a estabelecer um melhor protocolo para o desenvolvimento das plântulas do híbrido *Laelia purpurata* Lindl var venosa X *Cattleya warneri* T. Moore alba (Orchidaceae).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Botânico e Tratamentos

Foram utilizadas plântulas do híbrido de orquídea *Laelia purpurata* Lindl var venosa X *Cattleya warneri* T. Moore alba com 120 dias de desenvolvimento provenientes de sementeira *in vitro*, no meio de cultura "C" de Knudson acrescido de 20 g/L de sacarose. Foram selecionadas as plântulas com aproximadamente 1 cm em média, com uma ou duas folhas, apresentando o mesmo padrão de desenvolvimento.

As plântulas foram transferidas para os meios "C" de Knudson modificados com diferentes concentrações de sacarose e frutose (10, 15, 20 e 25 g/L), totalizando oito tratamentos. Cada tratamento foi repetido oito vezes. Cada repetição foi composta por dez plântulas, totalizando oitenta plântulas em cada tratamento.

Ensaio Experimental

O cultivo foi realizado em estantes abertas, em sala não climatizada do Laboratório de Botânica do Centro Universitário de Maringá, CESUMAR, sob luminosidade constante (24h/luz) de 1.500lux fornecidas por lâmpadas fluorescentes branca-fria.

O ensaio foi conduzido de junho a dezembro de 2006. Os meios de cultura estéreis foram distribuídos em frascos individuais autoclavados (120°C, 20 minutos) em câmara de fluxo laminar. As plântulas foram transferidas para os meios de cultura com o auxílio de pinças. As pinças utilizadas permaneceram em álcool 100% dentro da câmara, e foram submetidas à esterilização pelo fogo. Depois de esterilizadas com o auxílio das mesmas realizou-se a transferência das plântulas para seus respectivos tratamentos. Os frascos foram vedados com plástico parafilm.

Características Avaliadas

Após 180 dias de cultivo foram avaliados o número de folhas, de brotações e de raízes; o crescimento das raízes dado pelo comprimento e diâmetro da maior raiz e o crescimento das plântulas através do comprimento da plântula; a biomassa fresca e a biomassa seca. O comprimento da raiz e da plântula foi obtido com o auxílio de régua milimetrada, expresso em centímetros e o diâmetro da raiz, com auxílio de paquímetro digital, expresso em mm.

Depois de obtidas as medidas de comprimento das plântulas, estas foram pesadas em balança analítica para obtenção da biomassa fresca, expressa em gramas. Em seguida, foram levadas a estufa com circulação de ar forçada a 60° C por 24 horas. Após resfriamento espontâneo, em dessecador, obteve-se o peso da biomassa seca, em balança analítica, expresso em gramas.

Delimitação Experimental e Análise Estatística

O experimento foi delineado inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias entre tratamentos foram comparadas pelo Teste de Scott Knott a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo do tipo e concentração do carboidrato no desenvolvimento de plântulas do híbrido de *Laelia purpurata* Lindl var venosa X *Cattleya warneri* T. Moore alba (Orchidaceae).

Para a variável número de folhas, os tratamentos sacarose 15 g/L, frutose 15, 20 e 25 g/L não foram diferentes estaticamente, mostrando ser os tratamentos com os quais se obteve menor número de folhas, já o tratamento sacarose 20 g/L foi o que proporcionou maior número de folhas (Tabela 1). Sendo assim pode-se notar que os maiores valores em relação ao número de folhas foram obtidos quando se utilizou o meio "C" de Knudson tradicional, o qual apresentou em média de 10,2 folhas por plântula.

Ao se tratar da variável número de brotos pode se perceber que o tratamento 15 g/L de frutose proporcionou maior número de brotos, não diferindo significativamente do meio tradicional com 20 g/L de sacarose, e mostrando-se diferente dos demais tratamentos (Tabela 1).

Com relação às características de crescimento das plântulas, observou-se que no tratamento de sacarose 20 g/L obteve-se o maior comprimento das plântulas, seguido dos tratamentos 10 e 15 g/L de sacarose e 10 e 15 g/L de frutose. Observa-se pela tabela 1 que os maiores valores de biomassa fresca foram alcançados nos tratamentos de 10 g/L de frutose e 20 g/L de sacarose. A biomassa seca teve sua menor média no tratamento de 20 g/L de frutose. Neste tratamento também se observou menor média em: número de folhas, comprimento das plântulas, comprimento da raiz e no diâmetro e número de raízes (Tabelas 1 e 2).

Chaves et al. (13) avaliaram os meios nutritivos Murashige & Skoog (MS) e "C" de Knudson modificados no cultivo in vitro de *Laelia purpurata* var. Alba Coeruleia. Estes autores verificaram que o meio "C" de Knudson, contendo frutose como fonte de carbono, proporcionou incremento no número de folhas, assim como de raízes novas, indicando que a fonte de carbono possa estimular e/ou regular processos bioquímicos relacionados com a divisão e diferenciação celular. Neste mesmo estudo a frutose no meio nutritivo, proporcionou 100% de plântulas vivas, mas não promoveu um aumento no número de gemas, quando comparado com o controle, contendo sacarose (20 g/L) (Tabela 1).

Tabela 1. Características de crescimento da parte aérea e plântula do híbrido de *Laelia purpurata* Lindl var venosa X *Cattleya warneri* T. Moore alba (Orchidaceae), após 180 dias em meio de cultivo sob diferentes concentrações de frutose e sacarose

Tratamentos	Variáveis				
	Número de Folhas	Número de Brotos	Comprimento plântula (cm)	Biomassa Fresca/ Plântula (g)	Biomassa Seca/ Plântula (g)
Sacarose 10g	6,86 b	1,50 b	2,13 b	0,033 b	0,017 b
Sacarose 15g	5,35 c	1,00 b	2,18 b	0,046 b	0,014 c
Sacarose 20g	10,2 a	2,27 a	2,87 a	0,108 a	0,021 b
Sacarose 25g	8,5 b	1,10 b	0,93 c	0,067 b	0,021 b
Frutose 10g	7,34 b	1,45 b	1,70 b	0,13 a	0,03 a
Frutose 15g	5,49 c	1,85 a	2,18 b	0,037 b	0,008 c
Frutose 20g	4,89 c	1,15 b	1,03 c	0,014 b	0,003 c
Frutose 25g	4,19 c	1,12 b	0,65 c	0,03 b	0,007 c

Médias com letras distintas nas colunas representam tratamentos diferentes pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Estes resultados podem indicar que o direcionamento do vegetal seja escalonado,

ora privilegiando o crescimento da plântula, ora o desenvolvimento de gemas laterais.

Com relação ao número de raízes, verificou-se que o tratamento 10 g/L de frutose apresentou maior número de raízes, não diferindo significativamente do meio tradicional com 20 g/L de sacarose, e mostrando-se diferente dos demais tratamentos (Tabela 2). Elevadas concentrações de frutose afetaram negativamente no surgimento de novas raízes. Segundo George e Sherrington (10) e Faria et al. (14), concentrações elevadas de açúcar podem inibir a formação de raízes in vitro.

O maior comprimento da raiz das plântulas foi encontrado nos tratamentos sacarose 15 e 20 g/L, frutose 10 e 15 g/L enquanto que o menor comprimento foram encontrados nos tratamentos 20 e 25 g/L de frutose. Conforme houve um aumento na concentração de frutose, o tamanho médio das raízes diminuiu progressivamente, porém este não foi um fator que influenciou no diâmetro das raízes, onde se obteve o maior diâmetro na concentração de 15 e 25 g/L de frutose (Tabela 2).

Os níveis de sacarose no substrato de cultivo in vitro influenciam vários processos metabólicos nas culturas. O aumento da concentração de sacarose, de modo geral estimula o crescimento e a formação de raízes em algumas espécies (10). No entanto, segundo Andrade (15), na fase de enraizamento, a redução da concentração de sacarose no meio de cultura vem sendo citado como benefício na melhoria de qualidade do sistema radicular, bem como na sobrevivência das plântulas transplantadas.

De maneira geral, pode-se notar que a concentração 20 g/L de sacarose proporcionou melhores resultados. Fraguás et al. (16) verificaram que para plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambrana*, o aumento da concentração. Ao se optar pelo uso de frutose, a concentração mais indicada seria de 10 g/L, pois um aumento nessa concentração poderia alterar o potencial osmótico do meio, diminuindo a absorção de

água e sais pela plântula, diminuindo então seu desenvolvimento.

osmótica do meio de cultura pelo incremento na concentração de sacarose (25 g/L) dificultou a absorção de água e nutrientes pelos explantes.

Tabela 2 Características de crescimento do sistema radicular do híbrido de *Laelia purpurata* Lindl var venosa X *Cattleya warneri* T. Moore alba (Orchidaceae), após 180 dias em meio de cultivo sob diferentes concentrações de frutose e sacarose

Tratamentos	Variáveis		
	Número de Raízes	Comprimento da maior Raiz (cm)	Diâmetro da maior Raiz (mm)
Sacarose 10g	2,50 b	1,26 b	0,46 b
Sacarose 15g	2,68 b	1,92 a	0,50 b
Sacarose 20g	5,75 a	1,51 a	0,75 a
Sacarose 25g	3,83 b	1,20 b	0,63 a
Frutose 10g	7,30 a	1,85 a	0,48 b
Frutose 15g	4,25 b	1,73 a	0,63 a
Frutose 20g	2,63 b	0,83 c	0,51 b
Frutose 25g	2,34 b	0,76 c	0,59 a

Médias com letras distintas nas colunas representam tratamentos diferentes pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

CONCLUSÃO

O meio "C" de Knudson tradicional com 20 g/L de sacarose apresentou melhores resultados, proporcionando na maioria das variáveis condições satisfatórias de crescimento.

De uma forma geral o meio suplementado com sacarose apresentou melhores resultados em comparação ao meio suplementado com frutose. No entanto, ao se utilizar a frutose, as concentrações mais indicadas seriam de 10 e 15 g/L.

Bruna Manuelli Teles Moreira
Ethiene Cristina Tomba
Patricia da Costa Zonetti

Endereço para correspondência: Av. Sophia Rasgulaeff 3.328,
Maringá, Paraná, CEP: 87043-010;
Tel: (44)30288053;
E-mail: brunamanuelli@yahoo.com.br

Recebido em 08/10/07

Revisado em 07/11/07

Aceito em 28/11/07

REFERÊNCIAS

- (1) DRESSLER, R.L. **The orchids and classification**. Harvard: University Press. 1981.
- (2) ARDITTI, J. Aspects of the physiology of orchids. **Advances in Botanical Research**, London, 1979, v. 7, p. 421-655.
- (3) RAMOS, M.S.S. **A orquídea e sua reprodução pela semente**. Campinas: Indústria Gráfica Saraiva S.A., 1969.
- (4) RAO, A.N. Tissue culture in the orchid industry. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Eds.) **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977, p. 44-69.
- (5) MORALES, S. **Efeito de aditivos no cultivo in vitro de plântulas de *Catasetum fimbriatum* (E. MORREN) LINDL. & PAXTON, *Encyclia randii* (BARB. RODR.) PORTO & BRADE e de um híbrido de *Laelia* LINDL. x *Cattleya* LINDL. (ORCHIDACEAE)**. 2004. 48f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
- (6) MILANEZE, M.A. **Estudos em orquídeas nativas do Brasil: morfologia de sementes e cultivo assimbiótico**. 1997. 241f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro, SP.
- (7) BUTCHER, W.P.; INGRAN, D.S. **Plant tissue culture**. London: Edward Publishing Limited, 1976, p. 3-15.
- (8) DIXON, R. Isolations and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON R. R. (ed), **Plant cell culture: a practical approach**. Washington DC: IRL Press, 1985, p. 1-20.
- (9) CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998, p.87-132.
- (10) GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984.
- (11) TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas, Instituto Agrônomo, 1998. (Boletim técnico, 174)
- (12) GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SP / Embrapa-CNPq, 1998, v. 1.
- (13) CHAVES, T.O.; DUCCA, F.; CARVALHO, V.M.; ZONETTI, P.C. Avaliação dos meios nutritivos Murashige & Skoog (MS) e "C" de Knudson modificados no cultivo in vitro de *Laelia purpurata* var. alba Coeruleia. In: **IV EPCC – Encontro de Produção Científica do Cesumar**, 2005.

(14) FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.; JUNGHANS, T.G.; LEDO, C.A.S.; SOUZA, A.S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 2006, v. 28, n. 2, p. 267-270.

(15) ANDRADE, L.B. **Efeito do meio de cultura, tipos de explantes e período do escuro sobre a micropropagação da batata (*Solanum tuberosum* L.), cv. Cristal**. 1998. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

(16) FRAGUÁS, F.V.; SOUZA, A.V; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F. Crescimento in vitro de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Lavras, 2003, v. 50, n. 292, p. 719-726.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.