

TEOR DE SACAROSE NA INDUÇÃO DE MORFOGÊNESE *in vitro* DE *Cattleya eldorado* Lindl (Orchidaceae)

Lorena de Paula Cabral – UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Eva Maria Alves Cavalcanti Atroch – UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Sônia Maria e Souza de Araújo – UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Eduardo Ossamu Nagao – UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

E-mail para contato: lorenapcabral@ufam.edu.br

Agência Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ

Eixo Temático: 2.1.2. Ciências Biológicas

Categoria: Apresentação Oral

RESUMO

O gênero *Cattleya* Lindl. está representado por belas orquídeas tropicais, que a partir de um sistema de produção sustentável poderá se constituir em uma fonte de recurso para a floricultura regional. Assim buscou-se avaliar as respostas morfogênicas no crescimento de *Cattleya eldorado* Lindl., frente a variações nos teores de sacarose (g L^{-1}): T1 – 30 (controle); T2 – 15; T3 - 7,5 e T4 - 0,0 no meio de cultura de MS (1962), durante 90 dias. O teor de sacarose no meio proporcionou respostas diferenciadas sobre as variáveis enraizamento, emissão de brotações, ganho foliar e sobrevivência ao longo do tempo. Verificou-se que a redução do teor a 7,5 g L^{-1} resultou em respostas morfogênicas que favorecem a multiplicação desta espécie, promovendo maior ganho foliar sem comprometer a emissão de brotações e raízes. Tal condição de cultivo também pode ser favorável aos procedimentos de aclimatização das plântulas.

Palavras-chave: Autotrofia *in vitro*. Orquídea. Produção vegetal.

1. INTRODUÇÃO

Uma das maiores famílias de Angiospermas é a Orchidaceae, com 736 gêneros, dentre eles o *Cattleya* Lindl., de origem neotropical com 114 espécies das quais aproximadamente 100 ocorrem no Brasil, distribuídos em todas as regiões (CHASE et al., 2015; VAN DER BERG, 2014).

As Orchidaceae das campinas da Amazônia brasileira estão representadas por 155 espécies dentre elas a *Cattleya eldorado* Lindl, uma espécie monofoliada pertencente à subfamília Epidendoideae, tribo Epidendreae e subtribo Laeliinae (BRAGA, 1977; DRESSLER, 1981). Esta espécie tem

ocorrência registrada em uma área relativamente pequena da Amazônia, sendo encontrada na Venezuela e no Brasil nos estados do Pará e Amazonas, neste último restrito a parte central, ao redor de Manaus, nos dois lados do Rio Negro, até a divisa com o estado de Roraima, vegetando na maioria das vezes sobre o macucu (*Aldina heterophylla* Spr. ex Benth., Fabaceae), os igapós e, raramente, na terra-firme (LACERDA, 1995).

As espécies pertencentes a esta família, comumente chamadas de orquídeas, possuem grande importância econômica pelo fato de serem comercializadas como plantas ornamentais, devido a suas flores vistosas com variedade de cores e tonalidades diversas (CARNEIRO et al., 2017). No entanto, apresentam problemas em relação aos métodos de propagação convencionais, pois apesar de serem formadas inúmeras sementes por cápsulas, estas apresentam tamanhos extremamente reduzidas, sem endosperma e, em condições naturais, a porcentagem de germinação é 2 a 3%, dependendo de associações micorrízicas (CORRIE; TANDON, 1993). Além disso, é sabido que diante do aspecto econômico, a propagação por sementes em geral se torna inadequada para realização em larga escala, uma vez que geralmente não apresenta homogeneidade devido a segregação genética que ocorre na população descendente (PIERIK, 1990).

Diante disso, a propagação de plantas ornamentais via cultivo *in vitro* tem sido bastante utilizado e é reconhecido por permitir a reprodução massal de indivíduos, além de garantir uma produção com qualidade elevada e uniforme (AMOO et al., 2009; LEMES et al., 2016). Neste tipo de cultivo, em geral, adiciona-se uma fonte de carbono para compensar a radiação fotossintética inadequada, provenientes das salas de crescimento iluminadas com lâmpadas fluorescentes brancas frias, o que ocasionam a ausência ou ineficiência do processo fotossintético, que aliado a baixa concentração de CO₂ presente nos recipientes onde os explantes são inoculados prejudicam a fotossíntese, acarretando assim a necessidade de inclusão de uma fonte de açúcares nos meios de cultura (PASQUAL, 2001). O meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é o mais frequentemente empregado com a adição de 3% de sacarose, o que significa que as plantas se desenvolvem em uma condição

heterotrófica ou mixotrófica. A diminuição da sacarose no meio de cultura é interessante por alguns aspectos, pois dificulta o desenvolvimento de microrganismos (contaminação) e favorece o desenvolvimento da autotrofia tornando mais fácil a etapa de aclimatização das plantas *ex vitro*. Em orquídeas acrescentam-se também os efeitos que resultam em respostas morfogenéticas que influenciam o desenvolvimento de parte aérea e raiz, multiplicação de brotos, formação de protocormos e calos (LEMES et al., 2016).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de quatro concentrações de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L⁻¹) no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), durante três períodos de tempo (30, 60 e 90 dias), sobre a sobrevivência, o enraizamento, o número de brotações e no ganho foliar de *Cattleya eldorado*.

2. METODOLOGIA

Para este trabalho foram utilizados explantes de *Cattleya eldorado* com 01 par de folhas, com aproximadamente 02 cm de comprimento de parte aérea, sem o sistema radicular, provenientes de plântulas já estabelecidas *in vitro* acondicionadas em sala de crescimento no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Amazonas.

Em ambiente estéril, utilizando uma câmara de fluxo laminar horizontal, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 8 g L⁻¹ de ágar, distribuído em quatro tratamentos referentes aos teores de sacarose: T1 - 30g L⁻¹ (controle), T2 15g L⁻¹, T3 – 7,5g L⁻¹ e T4 - 0,0g L⁻¹, isento de qualquer regulador de crescimento, com pH ajustado para 5,8 e previamente esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por 25 minutos.

Após a inoculação, as unidades experimentais foram distribuídas em sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C, fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro, e intensidade luminosa de 30 μmol m⁻²s⁻¹ (Radiação fotossinteticamente ativa/PAR) fornecida por lâmpadas fluorescentes branco-frias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial constituído por 4 tratamentos de teor de sacarose (T1 - 30g L⁻¹ (controle), T2 15g L⁻¹, T3 – 7,5g L⁻¹ e T4 - 0,0g L⁻¹) em três intervalos de tempo (30, 60 e 90 dias) com 5 repetições de 20 tubos de ensaio com uma plântula. As variáveis analisadas foram as médias de porcentagem de plântulas enraizadas, número de brotações novas, sobrevivência e ganho foliar. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando o teste F foi significativo, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Efetuou-se a transformação dos dados nas variáveis enraizamento, brotação e enraizamento a fim de normalizá-los, utilizando a seguinte equação $\sqrt{(x + 5)}$. Os dados foram analisados com o auxílio dos programas computacionais EXCEL® e ASSISTAT® (SILVA; AZEVEDO, 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de sacarose e o tempo de cultivo resultaram em efeito significativo em todas as variáveis ($p \leq 0,01$) e houve interação significativa do período de avaliação com o tratamento, para as variáveis enraizamento ($p \leq 0,05$) e sobrevivência ($p \leq 0,01$).

As plântulas apresentaram um elevado índice de sobrevivência em todos os tratamentos, em que se observa uma porcentagem média de 72,25% de sobrevivência mesmo na ausência de sacarose, e nesta condição houve efeito claro do tempo de cultivo que resultou em um declínio a cada período. Desta forma verificou-se que apenas 50% das plantas conseguem sobreviver ao final dos 90 dias em condição de autotrofia. Tal situação pode ser explicada pelas características das lâmpadas fluorescentes, que representam um nível de aproximadamente 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Para efeito de comparação, em ambiente aberto com iluminação solar registra-se irradiância de 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ou mais. Diante disso, esse fator pode ter ocasionado a queda da sobrevivência por não permitir que as taxas de fotossíntese fossem suficientes para manter o crescimento e desenvolvimento do explante.

Por outro lado, percebeu-se um efeito benéfico na redução do teor de sacarose nas variáveis avaliadas. Assim a sobrevivência praticamente não foi afetada até uma redução de 25% da sacarose, uma vez que o tratamento com 7,5 gL⁻¹ de sacarose promoveu maior sobrevivência das plântulas, e foi superior ao tratamento com 15 gL⁻¹ (T2) (Tabela 1). Ocorreu maior porcentagem de enraizamento em T1 (30) e T2 (15) gL⁻¹ de sacarose. Nestes tratamentos observa-se que a indução das raízes se manteve estável ao longo do tempo. O contrário acontece nos tratamentos com menores teores, T3 (7,5) e T4 (0,0), onde apresentaram porcentagens menores de enraizamento no início, mas conseguiram incrementar significativamente o enraizamento aos 60 dias de cultivo, quando se verifica um aumento de 1,4 vezes em T3 (7,5) e de 4 vezes em T4 (0,0). Em consequência disso a média dos tratamentos para o período de 60 dias recebeu um incremento de 25,6%, e se manteve estável até o final dos 90 dias. Contudo o tratamento sem sacarose limitou a formação das raízes em 74%, em média, quando comparado ao tratamento completo (T1) no período final (Tabela 1).

O desempenho das plantas para produzir raízes em cada tratamento, demonstrou que a formação do sistema radicular demanda uma elevada fonte de energia e esqueletos de carbono, que tem efeitos também sobre a velocidade de surgimento das raízes. LEE-HO et al., (2007) verificaram em trabalho com *Arabidopsis thaliana* in vitro que o enriquecimento da atmosfera com CO₂, ou o aumento do teor de sacarose no meio de cultura, promoveram incrementos no crescimento radicular em comprimento e diâmetro, e alterações na morfologia das raízes para um padrão de ramificação mais elaborado.

Trabalhando com a mesma espécie, ROYCEWICZ e MALAMY (2012) comentam a sensibilidade do crescimento radicular à disponibilidade de sacarose em meio de cultura. Nestas plantas teores de 2% de sacarose no meio aumentou o número de raízes e o comprimento da raiz principal. Estes autores consideram que o crescimento radicular é favorecido pelo aumento de energia fornecido pela sacarose. Nas condições aqui testadas as plântulas nos tratamentos com maiores teores de sacarose (30 e 15 gL⁻¹) não apresentaram alterações significativas na formação de raízes ao longo do tempo, mas

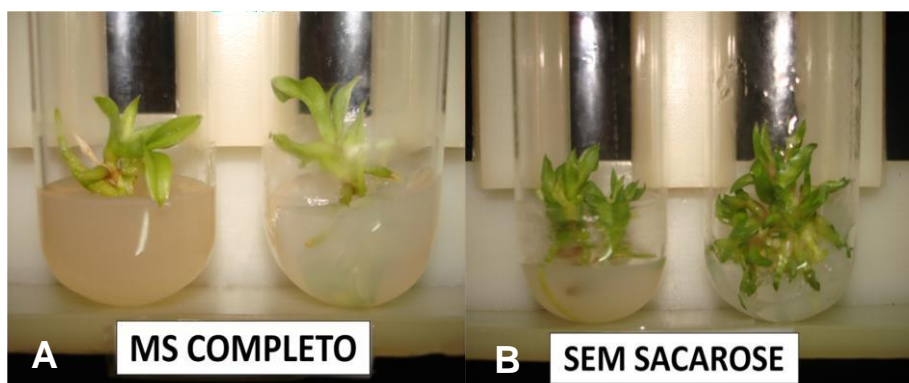
mantiveram as maiores médias de enraizamento ao final dos 90 dias. Os tratamentos com menores teores (7,5 e 0 gL⁻¹) apresentam enraizamento mais lento no início, embora em termos de incremento superem os tratamentos 1 e 2 aos 60 dias (Tabela 1).

Acredita-se que estas respostas podem variar entre as espécies. FARIA et al. (2004) em trabalho que avaliou o efeito de diferentes níveis de sacarose no crescimento *in vitro* de *Dendrobium nobile*, relata que o acréscimo de sacarose ao meio até 60 gL⁻¹ não influenciou o enraizamento, e que houve efeito apenas na ausência de sacarose. Efeito similar foi constatado por LEMES et al. 2016, testando diferentes concentrações de sacarose no enraizamento de *Miltonia flavescens*, utilizando meio MS meia força (metade das concentrações de macro e micronutrientes), à medida que a concentração de sacarose aumentou, o número de raízes reduziu. O mesmo relatado por Gadiano Junior et al. (2013) que verificaram que o número de raízes em *Catleya loddigesii* Lindley, também cultivada em meio meia força por 90 dias, foi reduzido em concentrações de 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose.

Por mais que o explante esteja em condições *in vitro*, mesmo que em baixas taxas, a fotossíntese acontece e há a produção de açúcares, que aliados aos que são adicionados artificialmente no meio através compostos como a sacarose, podem interferir negativamente na formação de raízes pelo fato de que esse incremento da concentração de açúcares pode ocasionar na diminuição de absorção de água e sais, prejudicando assim o crescimento do explante (THORPE et al., 2008; BESSON et al., 2010).

A emissão de brotações foi limitada apenas na ausência da sacarose no meio de cultura, quando se verifica um decréscimo de 25% em relação ao tratamento controle (Figura 1). Observa-se que a emissão de brotos se manteve estável ao longo do tempo na maioria dos tratamentos, com exceção de T3 que apresentou um incremento de 36,73% aos 60 dias de cultivo. À semelhança do enraizamento, o surgimento de brotos se estabiliza aos 60 dias. Contudo, ao contrário do enraizamento, a frequência do surgimento de brotos se equivale entre os tratamentos no intervalo de 30 dias (Tabela 1).

Figura 1: Comparação da quantidade de brotações de *Cattleya eldorado* entre meio de MS (1962) completo (A) e sem sacarose (B), após 90 dias de cultivo *in vitro*.



Fonte: A autora

O mesmo foi constatado por DIGNART et al. (2009), avaliando o efeito de três concentrações de sacarose (0,0; 15,0 e 30g L⁻¹) no crescimento e desenvolvimento de *Cattleya walkeriana* Gardn, onde não foram observadas diferenças estatísticas para o número de brotações por explantes nas concentrações acima citadas, contudo em ausência de sacarose, a brotação também foi prejudicada. Situação contrária foi verificada por RIBEIRO et al. (2009) em trabalho com multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica*, onde o maior teor de sacarose levou ao incremento das brotações. Tais respostas apontam para o particionamento diferenciado de carboidratos diante das limitações do meio ao longo do tempo.

Os efeitos dos teores de sacarose sobre o ganho foliar, estabeleceram uma hierarquização marcante entre os tratamentos. Observa-se um incremento crescente no número de folhas a partir da ausência de sacarose, que culmina com o teor de 7,5 gL⁻¹ (T3). Por outro lado, não há diferenças entre os tratamentos T1 (controle) e T2 (15). À semelhança das variáveis anteriores o maior crescimento, em todos os tratamentos, foi observado aos 60 dias de cultivo, ocorrendo uma estabilização ao final dos 90 dias (Tabela 1).

Segundo CALDAS et al. (1998), a sacarose funciona como recurso energético e prove carbonos precursores necessários para a biossíntese de componentes funcionais e estruturais, como aminoácidos, oligossacarídeos e outros compostos necessários para o crescimento e desenvolvimento da plântula.

Tabela 1: Médias transformadas e originais (entre parênteses) das porcentagens de sobrevivência, enraizamento e brotações, e médias originais de ganho foliar de plântulas de *Cattleya* sp submetidas a quatro tratamentos de teores de sacarose (gL^{-1}) (T1 – 30; T2 - 15; T3 – 7,5 e T4 - 0,0), em meio de MS (1962), avaliadas em intervalos de 30, 60 e 90 dias.

Concentração de sacarose (gL^{-1})	Período de avaliações			Médias de tratamentos
	30	60	90	
Sobrevivência				
30	9,82(96,43)aA	9,34(87,24)abA	9,18(84,27)aA	9,45(89,30)ab
15	9,24(85,38)bA	9,24(85,38)abA	8,41(70,73)abA	8,96(80,28)bc
7,5	9,72(94,48)abA	9,61(92,35)aA	9,17(84,09)aA	9,50(90,25)a
0	9,66(93,32)abA	8,61(74,13)bB	7,23(52,27)bC	8,50(72,25)c
Médias de períodos	9,61(92,35)A	9,20(84,64)B	8,50(72,25)C	9,10(72,81)
Enraizamento				
30	8,08(65,29)aA	8,99(80,82)aA	9,15(83,72)aA	8,74(76,39)a
15	7,77(60,37)aA	8,95(80,10)aA	9,22(85,01)aA	8,65(74,82)a
7,5	5,69(32,38)bB	8,15(66,42)aA	8,27(68,39)aA	7,37(54,32)b
0	1,04(1,08)cB	4,26(18,15)bA	4,26(18,15)bA	3,19(10,18)c
Médias de períodos	5,64(31,81)B	7,58(57,46)A	7,72(59,60)A	6,98(48,72)
Brotação				
30	4,70(22,09)aA	5,83(33,99)abA	6,26(39,19)abA	5,59(31,25)a
15	5,12(26,21)aA	6,05(36,60)abA	6,61(43,69)aA	5,92(35,05)a
7,5	4,22(17,81)aB	6,67(44,49)aA	7,08(50,13)aA	5,99(35,88)a
0	3,78(14,29)aA	4,34(18,84)bA	4,68(21,90)bA	4,27(18,23)b
Médias de períodos	4,45(19,80)B	5,72(32,72)A	6,16(37,95)A	5,44(29,59)
Ganho foliar				
30	1,41bB	2,46bcA	2,46bcA	2,11b
15	1,48abB	3,10abA	3,10abA	2,56b
7,5	1,92aB	3,73aA	3,73aA	3,13a
0	0,90cA	1,37cA	1,37cA	1,21c
Médias de períodos	1,43B	2,66A	2,66A	2,25

*Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teor de sacarose resultou em efeitos diferenciados sobre o desenvolvimento de brotações e surgimento de raízes. Observou-se que menores quantidades de açúcar inibem o enraizamento, mas estimulam as brotações. Tais resultados podem ter diferentes aplicações. Se o objetivo for obter plantas completas para a aclimatização, o teor de 75% (T2) de sacarose, se mostrou mais eficiente em relação ao meio com 100% (30 gL⁻¹), pois manteve o mesmo nível de enraizamento e maior porcentagem de brotações. Entretanto, uma redução a 25% do teor de sacarose (T3) poderá ser interessante em protocolos para multiplicação, uma vez que apresentou o maior número de brotações ao final dos 90 dias.

REFERÊNCIAS

- AMOO, S.O.; FINNIE, J.F.; VAN STADEN, J. *In vitro* propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 3, p. 273-278, 2009.
- BESSON, J.C.F.; OLIVEIRA, L.K.; BONETT, L.P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n.1, p.9-13, 2010.
- BRAGA, P.I.S. Biological aspects of the Orchidaceae from a Central Amazonian Campina. **Acta Amazonica**, v.7, 89 p, 1987.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, 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 CENARGEN, v.1, p.87-132, 1998.
- CARNEIRO, G. T.; GONÇALVES, L. M.; FLORES, A. S. Anatomia foliar de duas espécies de *Cattleya* (Orchidaceae) endêmicas dos Escudos das Guianas. **Biota Amazônia**, v.7, n.1, p.26-29, 2017.
- CHASE, M.W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 151–174, 2015.
- CORRIE, S.; TANDON, P. Propagation de *Cymbidium giganteum* Wall. Through high frequency conversion of encapsulated protocorms under *in vivo* and *in vitro* conditions. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 31, p. 61-64, 1993.

DRESSLER, R.L. **The orchids, natural history and classification**. 1. Ed. Cambridge: Harvard University Press, 1981.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M. C.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo in vitro de *Cattleya walkeriana*. **Ciências e Agrotecnologia**, vol. 33, n.3, p.780-787, 2009.

FARIA, R. T.; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, V. R. O.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p.780-783, 2004.

LACERDA, K.G. Amazon discovery of new species and extinction. In: Lacerda, K.G. et al. (eds). **Brazilian Orchids**. Sodo Publishing, 1995.

LEE-HO, E.; WALTON, L. J.; REID, D. M.; YEUNG, E. C.; Kurepin, L. V. Effects of elevated carbon dioxide and sucrose concentrations on *Arabidopsis thaliana* root architecture and anatomy. **Canadian Journal of Botany**, v. 85, n. 3, p.324-330, 2007.

LEMES, C. S. R.; SORGATO; J. C.; SOARES, J. S.; ROSA; Y. B. C. J. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial in vitro de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.3, p.499-505, 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 2001.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. 3ª ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1990.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B. ; Rodrigues, V. A. Multiplicação in vitro de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2388-2393, 2009.

ROYCEWICZ, P; MALAMY, J. E. Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays. **Philosophical Transactions the Royal Society B**, v.367, p. 1489–1500, 2012.

SILVA, F.A.S; AZEVEDO, C.A.V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n. 39, p.3733-3740, 2016.

THORPE, T. A.; STASOLLA, C.; YEUNG, E.; JAN DE KLERK, G.; ROBERTS, A.; GEORGE, E. F. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: GEORGE, E.F. et al. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Netherland: Springer, 2008.

VAN DER BERG, C. Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae). **Phytotaxa**, v. 186, n. 2, p. 75-86, 2014.