

TRANSFERÊNCIA *IN VITRO* PARA *EX VITRO* DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS C₃ (*Catasetum fimbriatum*) E CAM (*Cattleya intermedia*)

GABRIEL C. V. SAENZ¹; GIULIO C. STANCATO²

Nº 0700012

RESUMO

Para a formação de mudas, plântulas micropropagadas de orquídeas (*Catasetum fimbriatum* e *Cattleya intermedia*) são submetidas a uma etapa crítica da cultura de tecidos de plantas, que é a aclimatização. Com intuito de amenizar o estresse da planta, foi realizado um experimento testando diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura (0,0 e 5,0 e 20,0 g.L⁻¹) e frascos com e sem ventilação na tampa. Os resultados mostraram que para o *C. fimbriatum* a planta se saia melhor quando usado o meio com 20,0 g.L⁻¹ sem ventilação, e a *C. intermedia* a planta teve um resultado melhor no tratamento com 0,0 g.L⁻¹ sem ventilação. Elas apresentaram resultados diferentes, possivelmente pelo fato do *C. fimbriatum* ter um metabolismo C₃ e a *C. intermedia* ter um metabolismo CAM.

ABSTRACT

For the growth of plants, micropropagated orchid plantlets (*Catasetum fimbriatum* and *Cattleya intermedia*) are submitted into a critical step of the plants tissue culture, the acclimatization. To soften the plant stress, an experiment, wich tested different concentrations of sucrose in the medium (0,0 and 5,0 and 20,0 g.L⁻¹) and bottle with and without ventilation, were made. The results show us that for the *C. fimbriatum*, the plant had better development using the 20,0g.L⁻¹ medium without ventilation, and the *C. intermedia* had better results with the 0,0 g.L⁻¹ without ventilation treatment. They have different results probably because the *C. fimbriatum* has a C₃ metabolism and the *C. intermedia* has a CAM metabolism.

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, CCV/PUC-Campinas, Campinas-SP, ga_saenz@yahoo.com.br.

2. Orientador: Pesquisador, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP.

INTRODUÇÃO

Devido a grande variedade de espécies de orquídeas e sua beleza natural, estas chamam muita atenção do mercado consumidor de flores. Para a produção em larga escala das mesmas, são utilizadas técnicas da cultura de tecidos, porém, uma das etapas mais críticas na cultura de tecidos de plantas é a aclimatização, ou seja, a transferência das plântulas da condição *in vitro* para a condição *ex vitro*. Esta etapa envolve a transição de uma condição heterotrófica, na qual a plântula depende de uma grande quantidade de suprimento externo de energia e nutrientes e apresenta reduzido fluxo transpiratório (devido à baixa intensidade luminosa e a elevada umidade relativa), para uma condição autotrófica, na qual as plântulas também devem suportar um incremento na taxa de transpiração, ficando susceptível ao déficit hídrico. Embora existam algumas regras gerais, como a manutenção da alta umidade e temperatura amena, é possível o emprego de outros procedimentos que, também, podem proporcionar uma adaptação mais rápida para o estado autotrófico (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Uma pré-adaptação à condição autotrófica pode ser estimulada na plântula ainda *in vitro*, sendo que, nesta etapa, a manutenção do crescimento deve ser favorecida, já que o desenvolvimento da condição autotrófica dependerá do crescimento durante a transferência. Assim, o controle do ambiente se apresenta como uma estratégia de fundamental e crescente importância na promoção do crescimento, desenvolvimento e na morfologia das plântulas *in vitro* (KOZAI *et al.*, 1987; KOZAI, 1991).

Alterações na composição química do meio nutritivo (FUJIWARA *et al.*, 1988) e no intercâmbio de gases entre a atmosfera do frasco de cultura e o meio externo, podem promover uma adaptação ainda *in vitro*, melhorando a capacidade fotossintética, as relações hídricas e reduzindo ou eliminando a necessidade de aclimatização *ex vitro* (DENG & DONNELLY, 1993).

Os diferentes metabolismos de fixação do CO₂ das plantas (CAM e C₃), também influenciam no comportamento da planta *in vitro*, com isso o melhor tratamento para uma planta com metabolismo C₃ não é necessariamente o melhor para uma planta com metabolismo CAM.

MATERIAL E METODOS

Plântulas de *Cattleya intermedia* e *Catasetum fimbriatum*, ambas epífitas e pertencentes à família Orchidaceae, foram inoculadas em frascos de vidro com tampa plástica contendo, 50 mL de meio de cultura MURASHIGE & SKOOG (1962) com 6g.L^{-1} de agar e $\text{pH}= 5,9$, sendo que cada frasco continha cinco plântulas. Durante a fase *in vitro* do experimento que teve um período de 45 dias, os frascos foram mantidos em prateleiras de aço iluminadas com lâmpadas fluorescentes, em uma sala de cultura climatizada, com a temperatura oscilando na faixa de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo o fotoperíodo de dezesseis horas. No antes do início experimento as plântulas eram mantidas em meio de cultura MURASHIGE & SKOOG (1962) com $20,0\text{ g.L}^{-1}$.

Cada espécie foi submetida a seis tratamentos diferentes: $0,0\text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, sem ventilação; $0,0\text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, com ventilação; $5,0\text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, sem ventilação; $5,0\text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, com ventilação; $20,0\text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, sem ventilação; $20,0\text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, com ventilação.

Após os 45 dias *in vitro* as plântulas foram transferidas para uma bandeja (*ex vitro*), e levada para a casa de vegetação em local com sombrite, de forma que não recebesse diretamente a luz solar, onde ficaram durante 75 dias quando foram feitas as análises finais. A temperatura mínima da casa de vegetação variava de 18 a 22°C durante a noite e a máxima de 28 a 38°C durante o dia.

Nas amostragens coletadas foram feitas análises biométrica. A matéria seca foi obtida com a secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 70°C , até peso permanecer constante e a área foliar foi obtida utilizando contornos foliares, onde se imprimiu os contornos das folhas em um papel sulfite, cortou-se as áreas conhecidas do papel e pesou, fazendo uma regra de três entre o peso dos contornos, peso de uma área já conhecida e a área conhecida, para determinar a área foliar (BENINCASA, 1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os tratamentos de *Catasetum fimbriatum* o que apresentou um melhor resultado foi o tratamento com $20,0\text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, sem ventilação, como o observado na **FIGURA 1**. Nesta figura também é possível observar que os tratamentos sem

ventilação obtiveram um maior acúmulo de massa seca, já os tratamentos com ventilação não obtiveram uma diferença significativa entre eles.

Os valores de taxa de crescimento relativo, taxa de assimilação líquida, razão de área foliar, área foliar específica, razão de peso de folha encontram-se na **TABELA 1** e mostram que tanto a área foliar específica quanto a razão peso folha são menores nos tratamentos que apresentam um maior acúmulo de massa seca.

Nos tratamentos de *Cattleya intermedia* não houve uma grande diferença de acúmulo de massa seca entre os tratamentos mas pela **FIGURA 2** pode-se observar que os tratamentos com 0,0 g.L⁻¹ de sacarose, sobressaíram-se em relação às outras concentrações. E os tratamentos com 20,0 g.L⁻¹ de sacarose foram os que apresentaram os piores resultados.

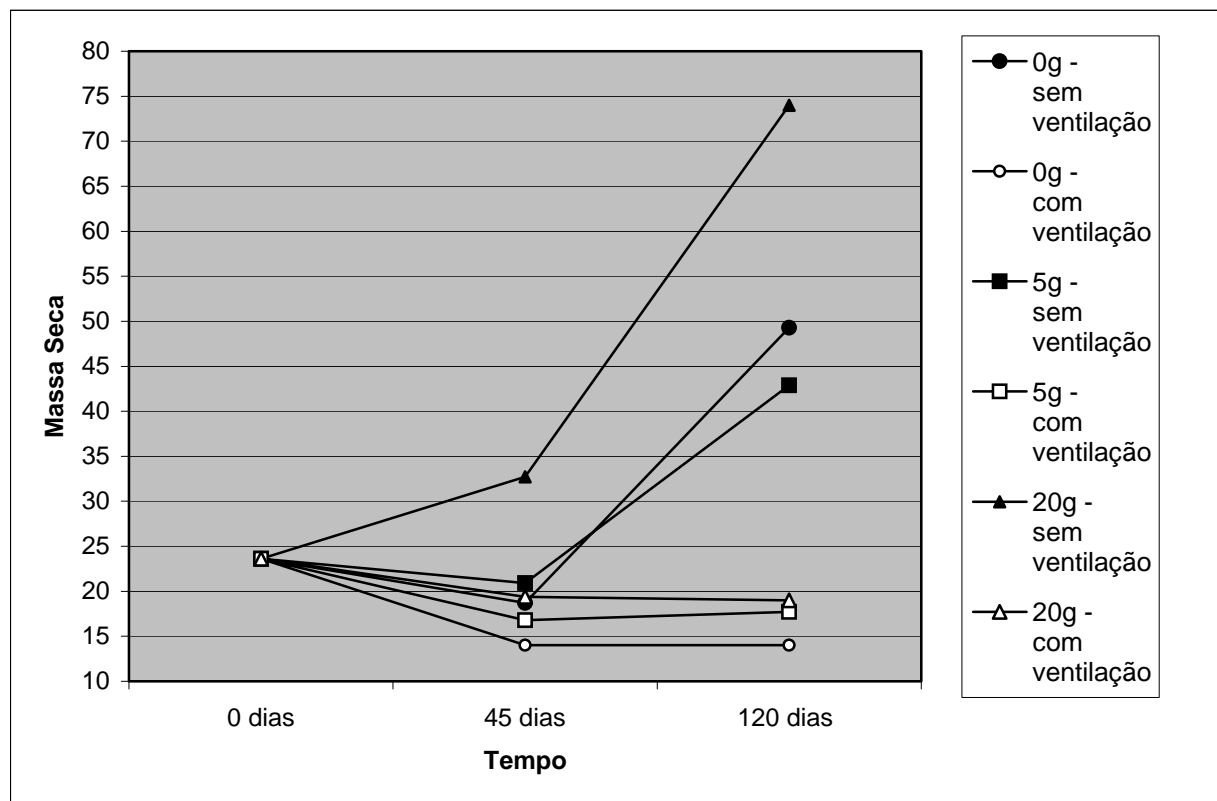


FIGURA 1. Acúmulo de massa seca em função do tempo nos seis tratamentos de *Cattleya fimbriatum*.

Na **TABELA 2** é possível observar que nos valores de taxa de crescimento relativo, taxa de assimilação líquida, razão de área foliar, área foliar específica, razão de peso de folha também não apresentou muita diferença entre os tratamentos, com exceção do tratamento com 20,0 g.L⁻¹ de sacarose, sem ventilação, o qual esteve abaixo da

média taxa de crescimento relativo, taxa de assimilação líquida e acima da média na razão de peso de folha.

É possível afirmar que a respostas das duas espécies para os tratamentos são diferentes e o acúmulo da massa seca da *C. intermedia* é mais lento, provavelmente pelo fato de ter um metabolismo CAM.

TABELA 1. Taxa de crescimento relativo, Taxa de assimilação líquida, Razão de área foliar, Área foliar específica, Razão peso folha dos tratamentos de <i>Catasetum fimbriatum</i> .					
	TCR - Taxa de crescimento relativo (mg.dia ⁻¹)	TAL - Taxa de assimilação líquida (mg/cm ² .dia ⁻¹)	RAF- Razão de área foliar (cm ² .mg ⁻¹)	AFE - Área foliar específica (cm ² .mg ⁻¹)	RPF - Razão de peso de folha
0g - sem ventilação	0,21	0,0376	0,12	0,63	0,18
0g - com ventilação	- 0,08	- 0,0135	0,42	1,14	0,37
5g - sem ventilação	0,16	0,0300	0,12	0,74	0,17
5g - com ventilação	- 0,05	- 0,0113	0,25	0,82	0,30
20g - sem ventilação	0,42	0,0775	0,07	0,50	0,15
20g - com ventilação	- 0,04	- 0,0068	0,30	1,03	0,29

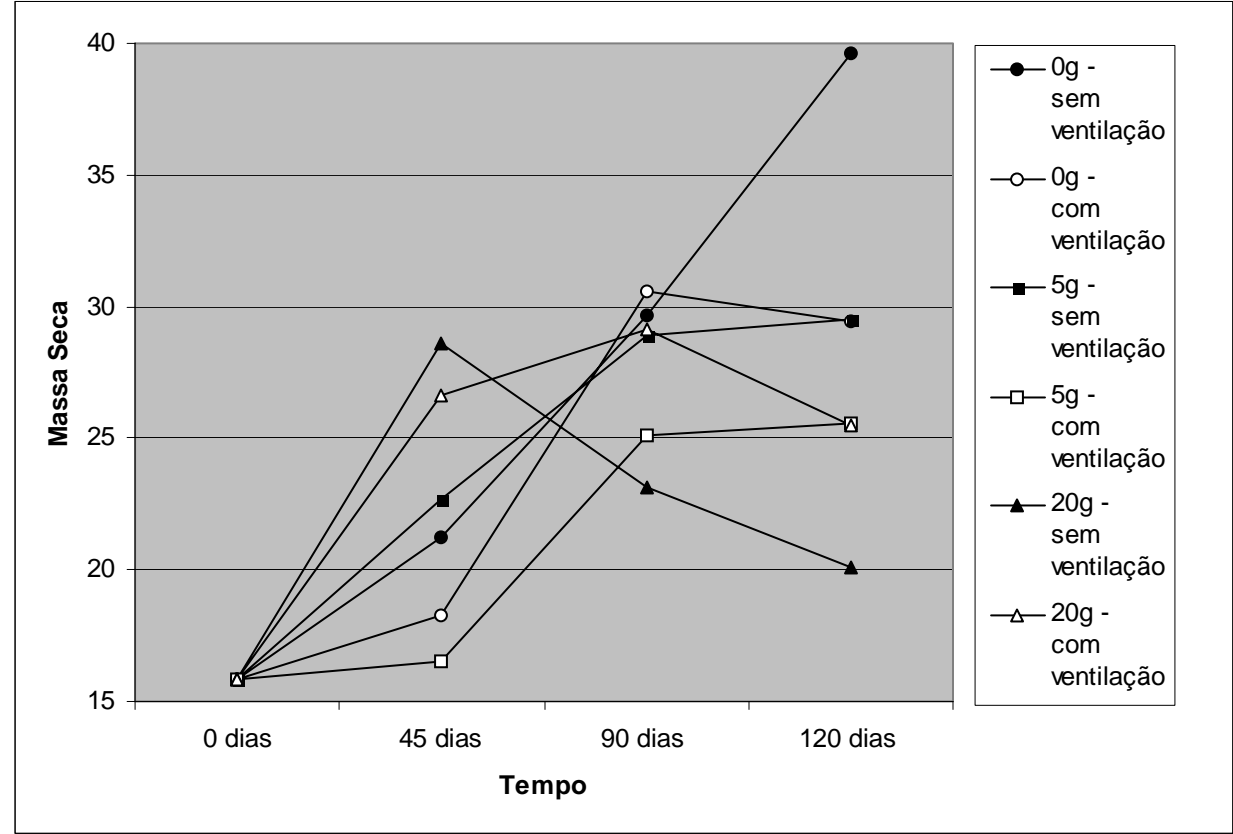


FIGURA 2. Acúmulo de massa seca em função do tempo nos seis tratamentos de *Cattleya intermedia*.

TABELA 2. Taxa de crescimento relativo, Taxa de assimilação líquida, Razão de área foliar, Área foliar específica, Razão peso folha dos tratamentos de *Cattleya intermedia*.

	TCR - Taxa de crescimento relativo (mg.dia ⁻¹)	TAL - Taxa de assimilação líquida (mg/cm ² .dia ⁻¹)	RAF- Razão de área foliar (cm ² .mg ⁻¹)	AFE - Área foliar específica (cm ² .mg ⁻¹)	RPF - Razão peso de folha
0g - sem ventilação	0,20	0,0399	0,13	0,21	0,59
0g - com ventilação	0,11	0,0258	0,15	0,27	0,55
5g - sem ventilação	0,11	0,0227	0,17	0,30	0,57
5g - com ventilação	0,08	0,0269	0,12	0,19	0,61
20g - sem ventilação	0,04	0,0080	0,22	0,37	0,60
20g - com ventilação	0,08	0,0242	0,13	0,24	0,55

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENINCASA, M. M. P. 1988. **Análise de crescimento de plantas**, FUNEP, Jaboticabal, 1988
- DENG, R. & DONNELLY, D.J. 1993. *In vitro* hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. **HortScience** **28**: 1048-1051.
- FUJIWARA, K.; KOZAI, T.; WATANABE, I. 1988. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoot and/or plantlets at rooting and acclimatization stage. **Acta Hort.** **230**: 153-158.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. 1990. Micropropagação. In: **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**, TORRES, A. C. & CALDAS, L.S. (eds.), ABCTP/EMBRAPA – CNPH, Brasília, pp. 99-169.
- KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. 1987. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. **Proc. Symposium Floriezel 87 Arlon, Plant micropropagation in horticultural industries**. pp. 135-141.
- KOZAI, T. 1991. Photoautotrophic micropropagation. **In vitro Cell. Dev. Biol.** **27**: 47-51.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant** **15**: 473-497.