

Vitor CA Leite¹ & Selma A Hebling^{1,2}

Efeito do ácido giberélico (GA₃) e da luz na germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore.³

Effect of gibberellic acid (GA₃) and light on the *in vitro* germination of *Cattleya warnerii* T. Moore seeds.

Resumo A família Orchidaceae é uma das maiores e com ampla distribuição, abrangendo espécies epífitas, humícolas ou litófitas. Em geral, as epífitas possuem muitas adaptações a condições de estresse ambiental, possuindo sementes ínfimas que de modo natural germinam mediante a simbiose com fungos micorrízicos rizoctonióides o que caracteriza o cultivo simbiótico. Floricultores têm propagado várias espécies *in vitro* utilizando meio de cultura asséptico. As sementes de orquídeas germinam muito lentamente e vários reguladores de crescimento como auxinas e citocininas, como também fotoperíodos têm sido utilizados para acelerar esse processo. As giberelinas são fitoreguladores que aceleram a germinação de várias espécies vegetais propiciando um aumento na produção de hidrolases que degradam a camada de aleurona de sementes com endosperma. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito das concentrações de 5, 10 e 20mg.l⁻¹ de ácido giberélico (GA₃), bem como a influência da luz contínua, do fotoperíodo de 16 horas e da ausência de luminosidade sobre o processo germinativo de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore, além disso, foi analisada a interação entre os regimes de luz e os meios de cultura com as diferentes concentrações de GA₃ utilizados. Foram feitas quatro repetições para cada tratamento sendo inoculadas aproximadamente 10.425 sementes por frasco. A iluminação foi feita com duas lâmpadas fluorescentes do tipo "luz do dia" e a temperatura foi a do ambiente, cuja média durante o período do experimento permaneceu em torno de 26°C. A germinação ocorreu em todos os tratamentos, com diferença significativa apenas para o regime escuro, que apresentou os menores valores de porcentagem de germinação. As sementes de *C. warnerii* se comportaram como indiferentes a luz e o ácido giberélico (GA₃) favoreceu a germinação somente na ausência de luminosidade.

Palavras-chave Orchidaceae, *Cattleya warnerii*, germinação, luz, ácido giberélico.

¹ Escola Superior São Francisco de Assis (ESFA), Rua Bernardino Monteiro 700, Santa Teresa, ES. CEP 29650-000

² shebling@gmail.com

³ Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da ESFA.

Abstract The Orchidaceae is one of the biggest families of plants, widely distributed, including epiphytes, humics or lithophilous species. In general, the epiphytes have several adaptations to the environmental stress and lowermost seeds that, in natural way, germinate by the symbiosis with mycorrhizal fungi called symbiotic culture. Floriculturists has propagated several species *in vitro* using different culture means. The seeds of orchids germinate very slowly and some growth regulators like auxins and citocinins, besides photoperiods, have been used to speed up this process. The gibberelins are growth regulators that speed up the germination of some vegetal species propitiating an increase in the production of hydrolases which degrade the aleurone layer of seeds with endosperm. The aim of the present work was to verify the effect of the concentrations of 5, 10 and 20mg.l⁻¹ of gibberellic acid (GA₃), besides the influence of the continuous light, photoperiod of 16 hours and absence of luminosity on the *Cattleya warnerii* T. Moore seeds germinability, moreover to analyze the interaction of the luminosity with the culture mean. Four repetitions for each treatment had been made seeing that approximately 10,425 seeds were inoculated in each bottle. Two fluorescent light bulbs such as "day light" were utilized for the illumination and the temperature was of the ambient, which average during the experiments was approximately 26°C. The germination occurred in all the treatments, with significant difference enters the averages only for the dark regimen which presented the smallest values of percentage of germination. The seeds of *C. warnerii* were indifferent to the light and the gibberellic acid hold up only the germination in the luminosity absence.

Keywords Orchidaceae, *Cattleya warnerii*, germination, light, gibberellic acid.

Introdução

A família botânica Orchidaceae é uma das famílias com o maior número de espécies, possuindo cerca de 20.000 espécies naturais, distribuídas por todas as regiões do globo, predominantemente nos trópicos e subtropicos (Barros,

1990). Na região tropical sua distribuição é altamente variável dependendo do clima. As espécies brasileiras foram estimadas em 2.300, agrupadas em 191 gêneros (Pabst & Dungs, 1975).

De acordo com Milaneze (1997) os órgãos vegetativos das espécies da família Orchidaceae, possibilitam sua ocorrência em locais de difícil acesso a outros vegetais: sobre os ramos mais altos das árvores, constituindo a condição epífita; sobre o dossel das florestas, condição humícola; sobre rochas com poucos sedimentos, condição litófitas; ou ainda, penetrando suas raízes no solo constituindo a condição terrestre. Atwood (1986) verificou que cerca de 73% das espécies que compõem essa família são epífitas.

A forma das sementes das orquídeas se mantém constante entre as várias espécies, possuindo pequenas dimensões e outras características próprias da família, podendo ser produzidas aos milhões em cada fruto (Arditti, 1967, 1979). Mas, o fator mais significativo é que todos os membros da família Orchidaceae em alguma fase do seu ciclo de vida mantêm uma associação com fungos micorrízicos rizoctonióides, que se faz necessária para a germinação de sementes embebidas de modo natural (Dressler, 1981).

Em contrapartida, os floricultores rotineiramente propagam orquídeas germinando sementes em um meio asséptico, cultivo assimbiótico, inicialmente desenvolvido por Lewis Knudson na década de 1920 (Arditti et al., 1990) e que trouxe como consequência um aumento significativo na produção destas plantas com ênfase no cultivo de gêneros de origem tropical tais como *Cattleya*, *Cimbidium*, *Odontoglossum*, *Coelogline*, *Laelia*, *Vanda* e *Demdrobrium* (Arditti et al., 1982).

Pelo fato das sementes de orquídeas germinarem muito lentamente, vários reguladores de crescimento como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno, têm sido adicionados aos meios de cultura para acelerar a germinação e o desenvolvimento das plântulas (Hew & Clifford, 1993).

Essas substâncias, entre suas várias funções, controlam o metabolismo e as respostas das sementes ao meio ambiente, isto é, constituem os fatores intrínsecos que controlam a germinação, mediando os processos fisiológicos da germinação e transformando sinais ambientais específicos em respostas bioquímicas. Isso produz modificações no estado fisiológico da semente, através da transcrição diferencial, repressão ou depressão gênica ou ativação do RNA mensageiro, ou ainda por alteração da permeabilidade da membrana. Modificações nas propriedades da membrana afetam a taxa de hidratação, liberação de enzimas, transporte iônico, pH e conteúdo de inibidores, situações estas que interferem na germinação das sementes (Davies, 1994).

Entre os reguladores de crescimento estão as giberelinas, que controlam a germinação, o crescimento por alongamento, além de outras funções. Existem vários tipos de giberelinas, entre os quais o ácido giberélico (GA_3),

amplamente utilizado em sistemas biológicos (Arteca, 1996). Segundo Yamaguchi & Kamiya (2002), substâncias bioativas, como o GA_3 , promovem a germinação de sementes em várias espécies de plantas. Holey (1994) sugeriu que essa giberelina pudesse promover a germinação da semente estimulando o crescimento do embrião por induzir a produção de hidrolases para a quebra e enfraquecimento das estruturas ao redor do embrião.

Esse grupo de fitoreguladores possui efeito sobre a quebra de dormência de muitas sementes e sobre a hidrólise de reservas em sementes de cereais. Em plantas não dormentes a aplicação de giberelinas pode acelerar a germinação, como também possui a capacidade de induzir o florescimento em plantas que se encontram em condições não indutivas (Wachowics & Carvalho, 2002).

Durante a germinação de grãos de cereais, a camada de aleurona (uma camada de células que recobre o endosperma) secreta hidrolases (geralmente α -amilases) no endosperma, fornecendo então nutrientes que alimentam a plântula em crescimento. Esse processo é controlado pela giberelina que regula a transcrição dos genes da α -amilase e a secreção dessa enzima pelas células da camada de aleurona. Estudos sobre a resposta da α -amilase pela camada de aleurona têm indicado que a giberelina é percebida por receptores localizados externamente na membrana plasmática. Seguindo esse evento inicial de percepção da giberelina, vários outros processos adicionais são ativados (Richards et al., 2001).

O uso das giberelinas no desenvolvimento de plântulas de orquídeas tem uma consequência negativa. Com a aplicação do ácido giberélico, o comprimento das folhas aumenta, mas o número de folhas diminui. As folhas apresentam sinais de clorose e o surgimento de raízes pode ser afetado gravemente. Há indicativos que durante a germinação, as sementes sintetizam a quantidade necessária de giberelinas, de modo que qualquer adição altera a concentração para supraótima.

Porém, mais estudos são necessários para compreender a biossíntese e ação das giberelinas na germinação de sementes de orquídeas (Hew & Clifford, 1993).

É preciso destacar também a extrema importância da luminosidade para o processo germinativo, com relação a esse fator existem as sementes que germinam somente após rápida exposição à luz ou de um período amplo de exposição; outras em que a germinação é desencadeada somente no escuro e ainda as sementes indiferentes à luz (Vázquez-Yanes & Orozco-Segóvia, 1991).

A *Cattleya warnerii* T. Moore é uma espécie de orquídea epífita que floresce de outubro a dezembro. Seu fruto possui cerca de 1.800.000 sementes além de apresentar um enorme número de variedades (Rusch, 1986), com as maiores flores do gênero. Ocorre na Mata Atlântica e em matas secas no sul do estado da Bahia, em Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Pabst & Dungs, 1975).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes doses de ácido giberélico adicionadas ao meio

de cultura, o efeito da luz contínua, do fotoperíodo ou da ausência de luz e o efeito da interação da luz com o GA₃ no processo germinativo *in vitro* de *Cattleya warnerii* T.Moore, visando a sua utilização em programas de reintrodução de espécies ameaçadas de extinção e a produção de mudas ou flores para comercialização.

Uma vez determinadas as melhores formas de cultivo dessa espécie sua comercialização poderá, além de reduzir os impactos da retirada criminosa dessas plantas nas matas, incrementar ainda mais uma atividade que pode refletir em desenvolvimento sustentável, frente ao grande potencial existente, como destacaram Kerbauy (1988), afirmando que o Brasil é um dos maiores produtores de flores para corte e Silva (1986) quando salientou as facilidades do cultivo de orquídeas no país.

Métodos

Local e época do experimento

Esse experimento foi conduzido em um laboratório particular situado no município de Cariacica, ES, nos meses de julho a outubro de 2006.

Obtenção das sementes

As sementes utilizadas foram obtidas de frutos coletados em plantas nativas de uma propriedade particular que possui um fragmento remanescente de Mata Atlântica, situado no município de Venda Nova do Imigrante, ES. Os frutos foram retirados de dez indivíduos diferentes, após serem completados 75% do período de maturação que é de seis a oito meses para o gênero *Cattleya* (Rusch, 1986).

Condições de iluminação

Para a germinação das sementes foi preparada uma câmara de germinação subdividida em três compartimentos totalmente isolados da penetração de luz externa. Esses compartimentos foram devidamente numerados e classificados de acordo com o tipo de iluminação ou ausência de luz. A iluminação foi feita com duas lâmpadas fluorescentes do tipo "luz do dia" para os tratamentos com iluminação e no tratamento com escuro foi usada uma lâmpada fluorescente envolvida por papel celofane verde somente quando da contagem das sementes germinadas. Assim, as sementes foram submetidas à luz contínua (**Lc**), ausência de luz (**Es**) e fotoperíodo (**Fp**) de 16 horas. A temperatura foi a do ambiente que, nos meses de condução do experimento permaneceu em uma média de 26 ± 2°C.

Meio de cultura

Nos ensaios propostos para germinação foi utilizado o meio

de cultura "Orchid Maintenance Replate Médium" com adição de ágar-ágar e de GA₃ nas concentrações de 5, 10 e 20mg.l⁻¹ (tabelas 1 e 2). Todos os tratamentos foram realizados com quatro repetições.

Foi preparado um meio de cultura básico (**MB**) que continha 34,386g de "Orchid Maintenance Replate Médium", 4,2g de ágar-ágar e aproximadamente 540ml

Tabela 1 Composição do meio de cultura "Orchid maintenance replate médium" utilizado nos experimentos.

Ingredientes	Porcentagem
Nitrato de amônio	1.44 %
Nitrato de potássio	1.66 %
Sal de EDTA, Dissódico e dihidratado	0.065 %
Cloreto de cobalto hexahidratado	0.00002 %
Sulfato cúprico pentahidratado	0.00002 %
Molibdato de sódio (VI) dihidratado	0.0002 %
Sulfato de manganês nonohidratado	0.015 %
Iodeto de potássio	0.0007 %
Ácido bórico	0.005 %
Carvão ativado	3.49 %

Tabela 2 Concentrações de GA₃ nos diferentes tratamentos. MC = meio de cultura; Lc = luz contínua; Fp = fotoperíodo de 16 horas e Es = ausência de luz.

Tratamentos	Número de repetições
Lc x MC (controle)	4
Lc x MC + 5mg.l ⁻¹ de GA ₃	4
Lc x MC + 10 mg.l ⁻¹ de GA ₃	4
Lc x MC + 20 mg.l ⁻¹ de GA ₃	4
Fp x MC (controle)	4
Fp x MC + 5 mg.l ⁻¹ de GA ₃	4
Fp x MC + 10 mg.l ⁻¹ de GA ₃	4
Fp x MC + 20 mg.l ⁻¹ de GA ₃	4
Es x MC (controle)	4
Es x MC + 5 mg/l ⁻¹ de GA ₃	4
Es x MC + 10 mg.l ⁻¹ de GA ₃	4
Es x MC + 20 mg.l ⁻¹ de GA ₃	4

de água destilada para atingir o volume de 600ml. Para o controle foi utilizado o **(MB)** sem a adição de GA₃; para a concentração de 5mg.l⁻¹ foi utilizado o **(MB)** com a adição de 0,003g de GA₃; para a concentração de 10mg.l⁻¹ foi utilizado o **(MB)** com a adição de 0,006g de GA₃ e para a concentração de 20mg.l⁻¹ foi utilizado o **(MB)** com a adição de 0,012g de GA₃. Foram colocados 35ml de meio de cultura em frascos de vidro de 250ml sendo os mesmos lacrados com tampa plástica, envolvidos com filme de PVC e, finalmente, submetidos a autoclavagem por 20 minutos sob 1atm. Após o resfriamento o pH foi corrigido para 5,4 com a utilização de soluções tamponantes de amônia a 0,1% e ácido clorídrico a 0,01%.

Inoculação das sementes

As sementes que foram utilizadas nesse estudo encontravam-se encerradas dentro dos frutos imaturos fechados o que exigiu apenas a descontaminação superficial dos frutos. Após esse procedimento, foi retirada uma massa de sementes equivalente a 1,6974g de cada fruto, todas as sementes foram misturadas em um becker adicionando-se 100ml de água destilada esterilizada, para garantir a variabilidade genética. Com o auxílio de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas da solução de sementes por frasco o que equivaleu a, aproximadamente, 10.425 sementes, com uma massa de 0,0061g. Com o intuito de evitar qualquer posterior contaminação todo o processo de inoculação foi realizado dentro de uma capela de fluxo laminar classe I.

Cultivo assimbiótico

Após a inoculação das sementes os frascos foram transportados para a câmara de germinação e expostos aos diferentes regimes de luz: (Lc) = Luz contínua, (Fp) = Fotoperíodo de 16 horas e (Es) = ausência de luz.

A germinação foi monitorada a cada três dias e após 45 dias de inoculação as sementes foram retiradas dos frascos para a avaliação da porcentagem de germinação que foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópio.

Porcentagem de germinação (G)

As sementes foram consideradas germinadas com o desenvolvimento do embrião em uma estrutura denominada "protocormo" que se refere a uma massa arredondada e indiferenciada de células como descrita por Rasmussen *et al.* (1989).

A porcentagem de germinação foi determinada através da seguinte fórmula:

$$G = (N/A) \times 100$$

Sendo:

N = número de sementes germinadas;

A = número total de sementes

Ao final, os dados da porcentagem de germinação foram transformados em arco seno $\sqrt{\%}$ para estabilizar a variância e, conseqüentemente, favorecer a homogeneidade (Santana & Ranal, 2004).

Análise estatística

Inicialmente os dados referentes a todos os tratamentos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, através do *software* "SISVAR", desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras, para testar a normalidade e uma vez que as distribuições não foram consideradas normais, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para se verificar a influência dos tratamentos realizados sobre a germinabilidade.

Resultados e discussão

Primeiramente foi verificada a influência dos diferentes regimes de luz na germinabilidade de *Cattleya warneri* T. Moore, para tanto, foi realizada a comparação entre os regimes de luz utilizados considerando apenas a concentração do hormônio igual a zero. Para se efetuar a comparação foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando um nível de significância de 5%. O resultado do teste mostrou que só existe diferença significativa entre os regimes de luz para a germinabilidade, valor $-p < 0,05$, ou seja, existe influência dos diferentes regimes de luz na germinabilidade (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 Teste de Kruskal-Wallis para verificação da influência dos diferentes regimes de luz na germinabilidade de *C. warneri* na ausência do ácido giberélico.

Parâmetro avaliado	Estatística de teste	Valor-p
Germinabilidade	8,462	0,015

Tabela 4 Comparação entre os efeitos dos diferentes regimes de luz na ausência de ácido giberélico (concentração zero) sobre a germinabilidade de sementes de *C. warnerii*.

Regimes de luz	Germinabilidade (arc.sen ? %)
Claro	52,49
Fotoperíodo	36,94
Escuro	26,87

A luz é um dos fatores ambientais mais comuns como agente desencadeador da germinação (Bai & Romo, 1995). De acordo com o comportamento da semente em relação a

exposição à luz, as sementes podem ser classificadas como fotoblásticas positivas, as quais dependem da luminosidade para germinar; fotoblásticas negativas, quando só germinam na ausência de luminosidade ou ainda fotoblásticas neutras, que germinam tanto na presença, quanto na ausência de luminosidade (Vázquez-Yanes & Orozco-Segóvia, 1991).

A luz que pode influenciar a germinação de sementes é entendida como a quantidade de energia radiante nos comprimentos de onda de, aproximadamente, 660nm, denominada luz vermelha, sendo suficiente para tornar ativo o mecanismo do sistema de pigmentos denominado fitocromo (Kendrick, 1976). Esse pigmento ao absorver luz em determinados comprimentos de onda, muda sua estrutura bioquímica e permite, ou não a resposta morfo genética (Borges & Rena, 1993).

Desta forma, a germinação em diferentes condições de luz pode ser devida à quantidade de fitocromos na forma ativa existente nas sementes ser suficiente para induzir o processo germinativo, como salientaram Barros *et al.* (2005).

As sementes de *C. warnerii* germinaram em todos os regimes de luz utilizados, porém, a Luz contínua (Lc) foi a condição que proporcionou a maior germinabilidade.

Como foi verificado por Milaneze (1997), outras espécies da família Orchidaceae como *Miltonia flavescens*, *Oncidium pulvinatum* e *Rodriguezia venusta*, entre outras da subtribo Laelinae também germinaram em diferentes regimes de luz e resultados similares também foram encontrados por Velten & Garcia (2005) com sementes de *Eremanthus elaeagnus*.

São muitos os relatos de espécies de outras famílias que são igualmente indiferentes ao fator luminosidade. Sementes de *Enterolobium contortisiliquum* não reagiram às diferentes intensidades luminosas apresentando valores altos de germinabilidade tanto na presença como na ausência de luminosidade (Hebling, 1997), assim como a germinação de sementes de *Foeniculum vulgare* ocorreu tanto na presença quanto na ausência de luz (Stefanello *et al.*, 2006). Lopes *et al.* (2005) concluíram que sementes de Bertalha germinam tanto na presença como na ausência de luminosidade, comportando-se como fotoblásticas neutras e Menezes *et al.* (2004) observaram que as sementes de *Salvia splendens* também se comportam como indiferentes à luz. Diferenças significativas não foram observadas na germinabilidade das sementes de *Tabebuia aurea* submetidas a tratamentos fotoblásticos, sendo, portanto fotoblásticas neutras (Cabral *et al.*, 2003).

Ao contrário, para quatro espécies do gênero *Xyris* a presença de luz foi uma condição necessária para que as sementes iniciassem o processo germinativo, apresentando resposta nula quando mantidas no escuro, o que as classifica como fotoblásticas positivas (Abreu & Garcia, 2005).

Segundo Milaneze (1997) a influência da iluminação

foi um fator expressivo nas porcentagens de germinação obtidas para *Xilobium variegatum*. Sementes de *Guazuma unifolia* também foram influenciadas pela luz (Araújo Neto *et al.*, 2002) e resultados semelhantes foram encontrados por Silveira *et al.* (2004) na germinação de *Marcetia taxifolia*.

Sementes de *Acacia polyphylla* apresentaram um maior índice de germinabilidade quando expostas à luz e ao sombreamento se comparados à ausência de luminosidade (Araújo Neto *et al.*, 2005).

Espécies do gênero *Syngonanthus* apresentaram um maior número de sementes germinadas sob a luz em relação ao regime escuro (Oliveira & Garcia, 2005). Na presença de luz com fotoperíodo de 8h de luz e 16h de escuro, sementes de alface apresentaram germinabilidade elevada (Menezes *et al.*, 2000).

Enquanto as sementes de *Cattleya forbesii* e *Cattleya labiata* mostraram-se parcialmente inibidas a germinar na condição de escuro (Milanese, 1997), sementes de *Cecropia glaziovii* não germinaram na ausência de luz, indicando a dependência da mesma para germinação desta espécie (Godoi & Takaki, 2005). Em sementes de Canafístula o escuro retardou o início do processo germinativo em comparação ao regime de luz branca contínua (Perez *et al.*, 2001).

O fato das sementes de *C. warnerii* germinarem em todos os regimes de luz utilizados permite classificá-las como indiferentes à luz, segundo (Vázquez-Yanes & Orozco-Segóvia, 1991). Porém, entre os três regimes de luz utilizados, as sementes de *C. warnerii* apresentaram maiores valores de germinabilidade na condição de claro, seguida pelo regime de fotoperíodo e por último, na condição de escuro, o que sugere que as mesmas necessitam de luz para expressar sua máxima germinabilidade (Tabela 4). Além disso, um outro fator que deve ser levado em conta é o tamanho diminuto das sementes de orquídeas como descrito por Silva (1986) e Milanese (1997). Em sementes pequenas, a ocorrência de germinação na presença de luz pode ser considerada uma característica adaptativa (Hewitt, 1998), principalmente para os membros da família Orchidaceae cujos tamanhos das sementes podem variar entre 0,3 e 0,5 milímetros de comprimento, podendo ser ainda menores.

De acordo com Benzing *et al.* (1982) as orquídeas epífitas são notáveis em explorar ambientes fisicamente estressados, com falta de luminosidade, escassez de água e minerais. Talvez isso explique a emergência das sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore na ausência de luz.

Para verificar a influência das diferentes concentrações de GA₃ na germinabilidade de *C. warnerii*, também foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando um nível de significância de 5%. De acordo com o teste só existem diferenças significativas entre as concentrações para a germinabilidade, considerando o regime de luz “escuro” (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 Teste de Kruskal-Wallis para verificação do efeito da interação entre as concentrações de ácido giberélico e os diferentes regimes de luz sobre a germinabilidade de *Cattleya warnerii* T.Moore

Regimes de luz	Variável	Estatística do teste	Valor-p
Claro	Germinabilidade	1,430	0,698
Fotoperíodo	Germinabilidade	1,606	0,658
Escuro	Germinabilidade	8,301	0,040

Tabela 6 Efeito das diferentes concentrações de Ácido giberélico (GA₃) sobre a germinabilidade de *Cattleya warnerii* T.Moore, considerando somente o regime de escuro.

Concentrações de GA ₃ (mg.l ⁻¹)	Germinabilidade (arc.sen ? %)
0	26,87
5	32,65
10	46,43
20	47,17

A aplicação de reguladores de crescimento que propiciam a germinação de sementes de espécies vegetais nativas é de extrema importância, e o uso da giberelina tem sido fundamental, pois está relacionada com a síntese de enzimas hidrolíticas como α -amilase e proteases que degradam reservas como amido e proteínas, as quais são usadas no desenvolvimento do embrião e também no alongamento da radícula (Taiz & Zeiger, 1991; Ferreira et al., 2001).

Roberts & Smith (1977) relatam a atuação do ácido giberélico na síntese de RNA e proteínas específicas para a germinação. Metivier (1986) também ressalta o papel das giberelinas no processo germinativo.

A germinação das sementes de *C.warnerii* não foi homogênea, apresentando protocormos de tamanhos variados. Essa heterogeneidade provavelmente está relacionada à capacidade de germinação, que nos vegetais é distribuída no tempo de acordo com a intensidade de dormência de suas sementes. Dessa forma, numa mesma planta pode haver sementes prontas para germinar e outras que germinarão após meses ou anos (Carvalho & Nakagawa, 2000). De acordo com Taiz & Zeiger (1991) a variação do índice de germinabilidade e heterogeneidade das plântulas germinadas pode ser consequência do balanço entre promotores e inibidores de crescimento. Como exemplo, e segundo a teoria de Khan (1971), as citocinonas teriam um papel permissivo na regeneração da dormência aumentando

a sensibilidade das sementes à ação das giberelinas.

Existem vários tipos de giberelinas, dentre os quais o GA₃, disponível comercialmente, tem sido muito usado em sistemas biológicos (Arteca, 1996). No presente trabalho, as sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore germinaram em todas as concentrações de GA₃ e em todos os regimes de luz utilizados (Tabela 6). Sementes de lavanda tratadas com GA₃ apresentaram aumento significativo na percentagem de germinação (Aoyama et al., 1996). Em sementes de *Eugenia uvala* o tratamento com giberelina também estimulou o processo germinativo (Scalon et al., 2004). O mesmo não aconteceu com sementes de *Passiflora nitida* germinadas *in vitro* não havendo diferença significativa na germinação com a utilização de GA₃ (Passos et al., 2004).

Esses resultados demonstram que as respostas fisiológicas de cada espécie variam com seu conteúdo genotípico. O fato das sementes utilizadas no experimento germinarem em todas as concentrações do fitorregulador, pode estar relacionado com a presença de altas concentrações de GA₃ em sementes imaturas como relatado por (Arteca, 1996) que seriam suficientes para sustentar metabolicamente a germinação das sementes de *C.warnerii*. Em contraposição, concentrações supraótimas desse biorregulador podem ter um efeito deletério como foi verificado por Pinheiro et al. (2001) em sementes de *Hancornia speciosa* submetidas a concentrações de GA₃ iguais ou superiores a 0,3mg.l⁻¹ adicionadas ao meio de cultura, que provocaram uma diminuição na porcentagem de sementes germinadas. Sabá et al. (2002) também relatam o efeito nocivo de altas concentrações de GA₃ aplicadas em tratamentos germinativos. Outra hipótese é que esse biorregulador não participe efetivamente do processo germinativo da espécie, devido a germinação da maioria das orquídeas ocorrer de modo natural através da simbiose com fungos micorrízicos (Dressler, 1981).

Como foi dito anteriormente foi observada diferença significativa apenas entre as concentrações de GA₃ utilizadas no regime de escuro (Tabelas 5 e 6), demonstrando que houve um aumento na porcentagem de sementes germinadas de acordo com o aumento da concentração de GA₃, sendo que o maior valor encontrado foi na concentração de 20mg.l⁻¹ (Tabelas 5 e 6). Esse resultado demonstra que as giberelinas, através de seu mecanismo de ação, podem ter propiciado um aumento das enzimas que mobilizam, por hidrólise, os açúcares presentes no meio de cultura, alterando o parâmetro analisado apenas no regime escuro, considerando que as sementes de *C.warnerii* como a maioria das demais orquídeas epífitas não possui endosperma, camada onde se situa grande quantidade de reserva de nutrientes (Veyret, 1974; Fredrikson, 1990). A partir deste resultado pode-se supor que, em parte, o GA₃ sobreponha o efeito da luz na germinação das sementes de *C.warnerii* beneficiando a emergência das mesmas.

Resultado semelhante foi encontrado por Passos *et al.* (2004) para sementes de *Passiflora nitida* que germinaram mais no escuro com o uso do GA₃ no meio de cultura. Em sementes de *Passiflora alata*, de acordo com Zucarelli *et al.* (2003), fitorreguladores como o GA₃ não beneficiam o processo de germinação. Sementes de lavanda apresentaram a menor média de porcentagem de germinação no tratamento com escuro contínuo (Aoyama *et al.*, 1996). Scalon *et al.* (2006) concluíram que os tratamentos com giberelina não se mostraram eficientes em acelerar a germinação e o crescimento das plântulas de *Enterolobium contortisiliquum*.

Conclusão

Com relação à germinabilidade, as sementes de *C. warnerii* comportam-se como indiferentes à luz, embora germinem melhor em luz contínua.

As concentrações de 5, 10 e 20mg.l⁻¹ de GA₃ adicionadas ao meio de cultura não estimulam a germinação de sementes de *C. warnerii* na presença de luz e fotoperíodo de 16 horas, porém, favorecem a germinação das mesmas quando elas se encontram no escuro.

Referências

- Abreu MEP & Garcia QS (2004) Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae) ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**. 19 (1): 149-154.
- Araújo Neto JC, Aguiar IB, Ferreira VM & Rodrigues TJD (2002) Temperaturas cardeais e efeito da luz na germinação de sementes de Mutumba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 6: 460-465.
- Araújo Neto JC, Aguiar IB, Ferreira VM & Rodrigues TJD (2005) Armazenamento e requerimento fotoblástico de sementes de *Acacia polyphylla* DC. **Revista Brasileira de Sementes**. 27: 155-124.
- Arditti J (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review**. 33: 1-97.
- Arditti J (1979) Aspects of the physiology of orchids. **Advances in Botanical Research**. 7: 421-655.
- Arditti J, Clements G, Fast G, Hadley G, Nishimura G & Ernest R (1982) Orchid seed germination and seedling culture - a manual. In: Arditti J (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives II**. New York: Cornell University Press, pp 243-270.
- Arditti J, Ernst R, Yam TW & Glabe C (1990). The contributions of orchid mycorrhizae fungi to seed germination: a speculative review. **Lindleyana**. 5(4): 249-255.
- Aoyama EM, Ono EO & Furlam MR (1996) Estudo da germinação de sementes de lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller). **Scientia Agrícola**. 53: 267-272.
- Arteca RD (1996) **Plant growth substances: principles and applications**. New York: Chapman & Hall, p. 332.
- Atwood JT (1986) The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. **Selbyana**. 9: 171-186.
- Bai Y & Romo JT (1995) Seedling emergence of *Artemisia frigida* in relation to hydration-dehydration cycles and seedbed characteristics. **Journal of Arid Environments**. 30: 57-65.
- Barros F (1990) Diversidade taxonômica e distribuição das Orchidaceae brasileiras. **Acta Botanica Brasileira**. 4: 177- 187.
- Barros SSU, Silva A & Aguiar IB (2005) Germinação de sementes de *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms (pau-d'álho) sob diferentes condições de temperatura, luz e umidade do substrato. **Revista Brasileira de Botânica**. 28: 727-733.
- Benzing DH, Ott DW & Friedman WE (1982) Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. **American Journal of Botany**. 69:608-614.
- Borges EEL & Rena AB (1993) Germinação de sementes. In: Aguiar IB, Pinã-Rodrigues FCM & Figliolia MB (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: Abrantes, pp 83-135.
- Cabral EL, Barbosa DCA & Simabukuro EA (2003) Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. F.E.S. Moore. **Acta Botanica Brasileira**. 17(4): 609-617.
- Carvalho NM & Nakagawa J (2000) **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, p 588.
- Davies PJ (1994) **Plant hormones: their role in plant growth and development**. New York: Nijhoff Publishers.
- Dressler RL (1981) **The orchids and classification**. Harvard: Harvard University Press, p. 332.
- Ferreira G, Seidel GO & Verona MM (2001) Efeito de fitorreguladores na germinação de sementes de *Atemóia* (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.). In: **Anais do VIII Congresso Nacional de Fisiologia Vegetal**, Ilhéus, BA.
- Fredrikson M (1990) Embriological study of *Herminium monorchis* (Orchidaceae) using confocal scanning laser microscopy. **American Journal Of Botany**. 7:123-127.
- Godoi S & Takaki M (2005) Efeitos da temperatura e a participação do fitocromo no controle da germinação de sementes de Embaúba. **Revista Brasileira de Sementes**. 27: 87-90.
- Hebling SA (1997) **Aspectos ecofisiológicos da germinação de sementes de Enterolobium contortisiliquum (Vellozo) Morong**. Tese de Doutorado em Ciências. Curso de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, SP.
- Hew CS & Clifford PE (1993) Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. **Plant Growth Regulation**. 13:231-239.
- Hewitt N (1998) Seed size and shade-tolerance: a comparative analysis of North American temperate trees. **Oecologia**. 114: 432-440.
- Hooley R (1994) Gibberellins: perception, transduction and responses. **Plant Molecular Biology**. 26: 1529-1555.
- Kendrick RE (1976) Photocontrol of seed germination. **Science Progress**. 63: 347-367.
- Kerbauy GB (1988) **Estudo da formação in vitro de estruturas semelhantes a protocormos a partir de células meristemáticas de raízes de Oncidium varicosum Lindl.** Tese

- (Livre-Docência, Área de Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.
- Khan AA (1971) Cytokinins: Permissive role in seed germination. **Science**. 171: 853-859.
- Lopes JC, Capucho MT, Martins Filho S & Repposi PA (2005) Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de Bertalha. **Revista Brasileira de Sementes**. 27: 18-24.
- Menezes NL, Franzini SM, Roversi T & Nunes EP (2004) Germinação de sementes de *Salvia splendens* Sellow em diferentes temperaturas e qualidade de luz. **Revista Brasileira de Sementes**. 26: 32-37.
- Menezes NL, Santos OS, Nunes EP & Schmidt D (2000) Qualidade fisiológica de sementes se alface submetidas a diferentes temperaturas na presença e ausência de luz. **Ciência Rural**. 30: 941-945.
- Metivier JR (1986) Citocininas e giberelinas. In: Ferri MG **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EDUSP, pp 93-162.
- Milaneze MA (1997) **Estudos em orquídeas nativas do Brasil: Morfologia de sementes e cultivo assimbiótico**. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.
- Oliveira PG & Garcia QS (2005) Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, *S. elegans* (Bong.) Ruhland e *S. venustus* Silveira (Eriocaulaceae). **Acta Botanica Brasílica**. 19(3): 639-645.
- Pabst GFJ & Dungs F (1975) **Orchidaceae Brasiliensis vol. I**. Hildesheim: Brücke-Verlag.
- Passos IRS, Matos GVC, Meletti LMM, Scott MDS, Bernacci LC & Vieira MAR (2004) Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 26: 380-381.
- Perez SCJGA, Fanti SC & Casali CA (2001) Influência da luz na germinação de sementes de *Canafístula* submetidas ao estresse hídrico. **Bragantia**. 60(3): 155-166.
- Pinheiro CSR, Medeiros DN, Macedo CEC & Alloufa MAI (2001) Germinação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gómez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 23: 413-416.
- Rasmussen H, Johansen B, Andersen TF (1989) Density-dependent interaction between seedling of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) in symbiotic *in vitro* culture. **Physiologia Plantarum**. v. 77, p. 473-8.
- Richards DE et al. (2001) How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic of gibberellin signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 52: 67-88.
- Roberts EM & Smith RD (1977) Dormancy and the pentose pathway. In: A.A. KHAN, (Eds.) **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. Amsterdam: Elsevier, pp 385-441.
- Ruschi A (1986) **Orquídeas do Estado do Espírito Santo**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura.
- Sabá RT, Lameira OA, Luz JMQ, Gomes APR & Innecco R (2002) Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**. 20: 106-109.
- Santana DG & Ranal MA (2004) **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora UNB, p 247.
- Scalon SPQ, Mussury RM, Gomes AA, Silva KA, Wathier F & Scalon Filho H (2006) Germinação e crescimento inicial da muda de Orelha-de-macaco (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong): efeito de tratamentos químicos e luminosidade. **Revista Árvore**. 30: 529-536.
- Scalon SPQ, Scalon Filho H & Rigoni MR (2004) Armazenamento e germinação de sementes de Uvaia (*Eugenia uvalha* Cambess). **Ciência e Agrotecnologia**. 28: 1228-1234.
- Silva W (1986) **Cultivo de orquídeas no Brasil**. São Paulo: Nobel.
- Silveira FAO, Negreiros D & Fernandes W (2004) Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Marcetia taxifolia* (A.St.-Hil.) DC. (Melastomataceae). **Acta Botanica Brasílica**. 18(4): 847-851.
- Stefanello R, Garcia DC, Menezes NL, Muniz MFB & Wrasse CF (2006) Efeito de luz, temperatura e estresse hídrico no potencial fisiológico de sementes de Funcho. **Revista Brasileira de Sementes**. 28: 135-141.
- Taiz L & Zeiger E (1991) **Plant Physiology**. Califórnia: The Benjamin Cummings, pp 559-565.
- Vázquez-Yanes C & Orozco-Segovia A (1991) Seed viability, longevity and dormancy in a tropical rain forest. In: Figliolia MB (Coord.) **Anais do II Simpósio Brasileiro sobre Tecnologia de Sementes Florestais**. São Paulo.
- Velten SB & Garcia QS (2005) Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasílica** 19(4): 753-761.
- Veyret I (1974) Development of the embryo and the young seedling stages of orchids. In: WITHNER, C. L. (Ed.). **The orchids: a scientific studies**. New York: Wiley-Interscience, pp 224-265.
- Wachowicz CM & Carvalho RIN (2002) **Fisiologia vegetal. Produção e pós colheita**. Curitiba: Champagnat, p 423.
- Yamaguchi S & Kamiya Y (2002) Gibberellins and light-stimulated seed germination. **Journal of Plant Growth Regulation**. New York, pp 369-376.
- Zucarelli C, Castro MM, Oliveira HR, Brancalhão SR, Rodrigues JD, Ono EO & Boaro CSF (2003) Fitorreguladores e germinação de sementes de maracujá doce em condições de laboratório. **Scientia Agrária**. 4: 9-14.