

Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*

Culture media and sucrose on initial *in vitro* growth of *Miltonia flavescens*

Camila Soares Rosa Lemes^{1*} José Carlos Sorgato¹ Jackeline Schultz Soares¹¹
Yara Brito Chaim Jardim Rosa¹

RESUMO

O cultivo *in vitro* tem sido utilizado para propagação de plantas ornamentais. A escolha do meio de cultivo e a concentração ideal de produtos orgânicos utilizados no enriquecimento dos meios, como a sacarose, são decisivos na elaboração de protocolos. Dessa forma, objetivou-se avaliar o crescimento inicial de *Miltonia flavescens*, cultivada por 90 e 180 dias, em quatro meios de cultivo com diferentes concentrações de sacarose. Plantas com 12 meses e germinadas *in vitro* foram cultivadas nos meios MS, MS ½, K e VW, cada um deles suplementado com 1,5g L⁻¹ de carvão ativado, 6,5g L⁻¹ de ágar bacteriológico e com 25, 30, 35, 40 e 45g L⁻¹ de sacarose. Aos 90 e 180 dias, foram avaliadas quanto à massa fresca, número de raízes, de folhas e de brotos e quanto ao comprimento da parte aérea e da maior raiz. As maiores médias para número de raízes, comprimento da parte aérea e massa fresca total foram obtidas nas plantas cultivadas por 180 dias em meio MS ½, suplementado com 25g L⁻¹ de sacarose. O maior comprimento de raiz foi verificado nas plantas cultivadas por 180 dias em meio MS suplementado com 45g L⁻¹ de sacarose. Já o número de brotos e de folhas não foram influenciados pelas concentrações de sacarose. *M. flavescens* apresentou maior crescimento da parte aérea e raiz, quando cultivada por 180 dias em meio MS ½, suplementado com 25g L⁻¹ de sacarose.

Palavras-chave: *Orchidaceae*, carboidrato, micropropagação.

ABSTRACT

The *in vitro* culture has been widely used for the ornamental plants propagation. The choice of the best medium and organic products concentration, such as sucrose, are decisive in the protocols. Thus, the aim of this study was to evaluate the initial growth of *Miltonia flavescens*, grown for 90 and 180 days, in four culture media supplemented with different concentrations of sucrose. Plants aged 12 months were

germinated *in vitro* and cultured on MS, MS ½ K and VW media each one supplemented with 1.5g L⁻¹ of activated charcoal, 6.5g L⁻¹ bacteriological agar and 25, 30 35, 40 and 45g L⁻¹ sucrose. After 90 and 180 days, fresh mass, number of roots, leaves and shoots, length shoot and the largest root were evaluated. The highest average for number of roots, shoot, length and total fresh weight were obtained in plants grown for 180 days on MS ½ medium supplemented with 25g L⁻¹ sucrose. The greater length of roots was observed in plants grown for 180 days on MS medium supplemented with 45g L⁻¹ sucrose. *M. flavescens* showed higher growth of shoots and roots when cultivated for 180 days on MS ½ medium supplemented with 25g L⁻¹ sucrose.

Key words: *Orchidaceae*, carbohydrate, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A técnica do cultivo *in vitro* de plantas ornamentais é reconhecida por ser útil para a produção em larga escala de indivíduos com elevada qualidade e uniformidade. A elaboração de protocolos de propagação possibilita o cultivo de espécies vulneráveis para comercialização ou para repovoamento (AMO et al., 2009).

A escolha do meio adequado ao cultivo de determinada espécie é importante, pois, através dele, tecidos e órgãos são supridos com macronutrientes, micronutrientes e outros produtos orgânicos (KNUDSON, 1946; VACIN WENT, 1949; MURASHIGE & SKOOG, 1962; CAMPOS, 2002) necessários à germinação e ao desenvolvimento *in vitro*.

¹Faculdade de Ciência Agrárias (FCA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-970, Dourados, MS, Brasil. E-mail: camisrosa@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

¹¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados, MS, Brasil.

Dentre os produtos orgânicos utilizados para o enriquecimento dos meios nutritivos, salienta-se a necessidade de suplementação exógena de carboidratos, uma vez que, em cultivos *in vitro*, a radiação fotossintética inadequada ou insuficiente e a baixa concentração de CO₂ dificultam a fotossíntese das plantas e acarretam na necessidade de açúcares, que forneçam energia e carbonos precursores para a biossíntese de componentes estruturais e funcionais, como oligossacarídeos, aminoácidos, e outras moléculas fundamentais para o crescimento de espécies submetidas a esse tipo de cultivo (PASQUAL, 2001).

Embora a maioria dos meios de cultivo utilizados para *Orchidaceae* sejam suplementados com carboidratos, a sua concentração ainda é fonte de estudo. Relatos científicos relacionam o conteúdo de sacarose presente nos meios de cultivo com a formação de raízes (THORPE et al., 2008; BESSON et al., 2010; GALDIANO JÚNIOR et al., 2013b). Entretanto, algumas concentrações do açúcar prejudicam não apenas a emissão e o crescimento radicular, mas também o crescimento da parte aérea (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013a).

Miltonia flavescens é uma espécie epífita, nativa da região sul do Brasil e Paraguai (IMES, 1997), com alto valor florístico e rusticidade. Em sua revisão, MULLER et al. (2007) salientam que a espécie sofre uma grande pressão, devido ao desmatamento, estando ameaçada de extinção, havendo necessidade de estudos que possibilitem a produção de mudas de boa qualidade, que viabilizem sua comercialização e sua utilização em programas de repovoamento.

Em vista do exposto, objetivou-se, com este trabalho, avaliar o crescimento inicial de *Miltonia flavescens*, cultivada por 90 e 180 dias, em quatro meios de cultivo suplementados com diferentes concentrações de sacarose.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de *Miltonia flavescens* Lindl., provenientes do Laboratório de Cultivo *in vitro* da FCA/UFMG, com aproximadamente seis folhas, 1,5cm de comprimento de parte aérea, desprovidas de sistema radicular, germinadas e cultivadas *in vitro*, por 12 meses, sendo subcultivadas por uma vez, em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) na metade da concentração de seus componentes (MS ½). O material foi geleificado com 6,5g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e suplementado

com 30g L⁻¹ de sacarose (C₆H₁₂O₆) (Dinâmica®, Brasil), sendo isento de reguladores de crescimento.

Para o estudo dos diferentes meios de cultivo no crescimento das plantas, foram utilizados os meios MS, MS ½ (na metade de seus macros e micros nutrientes), K (KNUDSON, 1946), VW (VACIN WENT, 1949), acrescidos de 1,5g L⁻¹ de carvão ativado, 6,5g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia), enriquecidos com 25, 30, 35, 40 e 45g L⁻¹ de sacarose (C₆H₁₂O₆) (Dinâmica®, Brasil) e isentos de reguladores de crescimento. Em seguida à etapa de preparo, o pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8, utilizando KOH (0,1M). Frascos plásticos transparentes providos de tampa rosqueável e capacidade para 100 mL receberam 20mL de meio de cultivo e foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1atm de pressão, por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios, em ambiente asséptico, três plantas de *M. flavescens* foram transferidas para cada frasco, os quais foram tampados e acondicionados em sala de crescimento com temperatura média de 25±2°C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética de 20,0μmol m⁻² s⁻¹, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40W cada. As culturas permaneceram nessas condições por 90 ou 180 dias.

Ao término de cada período de cultivo, as plantas foram removidas dos frascos e lavadas em água corrente até total remoção do meio de cultura. Após esse procedimento, as plantas foram avaliadas quanto à massa fresca total (g), ao número de raízes, de folhas e brotos e quanto ao comprimento da parte aérea (cm) e da maior raiz (cm). Para avaliação da massa fresca, foi utilizada uma balança digital e o comprimento da parte aérea e da maior raiz foi obtido por meio de um paquímetro digital.

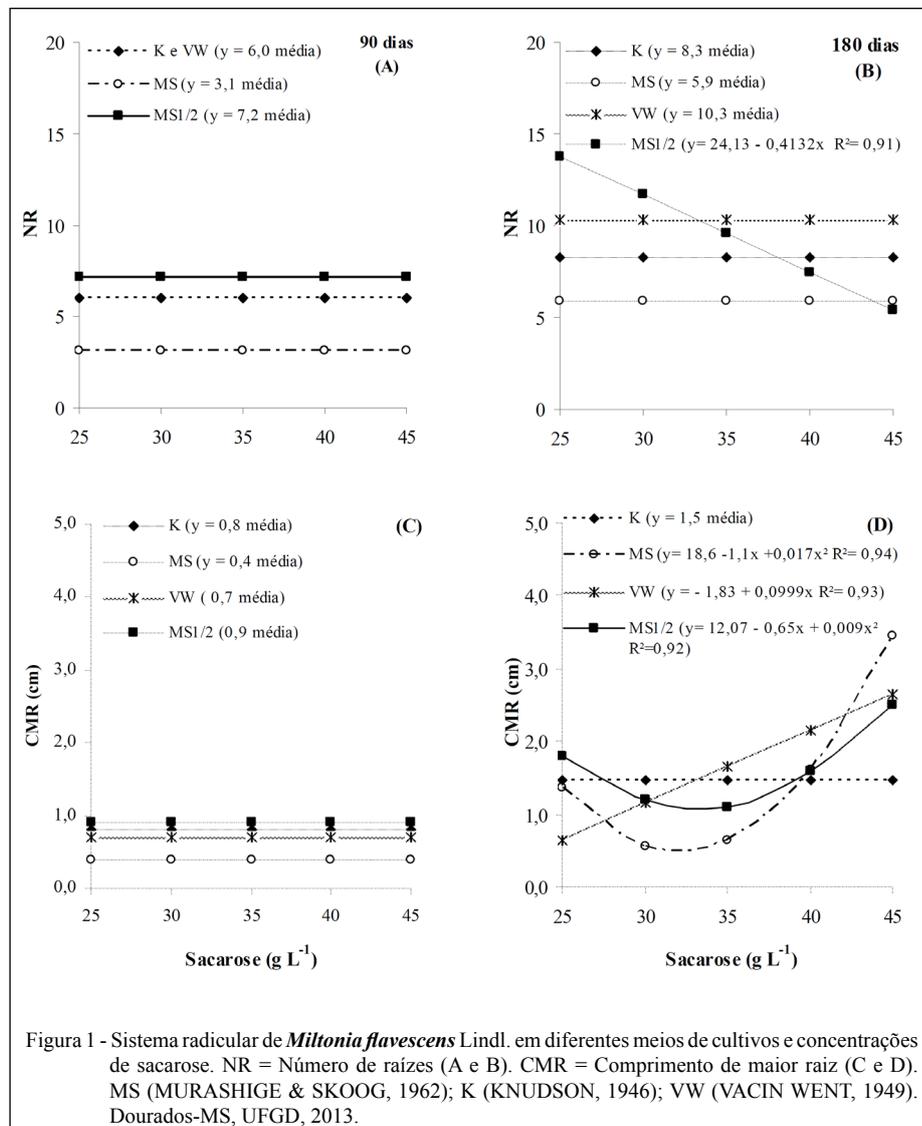
O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjados em esquema de parcela sub-subdividida, sendo alocados na parcela os quatro meios de cultivo, na subparcela as cinco concentrações de sacarose e na sub-subparcela os dois tempos de cultivo, com oito repetições de um frasco cada. As características vegetais foram submetidas à análise de variância com o auxílio do programa SISVAR (Statistical Analysis Software v.5.3. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG). Os fatores quantitativos foram comparados por análise de regressão e os qualitativos por teste de médias até 5% de probabilidade, sendo utilizado o teste de *Tukey* para comparar os meios e o teste t de *Student* para comparar os tempos de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos três fatores avaliados, o meio de cultura foi o que mais influenciou isoladamente as variáveis estudadas ($P < 0,05$). Efeito conjunto dos três fatores foi observado sobre o número de raízes ($P < 0,05$), comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea e massa fresca total. O número de brotos foi influenciado pela interação entre o meio de cultura e as concentrações de sacarose e entre os meios de cultura e o tempo de cultivo ($P < 0,01$), enquanto que o número de folhas só foi sensível ao efeito isolado dos meios de cultura ($P < 0,05$).

A figura 1 representa o desenvolvimento do sistema radicular de *M. flavescens* aos 90 e 180 dias, em função do meio de cultivo e concentrações

de sacarose. Independente do meio de cultivo, o número de raízes de *M. flavescens*, quando cultivada por 90 dias, não foi influenciado pelas concentrações de sacarose e apresentou os valores médios descritos na figura 1A. A maior média calculada para o número de raízes foi obtida em meio MS ½ (7,2) e a menor no meio MS (3,1). Aos 180 dias, o maior número de raízes ocorreu no meio MS ½ suplementado com 25g L⁻¹ de sacarose, resultando em aproximadamente 14 raízes/planta, praticamente o dobro da média obtida aos 90 dias. No meio de cultivo MS ½, à medida que a concentração de sacarose aumentou, o número de raízes reduziu. Nos demais meios testados, essa variável não foi influenciada pelo aumento das concentrações de sacarose, e o meio MS foi o que possibilitou a menor média de raízes/planta (5,9) (Figura 1B).



Segundo THORPE et al. (2008), meios que contêm altos níveis de sais, como, por exemplo, o MS, frequentemente inibem a iniciação de raízes e devem ser substituídos por meios que contêm baixos níveis, como o MS $\frac{1}{2}$, quando o objetivo for o enraizamento. Os autores sugerem ainda que o benefício dos baixos níveis de sais no meio se deve à necessidade de baixas concentrações de nitrogênio na formação de raízes.

BESSON et al. (2010) afirmam que a concentração de sacarose também pode interferir na formação das raízes, uma vez que o aumento da concentração de açúcares no meio de cultivo ocasiona a diminuição da absorção de sais e água, e isso pode interferir no crescimento da planta. THORPE et al. (2008) relatam que o açúcar produzido pela planta durante a fotossíntese somado à sacarose contida no meio de cultivo propiciam alta absorção de açúcar pelas plantas, elevando sua concentração de açúcar total e prejudicando o enraizamento. GALDIANO JUNIOR et al. (2013a) verificaram que o número de raízes em *Cattleya loddigesii* Lindley, cultivada em meio MS $\frac{1}{2}$ por 90 dias, foi reduzido em concentrações de 30 e 40g L⁻¹ de sacarose.

O comprimento da maior raiz de *M. flavescens*, quando cultivada por 90 dias, não foi influenciado pelas concentrações de sacarose, independentemente do meio de cultivo utilizado, e apresentou os valores médios descritos na figura 1C. A maior média calculada foi obtida em meio MS $\frac{1}{2}$ (0,9cm) e a menor no meio MS (0,4cm). Aos 180 dias, de maneira geral, as altas concentrações de sacarose nos meios MS, MS $\frac{1}{2}$ e VW favoreceram o crescimento radicular, enquanto que as plantas cultivadas em meio K não foram influenciadas pelo aumento das concentrações do açúcar. O maior comprimento da raiz calculado (3,4cm) foi obtido nas plantas cultivadas em meio MS suplementado com 45g L⁻¹ de sacarose (Figura 1D).

Diferentes concentrações de sacarose induzem diferentes respostas do sistema radicular de *M. flavescens*. Em relação ao número de raízes, a concentração de sacarose pouco influenciou essa variável, que está mais relacionada ao tempo de cultivo e aos meios de cultura utilizados (Figura 1A e 1B). Entretanto, quanto ao comprimento de raízes de *M. flavescens*, pode-se afirmar que maiores concentrações de sacarose promovem comprimentos radiculares maiores em plantas cultivadas por 180 dias (Figura 1D).

A figura 2 ilustra o comprimento da parte aérea e a massa fresca total de *M. flavescens*, aos 90 e 180 dias, em função do meio de cultivo e concentrações de sacarose.

Aos 90 dias, independente do meio de cultivo, o comprimento da parte aérea não foi influenciado pelas concentrações de sacarose, sendo a maior média calculada igual a 1,5cm, obtida em meio K (Figura 2A). Aos 180 dias, observou-se que o maior comprimento da parte aérea calculada (3,8cm) foi obtida quando as plantas foram cultivadas em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 25g L⁻¹ de sacarose e, à medida que a concentração do açúcar se elevou nesse meio de cultivo, a altura das plantas foi reduzida. Nos demais meios de cultivo, as diferentes concentrações de sacarose não influenciaram esta variável, entretanto os maiores valores foram observados no meio VW, seguido do K e do MS (Figura 2B).

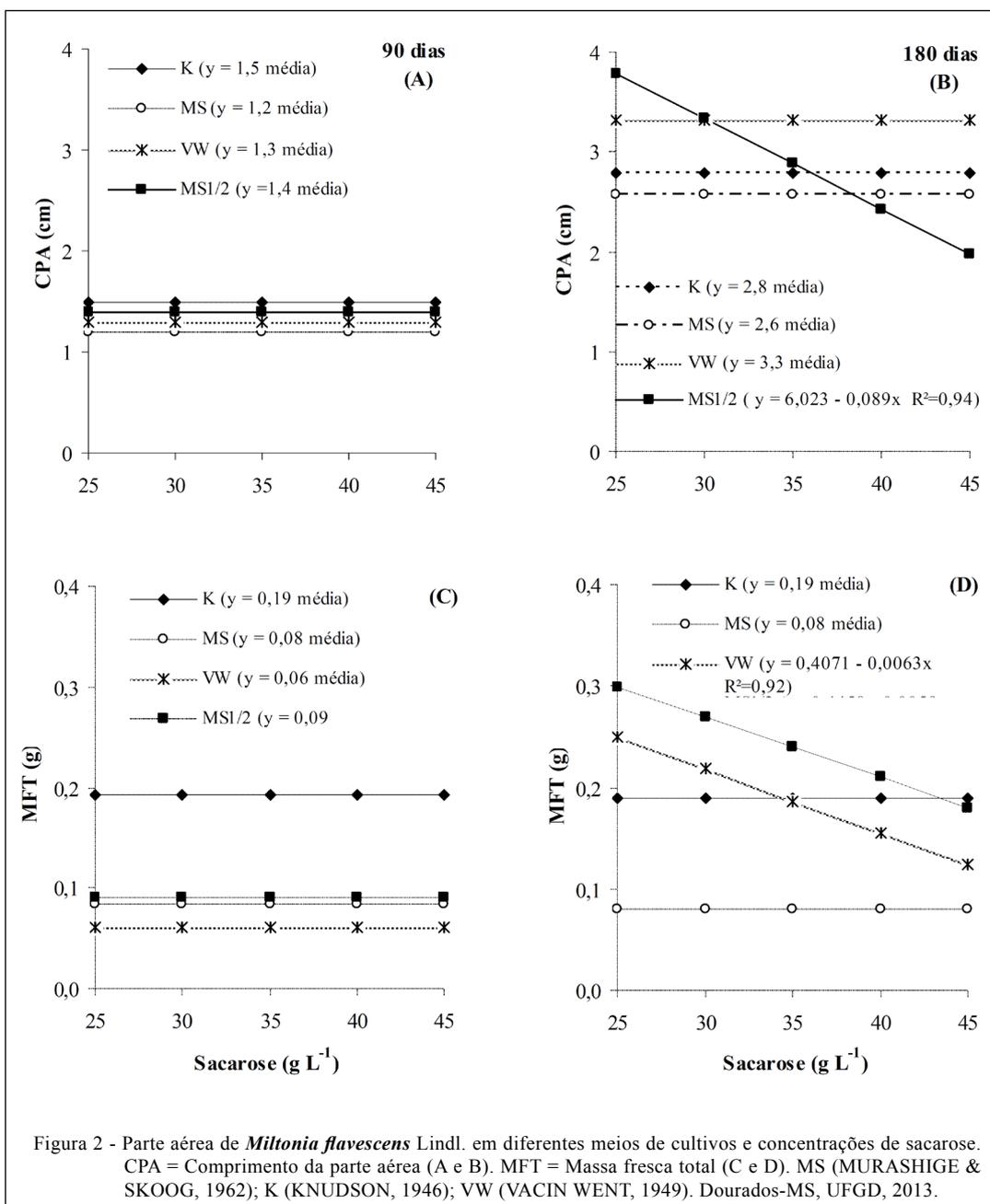
Segundo BESSON et al. (2010), o aumento da concentração de sacarose induz a diminuição da absorção de sais minerais e água, o que permite inferir que, para meios com menores níveis de sais, como o VW, a concentração de sacarose não interfere no CPA, enquanto que, para o MS $\frac{1}{2}$, concentrações de sacarose superiores a 30g L⁻¹ propicia o aumento do potencial osmótico do meio de cultura, interferindo no crescimento das plantas (BANDINELLI et al., 2013).

Independente do meio de cultivo, aos 90 dias, as diferentes concentrações de sacarose não influenciaram os valores de massa fresca total das plantas (Figura 2C). Entretanto, aos 180 dias, a maior massa fresca total calculada (0,30g) foi obtida em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 25g L⁻¹ de sacarose, sendo que concentrações do açúcar superiores a esta reduziram os valores da variável. A menor massa fresca total calculada, aos 180 dias, foi igual a 0,08g, obtida nas plantas cultivadas em meio MS, independente da concentração de sacarose utilizada.

Em relação ao número de brotos produzidos, houve efeito significativo (P<0,05) da interação entre tempo e meio de cultivo, com destaque para as plantas cultivadas em meio MS, as quais apresentaram a brotação reduzida com o aumento do tempo de cultivo (Tabela 1).

Aos 90 dias, independentemente da concentração de sacarose utilizada, não houve diferença no número de brotos das plantas cultivadas nos diferentes meios de cultivo. Entretanto, aos 180 dias, as plantas cultivadas em meio MS $\frac{1}{2}$ apresentaram maior brotação e foram estatisticamente semelhantes às plantas cultivadas em meio K. A menor média de brotos foi observada nas plantas cultivadas em meio MS, que foi estatisticamente semelhante à média observada no meio VW (Tabela 1).

A tabela 2 apresenta o comportamento, o número de folhas de *M. flavescens* nos diferentes meios estudados, independente da concentração de



sacarose e o tempo de cultivo. A maior média de número de folhas ocorreu no meio MS^{1/2} (15,9), que foi estatisticamente semelhante aos meios VW e K. O meio MS diferiu do meio MS^{1/2}, apresentando o menor valor médio da variável (12,7).

Sabe-se que a água se movimenta no interior das células, obedecendo à diferença de potencial osmótico exercida nas paredes celulares. A água sai de uma condição de alto potencial (numericamente

menos negativo) e caminha em direção a uma condição de baixo potencial (numericamente mais negativa). Baseado nisso, plantas cultivadas em ambientes com baixo potencial osmótico (causado pelo aumento de sais e/ou açúcares no meio) perdem água para o meio de cultivo e, conseqüentemente, o potencial hídrico de suas células diminui, acarretando em alterações de metabolismo e fazendo com que acumulem altos níveis do aminoácido prolina, em resposta à carência

Tabela 1 - Número de brotos de *Miltonia flavescens* Lindl. observado em função da interação entre tempo e meios de cultivo. Dourados-MS, UFGD, 2013.

Dias	Meios de cultivo			
	K	MS	MS ½	VW
90	0,73 aA	0,80 aA	0,33 bA	0,20 aA
180	0,87 aAB	0,13 bB	1,73 aA	0,73 aB

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si (t de Student, 5% de probabilidade); médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si (Tukey, 5% de probabilidade); MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962); K (KNUDSON, 1946); VW (VACIN WENT, 1949).

de água e ao estresse salino. Além disso, a atividade da principal via respiratória das células é reduzida, favorecendo a oxidase, acarretando em aumento da concentração de osmólitos e, conseqüentemente, elevados níveis de ácido abscísico (THORPE et al., 2008). Tais fenômenos justificam, portanto, a redução no NR, CMR, CPA, NB, NF e MFT apresentados por *M. flavescens* em meios com altas concentrações de sais, como o MS e/ou altas concentrações de sacarose.

Ainda sobre o aspecto negativo de altas concentrações de açúcar sobre o crescimento de algumas espécies de orquídeas, os resultados apresentados neste trabalho concordam com os obtidos por GALDIANO JUNIOR et al. (2013a) em plantas de *Cattleya loddigesii*, cultivadas por 90 dias em meio MS, suplementado com concentrações de sacarose. Os autores observaram que concentrações entre 20 e 22g L⁻¹ favoreceram o número de raízes e o crescimento da parte aérea, e que concentrações superiores a estas prejudicaram o crescimento. Em plantas de *Cattleya violaceae*, cultivadas por 150 dias em meio MS ½ suplementado com concentrações crescentes de sacarose, verificou-se que o número de raízes, comprimento da maior raiz e o comprimento da

parte aérea apresentaram maiores valores quando as plantas foram cultivadas em concentrações variando de 26 a 31g L⁻¹ de sacarose e que concentrações superiores propiciaram redução no crescimento (GALDIANO JUNIOR et al., 2013b).

CONCLUSÃO

Em vista dos resultados observados, conclui-se que *M. flavescens* apresentou maior crescimento quando cultivada por 180 dias em meio MS ½, suplementado com 25g L⁻¹ de sacarose.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pela bolsa de estudos concedida e assistência.

REFERÊNCIAS

AMO, S.O. et al. *In vitro* propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.96, p.273-278, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9484-8>>. Acesso em: 20 set. 2014. doi: 10.1007/s11240-008-9484-8.

BANDINELLI, M.G. et al. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, v.31, p.242-247, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v31n2/11.pdf>>. Acesso em 20 jun. 2015. doi: 10.1590/S0102-05362013000200011.

BESSON, J.C.F. et al. 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. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1237/904>>. Acesso em: 22 set. 2014.

CAMPOS, D.M. **Orquídea**: manual prático de reprodução. 3.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.

GALDIANO JUNIOR, R.F. et al. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.583-

Tabela 2 - Número de folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. observado em função dos diferentes meios de cultivo. Dourados/MS, UFGD, 2013.

Tratamentos	NF
MS	12,7 b
K	14,6 ab
VW	15,1 ab
MS ½	15,9 a
CV (%)	20,07
Média Geral	14,57

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Tukey 5% de probabilidade).

- 592, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p583>>. Acesso em: 22 set. 2014. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n2p583.
- GALDIANO JÚNIOR, R.F. et al. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violaceae* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. *Acta Amazonica*, v.43, n.2, p.127-134, 2013b. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v43n2/v43n2a01.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2014.
- IMES, R. **Orchids**: the illustrated identifier to over 100 cultivated varieties. London: Apple, 1997. 80p.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin*, v.15, p.214-217, 1946.
- MULLER, T.S. et al. Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens*. *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, p.252-254, 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/545>>. Acesso em: 29 set. 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 2001. V.1, 74p.
- THORPE, T. et al. 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. V.1, 501p.
- VACIN, E.F.; WENT, F. Some pH in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, v.110, p.605-617, 1949.