



ARTIGO

## Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl.

Jean Carlos Fernando Besson<sup>1</sup>, Lana Karina Oliveira<sup>1</sup>,  
Lucimar Pereira Bonett<sup>2</sup> e Suzana Stefanello<sup>3\*</sup>

Submetido em: 13 de agosto de 2009 Recebido após revisão em: 05 de janeiro de 2010 Aceito em: 05 de janeiro de 2010

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1237>

**RESUMO:** (Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl.). *Miltonia flavescens* é uma orquídea epífita nativa da região sul do Brasil, ameaçada de extinção pelo extrativismo e a destruição dos seus habitats. O tipo e a concentração dos carboidratos são importantes para promover o crescimento e o desenvolvimento das plantas *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de carboidratos no crescimento e enraizamento *in vitro* de *M. flavescens*. Foi utilizado o meio de cultura MS, modificado pela redução à metade da concentração de sais. Plantas provenientes de sementes estabelecidas *in vitro* foram utilizadas como explantes, os quais foram inoculados nos meios de cultura contendo os carboidratos sacarose, maltose ou glicose, nas concentrações de 0, 15, 30, 45 e 60 g.L<sup>-1</sup>. Após seis meses de cultivo, as plantas foram avaliadas quanto às características de comprimento da parte aérea, número de raízes, número de folhas, número de brotos e massa fresca. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo a unidade experimental constituída de um frasco com dez plantas. Apenas o número de folhas não foi significativamente afetado pela fonte e concentração de carboidratos. Quando o meio de cultura foi suplementado com 15 e 60 g.L<sup>-1</sup> de carboidrato, não foi verificada diferença entre suplementação de sacarose, glicose e maltose para as variáveis analisadas, enquanto que a sacarose, nas concentrações 30 e 45 g.L<sup>-1</sup>, promoveu o crescimento *in vitro* de *M. flavescens*.

**Palavras-chave:** Orchidaceae, cultivo *in vitro*, açúcares, planta ornamental, *Miltonia flavescens*.

**ABSTRACT:** (Source and concentration of carbohydrates on shoot growth and rooting of *Miltonia flavescens* Lindl.). *Miltonia flavescens* is an epiphytic orchid native to southern Brazil threatened with extinction by extraction and destruction of their habitats. Type and concentration of carbohydrates are important for promoting growth and development of *in vitro* cultured orchids. This study aimed to evaluate the effect of different carbohydrate sources and concentrations on *in vitro* growth and rooting of *M. flavescens*. *In vitro* seed-derived plants used as explants were cultured in half-strength MS media containing sucrose, maltose and glucose as carbohydrate sources, at concentrations of 0, 15, 30, 45 and 60 g.L<sup>-1</sup>. After six months in culture, plants were evaluated for aerial part height, root number, leaf number, shoot number and fresh weight. The experiment was arranged in a complete randomized design, with five replications per treatment and experimental unit consisting of ten plants per flask. Leaf number was the only variable that was not significantly affected by the source and concentration of carbohydrates. At the concentrations of 15 and 60 g.L<sup>-1</sup> of carbohydrate, no difference was found among sucrose, glucose and maltose for any variable tested. On the other hand, sucrose at concentrations of 30 and 45 g.L<sup>-1</sup> promoted *in vitro* growth of *M. flavescens*.

**Key words:** Orchidaceae, *in vitro* culture, carbohydrates, ornamental plant, *Miltonia flavescens*.

### INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é considerada a maior e mais diversificada família entre as plantas fanerógamas (Yew & Hew 2000), com mais de 800 gêneros, 35.000 espécies e um grande número de híbridos (Sheehan 1983, Dresler 1993). As orquídeas destacam-se pela exuberância de suas flores, muito apreciadas por colecionadores e comerciantes os quais, geralmente, realizam coletas indiscriminadas, retirando-as de seus habitats naturais (Ventura 2002).

Com a necessidade de suprir a demanda comercial e evitar a intensa degradação dos ambientes naturais, a técnica de cultura de tecidos tornou-se importante instrumento para a conservação e multiplicação de plantas. Essa ferramenta possibilita a propagação de plantas livre de patógenos e acelera os métodos convencionais

de propagação vegetativa, permitindo a produção de mudas de alto padrão e em quantidade suficiente para suprir a demanda comercial em qualquer época do ano (Schiavinato *et al.* 2008).

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, o cultivo *in vitro* de orquídeas ainda enfrenta algumas limitações como o custo de produção, a otimização de protocolos de cultivo específicos para cada espécie, variedade ou híbridos e a necessidade de aclimatização prévia das plantas (Govil & Gupta 1997).

O meio nutritivo a ser utilizado precisa fornecer todas as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e desenvolvimento *in vitro*. Quando cultivadas dessa forma, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo, necessitando, assim, de uma fonte exógena de carboidratos. A fonte e a concentração dependem da espécie vegetal e da fase do processo de micropropagação. Os

1. Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Paranaense (UNIPAR). Av. Parigot de Souza, 3636, CEP 85903-170, Toledo, PR, Brasil.

2. Engenheira Agrônoma, D.Sc., Professora da UNIPAR. Av. Parigot de Souza, 3636, CEP 85903-170, Toledo, PR, Brasil.

3. Bióloga, D.Sc., Professora da UNIPAR. Campus Toledo, Av. Parigot de Souza, 3636, CEP 85903-170, Toledo, PR, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: [sstefanello@unipar.br](mailto:sstefanello@unipar.br)

carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, olissacarídeos estruturais e todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (Caldas *et al.* 1998). Assim, o carbono exógeno no meio de cultivo serve como fonte de energia, influenciando na fisiologia da planta e diferenciação de órgãos (George 1996).

O tipo e a concentração dos açúcares são importantes para promover a germinação e o crescimento *in vitro* (Nicoloso *et al.* 2003, Moreira *et al.* 2007). A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos e, geralmente, sua concentração no meio MS (Murashige & Skoog 1962) é de 30g.L<sup>-1</sup> (Santos 2003).

Estudos preliminares realizados com *Miltonia flavescens* Lindl., uma orquídea epífita nativa da região sul do Brasil (Imes 1997) e ameaçada de extinção pela destruição do seu habitat natural, evidenciaram o desenvolvimento de plântulas na presença de 15 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Stefanello *et al.* 2009). Na propagação *in vitro* de orquídeas, outras fontes de carboidratos como a glicose, a frutose e a maltose também têm sido utilizadas (Tombolato & Costa 1998).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de plantas de *M. flavescens*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Paranaense, Campus Toledo, Toledo, Paraná.

Foram utilizadas, como explantes, plantas provenientes da germinação *in vitro* com aproximadamente 2 cm, as quais foram inoculadas em meio de cultura

MS com metade da concentração dos macronutrientes e micronutrientes (½ MS). Foram testadas três fontes de carboidrato: sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), maltose (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>) e glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), nas concentrações de 0, 15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>, totalizando 15 tratamentos. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) a 1 N, antes da adição do ágar (6,5 g.L<sup>-1</sup>).

Após o preparo, 50 mL de meio de cultura foram distribuídos em frascos de vidro com capacidade para 250 mL, tampados e submetidos ao processo de esterilização por autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos. A inoculação foi realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a unidade experimental foi constituída de um frasco contendo dez plantas, com cinco repetições. Posteriormente, os frascos foram transferidos para a sala de crescimento com temperatura de 24°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 µmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>.

O material vegetal permaneceu durante seis meses em cultivo, com um subcultivo a cada dois meses. Após este período, foi efetuada a avaliação das seguintes variáveis: comprimento da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas e massa fresca. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira 2003) e comparação de médias através do teste de Scott-Knott a 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após seis meses de cultivo das plantas de *M. flavescens in vitro* verificou-se que apenas o número de folhas não foi significativamente afetado pela fonte e concen-

**Tabela 1.** Comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), número de brotos (NB), número de folhas (NF) e massa fresca (MF) de plantas de *M. flavescens* após seis meses de cultivo em meio de cultura ½ MS com diferentes fontes e concentrações de carboidratos.

Carboidrato	Concentrações (g.L <sup>-1</sup> )				
	15	30	45	60	
		CPA (cm)			
Sacarose	4,15 bA	6,41 aA	5,46 aA	4,68 bA	
Glicose	4,45 bA	5,62 aA	4,41 bB	3,68 bA	
Maltose	4,37 bA	4,43 bB	6,36 aA	4,19 bA	
		NR			
Sacarose	7,62 bA	13,68 aA	6,45 bB	2,75 bA	
Glicose	7,33 aA	6,67 aB	1,95 bB	1,31 bA	
Maltose	4,25 bA	7,55 bB	13,75 aA	4,75 bA	
		NB			
Sacarose	1,37 bA	1,65 bA	2,47 aA	3,17 aA	
Glicose	1,33 bA	1,83 bA	3,25 aA	3,62 aA	
Maltose	1,05 bA	1,17 bA	1,50 bB	2,46 aA	
		NF			
Sacarose	10,83 aA	14,55 aA	14,02 aA	13,58 aA	
Glicose	10,5 aA	13,15 aA	14,99 aA	13,25 aA	
Maltose	11,37 aA	12,17 aA	13,87 aA	13,17 aA	
		MF (g)			
Sacarose	0,34 bA	0,70 aA	0,74 aA	0,43 aA	
Glicose	0,40 aA	0,67 aA	0,58 aA	0,47 aA	
Maltose	0,28 aA	0,44 aB	0,56 aA	0,46 aA	

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

tração de carboidratos (Tab. 1). Não houve crescimento dos explantes na ausência de carboidratos.

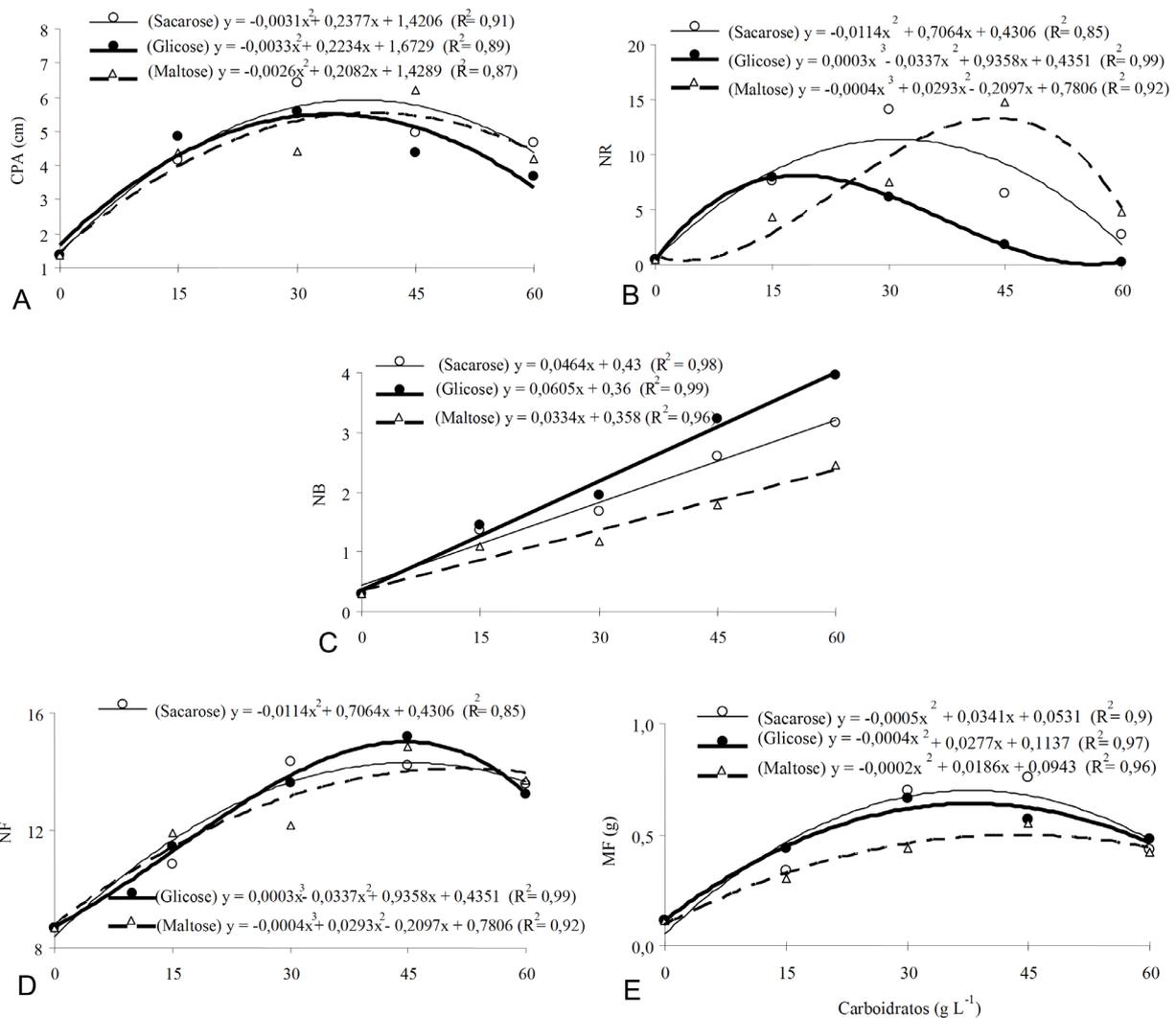
Quando o meio de cultura foi suplementado com 15 e 60 g.L<sup>-1</sup> de carboidrato, não foi verificada diferença significativa entre a sacarose, a glicose e a maltose para as variáveis analisadas. Nessas concentrações, os resultados foram inferiores quando comparados às outras concentrações testadas. Entretanto, quando o meio de cultura foi suplementado com 30 e 45 g.L<sup>-1</sup> de carboidratos, foi observada diferença significativa entre as fontes de carboidrato para o comprimento da parte aérea e número de raízes. Da mesma forma, foi observada diferença no número de brotos na concentração de 45 g.L<sup>-1</sup> e na massa fresca na concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> (Tab. 1).

Estes resultados diferem dos obtidos no cultivo de *Oncidium varicosum* Lindl. onde, em condições experimentais similares, 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi a melhor fonte e concentração de carboidrato para todos os parâmetros avaliados (Rego-Oliveira *et al.* 2003).

Os maiores valores médios para o comprimento da

parte aérea foram obtidos quando a concentração de carboidratos empregada foi 30 e 45 g.L<sup>-1</sup>, não diferindo entre si quando o carboidrato utilizado foi a sacarose. Com a suplementação dos demais carboidratos, os maiores comprimentos foram obtidos com 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 45 g.L<sup>-1</sup> de maltose (Tab. 1). Entretanto, não ocorreu diferença entre sacarose e glicose na concentração 30 g.L<sup>-1</sup> e tampouco entre sacarose e maltose na concentração 45 g.L<sup>-1</sup>. Em todas as fontes de carboidratos, o comprimento da parte aérea apresentou um ajuste quadrático, diminuindo com o aumento da concentração de carboidratos a partir de 45 g.L<sup>-1</sup> (Fig. 1A).

Esses resultados diferem dos obtidos com plantas de *Oncidium varicosum*, cultivadas em condições similares, onde o maior comprimento foi alcançado na presença de 60 g.L<sup>-1</sup> de maltose e sacarose, sendo diferente significativamente dos demais tratamentos testados (Rego-Oliveira *et al.* 2003). Os resultados do presente trabalho também diferem dos obtidos com plantas de *Dendrobium nobile* cultivadas por 120 dias *in vitro* e



**Figura 1.** Desempenho das variáveis em função da fonte e concentração de carboidratos após seis meses de cultivo *in vitro*: A. Comprimento da parte aérea (CPA). B. Número de raízes (NR). C. Número de brotos (NB). D. Número de folhas (NF). E. Massa fresca (MF).

que atingiram os maiores tamanhos na presença de 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Faria *et al.* 2004).

O número de raízes também foi afetado pela concentração e pela fonte de carboidratos (Tab. 1 e Fig. 1B), sendo os maiores valores obtidos quando o cultivo ocorreu na presença de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 45 g.L<sup>-1</sup> de maltose (13,68 e 13,75 raízes, respectivamente). Os dados obtidos são concordantes com as afirmações de vários autores que preconizam que a presença de carboidratos é essencial para o enraizamento *in vitro* de muitas espécies (George 1996, Grattapaglia & Machado 1998, Leite *et al.* 2000). A formação *in vitro* de um sistema radicular funcional e bem desenvolvido é um dos pontos fundamentais para a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização.

Quando se estudou o efeito da glicose no enraizamento (Tab. 1 e Fig. 1B), os maiores valores foram obtidos nas menores concentrações testadas, ou seja, 15 e 30 g.L<sup>-1</sup>, não havendo diferenças entre elas (7,33 e 6,67 raízes, respectivamente). De forma similar, em *Oncidium varicosum* foi verificado maior número de raízes sob concentrações baixas de glicose (20 e 30 g.L<sup>-1</sup>) e elevadas de maltose (60 e 90 g.L<sup>-1</sup>) (Rego-Oliveira *et al.* 2003).

Houve aumento linear do número de brotos em função do aumento das concentrações de carboidratos para todas as fontes testadas (Fig. 1C) e os maiores valores foram obtidos quando o cultivo ocorreu na presença de 45 e 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e glicose e 60 g.L<sup>-1</sup> de maltose, diferindo dos demais tratamentos (Tab. 1). De modo similar, as concentrações mais elevadas de carboidratos, como maltose e sacarose, promoveram maior proliferação de protocormos a partir de culturas celulares embriogênicas de *Oncidium* 'Gower Ramsey' (Jheng *et al.* 2006). O aumento na concentração de carboidratos ocasiona a elevação do potencial osmótico do meio de cultura, diminuindo a absorção de água e sais pela plântula, interferindo em seu crescimento (Fráguas *et al.* 2003).

O número de folhas não foi afetado significativamente pelo tipo e pela concentração de carboidratos (Tab. 1), embora com a suplementação do meio de cultura com 60 g.L<sup>-1</sup> observou-se tendência de diminuição no número médio de folhas (Fig. 1D).

Não houve diferença entre as fontes de carboidratos quanto à massa fresca, com exceção do tratamento 30 g.L<sup>-1</sup> de maltose que resultou em menor massa fresca (Tab. 1 e Fig. 1E). Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, a suplementação com sacarose (0; 5; 10; 20; 30 e 60 g.L<sup>-1</sup>) afetou o crescimento e o acúmulo de biomassa de plantas de *Dendrobium nobile*, sendo que a adição de 60 g.L<sup>-1</sup> promoveu o aumento da massa fresca (Faria *et al.* 2004). De modo similar, a elevação na concentração de sacarose permitiu a obtenção de maiores valores de massa fresca em plantas de *Oncidium varicosum* (Rego-Oliveira *et al.* 2003).

Em função das diferenças encontradas entre os trata-

mentos, constata-se a importância do tipo de carboidrato empregado, assim como da concentração adequada para o crescimento *in vitro* dessa espécie. Segundo Smeekens (2000), os carboidratos possuem função sinalizadora, podendo provocar alteração na expressão gênica similar aos efeitos atribuídos aos hormônios. A percepção ocorre através de sensores protéicos que desencadeiam uma cascata de eventos em nível celular, alterando a expressão gênica e as atividades enzimáticas, influenciando no crescimento.

## CONCLUSÕES

As fontes e concentrações de carboidratos influenciaram o crescimento *in vitro* de *M. flavescens*. As concentrações de 30 e 45 g.L<sup>-1</sup> de carboidratos mostram-se mais adequadas para os parâmetros avaliados. O cultivo na presença de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ou glicose resultou em maior comprimento da parte aérea e incremento de massa fresca, enquanto a multiplicação de brotos foi favorecida pela presença de 45 g.L<sup>-1</sup> dos mesmos carboidratos.

## REFERÊNCIAS

- CALDAS, L. S. HARIDASAM, P. & FERREIRA, M. E. 1998. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CNPQ. Pp: 87-132.
- DRESSLER, R. L. 1993. *Phlogeny and classification of the Orchid family*. Portland: Dioscorides Press. 314 p.
- FARIA, R. T., RODRIGUES, F. N., OLIVEIRA, L. V. R. & MÜLLER, C. 2004. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, 22: 780-783.
- FERREIRA, D. F. 2003. *Programa Estatístico Sisvar* (software). Lavras: UFLA.
- FRÁGUAS, F. V., SOUZA, A. V., PASQUAL, M. & DUTRA, L. F. 2003. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. *Revista Ceres*, 50: 719-726.
- GEORGE, E. F. 1996. *Plant propagation by tissue culture*. Part 2. Edington: Exergetics. 1361 p.
- GOVIL, S. & GUPTA, S. C. 1997. Commercialization of plant tissue culture in India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51: 65-73.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPQ. Pp: 87-132.
- IMES, R. *Orchids: the illustrated identifier to over 100 cultivated varieties*. London: Apple, 1997. 80 p.
- JHENG, F., DO, Y., LIAUH, Y., CHUNG, J. & HUANG, P. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science*, 170: 1133-1140.
- LEITE, G. B., FINARDI, N. & FORTES, G. R. L. 2000. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH x F97. *Ciência e Agrotecnologia*, 24: 353-357.
- MOREIRA, B. M. T., TOMBA, E. C. & ZONETTI, P. C. 2007. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lindl. var venosa x *Cattleya warneri* T. Moore Alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. *SaBios*, 2: 16-21.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- NICOLOSO, F. T., ERIG, A. C., RUSSOWSKI, D. & MARTINS, C. F. A. 2003. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, 27: 84-90.
- REGO-OLIVIERA, L. D., FARIA, R. T., FONSECA, I. C. & SACONATO, C. 2003. Influência da concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). *Semina: Ciências Agrárias*, 24: 265-272.
- SANTOS, E. K. 2003. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B. & BERED, F. *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: UFRGS. Pp. 415-444.
- SCHIAVINATO, Y. O., LUCON, T. N., TOMBOLATO, A. F. C., BARBOSA, W. & VEIGA, R. F. A. 2008. Micropropagação de *Anthurium plowmannii* Croat. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 4: 15-20.
- SHEEHAN, T. J. 1983. Recent advances in botany propagation and physiology of orchids. *Horticultural Reviews*, 5: 279-315.
- SMEEKENS, G. S. M. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 49-81.
- STEFANELLO, S., KARSTEN, J., MULLER, T. S., TOMCZAK, A. P., BONETT, L. P. & SCHUETER, A. S. 2009. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. *Ciência e Agrotecnologia*, 33: 53-59.
- TOMBOLATO, A. F. C. & COSTA, A. M. M. 1998. *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas: IAC (Boletim Técnico, n.174).
- VENTURA, G. M. 2002. *Propagação in vitro de orquídeas do grupo Cattleya*. 147 p. Dissertação (Pós-Graduação em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- YEW, C. K. N. G. & HEW, C. S. 2000. Orchid pseudobulbs – ‘false’ bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival. *Scientia Horticulturae*, 83: 165-172.