

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E
ACLIATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* Lindl.
(Orchidaceae).**

CAMILA SOARES ROSA LEMES

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2015

**GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E
ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* Lindl.
(Orchidaceae).**

CAMILA SOARES ROSA LEMES
Engenheira Agrônoma

Orientadora: PROFA. DRA. YARA BRITO CHAIM JARDIM ROSA

Tese apresentada a Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor

Dourados
Mato Grosso do Sul
2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

Lemes, Camila Soares Rosa.

Germinação, desenvolvimento e aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl. (Orchidaceae). / Camila Soares Rosa Lemes. – Dourados, MS : UFGD, 2015.

55p.

Orientadora: Profa. Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa
Tese (Doutor em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Orchidaceae. 2. Meios de cultivo. 3. Auxina. 4. Citocinina. 5. Sacarose. 6. Luminosidade. I. Título.

**GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E
ACLIATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* Lindl.
(Orchidaceae).**

por

Camila Soares Rosa Lemes

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM AGRONOMIA

Aprovada em: 2/2/2015



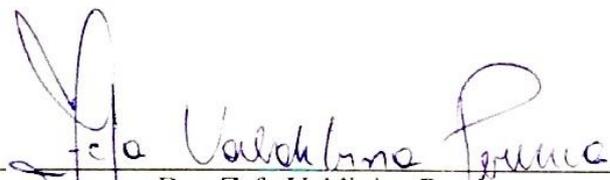
Dra. Claudia Roberta Damiani
UFGD



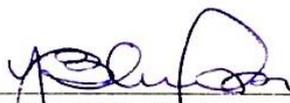
Dr. Edgard Jardim Rosa Júnior
UFGD/FCA



Dr. Etenaldo Felipe Santiago
UEMS



Dra. Zefa Valdivina Pereira
UFGD/FCBA



Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa
Orientadora – UFGD/FCA

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá.

Ao meu marido,
Lúcio Nunes Lemes

Ao nosso filho,
Pedro Soares Lemes

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu amor e fidelidade;

À Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade concedida;

Ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos;

À professora Yara Brito Chaim Jardim Rosa pela orientação, parceria, paciência e amizade;

Às funcionárias Nilda Tiyoko Kobayashi Hoffmann e Elda Barrios de Azambuja Silva pelo auxílio nas atividades laboratoriais;

À banca examinadora pelas valiosas sugestões e correções;

À todos que colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO I - MEIOS DE CULTIVO NA GERMINAÇÃO E	
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE <i>Miltonia flavescens</i> Lindl.....	9
RESUMO	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4. CONCLUSÕES	18
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO II – MEIOS DE CULTIVO E SACAROSE NO CRESCIMENTO	
INICIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Miltonia flavescens</i> Lindl.....	20
RESUMO	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4. CONCLUSÕES	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO III – BAP E ANA NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA	
RADICULAR DE <i>Miltonia flavescens</i> Lindl.....	31
RESUMO	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4. CONCLUSÃO	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO IV – ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Miltonia flavescens</i> Lindl.....	
RESUMO	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4. CONCLUSÃO	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55

GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* Lindl. (ORCHIDACEAE).

RESUMO

Dentre as Angiospermas, as orquídeas destacam-se pela sua heterogeneidade e tamanho de sua família. A ação humana, através da degradação de ambientes naturais, tem levado muitas espécies de orquídeas à extinção. Por este motivo, o cultivo *in vitro* tem sido utilizado como ferramenta na propagação, uma vez que possibilita a germinação e o desenvolvimento destas plantas em tempo relativamente menor ao observado na natureza. Desta forma, a elaboração de protocolos de multiplicação e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro* tem se tornado ferramenta importante. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de elaborar um protocolo de propagação *in vitro* e aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl. Foram realizados quatro experimentos no Laboratório de cultivo *in vitro* e na área de Jardinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), nos quais avaliou-se a germinação e o crescimento inicial de protocormos em diferentes meios de cultivos; o crescimento inicial de plantas cultivadas em diferentes meios de cultivos suplementados com concentrações de sacarose; o crescimento do sistema radicular em meio suplementado com diferentes concentrações de auxina e citocininas e aclimatização de plantas sob diferentes espectros luminosos. A germinação, aos 30 dias após a sementeira, e o crescimento inicial de protocormos, aos 180 dias após a sementeira, foram maiores em sementes cultivadas nos meios MS e MS ½. O crescimento inicial das plantas, 180 dias após o plantio, foi maior em plantas cultivadas em meio MS ½ suplementado com 25 g L⁻¹ de sacarose. O crescimento do sistema radicular foi maior nas plantas cultivadas por 180 dias, em meio MS ½ com balanço hormonal favorável à auxina. Aos 30 dias após a pré aclimatização, sob luz fluorescente branca (20,0 μmol m⁻² s⁻¹), observou-se 100% de sobrevivência das plantas, e após 180 dias, estas plantas apresentaram a maior relação de crescimento da parte aérea. Com base nos resultados obtidos, estabeleceu-se o protocolo de cultivo de *M. flavescens* para fins de propagação da espécie, tanto em programas de reintrodução quanto para sua comercialização.

Palavras-chave: Orquídea, meios de cultivo, auxina, citocinina, sacarose, condições de luminosidade

ABSTRACT

Among the Flowering Plants, orchids stand out for its diversity and size of your family. Human action, through the degradation of natural environments, has led many orchid species to extinction. For this reason, *in vitro* culture has been used as a tool for propagation, since it allows the germination and development of such plants in relatively less time to that observed in nature. Thus, the development of multiplication and development of plants grown *in vitro* protocols has become an important tool. This work was developed with the goal of developing an *in vitro* propagation protocol and acclimatization of *Miltonia flavescens* Lindl. Four experiments were performed in *the in vitro* culture laboratory and Jardinocultura area of the Faculty of Agricultural Sciences (FCA) of the Federal University of Grande Dourados (UFGD), in which were evaluated the germination and early development of protocorms in different media crops; the initial growth of plants grown in different media cultures supplemented with sucrose concentrations; the root growth in medium supplemented with different concentrations of auxin and cytokinin and acclimatization of plants under different light spectra. Germination at 30 days after sowing, and the initial development of protocorms, 180 days after sowing, were higher in cultivated seeds in MS and MS ½ medium. The initial growth of plants, 180 days after planting, was higher in plants grown on MS ½ medium supplemented with 25 g L⁻¹ sucrose. The root growth was greater in plants grown for 180 days, MS ½ medium with hormonal favor of auxin. At 30 days after pre acclimatization under white fluorescent light (20.0 μmol m⁻² s⁻¹), there was 100% survival of plants, and after 180 days these plants exhibited the majority of the growth air ratio. Based on the results, establishes the *M. flavescens* cultivation protocol for propagation of the specie, both in reintroduction programs and for marketing.

Keywords: Orchid, culture media, auxin, cytokinin, sucrose, lighting conditions

INTRODUÇÃO GERAL

A floricultura é um dos segmentos mais dinâmicos e avançados do agronegócio contemporâneo (IBRAFLO, 2014).

O mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais está distribuído por praticamente todos os estados. Em 2013, o setor envolveu 8 mil produtores, sendo que 28% deles concentraram-se no estado de São Paulo. No estado de Mato Grosso do Sul, por sua vez, a concentração foi de 0,8% (IBRAFLO, 2014).

Scherer (2006) afirma que o setor é considerado um negócio de expressivo retorno financeiro e muito importante na geração de emprego, renda e divisas. Segundo dados do IBRAFLO (2014), a cadeia produtiva de flores gerou, em 2013, cerca de 210 mil empregos, a produção realizou-se em aproximadamente 13.700 hectares e movimentou cerca de 5 bilhões de reais.

As orquídeas destacam-se como um dos principais produtos nacionais da floricultura e, a partir do ano 2000, sua produção e comercialização ampliaram-se consideravelmente (ICHINOSE, 2008). São predominantemente epífitas, com raízes aéreas, vivendo sobre árvores ou rochas e típicas de regiões tropicais. Outras são terrícolas, geralmente de regiões temperadas, embora possam habitar as regiões tropicais (MILLER e WARREN, 1996).

Adaptações ecofisiológicas no sistema radicular e eixo caulinar permitiram um sucesso substancial e considerável das orquídeas na ocupação de dosséis de florestas tropicais (BENZING, 1983). Entretanto, o desmatamento, especialmente na região do Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica, têm levado à extinção algumas espécies (MULLER et al., 2007).

A família Orchidaceae originou-se na Malásia, há milhões de anos, quando a maioria das famílias das angiospermas tornavam-se diferenciadas (GARAY, 1972).

Há cerca de 3.000 anos, nos tempos do rei Salomão, a orquídea era considerada uma planta especial. Escritos do sábio chinês Confúcio (551 a.C.) contêm citações sobre a planta, mencionando-a como “o perfume dos reis”. No Ocidente, todavia, o interesse pelas orquídeas era medicinal. Teofrasto, aluno de Aristóteles (370 a.C.), citou a planta em suas publicações, chamando-a de *Orchis* que, no grego, significa testículos, em alusão à forma do par de bulbos subterrâneos de certas espécies que crescem às margens do Mediterrâneo. Outros estudiosos, no ano 100, descreveram duas orquídeas entre 600 plantas medicinais. Por este motivo, eram tidas como úteis na

promoção do aumento da fertilidade e virilidade, uma crença que se espalhou por toda Europa até meados do século 18. No século 15 foram feitos livros e folhetos relacionados com orquídeas e no século 17 foram descritas pela primeira vez as orquídeas tropicais da Ásia (BLOSSFELD, 1991).

Sabe-se que a família Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificadas dentre as Angiospermas, com cerca de 850 gêneros e aproximadamente 25 mil espécies distribuídas em praticamente todos os continentes, com maior concentração e diversidade nas regiões tropicais e subtropicais, sendo encontradas desde as proximidades do polo Ártico até o polo Antártico, e, por isso, é considerada a maior família dentre as Angiospermas (STOUTAMIRE, 1964; DRESSELER, 2005; KERBAUY, 2011). No Brasil, são listadas 2.440 espécies, das quais 1.630 são endêmicas do país (BARROS et al., 2013).

Segundo Suttleworth et al. (1994), o gênero *Miltonia* é composto por aproximadamente 20 espécies, em sua maioria de regiões com altitude elevada e temperaturas amenas, podendo, também, desenvolverem-se em regiões mais quentes. *Miltonia flavescens* Lindl é epífita, nativa do Brasil, amplamente espalhada pelos estados das regiões sul, sudeste e regiões mais secas do interior. Possui crescimento simpodial; apresenta pseudobulbos angusto-ovalados, oblongos, bifoliados no ápice, de 8 a 10 cm de altura. Suas folhas são longas, lanceoladas, com 20 a 30 cm de comprimento; a inflorescência é basal, com 6 a 12 flores, em forma de estrela, de 8 a 10 cm de diâmetro. O seu florescimento acontece entre os meses de setembro a novembro, sendo que as pétalas e sépalas são de cor amarelo palha e labelo branco, com poucas machas vermelho-púrpura (Figura 1). Segundo Muller et al. (2007), esta espécie está entre aquelas com risco de extinção devido ao desmatamento.

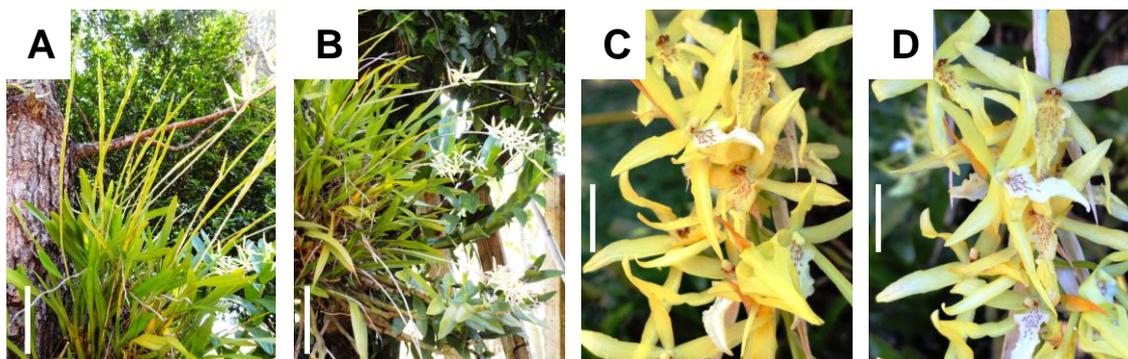


FIGURA 1. *Miltonia flavescens* Lindl. A e B = Aspecto morfológico da planta; C e D = Aspecto morfológico da flor. Barra de escala: A e B = 10 cm; C e D = 1 cm – Foto: Camila S. R. Lemes.

O cultivo *in vitro* é utilizado como instrumento para multiplicação de espécies vegetais, incluindo as orquídeas, sendo considerado uma ferramenta importante na obtenção de plantas tanto para a pesquisa, visando a preservação das espécies ameaçadas ou não de extinção, quanto para a produção em escala comercial (SORGATO et al., 2014 a).

Embora o cultivo *in vitro* seja uma técnica consolidada e muito utilizada na propagação de plantas, o seu sucesso depende de fatores como a espécie, meio, tempo de cultivos, entre outros. Por este motivo, pesquisas são elaboradas objetivando a formulação e o estabelecimento de protocolos, que garantam bons resultados em todas as etapas da propagação das plantas, a fim de que abasteçam bancos de germoplasma, bem como sejam utilizadas em programas de reintrodução e/ou comercialização.

Uma das grandes vantagens do cultivo *in vitro* é a capacidade de obtenção de um grande número de plantas em um tempo relativamente curto e com alta qualidade fitossanitária (SUZUKI e FERREIRA, 2007).

Com relação a propagação das orquídeas, de acordo com Stoutamire (1964), apenas 5% das sementes encontradas em um fruto de orquídea são capazes de germinar em condições naturais e a propagação vegetativa dessas plantas, por meio da divisão de touceira, produz, em média, uma nova muda a cada dois anos (CAMPOS, 2002) o que torna a produção natural de mudas bastante limitada. De modo geral, as sementes de orquídeas não apresentam endosperma e cotilédones e as únicas substâncias de reservas contidas no embrião são os lipídios. Estes, por sua vez, auxiliados pela citocinina, são utilizados durante a germinação (MANNING e VAN STADEN, 1987).

A germinação *in vitro* de orquídeas, por sua vez, foi proposta por Knudson, em 1946, porém ainda são escassas as informações a cerca da composição nutricional

que favorece a germinação e o crescimento *in vitro* das espécies. De acordo com Suzuki et al. (2009), a escolha do meio de cultivo, incluindo os nutrientes que o compõem, é importante, por exemplo, para o processo de germinação e varia de acordo com a espécie. Os meios Knudson (1946), Vacin & Went (1949) e Murashige & Skoog (1962) são alguns dos meios mais utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas (SUZUKI et al., 2010).

É importante ressaltar que a escolha do meio adequado ao cultivo de determinada espécie é fundamental, pois através dele, tecidos e órgãos são supridos com macronutrientes, micronutrientes, hormônios vegetais e produtos orgânicos necessários ao seu desenvolvimento *in vitro* (MURASHIGE e SKOOG, 1962; KNUDSON, 1946; VACIN WENT, 1949; CAMPOS 2002).

Dentre os hormônios vegetais mais utilizados no cultivo *in vitro* estão as auxinas e citocininas, que através da sua disponibilidade e interação, participam da formação de raiz, parte aérea e calo (MERCIER, 2004). As auxinas são responsáveis pelo aumento consistente da formação de primórdios radiculares em tecidos que naturalmente apresentam predisposição ao enraizamento (HAISSING, 1972) e o ácido alfa-naftaleno acético (ANA) é uma auxina sintética utilizada em diversas técnicas e protocolos para o enraizamento de culturas (MERCIER, 2004). Já as citocininas, por sua vez, relacionam-se com quase todos os aspectos do desenvolvimento, promovendo nas plantas divisão, alongamento e diferenciação celular, retardando a senescência, promovendo a superação da dominância apical e induzindo a proliferação de gemas axilares (TAIZ e ZEIGER, 2009). A benzilaminopurina (BAP) é uma citocinina que tem sido amplamente utilizada no cultivo *in vitro* (SOARES et al., 2012; STEFANELLO et al., 2009).

Outro aspecto importante a ser considerado na elaboração de um eficiente protocolo de multiplicação é o enriquecimento dos meios nutritivos com carboidratos. Sabe-se 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 adição de açúcares, para suprir a demanda de 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 este tipo de cultivo (PASQUAL, 2001). Dentre os açúcares mais utilizados no cultivo *in vitro* destaca-se a sacarose (THORPE et al., 2008).

Além do aprimoramento do cultivo *in vitro*, o cultivo *ex vitro* também é parte importante de um protocolo de multiplicação. Entretanto, existe ainda um grande número de espécies que não sobrevivem à transferência do cultivo *in vitro* para o *ex vitro* (também conhecida por aclimatização), e a morte destas plantas evidencia a carência de informações sobre este tipo de cultivo.

No caso das orquídeas, a aclimatização é crítica e delicada, uma vez que, no cultivo *in vitro* as plantas ainda são heterotróficas, apresentam baixa eficiência do sistema radicular, reduzida competência vascular, pouca quantidade de estômatos funcionais e mal formação da cutícula (FARIA et al., 2012) o que reduz a probabilidade de sobrevivência quando expostas a ambientes com elevada demanda evaporativa.

Alguns autores têm desenvolvido suas pesquisas buscando alternativas para reduzir a mortalidade de plantas durante a aclimatização. O uso de aclimatização intermediária, em sala de crescimento, associada ao fornecimento da radiação fotossintética obtida por meio de lâmpadas fluorescentes tem se mostrado efetivos na elevação da taxa de sobrevivência na aclimatização de algumas espécies, tais como *Dendrobium phalaenopsis* (SORGATO et al., 2014 b).

É importante lembrar que protocolos são necessários, acima de tudo, para espécies ameaçadas de extinção como *M. flavescens*. Embora a elaboração de um protocolo seja uma atividade dinâmica e que muitas novas informações possam ser acrescentadas, aprimorando bons resultados, vale salientar que conhecer a germinação, crescimento e aclimatização, por si só são suficientes para que a espécie seja multiplicada em qualquer região, para os mais diferentes fins.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho a elaboração de um protocolo de multiplicação e desenvolvimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl., incluindo etapas como a germinação, crescimento e aclimatização.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N., PESSOA, E. M.; FORSTER, W. Orchidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acessado em: 29 abr. 2013.

BENZING, D.H. Vascular epiphytes: a survey with special reference to their interections with other organisms. In: SUTON, S. T.; WITHMORE, T. C.; CHADWICK, A. C. (Eds.), **Tropical Rain Forest: Ecology and Management**, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993, p. 11-24.

BLOSSFELD, A. **Orquídeas**. Editora Europa, São Paulo, 1991. 70p.

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

DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, Sarasota v.26, p.155-158, 2005.

FARIA RT; ASSIS AM; UNEMOTO LK; CARVALHO JFRP. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenaz, 2012.124p.

HAISSING, B. E. Meristematic activity during adventitious root primordium development: influences of endogenous auxin and applied gibberelic acid. **Plant Physiology**, v. 49, p. 886-892, 1972.

IBRAFLOR. Números do setor: Mercado interno 2013. Disponível em: www.ibraflor.com. Acesso em: 08 dez 2014.

ICHINOSE, J. G. S. Desenvolvimento e acúmulo de nutrientes em duas espécies de orquídeas: *Dendrobium nobile* Lindl. e *Miltonia flavescens* Lindl. var. *stellata* Regel. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP.

GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, Boston, v.53, p.202-215, 1972.

KERBAUY, G. B. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua. 2011. 383p.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

MANNING, J. C.; VAN STADEN, J. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. **Australian Journal of Botany**, v. 35, p. 343-353, 1987.

MERCIER, H. Auxinas, In: KERBAUY, G. B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S. A., 2004. p. 217-249.

MILLER, D.; WARREN, R. **Orquídeas do Alto da Serra: da Mata Atlântica pluvial do Sudeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Salamandra, 1996. 256p.

MULLER, T.S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S. Crescimento *in vitro* e aclimatação de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 252-254, 2007.

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, v.1, 2001. 74p.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 617-623, 2012.

SCHERER, A.M.S. As flores da Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.7, n.3, p.9-13, 2006.

SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R.; RAMOS, W. B.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Acido naftalenoacético no enraizamento in vitro de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzgerald. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiania, v. 10, n. 18, p. 72-79, 2014.

SORGATO, J. C.; ROSA, Y. B. C. J.; SOARES, J. S.; LEMES, C. S. R.; SOUZA, G. G. 2014. Light in intermediate acclimatização of in vitro germinated seedlings of *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131619>>. Acesso em: 16 nov 2014.

STEFANELLO, S.; KARSTENM J.; MULLER, T. S.; TOMEZAK, A. P.; BONETT, L. P.; SCHUELTER, A. R. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 53-59, 2009.

STOUTAMIRE, W. P. Seeds and seedling of native orchids. **Michigan Botanist**, Michigan, v.3, n.4, p.104-19, 1964.

SUTTLEWORTH, F.S.; ZIM, H.S.; DILON, G.W. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. Tradução: LEMA FILHO, J.G., Editora Expressão e Cultura, Rio de Janeiro, 1994. 158p.

SUZUKI, R.M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W.M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 4, p. 731-742, 2010.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V. P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 657-666, 2009.

SUZUKI, R. M.; FERREIRA, W. M. Introdução às técnicas de micropropagação de orquídeas. Im: BARBOSA. L. M.; SANTOS JÚNIOR, N. A. (orgs). *A Botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais*. 1 ed. Imprensa oficial do Estado, São Paulo, 2007. p. 655-659.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E. C.; KLERK; G. J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E. F. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed, v. 1, 2008. 501p.

VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, 1949.

CAPITULO I – MEIOS DE CULTIVO NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *Miltonia flavescens* LINDL (ORCHIDACEAE).

RESUMO

Algumas espécies de orquídeas nativas estão ameaçadas de extinção. Por este motivo, estudos sobre sua germinação e desenvolvimento são importantes. Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a influência da composição nutricional dos meios de cultivo sobre a germinação e crescimento inicial dos protocormos de *Miltonia flavescens* Lindl. Sementes oriundas de polinização natural, sob condições assépticas, foram semeadas nos meios MS, MS ½, K e VW, cultivadas em sala com fotoperíodo e temperatura controlados (12 h; 25 °C ± 2). Após 30 dias da semeadura avaliou-se a germinação e aos 120 e 180 dias após a semeadura avaliou-se o crescimento inicial de protocormos. Os resultados demonstraram que os meios MS e MS ½ são ideais para a germinação das sementes. Após 180 dias de cultivo, os meios MS, MS ½, K e VW propiciaram condições para o desenvolvimento de plantas com raízes, porém, os meios MS e MS ½ apresentaram plantas mais desenvolvidas. Ressalta-se o fato de que, para esta espécie, os meios de cultura mais eficazes para a germinação são também os mais adequados para o desenvolvimento de plantas.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, nutrientes, orquídea.

ABSTRACT

Some species of orchids are highly endangered. For this reason, studies regarding germination and development are important. Thus, this study was conducted in order to verify the influence of the nutritional composition of the culture media on germination and initial development of *Miltonia flavescens* Lindl seeds. Seeds obtained from natural pollination, under aseptic conditions, were sowed in MS, MS ½ K and VW media, cultured in a room with controlled temperature and photoperiod (12 h; 25 °C ± 2). After 30 days of culture evaluated the germination and at 120 and 180 days after sowing evaluated the initial growth of protocorms. The results revealed that the ½ MS and MS media are suitable for seed germination. After 6 months of cultivation, MS, MS ½ K and VW media provided the development of plants with roots, however, ½ MS and MS media showed the most developed plants. It is noteworthy the fact that, in this species,

the most effective culture medium for germination are also the most suitable for the development of their seedlings.

Key-words: *in vitro* culture, nutrients, orchid.

INTRODUÇÃO

Devido à destruição de seus habitats e às de coletas predatórias a população de orquídeas nativas tem diminuído, principalmente nos países tropicais (LO et al., 2004). Segundo Stoutamire (1964), apenas 5% das sementes encontradas em um fruto de orquídea são capazes de germinar em condições naturais e a propagação vegetativa dessas plantas, por meio da divisão de touceira, produz, em média, uma nova muda a cada dois anos (CAMPOS, 2002) o que torna a produção natural de mudas bastante limitada.

Neste contexto, as técnicas de cultivo *in vitro* têm sido utilizadas não somente para a propagação de orquídeas, como também objetivando o estudo de aspectos fisiológicos relacionados ao seu desenvolvimento. Dentre essas técnicas, a germinação *in vitro* foi proposta por Knudson, em 1946, entretanto, ainda são escassas as informações a cerca da composição nutricional que favorecem a germinação e o crescimento *in vitro* de orquídeas devido às diferentes exigências apresentadas pelos indivíduos dessa família botânica. Os meios Knudson (1946), Vacin & Went (1949) e Murashige & Skoog (1962) são alguns dos mais utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas (SUZUKI et al., 2010).

Miltonia flavescens Lindl é epífita, nativa do Brasil e em vista da sua ameaça de extinção (IMES, 1997) e da escassez de informações sobre sua germinação e crescimento *in vitro*, este trabalho foi desenvolvido objetivando verificar a influência da composição nutricional dos meios de cultivo sobre a germinação e crescimento inicial de seus dos protocormos.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), pertencente à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), durante o período de abril à outubro de 2013.

Foram utilizadas sementes de *Miltonia flavescens* Lindl., oriundas de polinização natural, dessecadas por 14 dias em dessecador com sílica gel (25 ± 2 °C; 75% UR), posteriormente embaladas em papel alumínio, armazenadas por 15 meses, sob refrigeração (5 ± 2 °C) em frascos de polipropileno opaco providos de tampa com sílica gel. Após esse período realizou-se o teste de tetrazólio, seguindo metodologia proposta por Soares et al. (2012) e as sementes apresentaram 53% de viabilidade.

Sob condições assépticas, 10 mg de sementes foram imersas em água destilada estéril por 15 minutos. Na sequência, a água foi descartada e as sementes foram desinfestadas, segundo metodologia descrita por Campos (2002). Em seguida as sementes receberam tríplice lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Após o descarte da água de lavagem as sementes receberam 80 mL de água destilada estéril e essa suspensão de sementes foi utilizada para a semeadura *in vitro*.

Os meios de cultivo estudados foram o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962); K (KNUDSON, 1946), VW (VACIN WENT, 1949), modificados em suas composições conforme descrito no Quadro 1.

Os meios de cultivo foram solidificados com $6,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e o pH foi ajustado para 5,8 utilizando-se KOH (0,1M) antes da esterilização em autoclave. Foram utilizados como frascos de cultivo recipientes de plástico transparente, com capacidade para 100 mL, providos de tampa rosqueável, contendo 20 mL de meio de cultivo, conforme o tratamento, os quais foram esterilizados em autoclave a 120°C e à pressão de 1 atm, por 20 minutos.

Após o resfriamento e a solidificação dos meios, em ambiente asséptico, procedeu-se a semeadura, com o auxílio de um pipetador automático, utilizando-se 1000 μL da suspensão de sementes por frasco. A seguir, os frascos foram tampados e as culturas acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética média de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada, distantes aproximadamente 30 cm dos frascos de cultivo.

QUADRO 1. Composição dos nutrientes dos meios de cultivo utilizados para a germinação assimbiótica de sementes e crescimento inicial de *Miltonia flavescens* Lindl

Nutrientes	Knudson (K)	Murashige & Skoog (MS)	MS _{1/2}	Vacin & Went (VW)
	mM	mM	mM	mM
Amônia (NH ₄ ⁺)	3,79	20,62	10,31	3,79
Nitrato (NO ₃ ⁻)	4,24	39,43	19,72	5,20
Fosfato (PO ₄ ⁻⁻⁻)	1,84	1,25	0,63	2,48
Potássio (K)	1,84	20,06	10,03	7,04
Sulfato (SO ₄ ⁻)	4,84	1,50	0,75	4,80
Calcio (Ca ⁺⁺)	4,24	3,01	1,51	0,65
Magnésio (Mg ⁺⁺)	1,02	1,50	0,75	1,02
Cloro (Cl)	-	6,03	3,02	-
Sacarose	87,72	87,72	87,72	87,72
Carvão ativado	125,0	125,0	125,0	125,0
Nitrogênio total	8,03	60,05	30,03	8,99
Relação NH ₄ ⁺ :NO ₃ ⁻	0,89	0,52	0,52	0,73

Para o estudo da germinação das sementes, aos trinta dias após a semeadura, três frascos de cada meio de cultivo foram abertos, receberam a adição de 3 mL de água estéril e os materiais vegetais foram transferidos para placas de petri. A seguir foram contabilizados, com o auxílio de um microscópico estereoscópico, o número de embriões clorofilados (EC), número de sementes não germinadas (SNG), sendo a seguir calculada a porcentagem de germinação (%G) pela expressão: $(EC / SNG + EC) \times 100$. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os resultados expressos em porcentagem foram transformados para $\sqrt{x+1}$ e, posteriormente, foram submetidos a análise de variância, sendo as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010).

No estudo do crescimento inicial dos protocormos, as avaliações ocorreram aos 120 e 180 dias de cultivo, segundo metodologia descrita por Suzuki et al. (2009), sendo consideradas as seguintes classes morfológicas (Figura 1): Estádio 1= protocormo intumescido clorofilado; Estádio 2= protocormo com formação da primeira folha; Estádio 3= protocormo com duas folhas; Estádio 4= planta com folhas e uma ou mais raízes. Também foi contabilizada a porcentagem de protocormos mortos. Para cada tempo de cultivo foram utilizados três frascos de cada meio nutritivo estudado.

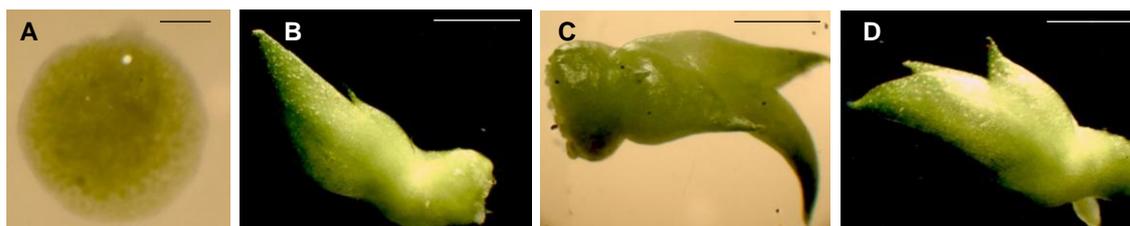


FIGURA 1. Morfologia geral dos estádios de desenvolvimento de protocormos até a formação de plantas de *Miltonia flavescens* Lindl. A) Estádio 1 = protocormo intumescido clorofilado; B) Estádio 2 = protocormo com formação da primeira folha; C) Estádio 3 = protocormo com duas folhas; D) Estádio 4 = planta com folhas e uma ou mais raízes. Barras de escala: A = 100 μ m; B, C, D = 1 mm – foto de Camila S. R. Lemes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjados em esquema de parcelas subdivididas, sendo alocados nas parcelas os quatro meios de cultivo e nas subparcelas os dois períodos de cultivo, com três repetições de um frasco de cultivo. Os resultados oriundos de variáveis discretas foram transformados para $\sqrt{x+1}$ sendo, em seguida, submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey até o nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os diferentes meios de cultivo influenciaram a germinação *in vitro* de *M. flavescens*, 30 dias após a semeadura (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl., 30 dias após a semeadura, em diferentes meios de cultivo. Dourados, UFGD, 2013

FV	GL	Quadrado médio
Meios	3	0,65 ^{**}
Resíduo	8	0,19
CV (%)		1,87
Média Geral		65,98

^{**} significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste t de Student

^{ns} não significativo

A identificação visual da germinação das sementes de *M. flavescens* foi observada aproximadamente 20 dias após a semeadura, quando as estruturas vegetais apresentaram-se clorofiladas (Figura 1 A). Os maiores percentuais de germinação (% G) foram observados nas sementes cultivadas nos meios MS (74,2 %) e MS_{1/2} (70,7 %) que

apresentaram, respectivamente, % G em torno de 14,5 e 11,0%, superiores aos outros dois meios estudados. (Quadro 2).

QUADRO 2. Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *Miltonia flavescens* Lindl., 30 dias após a semeadura. Dourados, UFGD, 2013

Meio de cultivo	Germinação (%)
MS	74,2 a
MS $\frac{1}{2}$	70,7 a
K	59,4 b
VW	59,7 b

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

Martini et al. (2001), estudando os meios K e MS na germinação de *Gongora quinquenervis* Ruiz & Pavón, verificaram que, vinte dias após a semeadura, os embriões cultivados no meio MS haviam germinado, enquanto que, a totalidade dos embriões cultivados no meio K haviam necrosado. Lo et al. (2004), também observaram que os meios MS e MS $\frac{1}{2}$ foram efetivos na germinação de *Dendrobium tosaense*, enquanto que os meios K e VW foram menos efetivos. Entretanto, dependendo da espécie de orquídea e do meio de cultivo estudados, outros autores observaram que o meio MS não foi o mais apropriado para a germinação das sementes. O meio VW propiciou a maior porcentagem de germinação em plantas de *Cattleya bicolor* Lindley, vinte e cinco dias após a semeadura, superando as porcentagem de germinação obtida nos meios MS e K (SUZUKI et al., 2010).

O meio de cultivo mais adequado à determinada espécie relaciona-se diretamente com os nutrientes fornecidos às plantas e a sua influência na germinação. De acordo com Stewart (1989), as espécies de orquídeas podem ser divididas em dois grandes grupos segundo suas necessidades nutricionais básicas. Um dos grupos é composto por espécies que germinam em meios de cultura com menor concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e potássio, tais como K e VW. Já o outro grupo é composto por espécies de orquídeas que germinam melhor em meios com maiores concentrações destes nutrientes, como o MS. Os resultados aqui apresentados, de maneira geral, sugerem que *M. flavescens* pertença ao segundo grupo, necessitando de meios de cultivo com amplo e maior fornecimento de nutrientes para que se inicie a germinação de suas sementes.

Além da composição nutricional do meio, deve-se considerar a relação amônio:nitrato ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$) nele estabelecida. Gamborg (1970) propõe que a

germinação de orquídeas é mais favorecida em meios que possuem em sua composição maior presença de amônio comparado ao nitrato. Os resultados apresentados por *M. flavescens* contrariam esta proposta, visto que, dentre os meios de cultivo estudados, os meios MS e MS $\frac{1}{2}$ são os que apresentam as menores proporções de amônio em relação ao nitrato.

A análise destes resultados permite inferir que os estudos sobre a germinação das espécies são importantes, uma vez que por meio deles é possível conhecer não somente a espécie, como também a sua interação com o meio na qual será cultivada, pois a literatura demonstra que não existe um padrão de comportamento que se possa generalizar. Tais conhecimentos permitem a elaboração de protocolos de multiplicação, que garantam, além da reprodução de espécies ameaçadas de extinção, a sua produção em larga escala visando o repovoamento de seus habitats ou mesmo a sua comercialização.

O efeito conjunto dos fatores tempo e meios de cultivo foi observado sobre o crescimento inicial dos protocormos, aos 120 e 180 dias após a semeadura (Quadro 3).

QUADRO 3. Resumo das análises de variância da porcentagem de protocormos em estágio 1 (% P1), 2 (% P2), 3 (% P3), 4 (% P4) de *Miltonia flavescens* Lindl, 120 e 180 dias após a semeadura. Dourados, UFGD, 2013.

FV	GL	Quadrados Médios			
		% P1	% P2	% P3	% P4
MEIO	3	2,47*	2,14*	2,62**	2,66 ^{ns}
erro 1	6	0,27	0,27	0,26	0,71
TC	1	16,81**	24,38**	3,29**	18,50**
TC*MEIO	3	7,44**	2,31**	1,63**	2,97*
erro 2	10	0,74	0,30	0,12	0,51
CV (%)		26,20	22,10	3,90	37,31
Média Geral		12,13	6,90	76,47	4,50

** significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste Tukey

* significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey

^{ns} não significativo

O estágio de desenvolvimento 3 foi observado as 120 dias (Figura 1 C). Neste estágio, os meios K, MS $\frac{1}{2}$ e VW destacaram-se por apresentarem as maiores porcentagens de protocormos (83%, 81% e 73%, respectivamente), superando estatisticamente o valor observado no meio MS (44%) (Figura 2A).

Em relação aos demais estádios de desenvolvimento, o meio MS apresentou 32% dos seus protocormos no estágio 1 e 24% no estágio 2. Com relação às sementes inoculadas no meio MS $\frac{1}{2}$, 13% dos protocormos permaneceu no primeiro estágio de

desenvolvimento e 6% no estágio 2. No meio K, 10% dos protocormos estavam no estágio 1 e 7% no estágio 2. O meio VW apresentou 14% dos seus protocormos no estágio 1 e 13% no estágio 2 (Figura 2A).

Aos 180 dias após a semeadura, as culturas já apresentaram protocormos em estádios 4 (Figura 1 D), sendo o meio MS aquele que apresentou a maior porcentagem de plantas com raízes (19%), e foi estatisticamente semelhante à porcentagem verificada no meio MS ½ (14%). Os demais meios de cultivo apresentaram porcentagem de plantas com raízes inferiores e iguais a 2,5% no meio VW e 1% no meio K, que por sua vez, foi o que apresentou a maior porcentagem de protocormos em estágio 3 (90%) (Figura 2B).

De acordo com Caldas et al. (1998), as formas inorgânicas de nitrogênio atuam de forma marcante sobre o crescimento e desenvolvimento em cultura de tecidos. Sabe-se que o nitrato sustenta boa taxa de crescimento em muitas espécies. No entanto, há espécies que não se desenvolvem bem quando este elemento atua. Embora a relação amônio: nitrato ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$) seja relatada por Gamborg (1970) como um dos fatores que atuam na germinação *in vitro* de orquídeas, observou-se nesse trabalho que ela também pode ser responsável pelo desenvolvimento inicial de *M. flavescens*.

Enquanto os meios K e VW apresentam um teor de N total variando entre 8,0 a 9,0 mM, os meios MS e MS ½, contém, respectivamente, 60,0 e 30,0 mM (tabela 1). Entretanto, vale destacar que, mesmo nos meios onde o teor de N total é menor, o desenvolvimento de plantas com raízes, aos 180 dias após a semeadura, foi observado (Figura 2B).

Em relação à formação e emissão de raízes, os meios MS e MS ½ sobressaíram-se e proporcionaram às plantas de *M. flavescens* o bom desenvolvimento do sistema radicular (Figura 2B). Nestes meios, a concentração de nitrato em relação ao amônio é maior, o que por sua vez, beneficiou o enraizamento. O efeito prejudicial do amônio sobre a formação das raízes foi relatado por Kerbauy (1993) em plantas de *Oncidium varicosum* e por Tavares et al. (2012), em plantas de *Phalaenopsis amabilis*, cultivadas por um ano, em diferentes concentrações de nitrato e amônio.

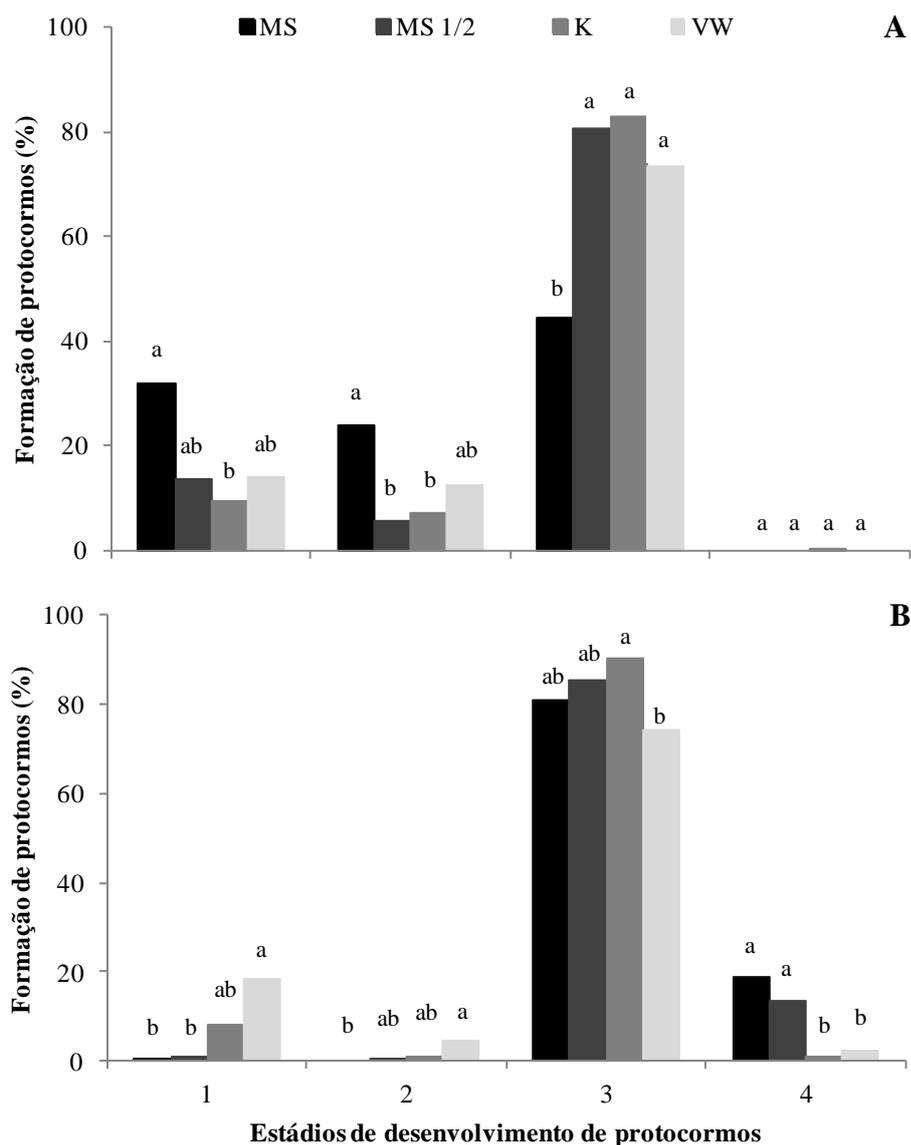


FIGURA 2. Desenvolvimento inicial de protocormos de *Miltonia flavescens* Lindl. em diferentes meios de cultivo. A) cento e vinte dias após a semeadura *in vitro* e B) cento e oitenta dias após a semeadura *in vitro*. Estádio 1 = protocormo clorofilado; estágio 2 = protocormo com formação da primeira folha; estágio 3 = protocormo com duas ou mais folhas; estágio 4 = plântula com folhas e uma ou mais raízes. MS (Murashige & Skoog, 1962); K (Knudson, 1946); VW (Vacin Went, 1949).

Os benefícios da formulação MS e MS ½ também foram observados por Lo et al. (2004), os quais verificaram que o número máximo de plântulas desenvolvidas a partir de cápsulas de *Dendrobium tosaense* Makino, com 12 semanas de idade foi obtido com o cultivo em meio MS½ aos 112 dias após a semeadura, além do maior número de protocormos clorofilados verificados nos meios MS e MS ½. Em contrapartida, os meios K e VW sequer permitiram a formação de protocormos. Estes

resultados contrastam com os observados por Suzuki et al. (2010) em plantas de *Cattleya bicolor*, as quais apresentaram a maior porcentagem de indivíduos com raízes quando cultivados por 180 dias no meio VW, seguido pelo K, e por último o meio MS. Em plantas de *Hadrolaelia tenebrosa* Suzuki et al. (2009) não verificaram sequer a formação de plantas com raízes no meio MS, aos 180 dias após a semeadura

CONCLUSÕES

Os resultados observados em *M. flavescens* indicaram que os meios MS e MS ½ promoveram a maior porcentagem de germinação e também foram os mais eficazes no crescimento inicial dos protocormos, e podem ser recomendados em protocolos que objetivam a produção e perpetuação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. p. 87-132.
- CAMPOS, D.M. **Orquídea: manual prático de reprodução**. 3 ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.
- FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.3**. Lavras: UFLA, DEX/UFLA, 2010.
- GAMBORG, O.L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, v. 45, p. 372-375, 1970.
- IMES, R. **Orchids: the illustrated identifier to over 100 cultivated varieties**. London: Apple, 1997. 80 p.
- KERBAUY, G.B. Indução *in vitro* de protocormóides em raízes de *Oncidium varicosum*. Efeito de fontes nitrogenadas, auxinas e citocininas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 16, p. 1-8, 1993.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.
- LO, S.H.; NALAWADE, S.M.; KUO, C.L.; CHEN, C.L.; TSAY, H.S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, v. 40, p. 528-535, 2004.

MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T.S. Propagação da orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1319-1324, 2001.

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.

SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; CANAZZA, M.M.; SORGATO, J.C.; ROSA, D.B.C.J.; ROSA, C.B.C.J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 24, n. 3, p. 226-233, 2012.

STEWART, J. Orchid propagation by tissue culture techniques – past, present and future. In: H. W. Pritchard (ed.). **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press: Cambridge, 1989. p. 147-183.

STOUTAMIRE, W.P. Seeds and seedlings of native orchids. **Michigan botanist**, v. 3, p. 107-119, 1964.

SUTTLEWORTH, F.S.; ZIM, H.S.; DILON, G.W. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. Tradução: LEMA FILHO, J.G., Editora Expressão e Cultura, Rio de Janeiro, 1994. 158p.

SUZUKI, R.M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W.M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 4, p. 731-742, 2010.

SUZUKI, R.M.; MOREIRA, V.C.; NACABASHI, M.; FERREIRA, W.M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V. P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 657-666, 2009.

TAVARES, A.R.; YOUNG, J.L.M.; ORI, S.S.; KANASHIRO, S.; LIMA, G.P.P.; CHU, E.P.; SUZUKI, R.M. Orchid *in vitro* growth as affected by nitrogen levels in the culture médium. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 119-124, 2012.

VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, 1949.

CAPITULO II - MEIOS DE CULTIVO E SACAROSE NO CRESCIMENTO INICIAL *IN VITRO* DE *Miltonia flavescens* LINDL (ORHIDACEAE).

RESUMO

O cultivo *in vitro* tem sido amplamente utilizado para a 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. Desta forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o crescimento inicial de *Miltonia flavescens* Lindl, cultivada por 90 e 180 dias, em quatro meios de cultivo suplementados com diferentes concentrações de sacarose. Plantas com 12 meses e germinadas *in vitro* foram cultivadas nos meios MS, MS ½, K e VW suplementados com 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 6,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e com 25, 30, 35, 40 e 45 g L⁻¹ de sacarose. As plantas foram cultivadas em sala com fotoperíodo e temperatura controlados (12 h; 25 °C ± 2) e aos 90 e 180 dias de cultivo foram avaliadas quanto à massa fresca, ao 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 25 g L⁻¹ de sacarose. O maior comprimento de raiz foi verificado nas plantas cultivadas por 180 dias em meio MS suplementado com 45 g L⁻¹ de sacarose. Já o número de brotos e de folhas não foram influenciados pelas concentrações de sacarose e as menores médias foram obtidas nas plantas cultivadas em meio MS. *M. flavescens* apresentou maior crescimento quando cultivada por 180 dias em meio MS ½ suplementado com 25 g L⁻¹ de sacarose.

Palavras-chave: Açúcar, orquídea, 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 and *in vitro* germinated

were cultured on MS, MS ½ K and VW media supplemented with 1.5 g L⁻¹ of activated charcoal, 6.5 g l⁻¹ bacteriological agar and 25, 30 35, 40 and 45 g L⁻¹ sucrose. The plants grew up in a room with controlled temperature and photoperiod (12 h, 25 ° C ± 2) and at 90 and 180 days were evaluated for fresh mass, the number of roots, leaves and shoots, the length shoot and the largest root. 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 25 g L⁻¹ sucrose. The greater length of roots was observed in plants grown for 180 days on MS medium supplemented with 45 g L⁻¹ sucrose. The number of shoots and leaves were not affected by sucrose concentrations and the lowest averages were obtained in MS medium.

Keywords: carbohydrate, orchid, 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 (MURASHIGE e SKOOG, 1962; KNUDSON, 1946; VACIN WENT, 1949; CAMPOS 2002) necessários à germinação e ao desenvolvimento *in vitro*.

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 este 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. 2013), 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. 2013).

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

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), durante o período de abril a outubro de 2013.

Foram utilizadas plantas de *Miltonia flavescens* Lindl., com aproximadamente seis folhas, 1,5 cm 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), geleificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (C₆H₁₂O₆) P.A. (Dinâmica®, Brasil).

Para o estudo dos diferentes meios de cultivo no crescimento das plantas foram utilizados os meios MS, MS½, K (KNUDSON, 1946), VW (VACIN WENT, 1949), acrescidos de 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 6,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e de 25, 30, 35, 40 e 45 g L⁻¹ de sacarose (C₆H₁₂O₆) P.A. (Dinâmica®, Brasil). 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 20 mL de meio de cultivo e foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm 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 $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W 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 (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 arrançados em esquema de parcela sub-subdividida, sendo alocado na parcela os meios de cultivo, na subparcela as concentrações de sacarose e na sub-subparcela os tempos de cultivo, com 8 repetições de um frasco cada. As características vegetais foram submetidas à análise de variância com o auxílio do programa Sisvar (FERREIRA, 2010). 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 estudados, o meio de cultura foi o que mais influenciou isoladamente as variáveis estudadas. Efeito conjunto dos três fatores foi observado sobre o número de raízes, 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 enquanto que o número de folhas só foi sensível ao efeito isolado dos meios de cultura (Quadro 1)

QUADRO 1. Resumo das análises de variância no número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de brotos (NB), Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF) e massa fresca total (MFT) de *Miltonia flavescens* Lindl., cultivada por 90 e 180 dias em diferentes meios de cultivo e concentrações de sacarose. Dourados, UFGD, 2013

FV	GL	Quadrados Médios					
		NR	CMR	NB	CPA	NF	MFT
MEIO	3	3,84 ^{**}	0,11 ^{ns}	0,24 [*]	0,06 [*]	0,98 [*]	0,0045 ^{**}
erro 1	8	0,49	0,03	0,05	0,01	0,18	0,0002
SAC	4	0,35 ^{ns}	0,16 ^{**}	0,20 [*]	0,08 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,0009 ^{ns}
MEIO*SAC	12	0,57 ^{ns}	0,08 ^{**}	0,17 ^{**}	0,03 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,0022 ^{**}
erro 2	40	0,96	0,04	0,63	0,03	0,42	0,0007
TC	1	12,57 ^{**}	2,73 ^{**}	0,34 ^{ns}	5,52 ^{**}	0,06 ^{ns}	0,0577 ^{**}
MEIO*TC	3	0,24 ^{ns}	0,03	0,65 ^{**}	0,07 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,0039 [*]
SAC*TC	4	0,51 ^{ns}	0,22 ^{**}	0,05 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,0003 ^{ns}
MEIO*SAC*TC	12	2,02 [*]	0,12 [*]	0,18 ^{ns}	0,07 [*]	0,88 ^{ns}	0,0022 [*]
erro 3	32	0,84	0,05	0,10	0,03	0,60	0,0009
CV (%)		34,74	15,30	25,39	9,73	20,07	2,83
Média Geral		7,05	1,13 cm	0,69	2,13 cm	14,57	0,13g

^{**} significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste Tukey

^{*} significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey

^{ns} não significativo

SAC = Sacarose / TC = Tempo de cultivo

A Figura 1 representa o comportamento 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 enraizamento se deu no meio MS ½ suplementado com 25 g L⁻¹ de sacarose, resultando em aproximadamente 14 raízes/planta, praticamente o dobro da média obtida aos 90 dias. Neste meio de cultivo, à medida que a concentração de sacarose aumentou, o número de raízes reduziu. Nos demais meios testados, esta 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).

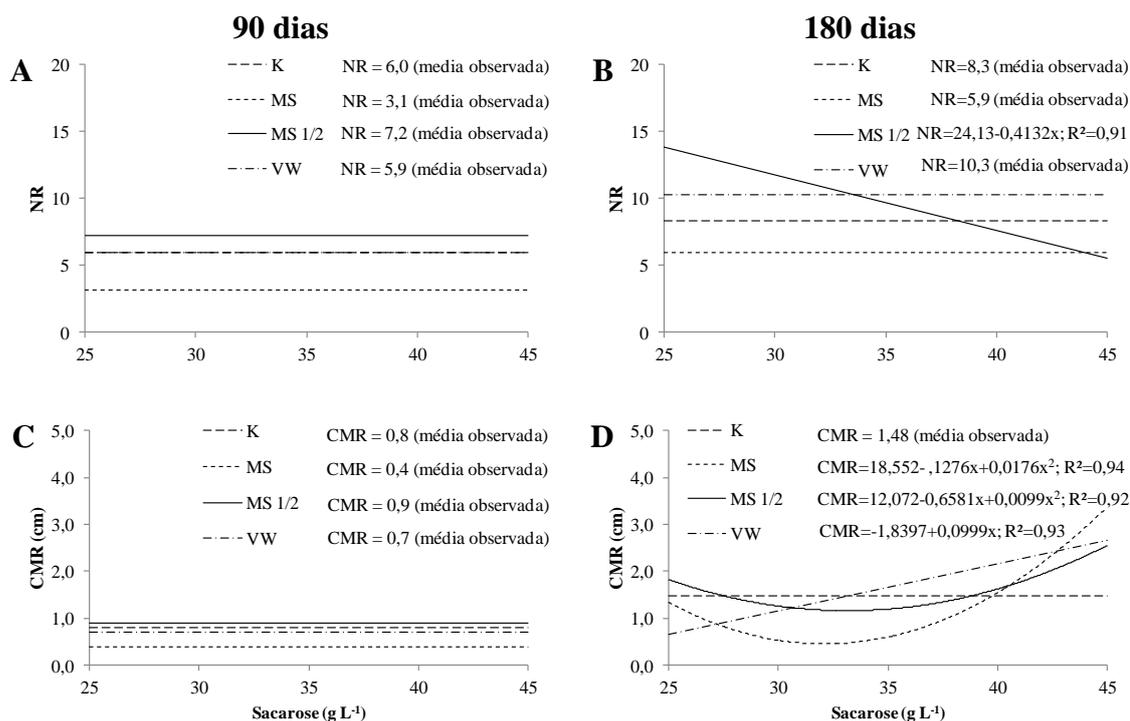


FIGURA 1. Sistema radicular de *Miltonia flavescens* Lindl. em diferentes meios de cultivos e concentrações de sacarose. NR = Número de raízes (A e B). CMR = Comprimento de maior raiz (C e D). MS (Murashige & Skoog, 1962); K (Knudson, 1946); VW (Vacin Went, 1949). Dourados-MS, UFGD, 2013.

Segundo Thorpe et al. (2008) meios que contém altos níveis de sais, como por exemplo o MS, frequentemente inibem a iniciação de raízes e devem ser substituídos por meios que contem baixos níveis, como o MS ½, 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 isto 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. (2013), verificaram que o número de raízes em *Cattleya loddigesii* Lindley cultivada em meio MS ½ por 90 dias foi reduzido em concentrações de 30 e 40 g 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 ½ (0,9 cm) e a menor no meio MS (0,4 cm). Aos 180 dias, de maneira geral, as altas concentrações de sacarose nos meios MS, MS ½ 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 (3,4 cm) foi obtido nas plantas cultivadas em meio MS suplementado com 45 g L⁻¹ de sacarose (Figura 1D).

Os resultados de crescimento da raiz sugerem uma mudança na alocação da biomassa, induzida pela concentração de sacarose no meio. Enquanto as baixas concentrações do açúcar favorecem a indução das raízes, as altas concentrações favorecem o crescimento radicular.

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, independentemente do meio de cultivo, o comprimento da parte aérea não foi influenciado pelas concentrações de sacarose, sendo a maior média calculada igual a 1,5 cm, obtida em meio K (Figura 2A). Aos 180 dias, observou-se que o maior comprimento da parte aérea calculada (3,78 cm) foi obtida quando as plantas foram cultivadas em meio MS ½ suplementado com 25 g L⁻¹ de sacarose e, à medida que a concentração do açúcar se elevou, a altura das plantas foi reduzida (Figura 2B). Nos demais meios de cultivo, as diferentes concentrações de sacarose não influenciaram esta variável.

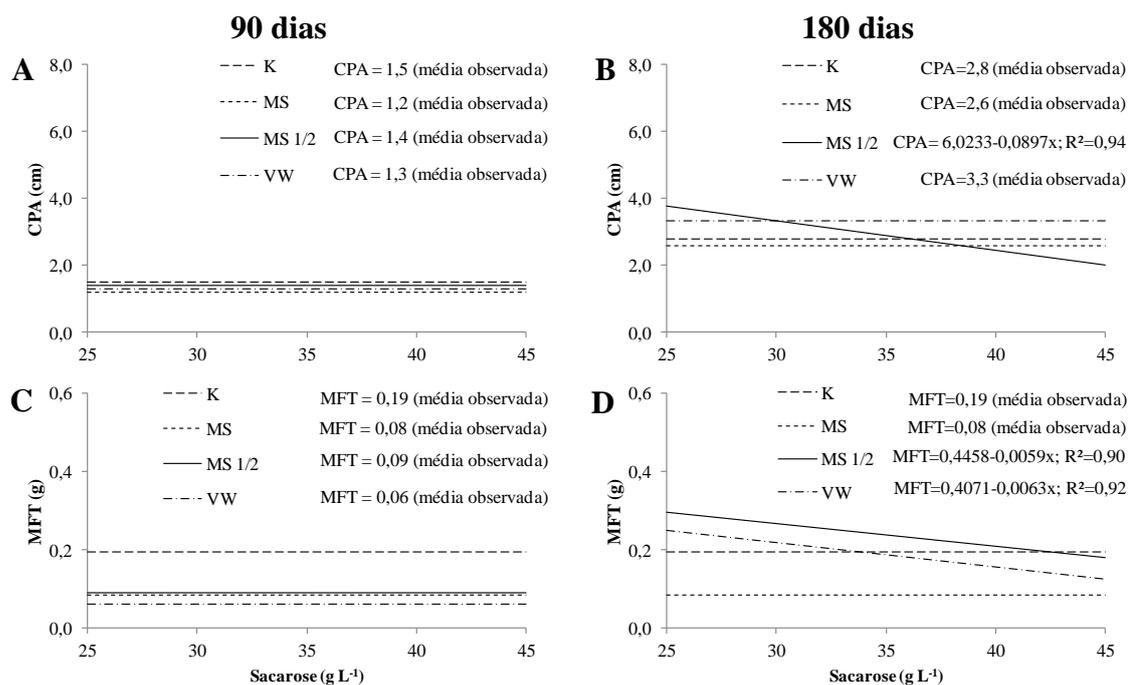


FIGURA 2. Parte aérea de *Miltonia flavescens* Lindl. em diferentes meios de cultivos e concentrações de sacarose. CPA = Comprimento da parte aérea (A e B). MFT = Massa fresca total (C e D). MS (Murashige & Skoog, 1962); K (Knudson, 1946); VW (Vacin Went, 1949). Dourados-MS, UFGD, 2013.

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 ½ suplementado com 25 g 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.

Em relação o 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 (Quadro 2).

Aos 90 dias, independentemente da concentração de sacarose utilizada, não houve diferença na taxa de brotação das plantas cultivadas nos diferentes meios de cultivo. Entretanto, aos 180 dias, as plantas cultivadas em meio MS ½ 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 media observada no meio VW (Quadro 2).

QUADRO 2. Número de brotos de *Miltonia flavescens* Lindl. observados 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).

O Quadro 3 ilustra o comportamento do número de folhas de *M. flavescens* nos diferentes meios estudados, independente da concentração de sacarose e o tempo de cultivo.

QUADRO 3. Número de folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. observadas 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)

A maior média de número de folhas ocorreu no meio MS½ (15,9), que foi estatisticamente semelhante aos meios VW e K. O meio MS diferiu do meio MS½, apresentando o menor valor médio da variável (12,7).

Sabe-se que a água movimenta-se 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 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, APA, NB e NF 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 nesse trabalho concordam com os obtidos por Galdiano Junior et al., (2013) em plantas de *Cattleya loddigesii* cultivadas por 90 dias em meio MS, suplementado com concentrações de sacarose, os quais observaram que concentrações entre 20 e 22 g 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 31 g L⁻¹ de sacarose e que concentrações superiores propiciaram redução nos crescimento (GALDIANO JUNIOR et al., 2013).

CONCLUSÕES

Em vista dos resultados observados conclui-se *M. flavescens* apresentou maior crescimento quando cultivada por 180 dias em meio MS ½ suplementado com 25 g L⁻¹ de sacarose e que tais informações são relevantes do ponto de vista de perpetuação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMO, S. O.; FINNIE, J. F.; VAN STANDEN, J. In vitro propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 96, p. 273-278, 2009.

BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; BONETT, L. P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 9-13, 2010.

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

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.3**. Lavras: UFLA, DEX/UFLA, 2010.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T.; LEMOS, E. G. M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 583-592, 2013.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; CASSANO, A. O.; LEMOS, E. G. M. 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, 2013.

IMES, R. **Orchids: the illustrated identifier to over 100 cultivated varieties**. London: Apple, 1997. 80 p.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

MULLER, T.S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S. Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 252-254, 2007.

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, v.1, 2001. 74p.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E. C.; KLERK; G. J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E. F. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed, v. 1, 2008. 501p.

VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, 1949.

CAPITULO III - BAP E ANA NA INDUÇÃO E CRESCIMENTO DO SISTEMA RADICULAR DE *Miltonia flavescens* Lindl (ORCHIDACEAE).

RESUMO

As auxinas e citocininas são as classes de hormônios vegetais mais utilizadas no cultivo *in vitro*. Entretanto, informações sobre a interação entre estes hormônios ainda são escassas para o cultivo de *Miltonia flavescens* Lindl (Orchidaceae). Por esta razão, objetivou-se com este trabalho avaliar a relação citocinina: auxina no desenvolvimento radicular de *M. flavescens* cultivada por 90 e 180 dias em meio de cultura suplementado com BAP e ANA. Plantas com idade de 12 meses e germinadas *in vitro* foram cultivadas em meio MS ½ suplementado com 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, 25 g L⁻¹ de sacarose e com concentrações de ANA (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ou 8,0 mg L⁻¹) combinadas às concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ou 8,0 mg L⁻¹). As plantas foram cultivadas em sala com fotoperíodo e temperatura controlados (12 h; 25 °C ± 2) e aos 90 e 180 dias de cultivo foram avaliadas quanto ao número de raízes, comprimento da maior raízes e massa seca da raiz. O maior número de raízes e massa seca de raízes foram observados nas plantas cultivadas por 180 dias em balanço hormonal com maior concentração de auxina em relação à citocinina. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se a relação citocinina:auxina favorável à auxina atua de forma decisiva sobre o crescimento do sistema radicular desta espécie, quando cultivada *in vitro* em meio MS ½ por 180 dias .

Palavras-chave: citocinina, auxina, enraizamento, orchidaceae

ABSTRACT

Auxins and cytokinins are plant hormones used *in vitro* culture. However, information about the interaction of these hormones and their relationships in orchid cultivation are still few. For this reason, the aim of this work was to evaluate the relationship cytokinin: auxin in root development of *Miltonia flavescens* grown for 90 and 180 days in culture medium supplemented with BAP and NAA. Plants aged 12 months and *in vitro* germinated were grown in ½ MS medium supplemented with 1.5 g L⁻¹ of activated charcoal, 5.5 g L⁻¹ bacteriological agar, 25 g L⁻¹ sucrose concentrations and NAA (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 or 8.0 mg L⁻¹) in combination with BAP (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 or 8.0 mg

L⁻¹). The plants grew up in a room with controlled temperature and photoperiod (12 h, 25 ° C ± 2) and at 90 and 180 days were evaluated on the number of roots, the greater root length and root dry mass. The largest number of roots and root mass were observed in plants grown for 180 days in hormonal balance with the highest concentration of auxin in relation to cytokinin. However, the greater root growth was observed in plants grown for 90 days in hormonal balance with the highest concentration of cytokinin relative to auxin.

Key-words: cytokinin, auxin, root, orchid

INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* tem sido amplamente utilizado para a propagação de plantas ornamentais, pois apresenta vantagens sobre os métodos convencionais de propagação, como a multiplicação rápida e obtenção de grande número de plantas com alta qualidade genética e fitossanitária (PASQUAL et al., 2008), sendo indicado para suprir a demanda do mercado e ainda minimizar as coletas predatórias de orquídeas.

O sucesso desse método consiste não apenas na germinação das sementes e no desenvolvimento das plantas, mas também na emissão de um sistema radicular vigoroso uma vez que a eficiência no cultivo *ex vitro* é aumentada quando se estimula a formação de maior quantidade de raízes em plantas cultivadas *in vitro* (DEWIR et al., 2005).

As auxinas são responsáveis pelo aumento consistente da formação de primórdios radiculares em tecidos que naturalmente apresentam predisposição ao enraizamento (HAISSING, 1972) e o ácido alfa-naftaleno acético (ANA) é uma auxina sintética utilizada em diversas técnicas e protocolos para o enraizamento de culturas (MERCIER, 2004).

As citocininas, por sua vez, relacionam-se com quase todos os aspectos do desenvolvimento, promovendo nas plantas divisão, alongamento e diferenciação celular, retardando a senescência, promovendo a quebra da dominância apical e induzindo proliferação de gemas axilares (TAIZ e ZEIGER, 2009). A benzilaminopurina (BAP), é uma citocinina que tem sido amplamente utilizada no cultivo *in vitro* (SOARES et al., 2012; STEFANELLO et al., 2009).

Não apenas a ação isolada desses reguladores de crescimento, mas as suas interações e a relação quantitativa de suas concentrações interferem no desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro* (MERCIER, 2004; STADEN et al. 2008).

Informações sobre a interação desses hormônios vegetais e suas relações em espécies da família Orchidaceae ainda são insuficientes, entretanto se fazem necessárias uma vez que a otimização do processo de cultivo *in vitro* propicia redução nos custos de produção e contribue para elaboração de protocolos para multiplicação *in vitro* inclusive de espécies em risco de extinção. Dentre estas espécies encontra-se a *Miltonia flavescens* Lindl. (IMES, 1997), uma orquídea muito apreciada pela beleza de suas flores e pelo seu alto valor comercial.

Em vista do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a relação citocinina: auxina no desenvolvimento radicular de *Miltonia flavescens* cultivada por 90 e 180 dias em meio de cultura suplementado com BAP e ANA.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), durante o período de setembro de 2011 a março de 2012.

Foram utilizadas plantas de *Miltonia flavescens* Lindl., com três folhas, 5 mm de comprimento de parte aérea e providas de sistema radicular com 3mm de comprimento, germinadas e cultivadas *in vitro*, por 12 meses, em meio Murashige e Skoog (1962) na metade da concentração de seus componentes (MS ½), geleificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (C₆H₁₂O₆) P.A. (Dinâmica®, Brasil).

Para a avaliação das concentrações dos reguladores de crescimento, foi utilizado o meio de cultura MS½ acrescido de 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia), 25 g L⁻¹ de sacarose (C₆H₁₂O₆) P.A. (Dinâmica®, Brasil) e das concentrações de ANA (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ou 8,0 mg L⁻¹) isoladas e combinadas às concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ou 8,0 mg L⁻¹), ambos da Neon®, totalizando 36 tratamentos. Após a etapa de preparo, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 utilizando KOH (0,1M). Frascos plásticos com tampa rosqueável e capacidade para 100 mL receberam 20 mL de meio de cultura e foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios de cultura efetuou-se a transferência, em ambiente asséptico, de três plantas de *M. flavescens* por frasco. Ao término da transferência, os frascos foram tampados e as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada (Figura 1).



FIGURA 1. Cultivo *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. A) Sala de crescimento com temperatura, radiação e fotoperíodo controlados; B) Frascos de cultivo; C) Plantas de *M. flavescens* com 12 meses de idade. Barra de escala: 10 cm (A); 5 cm (B); 1 cm (C) – foto de Camila S. R. Lemes.

As plantas foram cultivadas por até 90 ou 180 dias e, ao término de cada período de cultivo, foram removidas dos frascos, lavadas em água corrente, até a total remoção do meio de cultivo e separadas em parte aérea e sistema radicular com o auxílio de um bisturi. A seguir o sistema radicular foi avaliado quanto ao número de raízes, comprimento da maior raiz e massa seca da raiz. Para a avaliação da massa seca as raízes foram mantidas em estufa de circulação forçada a 68°C até massa constante.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjados em esquema de parcelas sub-subdivididas, sendo alocadas nas parcelas as seis concentrações de BAP, nas subparcelas as seis concentrações de ANA e na sub-subparcelas os dois tempos de cultivo com quatro repetições constituídas de dois frascos de cultivo. As características vegetais foram submetidas à análise de variância com o auxílio do programa SAEG (RIBEIRO JUNIOR, 2001). Os fatores qualitativos foram comparados pelo teste de t de Student até 5% e os quantitativos por análise de regressão.

A relação citocinina: auxina foi calculada para cada uma das variáveis, levando-se em consideração seus valores máximos calculados por meio das equações de regressão ajustadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo de cultivo (TC), as concentrações de BAP e de ANA atuaram em conjunto ($p < 0,01$), sobre todas as variáveis estudadas. Em relação aos efeitos isolados dos fatores estudados, apenas o BAP não influenciou significativamente ($p > 0,05$) o desenvolvimento do sistema radicular de *M. flavescens* (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo das análises de variância do número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e da massa seca (MSR) de *Miltonia flavescens* Lindl. Dourados-MS, UFGD, 2012

F.V.	Quadrados médios			
	G.L.	NR	CMR	MSR
BAP	5	0,27 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,38 ^{ns}
Erro 1	18	0,16	0,28	0,27
ANA	5	0,35*	0,62**	0,91**
BAP x ANA	25	0,62**	0,86**	2,61**
Erro 2	108	0,11	0,18	0,25
TC	1	1,65**	0,77*	85,02**
TC x BAP	5	0,08 ^{ns}	0,53**	1,21**
TC x ANA	5	0,31**	0,41*	1,20**
TC x BAP x ANA	25	0,36**	0,59**	2,06**
Erro 3	90	0,10	0,15	0,21
CV(%)		22,8	10,2	12,1
Média Geral		1,30	0,54 cm	0,58 mg

** significativo, ao nível de 1% de probabilidade; * significativo, ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo pelo teste F.

TC= tempo de cultivo; BAP = benzilaminopurina; ANA= ácido alfa-naftaleno acético

De maneira geral, as plantas cultivadas por 180 dias, apresentaram número médio de raízes igual a 1,63, valor este estatisticamente superior ao apresentado pelas plantas cultivadas por 90 dias (0,97). Embora as plantas cultivadas por 180 dias apresentassem maior número de raízes, o comprimento médio das mesmas (0,50 cm) não diferiu estatisticamente daquelas cultivadas por 90 dias (0,57 cm).

Em decorrência do sistema radicular das plantas de *M. flavescens* cultivadas ser formado por raízes muito finas e de tamanho reduzido, o maior número de raízes observado em plantas cultivadas por 180 dias não implicou que as mesmas apresentassem massa seca do sistema radicular superior àquelas plantas cultivadas por 90 dias. O valor médio da massa seca das plantas cultivadas por 90 dias foi de 1,06 mg, e das cultivadas por 180 dias foi de 0,55 mg.

Quando se avalia o efeito conjunto dos reguladores de crescimento em cada período de cultivo verifica-se que o número de raízes das plantas de *M. flavescens*

cultivadas por 90 dias apresentou resposta quadrática em função das concentrações de BAP e ANA (Figura 2A), enquanto que aquelas cultivadas até 180 dias apresentaram número de raízes linear e crescente à medida que a concentração dos reguladores de crescimento aumentou (Figura 2B).

Os resultados apresentados pelas plantas cultivadas por 90 dias demonstram que o maior número de raízes (1,7) seria obtido utilizando-se 5,1 mg L⁻¹ de BAP combinado com 3,8 mg L⁻¹ de ANA, sendo que em concentrações diferentes houve redução nesses valores (Figura 2A). Para as plantas que foram cultivadas até 180 dias o número de raízes formadas foi 2,5, resultante da combinação entre 8,0 mg L⁻¹ de BAP e 8,0 mg L⁻¹ de ANA (Figura 2B).

Muito se sabe sobre a importância de um sistema radicular bem desenvolvido. Segundo Kerbauy (1998), o enraizamento é essencial porque garante a sobrevivência das plantas na fase *ex vitro* uma vez que as raízes das orquídeas além de fixarem as plantas no substrato, também armazenam água e minerais através do velame e do complexo exoderme-velame, pois estas estruturas funcionam como uma esponja, reduzindo a perda de água por transpiração nos períodos de intervalos entre as regas (BENZING et al.,1982).

Quanto maior a concentração de ANA, maior o número de raízes aos 90 e 180 dias. De acordo com Mercier (2004), o enraizamento requer quantidades diferenciadas de auxinas dependendo da fase organogenética em que se encontra a planta. Na fase inicial, de indução e formação, seu requerimento é elevado, pois atuará como um sinal para se iniciar a divisão celular e a formação do novo meristema.

A maior demanda por ANA (8,0 mg L⁻¹) pelas plantas cultivadas por 180 dias, possivelmente, foi o motivo pelo qual estas plantas apresentaram o maior valor calculado de raízes (2,5) cerca de 1,5 vezes maior do que o máximo valor calculado (1,7) para plantas cultivadas por 90 dias, as quais, por sua vez, necessitaram de uma concentração menor (3,8 mg L⁻¹) do regulador. O efeito benéfico das altas concentrações de auxina sobre o desenvolvimento radicular também foi relatado por Johnson e Eminio (1979), os quais, estudando plantas de *Mammillaria elongata*, observaram que a iniciação de raízes foi otimizada por altos níveis de auxina.

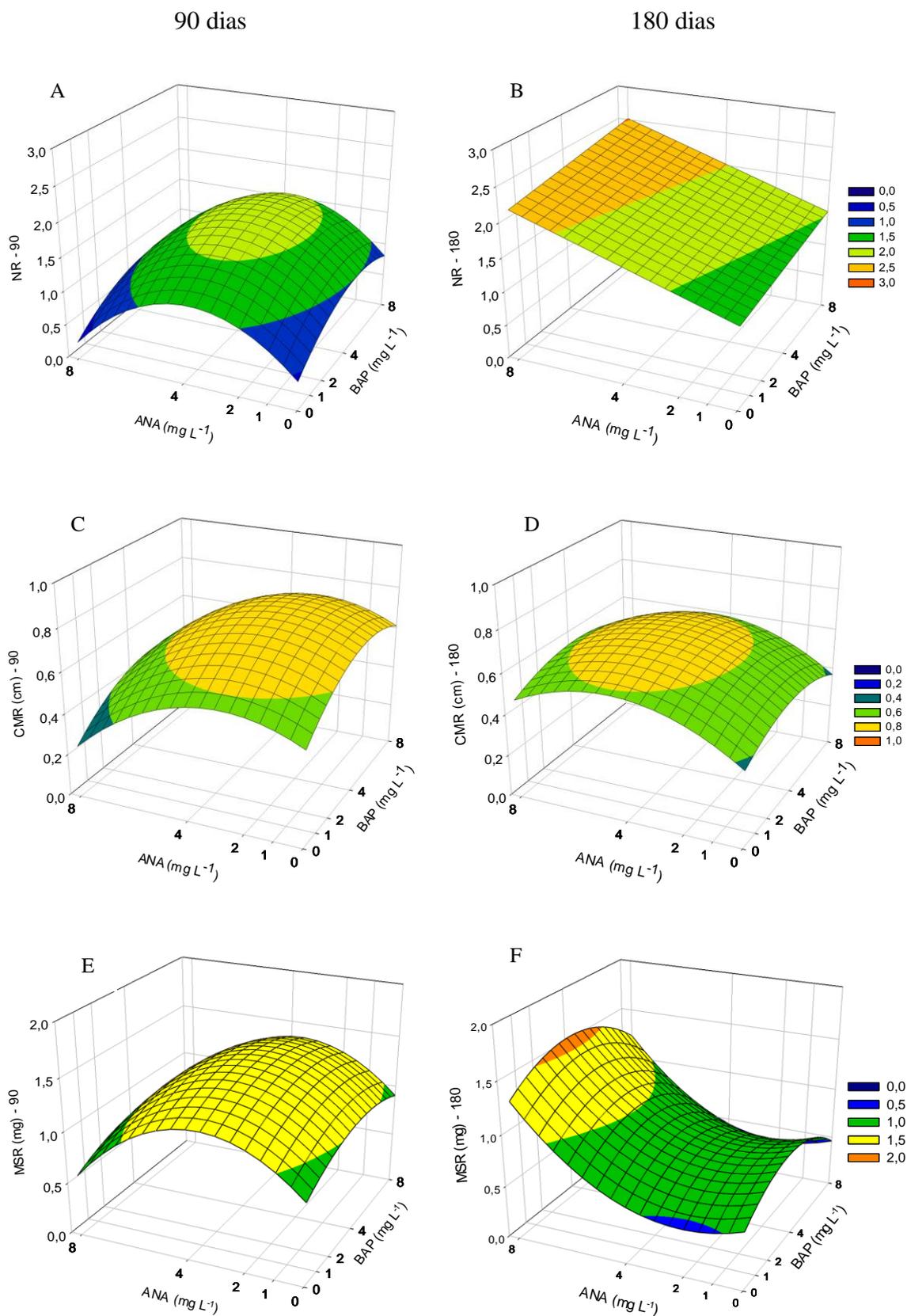


FIGURA 2. Sistema radicular de *Miltonia flavescens* Lindl. na presença de BAP e ANA. NR= número de raízes; CMR= comprimento de maior raiz. MSR= massa seca de raízes.. Dourados-MS, UFGD, 2012.

O Quadro 2 apresenta a equação da curva, o valor de R^2 e a significância do teste F da Figura 2.

QUADRO 2. Equação da curva, valor de R^2 e significância do teste F para número de raízes (NR); comprimento da maior raiz (CMR) e massa seca da raiz (MSR) de *Miltonia flavescens* Lindl. cultivada por 90 e 180 dias em função das concentrações de BAP e ANA. Dourados-MS, UFGD, 2012

A	NR= 0,4279+0,2253BAP+0,3900ANA-0,0222BAP ² -0,0514ANA ² ; $R^2= 0,96$; $p= 0,01$
B	NR= 1,2168+0,0383BAP+0,1242ANA+5,0389 ⁻¹⁸ BAP ² +1,0215 ⁻¹⁷ ANA ² ; $R^2= 0,95$; $p= 0,01$
C	CMR= 0,4621+0,0854BAP+0,0681ANA-0,0084BAP ² -0,0118ANA ² ; $R^2= 0,98$; $p= 0,01$
D	CMR= 0,3715+0,0483BAP+0,0933ANA-0,0061BAP ² -0,0099ANA ² ; $R^2= 0,85$; $p= 0,01$
E	MSR= 0,7965+0,1058BAP+0,2456ANA-0,0115BAP ² -0,0338ANA ² ; $R^2= 0,90$; $p= 0,01$
F	MSR= 0,5618+0,1434BAP-0,1019ANA-0,0195BAP ² +0,0248ANA ² ; $R^2= 0,93$; $p= 0,01$

A, C, E = 90 dias de cultivo; B, D, F = 180 dias de cultivo

Entretanto, dependendo da espécie e das suas condições de cultivo, altas concentrações de auxina podem ser prejudiciais ao desenvolvimento radicular. Souto et al. (2010) estudaram diferentes concentrações de ANA no enraizamento de *Cattleya bicolor* em meio Knudson C e, ao final de 360 dias, concluíram que 2 mg L⁻¹ de ANA inibiu a formação de raízes.

Muitos fatores estão envolvidos na formação do sistema radicular das plantas, porém, a interação entre os fitormônios é muito importante e não somente a sua contribuição individual. O Quadro 3 apresenta os valores máximos do número de raízes, comprimento da maior raiz e massa seca das raízes de *M. flavescens*, cultivada por 90 ou 180 dias, calculados a partir das equações apresentadas na Figura 1, em função das concentrações de BAP e ANA. Também é apresentada a relação citocinina:auxina estabelecida para cada variável em função das concentrações demandadas para a obtenção dos seus maiores resultados.

Ainda a respeito do número de raízes, observou-se que o balanço hormonal citocinina:auxina (C:A) foi favorável à citocinina (1,34) nas plantas cultivadas por 90 dias, sendo este o resultado da maior necessidade de BAP em relação ao ANA. Já nas plantas cultivadas por 180 dias, o balanço hormonal C:A foi igual a 1,00 (Quadro 3). Segundo Mercier (2004), balanços hormonais com elevadas proporções de citocinina favorecem a diferenciação de gemas caulinares em detrimento da diferenciação de raízes. Desta forma, os resultados apresentados sugerem que, para plantas de *M. flavescens* cultivadas por 180 dias, o meio de cultura deve oferecer um balanço

hormonal C:A tendendo ao equilíbrio, possibilitando, desta forma, a maior chance de formação de raízes.

QUADRO 3. Valores máximos calculados para número de raízes (NR); comprimento da maior raiz (CMR) e massa seca da raiz (MSR) de *Miltonia flavescens* Lindl. cultivada por 90 e 180 dias em função das concentrações de BAP e ANA e a relação citocinina:auxina (C:A). Dourados-MS, UFGD, 2012

90 dias			
	BAP (mg L⁻¹)	ANA (mg L⁻¹)	C:A
NR= 1,7	5,1	3,8	1,34
CMR= 0,8cm	5,1	2,9	1,76
MSR= 1,5 mg	4,6	3,6	1,28
180 dias			
NR= 2,5	8,0	8,0	1,00
CMR= 0,7 cm	3,9	4,7	0,83
MSR= 1,6 mg	3,7	8,0	0,46

As Figuras 2C e 2D apresentam os resultados do comprimento da maior raiz (CMR) de *M. flavescens* cultivadas por 90 ou 180 dias. Resposta quadrática dessa variável em função das concentrações de BAP e ANA foi observada nos dois grupos de plantas estudados.

Para as plantas cultivadas por 90 dias, o CMR calculado foi de 0,8 cm, obtido com a utilização de 5,1 mg L⁻¹ de BAP combinada com 2,9 mg L⁻¹ de ANA, sendo que valores superiores acarretaram decréscimos nessa variável (Figura 2C). Nas plantas cultivadas até 180 dias, o CMR calculado foi de 0,7 cm obtido combinando-se 3,9 mg L⁻¹ de BAP e 4,7 mg L⁻¹ de ANA (Figura 2D).

Em relação às diferentes concentrações de ANA e sua influência no CMR, verificou-se que as plantas cultivadas por 90 dias apresentaram maior comprimento de raiz necessitando de uma concentração do regulador 1,6 vezes menor do que a concentração requerida pelas plantas cultivadas até 180 dias. Esses resultados podem ser decorrentes do fato de que após a formação do primórdio radicular as elevadas concentrações de auxina, que antes eram necessárias, tornam-se inibitórias ao alongamento da raiz (MERCIER, 2004).

Analisando-se o balanço hormonal C:A estabelecido e a sua influência sobre o comprimento da maior raiz, verificou-se que as plantas que foram cultivadas por 90 dias e que apresentaram raízes mais longas, desenvolveram-se em meio de cultivo mais rico em citocinina do que em auxina (Quadro 1). Entretanto, os resultados observados neste trabalho são contrários às observações feitas por Staden et al. (2008), os quais

afirmam que altas concentrações de citocinina ($0,5 - 10 \text{ mg L}^{-1}$) geralmente inibem ou retardam a formação de raízes, além de evitar o seu crescimento. Ainda de acordo com estes autores, as citocininas geralmente não compõem meios onde serão cultivadas plantas que devem ser enraizadas para posterior aclimatização.

Em relação à massa seca do sistema radicular de *M. flavescens*, observou-se resposta quadrática dessa variável em função das concentrações de BAP e ANA, nos dois tempos de cultivo (Figura 2E, 2F).

Para as plantas cultivadas por 90 dias, o valor máximo calculado foi de 1,5 mg, obtido com a utilização de $4,6 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP combinada com $3,6 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, sendo que valores superiores acarretaram decréscimos nessa variável (Figura 2E). Nas plantas cultivadas por 180 dias, o valor máximo calculado foi de 1,6 mg obtido quando utilizou-se $3,7 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (Figura 2F).

As plantas cultivadas por 180 dias, de modo geral, apresentaram a massa seca de raízes prejudicada por baixas concentrações (até $2,1 \text{ mg L}^{-1}$) de ANA. Entretanto, quando a concentração de ANA foi maior do que $2,1 \text{ mg L}^{-1}$ verificou-se efeito benéfico deste regulador sobre a massa seca das raízes de *M. flavescens*. Os benefícios das concentrações deste regulador sob os valores de massa seca do sistema radicular de orquídeas também foram observados por Souto et al. (2010) em plantas de *Cattleya bicolor*, cultivadas em meio Knudson C acrescido de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg L^{-1} de ANA e cultivadas por 180 dias. De maneira semelhante, Mauro et. al. (1994) cultivando *Cattleya aurantiaca* no meio MS acrescido de 0,1; 1,0 e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA também observaram aumento da massa de raízes na presença do regulador e concluíram que, para esta espécie, a máxima produção de raízes deve ocorrer em meio suplementado com 10 mg L^{-1} de ANA.

A respeito dos balanços hormonais estabelecidos é possível afirmar que as plantas cultivadas por 90 dias requereram concentrações de citocinina sempre maiores do que auxina, diferentemente do verificado nas plantas cultivadas por 180 dias.

De maneira geral, plantas de *M. flavescens* cultivadas por 90 dias em meios de cultivo mais ricos em citocinina do que auxina encontraram ambiente mais adequado para o alongamento de suas raízes. Entretanto, o cultivo de *M. flavescens* por 180 dias fez com que as necessidades hormonais da planta se alterassem, passando a produzir mais raízes e massa seca de raízes na presença de meios mais ricos em auxina.

CONCLUSÃO

Em vista dos resultados observados conclui-se o sistema radicular de plantas de *M. flavescens* desenvolve-se melhor em plantas cultivadas por 180 dias em meios de cultivo que apresentem relação citocinina:auxina favorável à auxina, independente da concentração de hormônios utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENZING, D. H. et al. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velame-exodermis complex. **American Journal Botanic**, Columbus, v. 69, n. 4, p. 608-614, 1982.

DEWIR, Y. H., CHAKRABARTY, D., ALI, M. B., HAHN, E. J. & PAEK, K. Y. Effects of hydroponic solution EC, substrates, PPF and nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. **Plant Growth Regulation**, v. 46, p. 241-251, 2005.

HAISSING, B. E. Meristematic activity during adventitious root primordium development: influences of endogenous auxin and applied gibberelic acid. **Plant Physiology**, v. 49, p. 886-892, 1972.

JOHNSON, J. L.; EMINIO, E. R. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. **HortScience**, v. 14, n. 5, p. 605-606, 1979.

KERBAUY, G. B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A. C. & CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998. p. 161-181.

MAURO, M., SABAPATHI, D. & SMITH, R. A. Influence of ben-zylaminopurine and alpha-naphthaleneacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. **Lindleyana**, v. 9, p. 169-173, 1994.

MERCIER, H. Auxinas, In: KERBAUY, G. B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S. A., 2004. p. 217-249.

MOK, M. C. Cytokinin and plant development – Na overview. In: MOK, D.W. S.; MOK, M. C. (Ed.). **Cytokinins: chemistry, activity and fuction**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 155-166.

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.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 45-49, 2008.

RIBEIRO JR., J.I. **Análises estatísticas no SAEG (Sistema para análises estatísticas)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 617-623, 2012.

SOUTO, J. S.; MORIMOTO, J. M.; FERREIRA, W. M.; NAKABASHI, M.; SUZUKI, R. M. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 179-185, 2010.

STADEN, J. V.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture. 3 ed. v. 1, p. Springer, 2008, p. 205-226.

STEFANELLO, S.; KARSTENM J.; MULLER, T. S.; TOMEZAK, A. P.; BONETT, L. P.; SCHUELTER, A. R. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 53-59, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

CAPITULO IV - ACLIMATIZAÇÃO DE *Miltonia flavescens* Lindl (ORCHIDACEAE)

RESUMO

Embora a técnica do cultivo *in vitro* de plantas esteja bem desenvolvida, muitas espécies não sobrevivem à aclimatização. Avaliou-se o efeito de diferentes níveis e espectros de radiação fotossintética na aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl. Plantas com 18 meses oriundas de sementeira *in vitro* foram plantadas em frascos plásticos contendo substrato composto por esfagno e fibra de coco. Parte destas plantas foi acondicionada em viveiro, sob radiação de $130,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As demais plantas foram submetidas à aclimatização intermediária, por 30 dias, em sala de crescimento, com fotoperíodo e temperatura controlados, sob radiação de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz fluorescente branca) ou $10,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz fluorescente vermelha). Após 30 dias, as plantas que estavam em aclimatização intermediária foram transferidas para o viveiro. Aos 180 dias após a aclimatização, todas as plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência, comprimento da parte aérea e da maior raiz, número de folhas, de raízes e massa fresca. A aclimatização intermediária sob a radiação de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionou a maior média da sobrevivência e da relação entre o comprimento da parte aérea inicial e final. Independentemente se receberam radiação fotossintética de 130; 20 ou $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, as médias da relação entre massa fresca, número de raízes e comprimento da raiz foram superiores a 1,0, indicando que houve desenvolvimento vegetal. Baseado nos resultados observados, conclui-se que a aclimatização intermediária, por 30 dias em sala de crescimento, é benéfica à *Miltonia flavescens*.

Palavras-chave: Orchidaceae, cultivo *ex vitro*, condições de luminosidade

ABSTRACT

Although *in vitro* plant cultivation technique is well developed, many species do not survive the acclimatization. We evaluated the effect of different levels and photosynthetic radiation spectra in the acclimatization of *Miltonia flavescens* Lindl. Plants with 18 months from *in vitro* seeding were planted in plastic bottles containing substrate composed of sphagnum and coconut fiber. Part of these plants was wrapped

nursery, under radiation $130.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The remaining plants were submitted to intermediate acclimatization for 30 days in growth room with controlled temperature and photoperiod, under radiation of $20.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (white fluorescent light) or $10.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (red fluorescence light). After 30 days, the intermediate acclimatization plants were transferred to the nursery. At 180 days of acclimatization, all plants were evaluated for survival, shoot length and the largest root, number of leaves, roots and fresh pasta. The intermediate acclimatization under the radiation of $20.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided the highest average for survival and the relationship between the length of the initial and final shoot. Regardless of whether received photosynthetic radiation 130; 20 or $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the relationship between the average fresh weight, root number and root length was greater than 1.0, indicating that there plant development. Based on the results it is concluded that the intermediate acclimatization for 30 days in a growth chamber is beneficial to *Miltonia flavescens*.

Keywords: Orchidaceae, *ex vitro* culture, lighting conditions

INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* tem sido amplamente utilizado para a propagação de plantas ornamentais, apresentando vantagens como multiplicação rápida e obtenção de grande número de plantas com alta qualidade genética e fitossanitária (PASQUAL et al., 2008), sendo indicado para suprir a demanda do mercado e ainda minimizar as coletas predatórias de várias espécies, incluindo as quais as da família Orchidaceae.

Segundo Hazarika (2003), embora a técnica do cultivo *in vitro* de plantas esteja bem desenvolvida, existe ainda um grande número de espécies que não sobrevivem à transferência do cultivo *in vitro* para as condições *ex vitro*, denominada aclimatização. Para a maioria das espécies, esta transferência é crítica e delicada, uma vez que as plantas ainda são heterotróficas, apresentam baixa eficiência do sistema radicular, reduzida competência vascular, pouca quantidade de estômatos funcionais e mal formação da cutícula (FARIA et al., 2012) o que reduz a probabilidade de sobrevivência se expostas a ambientes com elevada demanda evaporativa.

Há relatos da elevação da taxa de sobrevivência de plantas cultivadas *in vitro* através da remoção das tampas dos frascos de cultivo, ainda em sala crescimento, por um período de 2 a 5 dias antes do transplante *ex vitro*, submetendo as plantas às condições de umidade relativa mais baixa, acarretando na adaptação mais rápida dos

estômatos do que nas plantas transplantadas diretamente para a casa de vegetação (NASCIMENTO et al., 2008; SCHUCK et al., 2012).

Além disso, outro aspecto que influencia no sucesso da aclimatização é a radiação fotossintética, pois dela decorrem respostas metabólicas, as quais atuam diretamente sobre a fotossíntese, fotomorfogênese de tecidos e órgãos e fototropismo (TAVEIRA, 2011).

Sorgato et al. (2015) observaram que a aclimatização intermediária, em sala de crescimento por trinta dias, utilizando radiação fotossintética proveniente de luz branca, vermelha ou a combinação das duas elevou a porcentagem de sobrevivência das plantas e um incremento na massa fresca de *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree, sendo possível a sua recomendação para esta espécie.

O gênero *Miltonia* é composto por aproximadamente 20 espécies, as quais predominam em regiões elevadas e de temperaturas amenas, havendo, porém, as que se desenvolvem em regiões mais quentes. São originárias do Panamá, Peru, Equador, Colombia, Bolívia, Argentina, Paraguai e Brasil, sendo este último o centro de origem de *Miltonia flavescens* Lindl, uma espécie epífita, amplamente espalhada pelos estados das regiões sul, sudeste e regiões mais secas do interior do Brasil. Seu florescimento acontece entre os meses de setembro a novembro, sendo que as pétalas e sépalas são de cor amarelo palha e labelo branco, com poucas machas vermelho-púrpura (SUTTLEWORTH et al., 1994). De acordo com Muller et al. (2007), devido à grande pressão resultante do desmatamento, a espécie *M. flavescens* está ameaçada de extinção, sendo necessários estudos que possibilitem a produção de mudas de boa qualidade que viabilizem sua utilização em programas de repovoamento e comercialização.

Em vista do exposto, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes níveis de radiações fotossintéticas, obtidos com diferentes espectros luminosos, na aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl, a fim de que as plantas sobrevivam à fase *ex vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de cultivo *in vitro* e na área de Jardinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), nas coordenadas de 22° 11' S e 54° 56' W, com altitude de 446 m, de abril a outubro de 2013. O clima é do tipo Cwa mesotérmico úmido

(KÖPPEN, 1948) e a precipitação total anual varia entre 1250 e 1500mm, com temperatura média de 22°C.

Para o estudo, foram utilizadas plantas de *Miltonia flavescen* Lindl., com aproximadamente 18 meses, obtidas a partir de germinação assimbiótica de sementes provenientes de frutos oriundos de polinização natural, colhidos em plantas adultas do orquidário da Universidade Federal da Grande Dourados. As plantas foram cultivadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) na metade de sua concentração de seus nutrientes ($MS^{1/2}$), em sala de crescimento com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, com radiação fotossintética de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

As plantas, com aproximadamente $3 \pm 0,5$ cm de altura, foram retiradas dos frascos de cultivo, lavadas com água corrente para remoção do excesso de meio de cultura e avaliadas quanto ao número de folhas (7,2), raízes (6,7), comprimento da maior raiz (11 mm) e massa fresca (0,10 g) (Figura 1). Na sequência, cada indivíduo foi plantado em recipientes de polietileno descartáveis com capacidade para 50 cm^3 apresentando diâmetro médio de 5,0 cm e altura de 4,0 cm, provido de furo para drenagem em sua base e preenchidos com o substrato esfagno rosa (Agrolink, Holambra-SP) + fibra de coco (Golden-Mix Chips, Amafibra®) (1:1 v v⁻¹).

Após o plantio, os recipientes contendo as plantas, foram apoiados em bandeja de polipropileno. Um conjunto de 20 plantas foi acondicionado diretamente em viveiro (V) coberto pela sobreposição de três telas de sombreamento de 50% cada, as quais propiciaram radiação fotossintética média diária de $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob condições médias de temperatura e umidade relativa de $22,6 \pm 5^\circ\text{C}$ e $73,9 \pm 10\%$, respectivamente, não sendo submetido à aclimatização intermediária. O sistema de irrigação utilizado nesse viveiro foi constituído de difusores, posicionados a um metro acima das plantas, acionados automaticamente por temporizador digital e válvula solenoide, possibilitando a realização de duas irrigações diárias, totalizando uma lâmina de água de 1 mm dia^{-1} .

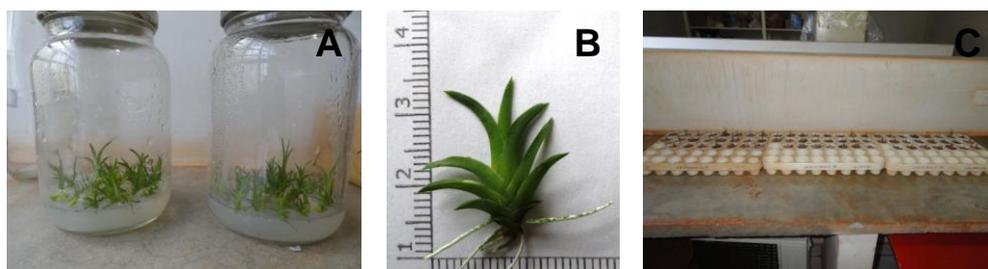


FIGURA 1. Aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl. A) Plantas de *M flavescens* com 1,5 anos de idade cultivadas *in vitro*; B) Aspecto morfológico das plantas aclimatizadas; C) Bandejas de polipropileno contendo os recipientes de cultivo – foto de Camila S. R. Lemes.

Dois conjuntos, de 20 plantas cada foram transferidos para sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12h) e foram submetidos à aclimatização intermediária, por 30 dias, sob as seguintes condições de radiação fotossintética: 1- luz fluorescente branca ($20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); 2- luz fluorescente vermelha (GRO-LUX[®]) ($10,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), fornecidas através de duas lâmpadas dispostas 30 cm acima das plantas. Durante este período, as plantas receberam duas pulverizações diárias com água destilada utilizando-se pulverizadores manuais. Após a aclimatização intermediária, os frascos foram transferidos para o mesmo viveiro que continha o conjunto de plantas que não foi submetido à aclimatização intermediária.

Aos 30 e aos 180 dias após o transplante, foram coletadas amostras de tecidos foliares de plantas submetidas às três condições de luminosidade. As folhas foram cortadas em fragmentos de 5 mm, fixadas em F.A.A. (formaldeído 35%, ácido acético glacial e etanol 50%), e armazenadas em refrigerador até o início do processo de desidratação em série alcoólica progressiva com álcool butílico terciário (DANKIN e HUSSEY, 1985). Após este processo os fragmentos foliares foram infiltrados em parafina e, posteriormente, em *paraplast*. Foram feitos cortes transversais de 3 μm de espessura em micrótomo rotativo manual, que foram corados com safranina-*orange G-fast Green* FCF (HAGQUIST, 1974). Depois de serem montadas as lâminas permanentes, as imagens foram analisadas utilizando o aplicativo computacional (*AxioVision* versão 3.1), acoplado ao microscópio de ocular micrométrica.

Durante a aclimatização definitiva, no viveiro, as plantas foram adubadas quinzenalmente, via foliar, com $2,0 \text{ mL L}^{-1}$ de NPK 10-10-10, acrescido dos seguintes micronutrientes: 0,025% de magnésio, 0,02% de boro, 0,05% de cobre, 0,10% de ferro, 0,05% de manganês, 0,0005% de molibdênio e 0,05% de zinco, com teor máximo de cloro de 0,025%. A cada 30 dias as plantas foram desinfestadas, preventivamente, com

O-S-dimetil-N-acetil-fosforamidotioato (4 mg L^{-1}) e Mancozebe (4 mg L^{-1}). Tanto para a adubação foliar, quanto para a desinfestação, foi utilizado pulverizador costal com capacidade para 5L.

Aos 180 dias após o transplante, as plantas foram retiradas dos substratos e lavadas em água corrente até total remoção dos substratos. Em seguida foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea (30,1 mm), número de folhas (5,8), de raízes (10,8), comprimento da maior raiz (32,8 mm), massa fresca (0,30 g).

Dado o interesse em investigar a hipótese de aumento no número de folhas, de raízes, no comprimento de parte aérea e da maior raiz e na massa fresca das plantas aclimatizadas em relação aos seus valores iniciais, calculou-se a relação entre os valores finais e iniciais de cada variável, por meio da expressão: $R = (VF/VI)$, onde VI é o valor da variável antes da aclimatização e VF é o valor da mesma variável após a aclimatização. Esses valores, assim como a porcentagem de sobrevivência, foram submetidos à análise de variância.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento, constituídas por uma planta. Os dados decorrentes de variáveis discretas ou de porcentagem foram transformados em $\sqrt{x + 1}$ antes de serem submetidos à análise de variância com a utilização do programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010). Havendo significância, os fatores qualitativos foram comparados por teste de médias (Tukey a 5% de probabilidade).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo das condições de luminosidade sobre a relação do número de folhas (RNF) ($p < 0,05$) e comprimento da parte aérea (RCPA) ($p < 0,01$) de *Miltonia flavescens*. Para as demais variáveis não houve efeito dos tratamentos ($p > 0,05$). Salienta-se que a sobrevivência das plantas foi superior a 85% e que as mortes ocorreram nos primeiros 30 dias da aclimatização (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da sobrevivência das plantas aos 30 (SOB30) e aos 180 (SOB 180) dias da aclimatização, da relação massa fresca (RMF), número de folhas (RNF), número de raízes (RNR), comprimento da maior raiz (RCMR) e comprimento da parte aérea (RCPA) de *Miltonia flavescens* Lindl., 180 dias após a aclimatização. Dourados, UFGD, 2013

F.V.	G.L	Quadrados médios						
		SOB30	SOB180	RMF	RNF	RNR	RCMR	RCPA
Trat	2	1166,66 ^{ns}	1166,66 ^{ns}	0,032 ^{ns}	0,032 [*]	0,052 ^{ns}	0,135 ^{ns}	0,056 ^{**}
Erro	57	614,03	614,03	0,063	0,007	0,026	0,116	0,004
CV (%)		26,5	26,5	12,6	6,2	9,9	16,7	4,6
M. Geral		93,3	93,3	3,1	0,8	1,7	3,2	1,0

^{**} significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste Tukey

^{*} significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey

^{ns} não significativo

O Quadro 2 apresenta a relação entre os valores finais e iniciais de cada variável em função da radiação fotossintética fornecida na aclimatização.

QUADRO 2. Sobrevivência das plantas aos 30 (SOB30) e aos 180 (SOB 180) dias da aclimatização, relações iniciais e finais de massa fresca (RMF), número de folhas (RNF) e de raízes (RNR), comprimento da maior raiz (RCMR) e da parte aérea (RCPA) de *Miltonia flavescens* Lindl. observados em função da aclimatização. Dourados-MS, UFGD, 2013

Tratamentos	SOB30	SOB180	RMF	RNF	RNR	RCMR	RCPA
LB	100a	100a	2,9a	0,8ab	1,5a	3,2a	1,2a
LV	95a	95a	2,9a	0,9a	1,7a	2,8a	0,9b
V	85a	85a	3,2a	0,7b	1,8a	3,6a	0,9b
CV (%)	26,5	26,5	12,5	6,1	9,8	16,7	4,6
Média Geral	93,3	93,3	3,1	0,8	1,7	3,2	1,0
DP	25,1	25,1	0,9	0,2	0,5	1,4	0,2

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

LB=luz branca (20,0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); LV=luz vermelha (10,0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); V=viveiro (130,0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A maior média da RNF foi observada nas plantas que receberam tratamento com luz fluorescente vermelha (LV), as quais não diferiram estatisticamente das plantas tratadas com luz fluorescente branca (LB), durante 30 dias de aclimatização intermediária. As plantas do viveiro (V), que não foram submetidas à aclimatização intermediária, apresentaram a menor média de RNF, sendo diferente estatisticamente ($p < 0,05$) apenas do tratamento LV (Quadro 2).

Os resultados da RNF apresentados indicam que o número de folhas observado aos 180 dias foi inferior ao apresentado pelas plantas no início do período de

aclimatização, o que, por sua vez, gerou valores da relação inferiores a 1,0, independentemente se as plantas foram ou não submetidas à aclimatização intermediária. Baseado nisso, sugere-se que este resultado pode ser decorrente do estresse ocasionado pela aclimatização. Plantas cultivadas *in vitro*, aparentemente vigorosas, podem apresentar uma série de mudanças morfológicas, anatômicas e fisiológicas quando aclimatizadas. Além disso, nestas condições, sabe-se que a camada de cera sobre as folhas é mínima ou inexistente e a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias ainda é frágil para permitir um fluxo transpiratório adequado (FARIA et al., 2012). Como resposta às novas condições de cultivo, a abscisão foliar é uma das formas de minimizar as perdas por evapotranspiração (TAIZ e ZEIGER, 2008).

Entretanto, as plantas submetidas à aclimatização intermediária com LV apresentaram as menores perdas de folhas e este resultado foi estatisticamente diferente do apresentado pelas plantas cultivadas no viveiro (Quadro 2), indicando o efeito benéfico da LV sobre a RNF, o que pode ser decorrente da capacidade que a radiação vermelha possui, de modo geral, de promover o crescimento e alongamento da parte aérea (MARKS e SIMPSON, 1999), além de estimular a biossíntese de citocinina endógena, que é um hormônio reconhecido por seu efeito benéfico sobre o desenvolvimento da parte aérea das plantas (GEORGE e DAVIES, 2008).

As plantas que receberam tratamento com LB apresentaram a maior média da RCPA, resultado esse estatisticamente diferente aos observados em plantas aclimatizadas em LV e diretamente no viveiro (Quadro 2).

O valor da RCPA superior a 1,0 indica que houve desenvolvimento vegetal e que, aos 180 dias, as plantas de *M. flavescens* tratadas com luz branca apresentaram crescimento de parte aérea superior ao apresentado no início do período experimental. A radiação branca, de amplo espectro, contém todos os comprimentos de onda (azul, vermelho e verde) necessários para ganhos energéticos pela fotossíntese, bem como para outros processos fisiológicos (ANTONOPLOU et al., 2004; ARAÚJO et al., 2009a; ARAÚJO et al., 2009b). Galdiano Júnior et. al (2012), cultivaram *Cattleya loddigesii* por 90 dias em meio MS ½ acrescido de diferentes concentrações de carvão ativado, sob radiação branca ou vermelha e, decorridos 120 dias após a aclimatização, constataram o efeito benéfico da luz branca sobre a porcentagem de sobrevivência das plantas, independentemente do tratamento *in vitro*, atribuindo os resultados, de modo geral, às melhores condições de desenvolvimento que este tipo de radiação

proporcionou às plantas.

Embora a radiação vermelha seja conhecida por promover alongamento de parte aérea de plantas que se desenvolvem *in vitro*, de acordo com Antonopolou et al. (2004) este comportamento não é geral e os autores afirmam que a influencia da qualidade da luz sobre o crescimento e o desenvolvimento das plantas está fortemente associado à espécie.

Independentemente do tratamento utilizado, todas as médias apresentadas pela variável RMF foram superiores a 1,0 (LB = 2,9; LV = 2,9; V = 3,2) (Quadro 2), indicando que houve desenvolvimento vegetal e que as condições oferecidas à espécie foram satisfatórias para os primeiros 180 dias após o transplante. De maneira semelhante, em todos os tratamentos utilizados verificou-se valores sempre maiores do que 1,0 para RNR e RCMR (Quadro 2), evidenciando desenvolvimento radicular satisfatório, que por sua vez é essencial na fase *ex vitro*.

Aos 30 e 180 dias, independente do tratamento utilizado, cortes transversais das folhas de *M. flavescens* apresentaram células epidérmicas unisseriadas da face adaxial maiores que da face abaxial, além de cutícula delgada ou inexistente (Figura 2). Segundo Stern e Judd (2001) em geral, as folhas de orquídeas apresentam clorênquima homogêneo, o que foi constatado neste experimento, já que em todas as lâminas não foi possível delimitar os parênquimas.

Após 30 dias do transplante, apesar da homogeneidade do clorênquima, as plantas submetidas à aclimatização intermediária, seja por LB ou LV, apresentaram maior organização das células que compõem o mesofilo, feixes vasculares mais evidentes e estruturados e células epidérmicas mais organizadas, comparativamente às plantas do viveiro. A organização das células epidérmicas, em vista frontal, apresentou-se alongada longitudinalmente na face adaxial, e arredondada na face abaxial. Em contra partida, no viveiro, as plantas apresentaram desorganização nas células do mesofilo e feixes vasculares pouco estruturados. Resultados semelhantes foram verificados por Sorgato et al (2015) em plantas *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree submetidas à aclimatização intermediária por 30 dias em sala de crescimento sob radiação de 9,45; 14,85; 18,9 e 162,0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Segundo Hazarika (2006), o mesofilo pouco diferenciado e o frágil sistema vascular das folhas formadas *in vitro* tornam essas plantas altamente susceptíveis ao estresse durante a aclimatização.

Aos 180 dias após o transplante, independentemente do tratamento, pode-se observar células da epiderme e mesofilo mais organizadas e feixes vasculares

desenvolvidos e diferenciados, indicando que, para *M. flavescens*, ao nível celular, este período é suficiente para garantir que ocorra a transição da fase *in vitro* para a *ex vitro*.

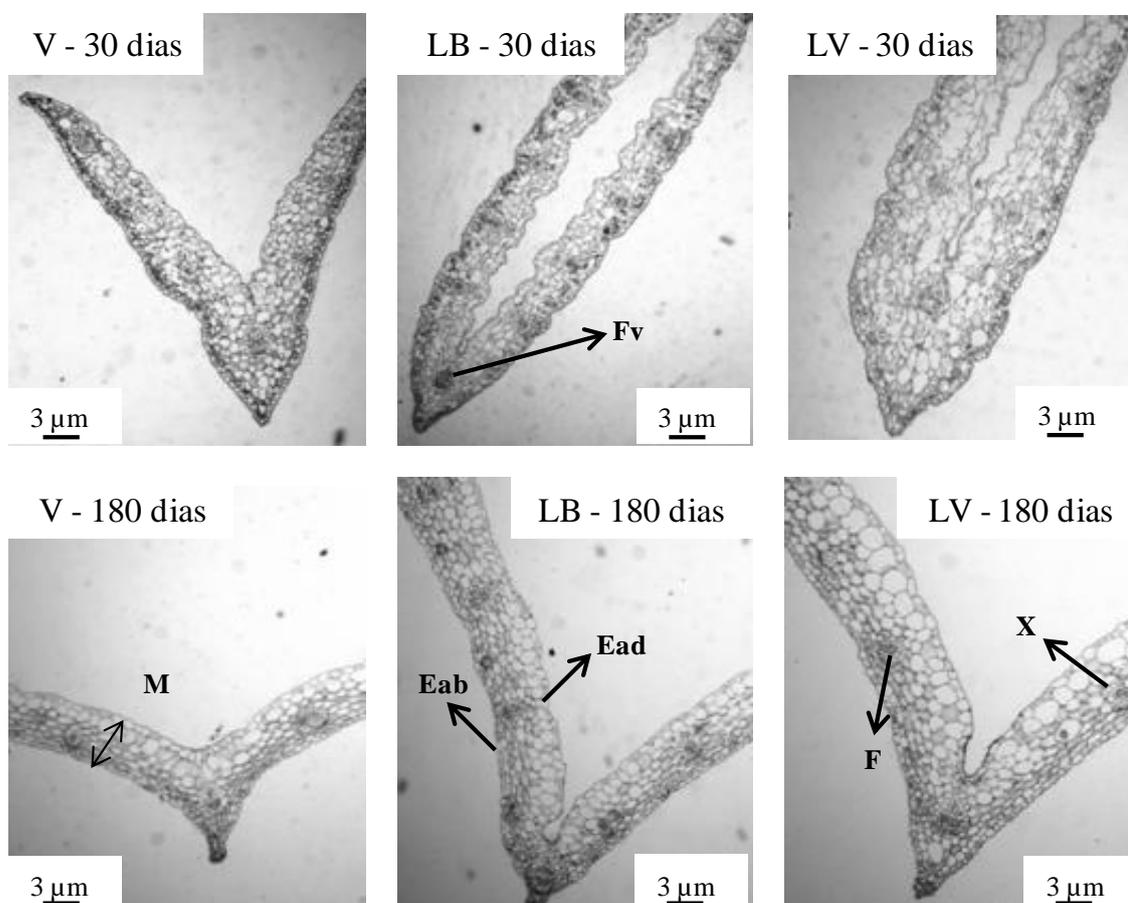


FIGURA 2. Cortes transversais de regiões medianas de folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. submetidas a diferentes condições luminosas: V – viveiro; LB – luz branca; LV: luz vermelha; aos 30 dias e 180 dias após a aclimatização. Epiderme da face adaxial (Ead), Epiderme da face abaxial (Eab), Feixe vascular (Fv), Xilema (X), Floema (F) e Mesofilo (M). Dourados/MS, UFGD, 2013.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos recomenda-se a pré-aclimatização de *M. flavescens*, por 30 dias, em sala de crescimento, com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, sob radiação fotossintética de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONOPOLOU, C.; DIMASSI, K.; THERIOS, I; CHATZISSAVVIDIS, C. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 549-553, 2004.

ARAÚJO. A. G.; PASQUAL, M.; MIYATA, L. Y.; CASTRO, E. M.; ROCHA, H. S. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de *Cattleya loddigesii* (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2506-2511, 2009a.

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; RODRIGUES, J. D.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 542-546, 2009b.

DANKIN, M. E.; HUSSEY, R. S. Staining and histopathological techniques in nematology. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J.N. (Eds.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina State University, 1985. p.39-48.

FARIA RT; ASSIS AM; UNEMOTO LK; CARVALHO JFRP. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenaz, 2012.124p.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.3**. Lavras: UFLA, DEX/UFLA, 2010.

GALDIANO JÚNIO, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 801-807, 2012.

GEORGE, E.F.; DAVIES, W. Effects of the Physical Environment. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd Ed, v. 1, 2008. 501p.

HAGQUIST, C. W. Preparation and care of microscopy slides. **American Biology Teacher**, McLean, v.36, p.414-417, 1974.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, New Delhi, v.108, p.105-120, 2006.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stanford, v.85, n.12, p.1704-1712, 2003.

MARKS, T. R; SIMPSON, S. E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 133-142, 1999.

MULLER, T.S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S. Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 252-254, 2007.

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.

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; ABBADE, L. C.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P. . Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): efeitos do BAP e AIB. **Revista Verde: Mossoró**, v.3, n.2, p.20-26, 2008.

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 45-49, 2008.

SCHUCK, M. R.; LIPSKI, B.; SILVA, A. L. L. da; CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Aclimatização de plantas micropropagadas de videira cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) em diferentes substratos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v.3, p.206-212, 2012.

SORGATO, J. C.; ROSA, Y. B. C. J; SOARES, J. S.; LEMES, C. S. R.; SOUZA, G. G. Light in intermediate acclimatização of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phanalenopsis* Deang Suree. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, p. 231-237, 2015

STERN, W. L.; JUDD, W. S. Comparative anatomy and systematics of *Catasetinae* (*Orchidaceae*). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 136, p. 153-178, 2001.

SUTTLEWORTH, F.S.; ZIM, H.S.; DILON, G.W. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. Tradução: LEMA FILHO, J.G., Editora Expressão e Cultura, Rio de Janeiro, 1994. 158p.

TAIZ L; ZEIGER E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 819p.

TAVEIRA, J. A. M. Novas tecnologias na aclimatização, formação e manejo de mudas. In: GERALD, L.T.S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua, 2011. 383p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos recomenda-se o meio MS e MS ½ para germinação e desenvolvimento inicial de *Miltonia flavescens*. Salienta-se que o meio MS ½ suplementado com 25 g L⁻¹ de sacarose e quando suplementado com balanço hormonal favorável à auxina, independentemente da concentração utilizada, propicia melhor desenvolvimento das plantas e do sistema radicular, respectivamente, quando cultivadas *in vitro* por 180 dias.

Em relação às plantas de *M. flavescens* oriundas de cultivo *in vitro* recomenda-se que as mesmas devam ser submetidas à pré-aclimatização por 30 dias, em sala de crescimento com temperatura média de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas, sob radiação fotossintética de 20,0 μmol m⁻² s⁻¹ obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

Finalizando, considerando a sobrevivência de 100% das plantas aclimatizadas que foram submetidas aos tratamentos supra-citados, conclui-se que os mesmos devam ser utilizados como protocolo de produção de *M. flavescens*.