

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Desmodium incanum* DC.

Joseila Maldaner¹; Raíssa Schwalbert²; Gerusa Pauli Kist Steffen¹; Cleber Witt Saldanha¹; Rosana Matos de Moraes¹

1. Pesquisador (a) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO - Rio Grande do Sul (jomaldaner@gmail.com)
2. Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, RS

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

Plântulas cultivadas *in vitro* geralmente requerem uma suplementação de carboidratos e a sacarose é a fonte de carboidratos mais comumente usada nesses estudos. Ainda não há informações sobre o requerimento de carboidratos em *Desmodium incanum*, assim o presente trabalho visou obter informações sobre a influência de concentrações de sacarose no meio de cultivo para essa espécie. Foram testadas quatro concentrações (0; 15; 30 e 45 g L⁻¹) de sacarose no meio de cultivo *in vitro* de *D. incanum*. A altura das brotações não foi alterada pelas concentrações testadas, tampouco o número de raízes. Por outro lado, observou-se que 15 g L⁻¹ de sacarose favoreceu a emissão de brotações e o número de folhas de plantas de *D. incanum* cultivadas *in vitro*. Da mesma forma a produção de biomassa foi favorecida pela concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose. Esses resultados permitem concluir que é necessária a adição de sacarose ao meio de cultura de *D. incanum* e que 15 g L⁻¹ é suficiente para a promoção do crescimento.

PALAVRAS-CHAVE: carboidratos, cultivo *in vitro*, pega-pega

SUCROSE CONCENTRATION IN THE *Desmodium incanum* DC. MORPHOGENESIS *IN VITRO*

ABSTRACT

Seedlings grown *in vitro* generally require supplementation of carbohydrates, and sucrose is the carbohydrate source most commonly used in these studies. There is no information on the requirement of carbohydrates in *Desmodium incanum*, so this work aims to obtain information on the influence of sucrose concentration in the culture medium for this species. Four concentrations (0, 15, 30 and 45 g L⁻¹) of sucrose were tested in the culture medium for *D. incanum*. Shoot height was not affected by concentrations of sucrose tested nor the number of roots. Moreover it was observed that 15 g L⁻¹ sucrose favored the shoots emission and leaves number in *D. incanum in vitro* cultured. Likewise biomass production was enhanced by 15 g

L⁻¹ sucrose. These results suggest that the addition of sucrose to the culture medium of *D. incanum* is required and 15 g L⁻¹ is sufficient to promote growth.

KEYWORDS: carbohydrates, *in vitro* culture, pega-pega

INTRODUÇÃO

No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam da adição de uma fonte de carboidratos no meio de cultivo. Isso ocorre pois as plântulas cultivadas *in vitro* não encontram concentrações de CO₂ e O₂ adequadas, resultando em teores insuficientes de clorofila para realizar a fotossíntese de modo a sustentar seu crescimento (GEORGE et al., 2008). Devido a essa baixa capacidade fotossintética, as plantas cultivadas *in vitro* apresentam caráter heterotrófico, pois as fontes de carbono, nutrientes e energia encontram-se disponíveis no meio de cultura (DUTRA et al., 2009; HARTMANN et al., 2011; BRONDANI et al., 2012; GREENWAY et al., 2012; FERNANDES et al., 2013). A fonte e a concentração dos carboidratos são determinantes na promoção da germinação, crescimento e ou regeneração das plântulas *in vitro* (NICOLOSO et al., 2003; FARIA et al., 2004), sendo a sacarose a fonte de carbono mais amplamente utilizada em cultivos *in vitro* (MALDANER et al., 2006), pois possui elevada solubilidade e rápida metabolização pela maioria dos vegetais (GIRI et al., 2004; MERKLE & NAIRN, 2005; GEORGE et al., 2008; YASEEN et al., 2013).

A sacarose atua como recurso energético e fornece carbonos precursores para a biossíntese de componentes estruturais e funcionais, como oligossacarídeos, aminoácidos e outras moléculas necessárias para o crescimento (CALDAS et al., 1998). O suprimento de açúcar pode ampliar as reservas de amido e sacarose nas plantas micropropagadas e favorecer a aclimatização, bem como acelerar as adaptações fisiológicas (HAZARIKA, 2003).

O processo de aclimatização consiste na conversão da condição heterotrófica para a autotrófica, em paulatino retorno às características naturais da planta. Durante o cultivo *in vitro* é constatada alta umidade relativa e baixa irradiância luminosa, enquanto na fase *ex vitro* o ambiente apresenta características opostas tais como menor umidade, maior temperatura e irradiância (DEB & IMCHEN, 2010). Como consequência, é verificada baixa taxa de sobrevivência em casa de vegetação para algumas espécies (BARBOZA et al., 2006). A adição de açúcar ao meio de cultura, entretanto, pode também estar relacionada à redução no crescimento, baixa atividade fotossintética, mau funcionamento de estômatos e menor desenvolvimento de cutícula (JO et al., 2009).

Desmodium incanum DC. é uma das leguminosas predominantes nos campos do Rio Grande do Sul. Popularmente conhecida como “pega-pega” esta espécie apresenta boas características bromatológicas como forrageira, sendo considerada moderadamente palatável e persistente (quando sob pastejo, tem forte enraizamento nos nós formando estolões), sendo bem aceita pelos animais (BOLDRINI, 1993). A espécie adapta-se aos mais variados tipos de solos, crescendo bem em solos de média acidez, podendo persistir e vegetar em solos muito ácidos (pH 4,5 ou menos) de baixa fertilidade (CORADIN et al., 2011). São poucos os trabalhos com essa espécie em condições de cultivo *in vitro* (MALDANER et al., 2014; SCHWALBERT et al., 2014), e ainda não há informações sobre o requerimento de carboidratos em *D. incanum*, assim o presente trabalho visou obter informações sobre a influência de concentrações de sacarose no meio de cultivo para essa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em laboratório no Centro de Pesquisa em Florestas - Fepagro Florestas - Santa Maria – RS no período de abril a julho de 2014. Um lote de 500 g de sementes de *Desmodium incanum*, previamente coletadas no Centro de Pesquisa Iwar Beckman, Fepagro Campanha – Hulha Negra – RS, passou por um processo de desinfestação conforme descrito por MALDANER et al. (2014) e então foram colocadas para germinar em meio de cultura (MURASHIGE & SCOOG, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar (pH 5,8), suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0; 15, 30, 45 g L⁻¹).

O material foi mantido em sala de crescimento sob temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 35 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Fepagro Florestas – Santa Maria – RS.

Após 30 dias nessas condições de cultivo, avaliou-se a altura das brotações com o auxílio de uma régua e o número das brotações, o número de folhas, o número de raízes, através de contagem. As plantas foram então seccionadas, separando-as em parte aérea e raiz, e ambas as partes foram secas em estufa a 60°C até atingirem massa constante, sendo contabilizado massa seca de raiz e massa seca de parte aérea através da pesagem em balança analítica.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 20 repetições, sendo que a unidade experimental consistiu em um frasco (100 mL de volume) com 20 mL de meio de cultura e uma semente de *D. incanum*. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com $\alpha=0,01$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software ASSISTAT 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que a altura das brotações de *Desmodium incanum* não foi alterada pelas concentrações de sacarose testadas (Fig. 1 A), tampouco o número de raízes (Fig. 1D) foi influenciado pelos tratamentos. Por outro lado, concentrações elevadas de sacarose (45 g L⁻¹) promoveram redução significativa ($p<0,05$) no número de brotações e de folhas (Fig. 1B e 1C) de *D. incanum* cultivado *in vitro*. Mais do que isso, observou-se que 15 g L⁻¹ de sacarose favoreceu a emissão de brotações (Fig. 1B) e o número de folhas (Fig. 1C) em *D. incanum* nessas condições de cultivo.

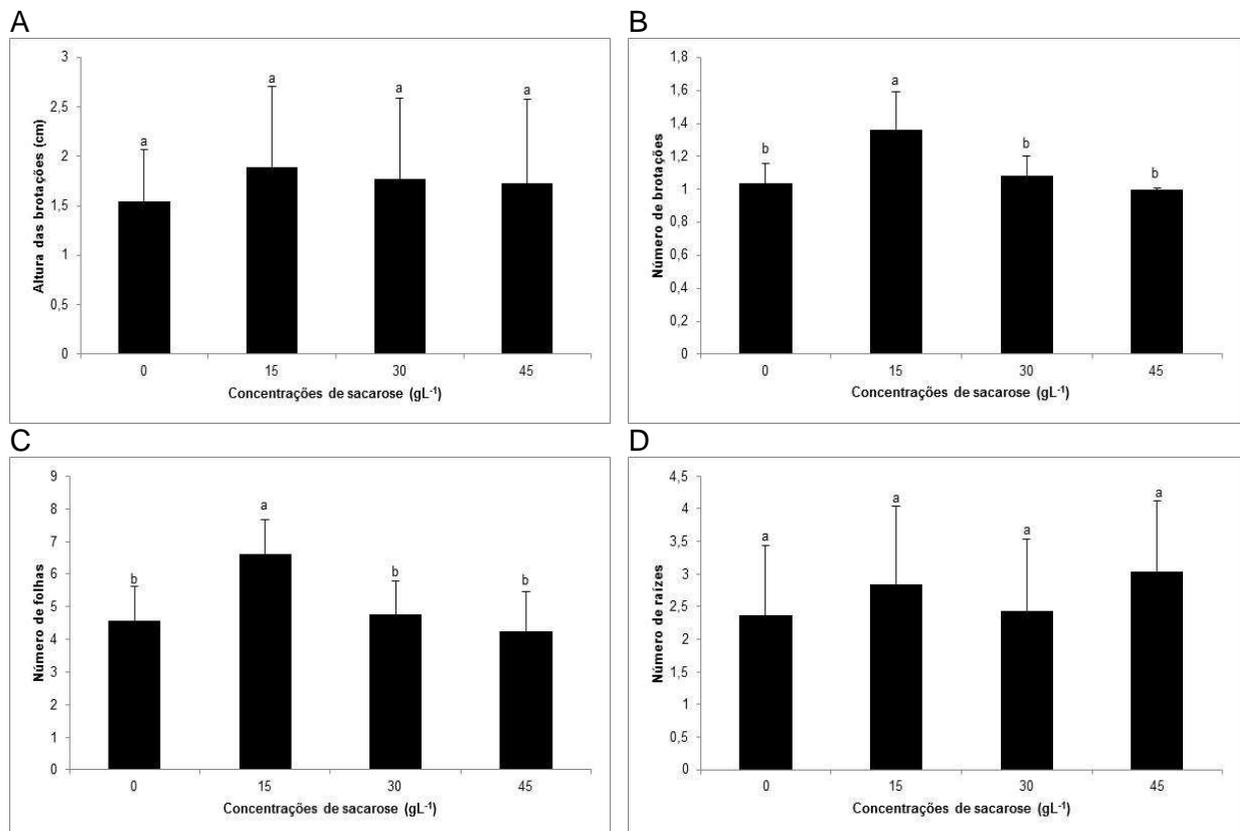


FIGURA 1: Efeito de diferentes concentrações de sacarose na altura das brotações (A), no número de brotações (B), no número de folhas (C) e no número de raízes de *Desmodium incanum* cultivado *in vitro*. Médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 1% de probabilidade de erro.

Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, no cultivo *in vitro* de *Cattleya loddigesii*, a maior média para o número de folhas foi estimada em uma concentração moderada de sacarose, 18 g L⁻¹ (GALDIANO JÚNIOR et al., 2012). Neste estudo, GALDIANO JÚNIOR et al. (2012) verificaram que o comprimento da parte aérea e comprimento da maior folha foram reduzidos na ausência e na maior concentração (40 g L⁻¹) de sacarose. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que o aumento da concentração de açúcares pode provocar a diminuição da absorção de sais minerais e água o que, conseqüentemente, pode interferir no crescimento da planta (FRÁGUAS et al., 2003; BESSON et al., 2010). O número de raízes de *Cattleya loddigesii*, bem como o comprimento da maior raiz foi influenciado pelo aumento da concentração de sacarose no meio de cultura, sendo averiguada redução para o crescimento nas concentrações de 30 e 40 g L⁻¹ deste carboidrato (GALDIANO JÚNIOR et al., 2012).

Os dados aqui apresentados confirmam que o excesso de carboidratos no meio de cultura pode ser tão ou mais prejudicial que sua ausência. Esses resultados

estão em consonância com os apresentados por JO et al. (2009), os quais verificaram baixo crescimento foliar de *Alocasia amazonica* micropropagadas em concentrações elevadas de sacarose (60 e 90 g L⁻¹). BRAUN et al. (2010) obtiveram respostas semelhantes para *Beta vulgaris*, e diversos outros trabalhos apontaram que o aumento na concentração de sacarose acarretou diminuição do número de folhas e de entrenós em batata (MOHAMED & ALSADON, 2010; BADR et al., 2011; BANDINELLI et al., 2013).

Os carboidratos adicionados ao meio nutritivo são determinantes no crescimento e nas respostas fisiológicas das plantas *in vitro*, atuando tanto como fonte de energia e de carbono como regulador osmótico do meio de cultura. Dependendo da concentração, osmorreguladores, como manitol, sorbitol, sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (SHIBLI et al., 2006; FLORES et al., 2013) e, assim, possibilitando sua conservação.

Normalmente, as respostas de biomassa, confirmam as avaliações no crescimento das plantas. Conforme esperado, a biomassa de *D. incanum* foi significativamente influenciada pela concentração de sacarose, onde tanto a massa seca da parte quanto a massa seca das raízes foram favorecidas pela concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose (Fig. 1A e B), ao passo que a ausência de sacarose ou concentrações superiores (30 e 45 g L⁻¹) geraram médias inferiores de massa seca.

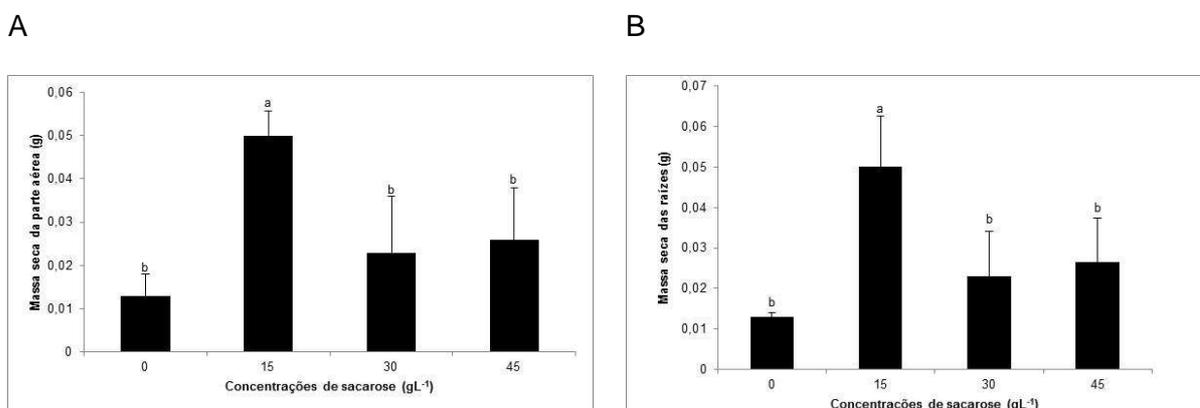


FIGURA 2: Efeito de concentrações de sacarose na massa seca da parte aérea (A) e das raízes (B) de *Desmodium incanum* cultivado *in vitro*. Médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 1% de probabilidade de erro.

GALDIANO JÚNIOR et al. (2012) também citam uma concentração intermediária (23 g L⁻¹) como sendo a mais favorável para incremento em massa seca de *Cattleya loddigesii*. BRAUN et al. (2010), detectaram menor massa *in vitro* de *Beta vulgaris* com concentrações elevadas de sacarose, 45 ou 60 g L⁻¹. Esses resultados confirmam que concentrações mais elevadas desse açúcar são desaconselhadas para o crescimento *in vitro* de várias espécies (PIVETTA et al., 2010, FERNANDES et al., 2013). Isso porque altas concentrações de carboidratos podem induzir estresse osmótico, o que reduz a atividade metabólica *in vitro* e, conseqüentemente, afeta o crescimento das plântulas (JO et al., 2009).

CONCLUSÕES

Desmodium incanum necessita de suplementação de carboidratos para seu desenvolvimento *in vitro* e, a concentração de 15 g L⁻¹ é suficiente e necessária para o crescimento *in vitro* dessa espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul pelo financiamento do projeto e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio fornecido ao longo deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BANDINELLI, M.G.; BISOGNIN, D.A.; GNOCATO F.S.; MAMBRIN R.B; SAUSEN, D; NICOLOSO, F.T. 2013. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, v.31, n.2, p. 242-247, 2013.

BARBOZA, S.B.S.C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.185-194, 2006.

BADR, A; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, n.1, p.13-24, 2011.

BESSION, 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**, v.8, n.1, p.9-13, 2010.

BOLDRINI, I.I. **Dinâmica de vegetação de uma pastagem natural sob diferentes níveis de oferta de forragem e tipos de solos, Depressão Central, RS**. Porto Alegre, 1993. 262f. Tese (doutorado em Zootecnia). Faculdade de Agronomia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BRAUN, H.; LOPES, J.C.; SOUZA, L.T.; SCHMILDT, E.R.; CAVATTE, R.P.Q.; CAVATTE, P.C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.539-546, 2010.

BRONDANI, G.E.; WIT ONDAS, H.W.; BACCARIN, F.J.B; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthami* to form a clonal microgarden. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.48, n.5, p.478-487, 2012.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CENARGEN, v.1, p.87-132, 1998.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul**. Brasília: MMA, 934p., 2011.

DEB, C.R.; IMCHEN, T. An efficient in vitro hardening technique of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, v.9, n.1, p. 79-83, 2010.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.58, p.49-59, 2009.

FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA, L.V.R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p.780-783, 2004.

FERNANDES, D.A.; AZEVEDO, P.H.; COSTA, R.B.; BRONDANI, G.E. Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* L.f. **Revista de Agricultura**, v.88, n.3, p. 218-228, 2013.

FLORES, R.; ULIANA, S.C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T.M.B. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.3, p.192-199, 2013.

FRÁGUAS, C.B.; VILLA, F.; SOUZA, A.V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Ceres**, v. 50, n. 292, p.719-726, 2003.

GALDIANO JUNIOR, 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**, v.42, n.5, p. 801-807, 2012.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; De KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Netherlands: Springer, v.1. 501p., 2008.

GIRI, C.C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v.18, n.2, p.115-135, 2004.

GREENWAY, M.B.; PHILLIPS, I.C.; LLOYD, M.N.; HUBSTENBERGER, J.F.; PHILLIPS, G.C. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.48, n.4, p.403-410, 2012.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. São Paulo: Prentice-Hall, 915p., 2011.

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

JO, E. A.; TEWARI, R.K.; HAHN, E.J.; PAEK, K. Y. In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.96, n.3, p.307-315, 2009.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1201-6, 2006.

MALDANER, J.; SCHWALBERT, R.; SALDANHA, C.W.; CONTERATO, I.F.; STEFFEN, G.P.K. Procedimentos para cultivo *in vitro* de *Desmodium incanum*. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**, v.10, n.18, p.2533-2542, 2014.

MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant**, v.41, n.5, p.602-619, 2005.

MOHAMED M.A.H.; ALSADON A.A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v.123, n.3, p.295-300, 2010.

MURASHIGE T; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, 2003.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, R.; FARIA, R. T. F.; TAKANE, R. J. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, v.40, n.9, p.1897-1902, 2010.

SCHWALBERT, R.; MALDANER, J.; AITA, M.F.; AMARAL, G.A.; TAROUCO, A.K. Concentrações de sais do meio MS no cultivo *in vitro* de *Desmodium incanum*. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**, v.10, n.18, p.1009-1015, 2014.

SHIBLI, R. A.; SHATNAWI, M.A.; SUBAIH, W.S.; AJLOUNI, M. M. In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, n.4, p.372-382, 2006.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I.A. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v.40, n.4, p.2837-2849, 2013.