

# MORFOLOGIA DO FRUTO, SEMENTE E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Caularthron bicornutum* (ORCHIDACEAE)

## (SEED AND POD MORPHOLOGY AND *IN VITRO* PROPAGATION OF *Caularthron bicornutum* – ORCHIDACEAE)

Renato Fernandes Galdiano Júnior 1,2,3; Cibele Mantovani 4; Elisângela Soares Gomes 5; Eliana Gertrudes de Macedo Lemos 6.

1- Curso de Ciências Biológicas, 2CEPeD, Faculdades Integradas Fafibe; 3-PG Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (FCAV – Unesp), Jaboticabal/SP.

**renatofgaldianojr@yahoo.com.br**

4G- Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, Departamento de Tecnologia, FCAV – Unesp, Jaboticabal/SP.

**orquidariomantovani@ig.com.br**

5PG- Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, Departamento de Tecnologia, FCAV – Unesp, Jaboticabal/SP.

**trinkabio2005@yahoo.com.br**

6- Professora Titular. Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, Departamento de Tecnologia, FCAV – Unesp, Jaboticabal/SP.

**egerle@fcav.unesp.br**

**Abstract.** *The aim of this research was to analyze fruit external morphology, seeds and the effect of activated charcoal in the in vitro growing of *Caularthron bicornutum*. The fruits were measured and their data analyzed. Seeds were sterilized within aseptic chamber and inoculated into flasks with MS medium and, after germinated, inoculated in four treatments on MS medium supplemented with active charcoal (T1: 0 g.L<sup>-1</sup>, T2: 1 g.L<sup>-1</sup>, T3: 2 g.L<sup>-1</sup> e T4: 4 g.L<sup>-1</sup>) and arranged in a randomic design. 210 days after sowing were measured biometric data and analyzed statistically. The fruits are dehiscent pods, with inferior ovary, glabrous, tricarpellate and with small and numerous seeds. Based on the results, we recommend the addition of 1 g.L<sup>-1</sup> of this compound for efficient in vitro propagation of this specie.*

**Keywords:** *fruit and seed morphology; micropropagation; orchid.*

**Resumo.** *Os objetivos deste estudo foram analisar a morfologia externa de frutos, sementes e os efeitos do carvão ativado no crescimento in vitro de *Caularthron bicornutum*. Os frutos foram mensurados e seus dados analisados. Sementes foram desinfestadas no interior de câmara asséptica e inoculadas em frascos com meio de cultura MS e, após germinadas, repicadas em quatro tratamentos constituídos de meio MS suplementados com carvão ativado (tratamento T1: 0 g.L<sup>-1</sup>, T2: 1 g.L<sup>-1</sup>, T3: 2 g.L<sup>-1</sup> e T4: 4 g.L<sup>-1</sup>) e dispostos em um delineamento inteiramente casualizado. 210 dias após a semeadura foram mensurados dados biométricos e submetidos à análise estatística. Os frutos são cápsulas deiscentes, com ovário ínfero, glabro,*

*tricarpetal e as sementes pequenas e numerosas. Com base nos resultados, recomenda-se a adição de 1 g.L<sup>-1</sup> deste composto para eficiente propagação in vitro desta espécie.*

**Palavras-chave:** morfologia externa; micropropagação; orquídea.

## INTRODUÇÃO

*Caularthron bicornuthum* é uma orquídea de porte médio e nativa da Amazônia (Estados de Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima). Destaca-se pelo rápido crescimento até a fase adulta e distinta beleza de sua inflorescência, apresentando amplo potencial como planta ornamental (LUZ, 1998).

As orquídeas representam a maior e mais altamente evoluída família de sua ordem (DRESSLER, 1981). Estimativas sugerem a existência de cerca de 25.000 espécies naturais, subdivididos em 600 a 800 gêneros (HEW e YONG, 1997). Possuem hábito terrestre, rupícola e a maior parcela é representada por espécies epífitas. Com adaptações eco-fisiológicas importantes no sistema radicular e no eixo caulinar, estas plantas atingiram um sucesso substancial na ocupação dos dosséis das florestas tropicais (BENZING, 1983).

Na natureza, a germinação e os primeiros estágios de desenvolvimento do embrião das orquídeas são dependentes do estabelecimento de associações com fungos micorrízicos. Acredita-se que durante estes períodos estes embriões seriam heterotróficos e incapazes de utilizar carboidratos complexos (ERNST e ARDITTI, 1990).

As primeiras tentativas de cultivo assimiótico de orquídeas foram realizadas, com sucesso, por Lewis Knudson no início da década de 20, e proporcionaram pesquisas subseqüentes sobre a influência dos chamados “fatores de crescimento” (carboidratos, hormônios, vitaminas, aminoácidos, nutrientes minerais e luz, entre outros), sobre a germinação e crescimento inicial de suas plântulas. Desta forma, em muito se expandiu o comércio das espécies nativas e ornamentais, como também a produção de novos híbridos (VACIN e WENT, 1949).

Carvão ativado é preparado pela carbonização controlada da madeira em vapor ou ar, é utilizado comumente para adsorção de sólidos e gases. Trata-se de um pó de carvão finamente moído para aumentar a área de adsorção de partículas. Mesmo não sendo um regulador de crescimento, tem a capacidade de modificar o meio e, em algumas circunstâncias, melhorar ou regular o crescimento de plântulas *in vitro* (GEORGE, 1993). No entanto, pode alterar o pH, remover nutrientes orgânicos e reguladores de crescimento, inibir o crescimento e a morfogenia. O mesmo autor afirmou que a adição de carvão ativado (entre 1,0 a 2,0 g.L<sup>-1</sup>) pode estimular a germinação e o crescimento de orquídeas, principalmente em espécies que liberam substâncias fenólicas *in vitro*.

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar os efeitos de diferentes doses de carvão ativado no crescimento de plântulas germinadas *in vitro* e posterior sobrevivência em condições *ex vitro* de *Caularthron bicornutum*, espécie de orquídea nativa do Brasil e de grande interesse para produção comercial.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal - SP.

Matrizes da espécie *Caularthron bicornutum* do acervo do LBMP foram polinizadas artificialmente e cerca de 90 dias depois as cápsulas foram colhidas e lavadas com água

corrente e detergente. Cerca de cinco unidades foram analisadas e os seus dados (comprimento, largura, perímetro do fruto e quantidade de sementes) mensurados com o auxílio de um paquímetro. A massa total de cada fruto contendo sementes foi medida utilizando-se balança analítica (Shimadzu, Japão).

Outras cápsulas de sementes maduras foram desinfestadas no interior de câmara asséptica utilizando hipoclorito de sódio e etanol 70% (FARIA e STANCATO, 1998). Em seguida, foram abertas com bisturi e pinças e então inoculadas em caixas de plásticas tipo Magenta<sup>®</sup> (Magenta, EUA) com capacidade de 280 mL contendo 40 mL de meio de cultura composto pelos sais minerais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido 3% sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e o pH ajustado para 5,7. Em seguida, o meio de cultura foi autoclavado a 121 °C e 1,1 atm durante 15 minutos (CALDAS et al., 1998).

Depois de 60 dias após a semeadura, os protocormos foram inoculados em quatro tratamentos constituídos de meio MS com metade da concentração de macronutrientes e suplementados com concentrações de carvão ativado (tratamentos T1: 0 g.L<sup>-1</sup>, T2: 1 g.L<sup>-1</sup>, T3: 2 g.L<sup>-1</sup> e T4 g.L<sup>-1</sup>). O meio de cultura utilizado foi preparado e esterilizado conforme descrito acima.

Para cada tratamento, foram utilizados cinco frascos (repetições) contendo 10 plântulas cada, perfazendo um total de 200 plântulas distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado e incubadas em câmara de crescimento à temperatura de 25°C, sob iluminação artificial e fotoperíodo de 16 horas de luz durante 150 dias. Após esse período, as plântulas foram retiradas dos frascos e mensurado o número e comprimento da maior raiz, da massa fresca da parte aérea e radicular juntas (massa de matéria fresca total) com o auxílio de uma régua graduada em centímetro. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias separadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos de *Caularthron bicornutum* são cápsulas deiscentes, tricarpelares, com ovário ínfero e glabro. A placentação das sementes apresentou-se parietal. Os dados obtidos a partir das análises biométricas da morfologia externa de frutos estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Dados biométricos de frutos maduros de *Caularthron bicornutum*, colhidos com 90 dias após polinização. Jaboticabal – SP, 2010.

	Comprimento	Largura	Perímetro	Massa
	-----cm-----			-----g-----
<b>Valores</b>	4,4 ± 0,3*	16 ± 5	41 ± 8	67,4 ± 14,2

\*Valores médios obtidos a partir de cinco frutos ± desvio padrão

Conforme ARDITTI e GHANI (2000), as sementes das orquídeas representam estruturas minúsculas, com ausência de endosperma, embrião rudimentar e bastante reduzido quando comparado ao volume da testa reticulada ou lisa que recobre o tegumento. De acordo com estes autores, essas características podem apresentar ampla variação entre as espécies e traduzem-se em importantes características adaptativas para a dispersão pelo vento.

As plântulas de *Caularthron bicornutum* apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos avaliados. Para a parte radicular, a adição de carvão ativado apresentou efeitos sinérgicos: o número de raízes foi maior nos tratamentos 2 e 3, enquanto o tratamento 4 obteve média de comprimento da maior raiz inferior até mesmo ao tratamento 1, e para a

massa fresca total foi verificado maiores médias entre os tratamentos 2 e 3, respectivamente, e a menor obtida no tratamento 1 (tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e comprimento do maior bulbo (CMB) e massa de matéria fresca total (MMFT) de plântulas de *Caularthron bicornutum* 210 dias após a semeadura e cultivo *in vitro*. Jaboticabal – SP, 2010.

Tratamentos	NR	CMR	CMB	MMFT
		-----cm-----		-----mg-----
T1 – 0 g.L <sup>-1</sup> carvão ativado	1,65AB*	1,38A	22,95B	1,31B
T2 – 1,0 g.L <sup>-1</sup> carvão ativado	2,5A	1,28A	49,05A	1,96A
T3 – 2,0 g.L <sup>-1</sup> carvão ativado	1,9A	1,00AB	50,95A	1,86A
T4 – 4,0 g.L <sup>-1</sup> carvão ativado	0,5B	0,36B	35,7AB	1,82A
C.V. (%)	43,13	37,8	28,14	29,3

\*Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

ARAÚJO et al. (2006), ao estudar o crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* também verificaram que a adição de carvão ativado ao meio nutritivo em diferentes concentrações também pode trazer resultados contrastantes, sendo necessário ajustar a quantidade deste aditivo conforme a espécie Orchidaceae.

Para o comprimento da maior raiz, o tratamento controle (tratamento T1) apresentou-se mais eficaz. ZAIDAN (2002) observou que carvão ativado inibiu totalmente o enraizamento *in vitro* de mamoeiro (*Carica papaya*) em meio MS com a metade da concentração dos macronutrientes, sugerindo que este aditivo foi responsável por certa limitação do crescimento radicular em meio nutritivo.

Para o crescimento aéreo, a adição de carvão ativado apresentou-se benéfica, sendo verificadas plântulas mais tenras e vigorosas nos tratamentos suplementados (tratamentos T2, T3 e T4), obtendo a menor eficiência para o crescimento do maior pseudobulbo em T1. Por consequência, as maiores massas frescas totais (parte aérea e radicular) foram encontradas em T2 e T3 (tabela 2).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes acrescido de carvão ativado (1 g.L<sup>-1</sup>) é o mais recomendado para a propagação *in vitro* da orquídea *Caularthron bicornutum*.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A.G. PASQUAL, M. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson-C e carvão ativado. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v.2, n.2, p.61-67, 2006.
- ARDITTI, J.; GHANI, K.A.B. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v.145, p.367-421, 2000.
- BENZING, D.H. Vascular epiphytes: a survey with special reference to their interactions with others organisms. In: SUTTON, S. T. WITMORE T. C. & CHADWICK, A. C. (Eds). **Tropical Rain Forest: Ecology and Management**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 11-24, 1983.

- CALDAS, L.S. Meios Nutritivos e aclimatização. In: Torres, A. C. (Ed.). **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI / Embrapa- CNPH, 1998, v. 1, p. 87-133.
- DRESSLER, R.L. **The orchids: natural history and classification**. Harvard: Harvard University Press. 1981. 332p.
- ERNST, R.; ARDITTI, J. Carbohydrate physiology of orchid seedlings. III. Hydrolysis of maltooligosaccharides by *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. **American Journal of Botany**, v.77, p.188-195, 1990.
- FARIA, R.T.; STANCATO, G.C. Orquídea – Semeadura. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A. M. M. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo de Campinas: micropropagação de plantas ornamentais**, 1998. v. 174, p.37.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 – the technology. 2. ed. Edington: Limited, 1993. 786 p.
- HEW, C.S.; YOUNG, J.W.H. **The physiology of tropical orchids in relation to the industry**, Singapore: World Scientific, 331 p., 1997.
- LUZ, F.J.F. **Orquídeas na amazônia**. São Paulo: On Line. 1998, 65p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- VACIN, E.F.; WENT, F.W. Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchids seeds. **Botanical Gazette**, v.111, p.175-183, 1949
- Z Aidan, H.A. **Micropropagação e uso de marcadores moleculares na determinação do sexo do mamoeiro**. 2002, 166f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2002.