

CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Dendrobium nobile* LINDLEY COM ADIÇÃO DE CARVÃO ATIVADO

(*IN VITRO* GROWTH OF *Dendrobium nobile* LINDLEY WITH ACTIVATED CHARCOAL)

Renato Fernandes Galdiano Júnior^{1,2}; Pedro Cassoli Neto³; Cibele Mantovani⁴

¹ Professor do Curso de Ciências Biológicas, CEPeD, Faculdades Integradas FAFIBE, Bebedouro – SP; ² Doutorando em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, campus Jaboticabal – SP - renatofgaldianojr@yahoo.com.br.

³ Graduando em Ciências Biológicas, Faculdades Integradas FAFIBE, Bebedouro – SP. pedrocassoli@hotmail.com.

⁴ Graduanda em Agronomia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, campus Jaboticabal – SP - orquidariomantovani@ig.com.br.

Resumo: O objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento *in vitro* de plântulas obtidas por sementeira da orquídea *Dendrobium nobile* em diferentes concentrações de carvão ativado. O experimento foi conduzido no Departamento de Biologia das Faculdades Integradas FAFIBE. Sementes maduras foram inoculadas em meio de cultura ½ MS e, após a formação de protocormos com folíolos foram subcultivados no mesmo meio adicionado concentrações de carvão ativado (0; 1,0 e 2,0g L⁻¹). 90 dias após o subcultivo, as plântulas foram retiradas dos frascos e avaliado o número e comprimento da maior raiz, número de folhas, altura da parte aérea, número de bulbos, massa de matéria fresca total (parte aérea e raiz) e massa de matéria seca total, sendo as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Por meio desses parâmetros, verificou-se que a ausência de carvão ativado favoreceu a maior eficiência para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile*.

Palavras-chave: orquídea, micropropagação, aditivo complexo.

Abstract: The aim of this work was to evaluate *in vitro* growth of plantlets obtained by sowing *Dendrobium nobile* orchid in different concentrations of activated charcoal. This experiment was conducted in the Biology Department of Faculdades Integradas FAFIBE. Mature seeds were inoculated on ½ MS medium and after the formation of protocorms with leaflets were subcultured in the same medium added activated charcoal concentrations (0, 1,0 and 2,0g L⁻¹). 90 days after subculture, the plantlets were removed from flasks and assessed the number and length of roots, leaf number, shoot height, number of bulbs, total fresh matter weight (shoot and root) and mass of total dry matter. The means were subjected to the Tukey test at 5% probability. By means of these parameters, it was found that the absence of activated charcoal promoted greater efficiency for *in vitro* growth of *Dendrobium nobile*.

Key-words: orchid, micropropagation, complex additive.

INTRODUÇÃO

As orquídeas são altamente valorizadas por sua fantástica gama de variação de colorido e longa durabilidade das flores. O gênero *Dendrobium* compreende mais de 1500 espécies, é considerado um dos maiores da família Orchidaceae e originário da Ásia tropical e subtropical, prolongando-se até as Ilhas Fiji e sul da Austrália. *Dendrobium nobile* é uma espécie de folhas caducas bastante popular e apresenta ampla variedade. O caule é ereto, atingem 30-40cm de altura, com grupos de 2-3 folhas – de cerca de 7cm de diâmetro – por nó e foi muito utilizada na obtenção de híbridos comerciais (SHUTTLEWORTH et al., 1970).

O cultivo *in vitro* de orquídeas demanda, entre as distintas espécies que essa família apresenta, meios de cultura específicos muitas vezes elaborados com aditivos complexos, a fim de proporcionar as condições mais favoráveis de crescimento (CAMPOS, 2010). Dentre os inúmeros fatores explorados para aumentar a eficiência e rapidez na produção *in vitro* dessas plantas é a adição de carvão ativado (ARDITTI; ERNEST, 1993).

A adição desse complexo ao meio de cultura pode apresentar efeitos benéficos ou prejudiciais *in vitro*. Tais efeitos são atribuídos à formação de ambiente escuro no meio e também à adsorção de algumas substâncias as quais são inibitórias ou não às plantas, como fenóis, etileno, reguladores de crescimento, vitaminas e outras substâncias orgânicas (THOMAS, 2008). O carvão ativado pode ainda liberar substâncias naturalmente presentes ou, adsorvidas por ele (PAN; STADEN, 1998).

Em grande parte dos trabalhos, têm sido utilizados até 2,0g L⁻¹ desse composto no meio para o crescimento de algumas espécies da família Orchidaceae (FARIA et al., 2002; MORALES et al., 2006; SANTOS et al., 2006), sendo que a adição de concentrações maiores apresentaram efeito prejudicial (ARAÚJO et al., 2006; GALDIANO-JÚNIOR et al., 2010).

Em razão da importância e popularidade da orquídea *Dendrobium nobile* para a orquidicultura brasileira e mundial, a ampliação do conhecimento referente ao crescimento *in vitro* e disponibilização de plântulas de qualidade são cada vez mais necessários. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar o crescimento dessa orquídea em diferentes concentrações de carvão ativado no meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Cápsula com sementes maduras obtidas por autopolinização artificial de *Dendrobium nobile* foi gentilmente fornecida pelo Orquidário Mantovani (Itápolis - SP) e transferida para o Laboratório de Botânica e Micropropagação Vegetal, Departamento de Biologia das Faculdades Integradas FAFIBE, em que foi lavada com detergente e água corrente, sendo em seguida superficialmente desinfestada.

A desinfestação foi conduzida com etanol 70% por 5 minutos seguido de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo durante 30 minutos e enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada no interior de câmara de fluxo (FARIA, 1998). As sementes foram inoculadas em frascos plásticos de 220 mL contendo 30 mL de meio nutritivo MS reduzido e autoclavados a 121 °C e 1,1 atm durante 15 minutos (CALDAS et al., 1998).

O meio de cultura ½ MS consistiu da formulação proposta por MURASHIGE & SKOOG (1962) com apenas metade da concentração de macronutrientes e suplementado com vitaminas, inositol e glicina (COSTA et al. 2009), 2% de sacarose, pH ajustado para 5,7 e geleificado com 0,7% de ágar (tipo E, Sigma[®]). A germinação e crescimento ocorreram em sala de incubação sob condições controladas (com temperatura de 25 ± 2°C e iluminação incidente nos frascos de, aproximadamente, 75 µmol.m⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas luz).

Decorridos 90 dias, explantes com cerca de 0,5 cm e com presença de dois folíolos foram transferidos para três diferentes tratamentos, compostos de diferentes concentrações de carvão ativado Synth[®] (0; 1,0 e 2,0g L⁻¹), o qual foi adicionado ao meio de cultura antes da autoclavagem.

Após 180 dias do início do experimento, foi avaliado o crescimento *in vitro* a partir de medidas biométricas do número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de folhas (NF), número de bulbos (NB), altura da parte aérea (APA), massa da matéria fresca total (parte aérea e radicular, MMFT) e massa de matérias seca total (MMST).

As medidas foram aferidas ao colocar as plântulas estiradas em bancada e mensuradas com o auxílio de régua e paquímetro. A massa foi medida por meio de balança analítica (Gehaka, mod. AG200). As médias de cada tratamento foram transformadas em $(x + 1)^{1/2}$, submetidos à análise de variância e separadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro por meio do programa Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de carvão ativado em meio de cultura ½ MS proporcionou menor eficiência para o crescimento *in vitro* de plantas de *Dendrobium nobile*, exceto para o número de bulbos e altura da parte aérea (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios para número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR, em cm), número de bulbos (NB), altura da parte aérea (APA, em cm), número de folhas (NF), massa de matéria fresca total (parte aérea e radicular, MMFT, em g) e massa de matéria seca total (parte aérea e radicular, MMST, em g) de plântulas de *Dendrobium nobile* sob diferentes concentrações de carvão ativado (g L⁻¹). Bebedouro-SP, 2010.

Tratamentos	NR	CMR (cm)	NB	APA (cm)	NF	MMFT (g)	MMST (g)
0	2,93a	4,34a	1,99a	3,66a	2,2a	8,78a	0,009a
1,0	2,16b	2,3b	1,96a	3,52a	1,99b	6,34b	0,006b
2,0	2,06b	2,3b	1,99a	3,57a	2,07b	6,75b	0,007b
C.V. (%)	18,66	22,21	12,49	12,45	8,28	22,33	24,29

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Ainda que para estas duas variáveis da parte aérea não tenha sido verificado diferenças significativas, o tratamento controle (ausência de carvão ativado) proporcionou maior número de folhas. A maior quantidade de folhas pode determinar maior área fotossintética e, conseqüentemente maior produção de fotoassimilados e desenvolvimento geral da plântula, em especial durante a fase de aclimatização que precede a etapa de micropropagação *in vitro*.

A parte radicular apresentou crescimento menos favorecido pela adição de carvão ativado, como apresentado pelo número de raízes e comprimento da maior raiz (tabela 1). Tais resultados discordam dos verificados para as orquídeas brasileiras *Cattleya walkeriana* (FARIA et al., 2002), *Catasetum fimbriatum* (MORALES et al., 2006) e *Sophranitis coccinea* (SANTOS et al., 2006), em que, independentemente do tipo e concentração do meio de cultura utilizado, a adição desse composto propiciou o crescimento *in vitro*.

Entretanto, VAN WAES (1987) verificou que a adição de carvão ativado no meio de cultura resultou em crescimento mais lento nas espécies europeias *Ophrys* spp., *Orchis* spp., *Spiranthes* spp., e demonstrou que o comportamento de espécies orquídeas em meio de cultura suplementado com carvão é dependente do genótipo em estudo.

A adição de carvão ativado ao meio de cultura pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, conforme a espécie e o tipo de tecido utilizado, além da fonte do carvão, pureza e grau de ativação (PAN; STADEN, 1998). Segundo os mesmos autores, a adsorção não-

seletiva do carvão ativado, como por exemplo, em relação às vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina), além de quelatos de ferro e zinco, podem resultar em efeitos negativos para o cultivo.

Ademais, JOHANSSON (1983) descreve que, além de sua capacidade adsortiva, um possível efeito negativo do carvão ativado pode ser dependente das condições de cultivo, a exemplo do volume do meio de cultura no frasco da cultura.

Assim, as condições de cultivo do presente experimento associado às características reconhecidas deste complexo provavelmente foram determinantes para as características observadas, em que a presença do carvão ativado influenciou negativamente para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio de cultura ½ MS sem adição de carvão ativado favoreceu a maior eficiência para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* nas condições experimentais utilizadas.

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 & Micropropagation**, v.2, n.2, p.61-67, 2006.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993. 682p.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CENARGEN, v.1, 1998. p.87-132.

CAMPOS, D.M. **Orquídeas: reprodução por sementes em laboratório caseiro**. v.6, 2010.

COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p.63-67.

FARIA, R. T. Micropropagação de *Dendrobium nobile in vitro*. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p.63-67.

FARIA, R.T. ; Santiago, D.C.; Saridakis, D.P.; Albino, U.B.; Araújo, R. Preservation of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, n.3, p.489-492, 2002.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, n.1, p. 36-41, 2008.

GALDIANO-JÚNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.; GOMES, E.S.; LEMOS, E.G.M. Morfologia do fruto, semente e propagação *in vitro* de *Caularthron bicornutum* (Orchidaceae). **Revista EPeQ Fafibe**, v.1, p.64-68, 2010.

JOHANSSON, L. effects of actived charcoal in anther cultures. **Physiology of Plant**, v.59, p.393-403, 1983.

MORALES, S.; MILANEZE, M.A.G.; MACHADO, M.F.P.S. Effect of activated charcoal for seedling development of *Catasetum fimbriatum* Lindley (Orchidaceae). **Journal of Plant Science**. v.1, n.4, p.388-391, 2006.

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

PAN, M.J. & STADEN, J.V. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.155-163, 1998.

SANTOS, A.F.; VENTURE, G.M.; DIAS, J.M.M.; GOULART, M.S.; NOVAIS, M.S.; CECON, P.R.; TEIXEIRA, L.S.; MOURA, E. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta**, v.46, p.8-12, 2006.

SHUTTLEWORTH, F.S.; ZIM, H.S.; DILLON, G.W. **Orquídeas**; 430 ilustrações a cores. Verona: Mondadori, 1970. 160p.

THOMAS, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v.26, p.618–631, 2008.

VAN WAES, J. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of Western European orchids. **Acta Horticulturae**, v.212, p.131-138, 1987.