

Efeito de carvão ativado e do grafite no crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae).

¹Gonçalves, Letícia de Menezes¹; ¹Prizão-Resende, Eliane Cristina; ²Bassi, Alyadni Janayna Trento; ²Milaneze-Gutierrez, Maria Auxiliadora; ³Machado, Maria de Fátima Pires da Silva.

¹Universidade Estadual de Maringá, Pós-Graduação em Agronomia, Avenida Colombo 5970, CEP 8702900, Maringá-PR, fone (44) 3261 4961; e-mail: let_over@hotmail.com, elianeprizao@yahoo.com.br; ²Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Cultivo de Orquídeas, Avenida Colombo 5970, CEP 8702900, Maringá-PR, fone (44) 32614961, e-mail: alyadni@hotmail.com; milaneze@uem.br. ³Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Laboratório de Genética e Cultura de Tecidos Vegetais, Avenida Colombo 5970, CEP 8702900; Maringá-PR, fone (44) 32614681, e-mail: mfpsmachado@uem.br.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores entre as fanerógamas, sendo altamente especializada, e a mais evoluída dentre as monocotiledôneas (DRESSLER, 1993).

As orquídeas do gênero *Cattleya* são nativas do Brasil (BICALHO, 1980), e apresentam ocorrência natural no México, América Central e do Sul. São as orquídeas mais comercializadas na atualidade, agrupam inúmeras espécies e milhares de híbridos que possuem flores grandes e vivamente coloridas. São, em geral, epífitas, com pseudobulbo ereto e relativamente grande encimado por uma folha (unifoliada) ou duas folhas (bifoliadas) (PAULA e SILVA, 2004). Este gênero abrange mais de 50 espécies, sendo a *Cattleya bicolor* incluída na lista das mais conhecidas no Brasil (ENGLERT, 2000).

Em orquídeas, os métodos de germinação simbiótica foram substituídos pelo procedimento de germinação não-simbiótica, após Lewis Knudson, em 1922, relatar que o fungo não era necessário para a germinação das sementes de orquídeas, caso fossem semeadas em meio de cultura que contém ágar, sais apropriados e açúcar. Das várias fórmulas nutritivas propostas por Knudson, a mais conhecida é a fórmula "C" (KC) de 1946, sendo um meio apropriado para a maioria das espécies de orquídeas (GRIESBACH, 2002).

O carvão ativado é um aditivo bastante utilizado na propagação *in vitro* das mais diversas espécies vegetais, inclusive no cultivo de orquídeas. Diversas funções são atribuídas ao uso de carvão na cultura assimbiótica, e uma das principais utilizações é para o escurecimento do meio de cultura (Pasqual, 2001). Durante as suas revisões, Arditti *et al.* (1982) sugerem a adição de 2 g/L de grafite, quando se deseja apenas o escurecimento do meio em substituição ao carvão ativado, pois este último possui a capacidade de adsorção irreversível de certos compostos como certas vitaminas, hormônios, que podem ser limitantes para o desenvolvimento da cultura.

Neste sentido, a proposta do presente estudo foi verificar os efeitos da concentração de carvão ativado e de grafite, adicionados ao meio de cultura nos processos de desenvolvimento *in vitro* da espécie *Cattleya bicolor*. É possível que a concentração destes compostos possa ser indicada como eficientes para os processos de desenvolvimento das plantas, e que o grafite possa ser usado em substituição ao carvão ativado.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultivo de Orquídeas da Universidade Estadual de Maringá.

Após 8 meses de cultivo, 15 plantas em média de *Cattleya bicolor*, medindo aproximadamente 1,00 cm, foram transferidas para os meios de cultura (KC) adicionados das seguintes concentrações de carvão ativado e grafite: 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 e 7,5 g L⁻¹, sob influência de luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas.

O período de cultivo foi de 6 meses, e para cada tratamento com *Cattleya bicolor*, foram utilizadas quatro repetições e 35 ml de meio de cultura por frasco.

A fim de mensurar o desenvolvimento alcançado pelas plantas, foi calculado o Índice de Crescimento (IC) como proposto por Spoerl (1948) e modificado por Milaneze (1997), que considera o número de raízes e folhas formadas. Além do IC, foram observadas as seguintes variáveis: número de brotos, número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes e comprimento da raiz. Foram consideradas as medidas da parte aérea e da raiz até 2 cm de comprimento, porque somente cerca de 11% e 20% de plantas apresentaram parte aérea e raiz respectivamente acima de 2cm.

Nos ensaios propostos, o pH de todos os meios de cultura foram ajustados com KOH (1N) e HCl (50%) para 5,30 antes da adição de 6,5 g L⁻¹ de ágar e 2,0 g L⁻¹ de sacarose. Todos os frascos que continham os meios de cultura, juntamente com quatro amostras de pH de cada meio nutritivo para verificação do pH inicial, foram autoclavados por 20 minutos sob pressão de 1 atm. Ao término do período do experimento, foram verificados os valores de pH final alcançados pelos meios nutritivos onde foram cultivados os explantes.

As réplicas foram mantidas em sala climatizada, com temperatura de 25±2°C, sob influência de luz contínua ou fotoperíodo 14 horas, proporcionados por lâmpadas fluorescentes de 40 Watts, com intensidade luminosa de 14,9 μmol m⁻²s⁻¹.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados e os dados foram analisados estatisticamente, utilizando o programa SAS (System for Windows V8) ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F e o Teste de Tukey com 5% da probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de diferentes concentrações de carvão ativado ou de grafite, no meio de cultura KC, interferiu com a formação de brotos nas plantas de *C. bicolor*, mas não foram dependentes das condições de manutenção da cultura sob luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas de luz; não foi verificado também, interação significativa entre a adição do carvão ativado, ou de grafite, e as condições de manutenção das plantas. Embora as comparações entre as médias dos números de brotos nas plantas mantidas nos meios com grafite ou carvão ativado não tenham mostrado diferenças significativas em relação ao meio controle, o maior número de brotos (2,81) em plantas de *C. bicolor* foi observado naquelas mantidas no meio KC que continham 7,5 g L⁻¹ de grafite, e os menores índices de brotações ocorreram nas plantas mantidas nos meios que continham 3,0 e 4,5 g L⁻¹ de carvão ativado, e 1,5 g L⁻¹ de grafite (Tabela 1). A interferência negativa do carvão ativado na indução de brotos em plantas cultivadas em meio KC tem sido descrita para orquídeas (Araújo, 2004), e também para outras espécies de plantas (Fráguas, 2003).

O número de folhas formadas em *C. bicolor* não foi diferente nas plantas mantidas em meio de cultura KC que continham as diferentes concentrações de carvão ativado ou de grafite (Tabela 1). Para outras espécies de orquídeas, como para o híbrido *Brassocattleya* 'Pastoral x *Laeliocattleya*' Amber Glow', tem sido indicado que a adição de carvão ativado ao meio de cultura inibe a formação de folhas (Silva *et al.*, 2003). O número de folhas das plantas de *C. bicolor* também não foi dependente das condições de manutenção da cultura sob luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas de luz.

Maior número de plantas de *C. bicolor* que apresentaram comprimento da parte aérea em torno de 2 cm ocorreu meio KC adicionado de 6,0 g L⁻¹ de grafite, quando comparado ao tratamento controle.

A adição de 4,5 ou 6,0 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura KC promoveu o desenvolvimento de maior número de raízes nas plantas (Tabela 1). Por outro lado, a adição de diferentes concentrações de grafite não estimulou a formação de raízes em *C. bicolor*, indicando que o escurecimento do meio de cultivo por ambos compostos, carvão ativado ou

grafite, não deve ser o único fator determinante do aumento no número de raízes em plantas cultivadas em meio contendo o carvão ativado.

O número de raízes formadas nas plantas de *C. bicolor* não foi influenciado pelas condições de manutenção da cultura sob luz contínua ou com fotoperíodo de 14 horas, mas o desenvolvimento das raízes, comprimento das mesmas, foi dependente da adição de concentrações específicas de grafite ou carvão ativado, bem como da interação entre as diferentes concentrações destes compostos e as condições de manutenção com luz contínua ou com fotoperíodo de 14 horas; a interação foi significativa. Um maior número de plantas apresentando raízes que atingiram um comprimento de até 2 cm foi observado nos meio KC contendo 3,0 e 7,5 g L⁻¹ de carvão ativado (Tabela 1).

A análise do índice de crescimento que considera o número de raízes e folhas formadas em cada planta, não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Tabela 1. Teste de média para as variáveis NB (número de brotos), NF (número de folhas), CPA (comprimento da parte aérea), NR (número de raízes), (CR) comprimento da raiz e (IC) Índice de Crescimento em *Cattleya bicolor*.

Tratamentos g L ⁻¹	Médias dos tratamentos					
	NB	NF	CPA	NR	CR	IC
KC (controle)	1,96 abc	5,56 ab	44,965 b	5,15 c	23,779 c	2514,4 a
KC + Grafite 1,5 g L ⁻¹	1,49 c	6,49 a	64,964 ab	5,11 c	30,648 abc	2515,0 a
KC + Grafite 3,0 g L ⁻¹	2,21 abc	5,44 b	65,650 ab	5,26 c	36,041 abc	2505,8 a
KC + Grafite 4,5 g L ⁻¹	1,82 abc	5,65 ab	69,389 ab	5,20 c	39,284 ab	2599,9 a
KC + Grafite 6,0 g L ⁻¹	2,59 ab	5,94 ab	81,558 a	5,52 bc	37,153 abc	2638,1 a
KC + Grafite 7,5 g L ⁻¹	2,81 a	5,71 ab	72,076 ab	6,53 abc	26,405 bc	2696,9 a
KC + Carvão 1,5 g L ⁻¹	2,28 abc	5,84 ab	64,211 ab	6,47 abc	28,025 abc	2643,0 a
KC + Carvão 3,0 g L ⁻¹	1,49 c	5,57 ab	66,345 ab	6,46 abc	42,693 a	2741,1 a
KC + Carvão 4,5 g L ⁻¹	1,51 c	5,97 ab	66,896 ab	7,07 ab	37,920 abc	2754,0 a
KC + Carvão 6,0 g L ⁻¹	1,92 abc	5,80 ab	65,991 ab	7,70 a	40,740 ab	2858,8 a
KC + Carvão 7,5 g L ⁻¹	1,67 bc	5,53 ab	65,733 ab	6,18 abc	41,814 a	2635,1 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os valores de pH dos meios de cultura onde se desenvolveram as plantas de *C. bicolor*, previamente aferidos para 5,30 antes do processo de autoclavagem, foram alterados significativamente quando da adição de grafite ou de carvão ativado. Maiores variações no valor do pH inicial do meio de cultura foram verificadas com a adição de 6,0 g L⁻¹ de grafite e com 4,5 g L⁻¹ do carvão ativado. O carvão ativado usado na concentração de 3,0 g L⁻¹ e o controle (KC) não determinaram alterações significativas no pH inicial do meio, enquanto as cinco concentrações de grafite promoveram aumento significativo na variação do pH inicial do meio de cultura KC.

Quanto aos valores do pH final, as diversas concentrações do carvão ativado provocaram a alcalinização dos meios de cultura; uma alteração pronunciada (valor do pH final = 7.12) pode ser verificada com a adição de 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultura das plantas de *C. bicolor*. Contrastando com as variações de pH detectadas nos meios de cultura contendo carvão ativado, no experimento-controle na ausência de ambos compostos, bem como nos meios contendo as diferentes concentrações de grafite, ocorreu uma acidificação do meio de cultura em relação ao pH inicial da cultura de *C. bicolor* (pH = 5,34).

As alterações nos valores do pH inicial e pH final dos meios de cultura são evidências que merecem destaque porque, o efeito positivo, ou negativo, nas variáveis sob influência das diferentes concentrações de carvão ativado ou grafite pode ser decorrente de alterações do pH dos meios e/ou da interação entre os diferentes fatores com as alterações de pH.

CONCLUSÕES

O grafite não pode ser utilizado em substituição ao carvão ativado, pois a adição de 6,0 g L⁻¹ de grafite ao meio KC estimulou o comprimento da parte aérea das plantas de *C. bicolor*, mas não promoveu nenhum efeito no desenvolvimento das raízes.

Houve efeito positivo da adição de 6,0 g L⁻¹ de grafite para promover o desenvolvimento da parte aérea de plantas de *C. bicolor*.

A adição de carvão ativado e grafite promoveram variações pronunciadas no pH inicial e final do meio de cultura KC, principalmente nas diversas concentrações de carvão ativado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, A.G de. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídeas.** 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

ARDITTI, J. et al. Orchid seed germination and seedling culture – a manual. In: _____ (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives II.** New York: Cornell University, 1982. p.244-370.

BICALHO, H.D. Aspectos ornamentais e taxionômicos das orquídeas gênero *Cattleya* no continente sul-americano. In: CONGRESSO DA ESCOLA SUPERIOR AGRONÔMICA LUIZ DE QUEIROZ, 37.; 1980, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1980. p.157-168.

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family.** Portland: Dioscorides, 1993. 314p.

ENGLERT, S.L. **Orquídeas & bromélias: manual prático de cultivo.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 96 p.

FRAGUAS, C.B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes.** 2003. 109f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

GRIESBACH, R.J. **Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market: trends in new crops and new uses.** West Lafayette, 2002. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/griesbach.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2004.

MILANEZE, M.A. **Estudos em orquídeas nativas do Brasil: morfologia de sementes e cultivo assimiótico.** 1997. 233 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

PASQUAL, M. **Meios de cultura.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74p.

PAULA, C.C. de.; SILVA, H.M.P. **Cultivo prático de orquídeas.** 3 ed. Viçosa: UFV, 2004. 106 p.

SILVA, E.F. da. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya* ‘Pastoral’ X *Laeliocattleya* ‘Amber Glow’.** 2003. 62f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003

SPOERL, E. Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. **American Journal of Botany**, v.35, p.88-95, 1948.

PALAVRAS-CHAVE: *Cattleya bicolor* LINDL., propagação *in vitro*, aditivos.