

ELIANE CRISTINA PRIZAO

**EFEITO DE CARVÃO ATIVADO E DO GRAFITE NO CRESCIMENTO *IN*
VITRO DE ORQUÍDEAS**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ELIANE CRISTINA PRIZAO

**EFEITO DE CARVÃO ATIVADO E DO GRAFITE NO CRESCIMENTO *IN*
VITRO DE ORQUÍDEAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2006**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P961e Prizão, Eliane Cristina
Efeito de carvão ativado e do grafite no
crescimento *in vitro* de orquídeas / Eliane Cristina
Prizão. -- Maringá : [s.n.], 2006.
43 f. : il. color., figs.

Orientador : Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da
Silva Machado.
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora
Milaneze Gutierre.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2006.

1. Orquídeas. 2. Cultivo *in vitro*. 3. Carvão
ativado. 4. Grafite. I. Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. II.
Título.

CDD 21.ed. 584.4

ELIANE CRISTINA PRIZAO

**EFEITO DE CARVÃO ATIVADO E DO GRAFITE NO CRESCIMENTO *IN*
VITRO DE ORQUÍDEAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em:

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado
(Orientadora)

Aos meus pais Antonio e Leonice, por todo amor, apoio e confiança, sem eles eu nada seria ou teria. Ao meu noivo Anderson pelo amor, carinho, por toda a paciência e tantos momentos de ajuda.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Acima de todas as coisas, meu imenso agradecimento a Deus, que a cada instante deu-me forças para que eu conseguisse vencer mais uma etapa tão sonhada em minha vida.

À Nossa Senhora Aparecida, que foi minha intercessora a cada instante.

À Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela sua orientação, paciência, e disposição para me ajudar sempre que precisei.

À Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre, pela oportunidade de estágio, sua disposição e alegria, além do grande incentivo à pesquisa com as orquídeas.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Aos funcionários do PGA, Érica e Ruy que sempre estiveram nos orientando.
Aos meus irmãos Alex Sandro e Carlos Eduardo que, mesmo não estando sempre perto, foram tão importantes.

À minha grande amiga e companheira de estágios Alyadni, por todos os momentos que estive comigo nesta caminhada, pelas viagens que fez para estar tantos e tantos dias ajudando-me no laboratório.

Às minhas amigas e “irmãs” Andressa e Fernanda, que estiveram o tempo todo comigo, dividindo os problemas, angústias e muitas risadas, cuidaram de mim e foram meu porto seguro sempre que estive longe da minha família.

À amiga Letícia, por todos os momentos que estive comigo, nas disciplinas, no laboratório, amiga que nunca negou ajuda sempre que precisei.

Ao amigo Vinícius que prontamente me ajudou na obtenção e formatação das figuras.

À minha amiga de longa caminhada Camila que sempre me apoiou, preocupou-se comigo, e mesmo com o tempo e a distância sempre foi minha fiel amiga.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

BIOGRAFIA

ELIANE CRISTINA PRIZAO, filha de Antonio Carlos Prizão e Leonice da Silva Prizão, nasceu em Cianorte, Estado do Paraná, aos 04 de junho de 1982.

Em fevereiro de 2004, graduou-se no curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, pela Universidade Paranaense, no Estado do Paraná.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia na área de Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá, no Estado do Paraná.

No dia 13 de dezembro de 2006, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos gerais da cultura	4
2.2 Micropropagação de plantas ornamentais	5
2.3 Meio de cultura	6
2.4 Carvão ativado	8
2.5 Grafite	11
2.6 pH	12
2.7 Luz	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Efeito de carvão e do grafite no crescimento de <i>Cattleya bicolor</i> LINDL. e um híbrido secundário de <i>Cattleya</i>	16
3.2 Condução dos experimentos e coleta de dados	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado e do grafite no desenvolvimento de plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> LINDL.	19
4.2 Efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado e do grafite no desenvolvimento de plântulas do híbrido 'BLC Pastoral Innocence'	25
4.3 Efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado e do grafite no pH inicial e final do meio de cultura KC, para o desenvolvimento de plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> e do híbrido 'BLC Pastoral Innocence'	31
4.4 Efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado e do grafite no desenvolvimento de plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> e do híbrido 'BLC Pastoral Innocence'	34
5 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise de variância para as características 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 <i>Cattleya bicolor</i>	19
Tabela 2	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 <i>Cattleya bicolor</i>	20
Tabela 3	Análise de variância para as características 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 no híbrido 'BLC <i>Pastoral Inocence</i> '	25
Tabela 4	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 do híbrido 'BLC <i>Pastoral Inocence</i> '	26
Tabela 5	Análise de variância para o valor do pH inicial e final do meio de cultura Knudson contendo diferentes concentrações de carvão ativado ou grafite para <i>Cattleya bicolor</i> e para o híbrido 'BLC <i>Pastoral Inocence</i>	31
Tabela 6	Teste de média para os valores de pH inicial e final do meio de cultura Knudson contendo diferentes concentrações de carvão ativado ou grafite para <i>Cattleya bicolor</i> e para o híbrido 'BLC <i>Pastoral Inocence</i>	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> , após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de carvão ativado, sob influência de luz contínua	23
Figura 2	Plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> , após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de carvão ativado, sob influência de fotoperíodo de 14 horas	23
Figura 3	Plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> , após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de grafite, sob influência de luz contínua	24
Figura 4	Plântulas de <i>Cattleya bicolor</i> , após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de grafite, sob influência de fotoperíodo de 14 horas	24
Figura 5	Plântulas do híbrido 'BLC <i>Pastoral Inocence</i> ', após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de carvão ativado, sob influência de luz contínua	29
Figura 6	Plântulas do híbrido 'BLC <i>Pastoral Inocence</i> ', após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de carvão ativado, sob influência de fotoperíodo de 14 horas	29
Figura 7	Plântulas do híbrido 'BLC <i>Pastoral Inocence</i> ', após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de grafite, sob influência de luz contínua	30
Figura 8	Plântulas do híbrido 'BLC <i>Pastoral Inocence</i> ', após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de grafite, sob influência de fotoperíodo de 14 horas	30

RESUMO

PRIZAO, Eliane C., Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2006.
Efeito do carvão ativado e do grafite no crescimento *in vitro* de orquídeas.
Professora Orientadora: Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.
Professor conselheiro: Dr^a Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

A proposta do presente estudo foi verificar o efeito das concentrações de carvão ativado e grafite adicionado ao meio de cultura no desenvolvimento *in vitro* da espécie *Cattleya bicolor* e do híbrido 'BLC *Pastoral Innocence*'. As culturas assimbióticas foram mantidas sobre meio nutritivo Knudson (KC) suplementado com carvão ativado ou grafite nas concentrações: 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 e 7,5 g/L, sob influência de luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas, pelo período de seis meses. A adição de 6,0 g/L de grafite ao meio KC estimulou o comprimento da parte aérea das plântulas de *C. bicolor* e o aumento no número e comprimento das raízes foram evidentes nos meios que continham 6,0 e 3,0 g/L, respectivamente, de carvão ativado. No híbrido 'BLC *Pastoral Innocence*', a adição de 4,5 g/L de carvão ativado ao meio KC promoveu maior número de brotos. Um aumento no comprimento da raiz foi observado com a adição de 4,5 e 1,5 g/L de carvão ativado. Houve um aumento no comprimento da parte aérea, número de raízes e no IC na presença de luz contínua, enquanto que o fotoperíodo de 14 horas promoveu aumento no comprimento das raízes do híbrido. As diferentes concentrações de carvão ativado e grafite no meio KC promoveram alterações no pH inicial e final dos meios de cultura. As diferentes concentrações do carvão ativado provocaram alcalinização dos meios, já no controle e nas diferentes concentrações de grafite, ocorreu acidificação em relação ao pH inicial onde foram cultivadas as plântulas de *C. bicolor* e do híbrido.

Palavras-chave: Meio Knudson, aditivos, concentrações, orquídea.

ABSTRACT

PRIZAO, Eliane C., Universidade Estadual de Maringá, December 2006. **Influence of the activated charcoal and graphite on *in vitro* growth of orchids.** Adviser: Dr. Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Co-adviser: Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

Influence of activated charcoal and graphite added to the culture medium in *in vitro* development of *Cattleya bicolor* and hybrid BLC *Pastoral Innocence* is provided. Asymbiotic cultures were maintained on medium nutrient culture Knudson (KC) supplemented with activated charcoal or graphite at 1.5; 3.0; 4.5; 6.0 and 7.5 g/L concentrations in continuous light or 14h-photoperiod, during 6 months. Whereas the addition of 6.0 g/L of graphite to KC medium triggered the length of *C. bicolor's* aerial part, there was also an increase in number and length of roots respectively in 6.0 and 3.0 g/L media of activated charcoal. The addition of 4.5 g/L of activated charcoal in hybrid BLC *Pastoral Innocence* to KC medium favored a greater number of shoots. An increase in root length has been reported when 4.5 and 1.5 g/L of activated charcoal were added. Length of aerial part, number of roots and IC in continuous light increased, whereas the 14h-photoperiod triggered an increase in the length of the hybrid's roots. Different activated charcoal and graphite concentrations in the KC medium favored changes in initial and final pH in the culture media. Different concentrations of activated charcoal caused the alkalization of media; on the other hand, there was an acidification in control and in the different graphite concentrations with regard to initial pH in which *C. bicolor* and the hybrid plants were cultivated.

Key words: Knudson medium, addition, concentrations, orchids.

1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores entre as fanerógamas, sendo altamente especializada, e a mais evoluída dentre as monocotiledôneas (DRESSLER, 1993). Além da diversidade de tamanho, forma e cor de suas flores, as orquídeas possuem os híbridos que são, geralmente, desenvolvidos refletindo a preferência do consumidor. Tanto as espécies quanto os híbridos intragenéricos e intraespecíficos dos gêneros *Cattleya* e *Laelia* são de interesse comercial em razão da beleza e tamanho de suas flores (GRIESBACH, 2002). Foram registrados, até o ano de 2001, 80.318 híbridos de seis gêneros de orquídeas (*Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* e *Vanda*), os quais constituem os componentes mais importantes do comércio internacional de orquídeas. O cultivo desses seis gêneros tem sido realizado desde que se iniciou a hibridação nas orquídeas no século XIX, sendo que o primeiro híbrido interespecífico registrado foi de *Cattleya* em 1850. A *Cattleya* é o grupo que possui maior número de híbridos, observando-se a existência de aproximadamente 29.000 híbridos, com destaque este gênero no setor de comercialização de orquídeas (CONVENCIÓN..., 2002).

O comércio de produtos da floricultura vem se expandindo; Kiyuna et al. (2004) registra que no Brasil é observado aumento de 21% nas exportações entre os anos de 2003 a 2004, e isto equivale a um acréscimo de 19,5 US\$ em 2003 para 23,6 US\$ em 2004. Já, a importação obteve um decréscimo de 2% de um ano para o outro, portanto, o mercado de flores e plantas ornamentais obteve desempenho excepcional por dois anos consecutivos. Dentre os produtos exportados, destaca-se o grupo de mudas, seguido pelos bulbos e flores cortadas para buquês. O valor das exportações de mudas, no primeiro semestre de 2004, representa 56,1% do total das exportações de produtos da floricultura. Segundo Kiyuna et al. (2005), no ano de 2004, destacou-se a exportação de flores frescas (87,2%), mudas de orquídeas (55,4%), mudas de plantas ornamentais, exceto orquídeas (18,0%), além dos bulbos, tubérculos e rizomas (16,9%).

A expansão no comércio de flores e plantas ornamentais faz com que ocorra aumento na fronteira agrícola, onde o Estado de São Paulo que é responsável por 70% da produção nacional (FEDERAÇÃO..., 2001) apresentando crescimento de 45% na área cultivada entre os anos de 1998 a 2003, e resulta em um aumento na renda familiar dos floricultores que possuem esta atividade como exploração econômica principal, que evidencia a importância do setor como gerador de renda no campo e conseqüentemente, aumenta a exportação de flores (FRANCISCO; KIYUNA, 2004).

Dentre os diversos países produtores de orquídeas, segundo Convención... (2002), os principais são: Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Indonésia, Malásia, Países Baixos e Tailândia.

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. Assim, com a tecnologia da germinação assimbiótica, milhares de plântulas poderiam chegar à maturidade a partir de um único fruto. 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).

De acordo com Convención... (2002) dentre as milhares de orquídeas comercializadas anualmente, 95% destas são propagadas artificialmente, no sentido de diminuir o número de plantas coletadas em seu habitat natural.

Diversos são os aditivos ou suplementos que podem ser adicionados ao meio de cultura. O carvão ativado é um destes aditivos 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); por outro lado em inúmeros trabalhos há indicações de que este composto possui a capacidade de adsorção de compostos do meio.

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* e de um

híbrido secundário de *Cattleya*. É possível que a concentração destes compostos possa ser indicada como eficientes para os processos de desenvolvimento das plântulas, e que o grafite possa ser usado em substituição ao carvão ativado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cultura

As orquídeas são pertencentes à família Orchidaceae, a mais evoluída do reino vegetal, apresentam cerca de 18.500 espécies distribuídas em 788 gêneros e mais de 100.000 híbridos, sendo que para alguns autores, o número de espécies pode ultrapassar 25.000 (PAULA; SILVA, 2004).

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; SILVA, 2004). Este gênero abrange mais de 50 espécies, sendo a *Cattleya bicolor* incluída na lista das mais conhecidas no Brasil (ENGLERT, 2000).

Dentre as orquidáceas, as do gênero *Cattleya* e do gênero *Laelia* são as mais ornamentais e também as mais conhecidas. A facilidade do cultivo, condições artificiais aliadas à beleza ornamental das suas flores nas espécies e híbridos, tornaram-nas muito procuradas por colecionadores, orquidófilos e para fins comerciais (BICALHO, 1980).

O elevado número de espécies e híbridos de orquídeas possibilitam a ocorrência de grande variabilidade de formas, tamanhos e cores de folhas e flores. Graças à beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas destacam-se como importante planta ornamental, de grande interesse econômico e botânico (ARAUJO, 2004).

Quanto à produção de mudas de orquídeas por sementes, Hadley (1982) relatou que Bernard, em 1904, foi o primeiro a descrever a infecção fúngica ocorrente nas espécies de orquídeas utilizando-se de um híbrido do gênero *Cypripedium* L. e a espécie *Bletia hyacinthina* (Sm.) R. Br.

As sementes de orquídeas são muito pequenas, medem aproximadamente 0,015 mm de comprimento e 0,009 mm de diâmetro. Embora em um único fruto, denominado cápsula, possa conter 500.000 sementes ou mais, estas possuem pouquíssima ou nenhuma reserva alimentícia, o que dificulta sua germinação na natureza (PAULA; SILVA, 2004). A germinação das sementes de orquídeas *in vivo* depende da relação simbiótica com um fungo (GRIESBACH, 2002), pois elas não possuem reserva nutritiva necessária para a germinação (PAULA; SILVA, 2004); já *in vitro* é possível a germinação por meio da adição de um meio nutritivo, sendo este tipo de germinação denominada assimbiótica (PIERIK, 1990). Com a tecnologia da germinação assimbiótica, milhares de plântulas poderiam chegar à maturidade, a partir de um único fruto (GRIESBACH, 2002).

2.2 Micropropagação de plantas ornamentais

Para satisfazer as necessidades de mercado, preservar as espécies, manter a biodiversidade e recuperar áreas já despovoadas, é importante dispor de métodos adequados de propagação, de modo a permitir a clonagem rápida e massiva das plantas (ARAUJO, 2004). A micropropagação de plantas ornamentais é a técnica de cultura de tecidos mais amplamente utilizada. Mais de 500 milhões de plantas são propagadas anualmente, e a maioria é constituída por espécies ornamentais (DEBERGH, 1994), das milhares de orquídeas comercializadas anualmente, aproximadamente 95% são propagadas artificialmente (CONVENCIÓN..., 2002). Atualmente, a maior concentração da atividade de micropropagação reside na limpeza clonal e na produção de mudas de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas (PASQUAL, 2001).

A técnica de micropropagação se baseia na totipotencialidade, que é a capacidade que as células possuem de dar origem a uma planta inteira (TORRES et al., 1999). A partir da técnica de clonagem *in vitro*, também conhecida por micropropagação, ocorre a formação de indivíduos geneticamente idênticos, a partir de células ou fragmentos de uma determinada matriz. Esta técnica tem se mostrado de enorme importância prática e potencial nas áreas agrícolas, florestal, horticultural, bem como na pesquisa básica em

geral. A multiplicação *in vitro* em larga escala de plantas de importância econômica tem resultado na instalação de verdadeiras biofábricas comerciais, baseadas no princípio da linha de produção (KERBAUY, 1997).

Como é possível um ajuste dos fatores que influenciam a propagação vegetativa tais como nutrientes e níveis de reguladores de crescimento, consegue-se uma taxa de propagação maior que a propagação convencional, produzindo assim um maior número de plantas em menor período de tempo, além de poder acelerar a produção de novas variedades (HENAO, 1991).

Segundo Debergh (1994), a utilização de tecidos para fins de propagação de plantas é normalmente dividida em cinco estágios: estágio 0, seleção e preparo da planta matriz; estágio 1, estabelecimento de cultura asséptica; estágio 2, multiplicação rápida; estágio 3, preparação para o crescimento em meio natural, e estágio 4, aclimatização.

Particularmente, na área de plantas ornamentais, onde predominam plantas híbridas (gérbera, cravo, tulipa, orquídea etc), a clonagem *in vitro* de matrizes selecionadas tem permitido a compatibilização de demandas específicas do mercado interno e externo, com atributos importantes como época de floração, coloração, tamanho e forma das flores, número de flores por planta, comprimento e resistência das hastes florais, tamanho e vigor das plantas etc (KERBAUY, 1997).

A clonagem de orquídeas *in vivo* é um processo muito lento e pode requerer um tempo de até dez anos para obter um clone de tamanho aceitável. Já, o cultivo *in vitro* apresenta as vantagens de serem em alguns casos, muito eficientes, proporcionarem altos rendimentos e mantêm nos descendentes as características da planta-matriz (PIERIK, 1990).

É, porém, bastante reduzido o número de trabalhos publicados que envolvem cultura de células e tecidos vegetais de espécies de orquídeas. Além disso, é necessário otimizar protocolos eficientes para a propagação em larga escala (ARDITTI; ERNST, 1993).

2.3 Meio de cultura

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos

tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células (CALDAS et al., 1998).

O meio de cultura é constituído de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem: água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e fitorreguladores. Outros componentes orgânicos, tais como: aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas podem ser adicionadas ao meio para otimizar determinada resposta no padrão de crescimento (TORRES et al., 2001).

Em 1922, Lewis Knudson, na Universidade de Cornell, relatou 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 açúcares. Com isto, por meio da tecnologia da germinação assimbiótica, milhares de plântulas poderiam chegar à maturidade a partir de um único fruto. Das várias fórmulas nutritivas propostas por Knudson, a mais conhecida é a fórmula "C" (KC), de 1946, que passou a ser utilizada para a germinação de sementes e cultivo de plântulas de várias espécies de orquídeas (GRIESBACH, 2002).

Geralmente, um meio basicamente simples é recomendado às orquídeas porque não exigem altas quantidades de minerais (PIERIK, 1990). Na sua maioria (*Cattleya*, *Cymbidium*, *Oncidium*, *Laelia*, *Vanda* entre diversos outros gêneros populares) é usado o meio Knudson "C" ou com algumas modificações na formulação original (ARDITTI et al., 1982). Para tanto, observa-se uma grande variedade de meios para a micropropagação, porém, a maioria das descrições de preparos de meio de cultura alternativos não demonstram de maneira comparativa se o novo meio é ou não melhor do que o outro do qual ele foi originado. Na maioria das vezes, os meios são selecionados em função da espécie e tipo ou estágio da cultura que está sendo efetuado, uma vez que a formulação mais apropriada de meio pode variar dentro de uma mesma espécie (PASQUAL et al., 1997).

2.4 Carvão ativado

A composição do meio de cultura é um aspecto de extrema importância na cultura de tecido vegetal (GAMBORG, 2002), o meio Knudson “C” (KC), amplamente utilizado para o cultivo *in vitro* de orquídeas, pode ser facilmente modificado por meio de aditivos ou suplementos diversos, em que o carvão ativado é um dos diversos compostos que pode ser adicionado ao meio nutritivo. John T. Curtis, em 1943, foi o primeiro a escurecer o meio de cultura para a germinação de sementes de orquídeas nativa americana do gênero *Cypripedium* (ARDITTI; KRIKORIAN, 1996; ARDITTI et al., 1982).

No cultivo *in vitro* pode ser utilizado tanto o carbono animal, quanto o carbono vegetal, e este último é o mais utilizado em meios de cultura (ARDITTI, et al., 1982; ARDITTI; ERNST, 1993). O carvão vegetal ou carbono ativado é caracterizado pela relação extremamente grande entre área-peso (até 2000 m²/g), sendo comumente utilizado para a adsorção de substâncias (ARDITTI; ERNST, 1993).

De acordo com Pasqual (2001), o carvão ativado finamente moído é freqüentemente adicionado ao meio em diferentes estágios da cultura de tecidos. Apesar de não ser um regulador de crescimento, este composto modifica a composição do meio e, por isso, em algumas circunstâncias, regula o crescimento da planta *in vitro*. Diversos efeitos têm sido relacionados com a adição do carvão ativado ao meio de cultura, tais como: promoção de morfogênese (particularmente embriogênese); restrição de excesso de crescimento de calo, adsorção de compostos exsudados dos tecidos cultivados ou presentes no ágar que, de alguma maneira inibiria o crescimento; formação de raízes em virtude da, provavelmente, sua alta capacidade em excluir a luz do meio de cultura.

Segundo Henao (1991), a adição de carvão ativado ao meio de cultivo pode apresentar efeitos benéficos ou prejudiciais. O crescimento, a organogênese e a embriogênese são estimulados em espécies como *Funaria*, micrósporos de tabaco, orquídeas, embriões de palma, ápices de gengibre, porém, tem-se observada a inibição do crescimento em soja e *Haplopappus*.

Ernst (1975), Hinnen et al. (1989) e Moraes et al. (2003) obtiveram resultados positivos no crescimento e desenvolvimento de diversas espécies

de orquídeas quando adicionado carvão ativo ao meio de cultura. Moraes et al. (2003) observaram que além do carvão melhorar a qualidade da plântula de orquídea *in vitro* a sobrevivência delas após sua aclimatização também aumentou.

A germinação das sementes de orquídeas também é favorecida com a presença do carvão ativado (ARDITTI; KRIKORIAN, 1996). Rodrigues et al. (2003) analisaram que dentre diferentes concentrações de carvão ativado testadas, a concentração de 0,5 g L⁻¹ proporcionou melhor germinação das sementes, independente do pH do meio de cultura.

Segundo Groll et al. (2002), os efeitos do carvão ativo podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta, e em Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), o carvão teve efeito positivo até o sétimo dia sobre a diferenciação e germinação, após isto não apresentou efeito benéfico, indicando assim, que o uso contínuo do carvão durante todo o período de germinação poderá inibi-la.

O carvão ativo por possuir fortes propriedades adsorventes tem sido utilizado para a adsorção de produtos químicos, gases e sólidos dissolvidos. Se por um lado ele adsorve substâncias indesejáveis no meio, por outro ele pode se ligar irreversivelmente aos reguladores de crescimento, vitaminas, íons, que prejudicam o desenvolvimento da cultura (PASQUAL, 2001; ARDITTI et al., 1982).

Pesquisas demonstram a adsorção de reguladores de crescimento como auxina (EISFELD et al., 2004), GA₃ (ácido giberélico) (CHAGAS et al., 2005), tiamina, ácido nicotínico (WEATHERHEAD et al., 1978), piridoxina, ácido fólico, além de quelatos de ferro (JOHANSSON et al., 1990). Até mesmo a adsorção de tanino existente na polpa de fruto verde de banana adicionada ao meio foi adsorvida pelo carvão, sendo, portanto, benéfico à cultura (SILVA et al., 2003).

Uma outra função atribuída ao carvão ativado é a sua atuação como antioxidante. Em cultura de tecido de bananeira, para prevenir a oxidação polifenólica, adiciona-se ácido cítrico, ácido ascórbico e carvão ativado, separadamente ao meio (UTINO et al., 2001). Ledo et al. (2001), observaram que tanto na presença ou ausência de ácido ascórbico, ráquias de inflorescências maduras de *Euterpe oleraceae* Mart. (açazeiro), somente

alcançaram menor grau de oxidação quando foram inoculados em meio sólido suplementado com 0,3% de carvão ativado. Bressan et al. (1999) também observaram que plântulas de *Phalaenopsis* transplantadas em meio sem carvão ativado causavam escurecimento do meio devido a determinadas substâncias, provavelmente fenóis, que seriam exsudados das raízes.

O carvão ativado tem sido bastante utilizado no cultivo *in vitro* para estimular o enraizamento, principalmente devido à sua alta capacidade em excluir a luz do meio (PASQUAL, 2001). Coelho et al. (2001) e Mantovani et al. (2001), observaram em seus trabalhos efeitos positivos do carvão ativo quanto ao enraizamento, alongação e engrossamento das raízes. Entretanto, Côrrea et al. (2003) observaram que a presença de carvão ativado afetou negativamente a formação de estruturas semelhantes às raízes tuberosas de *Ipomoea batatas* (L. Lam), e as raízes formadas na presença do mesmo se apresentaram finas e com redução na matéria seca; Borges et al. [s.d] também relataram que a presença de carvão, promoveu redução e retardo no enraizamento de brotos de *Ananas porteanus* K. Koch ex E. Morren, um abacaxi ornamental.

Segundo Pasqual (2001), diversos autores têm relatado que o carvão ativado causa aumento no pH do meio de cultura, sendo observado aumento de 0,75 unidades no pH em meio MS na presença de 0,5% de carvão ativo, esta mudança no pH ocorreu, em parte, durante a autoclavagem e em parte, nos primeiros 14 dias subsequentes em meio armazenado. Como o pH pode influenciar o crescimento e a morfogênese da cultura, é provável que alguma diminuição nos efeitos do carvão ativado em plantas possa ser atribuída às mudanças induzidas por ele no pH do meio.

Ao contrário, Pan e Van Staden (1999), testando diferentes concentrações de carvão ativo, analisaram que o pH de todos os meios diminuíram uma a duas unidades após a autoclavagem, atingiram um pH ótimo para que ocorresse a promoção da morfogênese. Hinnen et al. (1989) observaram que o carvão ativado apresenta baixa capacidade tamponante no meio, obtendo uma redução no pH de 5,2 para 4,00 após 12 semanas de cultivo de sementes de um híbrido de *Phalaenopsis*.

Hinnen et al. (1989) relatam ainda sobre a importância do grau de pureza do carvão ativado, pois analisando diferentes graus de pureza do carvão, ele obteve um aumento significativo no peso fresco de raízes e plantas

em meio que continha carvão com maior grau de pureza, Arditti et al. (1982), também cita que é importante utilizar um carvão de boa qualidade.

As mais diversas concentrações de carvão ativado são utilizadas nos trabalhos de cultivo *in vitro*. De acordo com Arditti et al. (1982), o carvão vegetal para a maioria dos meios deveria ser usado na concentração de 2 g/L. Torres et al. (2001) citam que a adição de carvão ativo deve variar nas concentrações de 0,2% a 0,3%, quando ocorre escurecimento do tecido *in vitro*, descoloração do meio, formação de calo na fase de enraizamento ou quando o crescimento do tecido é inibido. As mais diversas concentrações de carvão ativo são observadas nos trabalhos de cultivo *in vitro*, e geralmente variam entre 1,0 a 3,0 g (BRESSAN et al., 1999; COELHO, et al., 2001; ERNST, 1975; HINNEN, et al., 1989; MANTOVANI et al., 2001; MORAES et al., 2003; PIERIK et al., 1988; YAM; WEATHERHEAD, 1988).

2.5 Grafite

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.

O grafite é amplamente distribuído mundialmente, mesmo assim ele possui pequena importância econômica. Há uma escassez mundial de grafite natural e é particularmente fabricado na América do Norte e Europa (GREENWOOD; EARNSHAW, 1984).

Segundo os autores acima citados, o grafite natural pode ser utilizado na fabricação de aço, na fundição, refratários, lubrificantes, lápis e outros.

O grafite é uma das formas alotrópicas do carbono, tal como o carvão e o diamante. Ele pode ser natural ou sintético, apresentando a mesma estrutura cristalina, porém com tamanho de cristalitos variados e diferentes propriedades físicas e químicas. É um excelente condutor de calor e eletricidade e exibe resistência ao ataque químico, ao choque térmico e baixa molhabilidade por vidros e metais (exceto aço e ferro fundido) e altas temperaturas (OLIVEIRA et al., 2000).

No grafite, os átomos estão arranjados na forma de anéis hexagonais fundidos (BRADY; HUMISTON, 1986), são a ligação entre as camadas de grafite fraca, consistindo em forças de London que podem suportar o cristal de grafite somente porque as camadas são muito largas. As camadas podem escorregar umas sobre as outras, o que dá ao grafite propriedades lubrificantes muito úteis (RUSSEL, 1980; BRADY; HUMISTON, 1986).

O grafite possui uma reatividade e uma difícil molhabilidade por materiais aquosos e orgânicos. Em meio aquoso, o grafite apresenta inferior dispersibilidade do que os óxidos, carbetos e outros materiais. No processo de dispersão, a fase líquida deve, inicialmente, molhar a superfície externa do material e também substituir o ar contido no interior dos aglomerados de partículas. Tais aglomerados são então quebrados com o auxílio de agitação mecânica, e expõem a superfície de cada partícula ao líquido. Dessa forma, as superfícies tornam-se disponíveis para a atuação dos aditivos e conseqüente estabilização (OLIVEIRA et al., 2000).

2.6 pH

O pH do meio é responsável pela manutenção da solubilidade dos sais, influencia a absorção de nutrientes e reguladores de crescimento e afeta a eficiência do ágar. Normalmente, o pH apropriado para a germinação de sementes de orquídeas deve ser entre 4,8 e 5,5. O meio pode não ser solidificado em pH muito abaixo de 4,0, além disto, o crescimento das plântulas pode ser inibido quando o pH é menor que 4,0 ou maior que 8,0 (ARDITTI et al., 1982; PASQUAL, 2001). A maioria dos tecidos cultivados são crescidos em pH de 5,2 a 5,8 (SKIRVIN, 1986).

Segundo Pasqual (2001), a diferenciação e a morfogênese são freqüentemente dependentes do pH. Diversos relatos mostram que o pH do meio pode influenciar a formação de raízes de algumas plantas *in vitro*, em que um pH levemente ácido parece ser preferido para a maioria das espécies vegetais e uma explicação é que a acidez é necessária para a ação das auxinas.

Nos mais variados tipo de meios de cultura utilizados para o cultivo de orquídeas, observa-se uma grande variação nos valores de pH, ajustados

antes da autoclavagem ou esterilização por filtração (MORALES, 2004). Os meios de cultura MS (completo ou com a metade dos sais), Gamborg B5 e WPM (modificados ou não) foram ajustados entre 5,5 e 6,0 por Borges et al. [s.d], Bressan et al. (1999), Coelho et al. (2001), Groll et al. (2002), Hinnen et al. (1989), Mantovani et al. (2001), Pan e Van Staden (1999), Pierik et al. (1988), Praxedes et al. (2000), Utino et al. (2001) e Yam e Weatherhead (1988). Já, no meio Knudson, observou-se a aferência do pH em torno de 5,2 a 5,5 por Kerbauy (1984), Martini et al. (2001) e Morales (2004).

Pierik et al. (1988), ao analisarem diferentes pHs (5,5; 6,0; 6,5; e 7,0), verificaram bom desenvolvimento de *Paphiopedilum ciliolar* Pfitz em pH menor que 7,0, ao observar a inibição do crescimento no pH 7,0.

Ao contrário, Pasqua et al. (2002) obtiveram aumento no crescimento de *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun em pH 7,0; já, em pH 3,0 houve ocorrência de necrose no explante, após uma semana do cultivo.

Skirvin et al. (1986) sugerem que, os pesquisadores façam as medições de pH após a autoclavagem, pois esta prática não é rotineira, não ficando, portanto, explícito em qual valor de pH foi iniciada a cultura. Podem ocorrer mudanças no pH após a autoclavagem, e estas mudanças são esperadas com ou sem a adição de ágar.

O pH do meio deve ser ajustado antes da adição do agente gelificante. Owen et al. (1991) observaram que a adição do agente gelificante em meio MS alterou o pH para um aumento de 0,23 unidades, e Pasqual (2001) também relata que a maioria dos tipos de ágar faz com que ocorra aumento do pH logo após serem dissolvidos.

Segundo Owen (1991), diversos componentes inorgânicos, orgânicos e complexos podem influenciar o pH do meio, podem alterar o crescimento e desenvolvimento da planta *in vitro*. O carvão ativado, por exemplo, é um aditivo que altera o pH do meio, que é observado um aumento no pH.

Um outro fator que pode promover a alteração do pH do meio é a presença ou ausência dos tecidos vegetais. Vacin e Went (1949), ao medir o pH do meio contendo *Epidendrum o' brineanum* ao final de cem dias, observaram uma alteração de 5,46 para 3,78; já na ausência de explante em 277 dias de cultivo, o pH pouco se alterou: 5,46 para 5,23. Skirvin (1986) também afirma que a presença dos tecidos de plantas afeta o pH final do meio.

Além dos pesquisadores medirem o pH do meio antes e após a autoclavagem, o autor acima sugere também que as medições sejam realizadas durante o tempo de cultivo para observar quais as variações que podem ocorrer.

2.7 Luz

De acordo com as definições de Pasqual (2001) e Torres et al. (2001), a luz é a forma de radiação eletromagnética cujo crescimento e desenvolvimento das plantas são dependentes para processos como fotossíntese (conversão de energia luminosa em energia química), fotomorfogênese (desenvolvimento de estruturas ou de formas induzidas pela luz) e fototropismo (resposta em crescimento das plantas induzidas pela luz).

Segundo Arditti e Ernst (1993), diversos aspectos da luz são de extrema importância na micropropagação de orquídeas: presença ou ausência de luz, duração (fotoperíodo), intensidade (níveis de energia), qualidade (cor), e fonte (natural, fluorescente, incandescente). Pasqual (2001) relata que a influência da luz pode ser direta, por meio da ação sobre o tecido que já está crescendo *in vitro*, ou indireta, por meio da influência da luz sobre a planta-mãe. Algumas vezes, as divisões iniciais das células de explantes e o crescimento de calos podem ser inibidos pela luz, apesar de geralmente, a luz ser requerida para ótimos resultados para o crescimento *in vitro* de tecidos organizados.

Pasqual (2001) cita ainda que, as lâmpadas fluorescentes são utilizadas quase universalmente para fornecer luz para as culturas. Elas têm a vantagem de proporcionar iluminação sem gerar muito calor. Lâmpadas incandescentes são, às vezes, utilizadas para complementar a luz fluorescente no espectro do vermelho, mas isso nem sempre é desejável. As salas de crescimento para micropropagação são equipadas com lâmpadas de luz branca fria, “Gro-lux” ou mistura de ambas.

Erig e Schuch (2005), procurando determinar um possível tipo mais ativo de luz que a luz branca, de forma a aumentar a eficiência da multiplicação *in vitro* de framboeseira “Batum”, testaram cinco diferentes tipos de luz – branca (controle), vermelha, amarela, azul e verde, observando que a

multiplicação é aumentada com a luz verde, embora, a luz branca seja a mais utilizada na cultura de tecidos. Entretanto, no desenvolvimento de *Chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT, o tratamento com luz vermelha foi o que proporcionou o melhor desenvolvimento das plantas, quando comparados com a luz verde, azul e branca (AFFONSO et al., 2003).

Lima et al. (2003) comparando a luz fria e gro-lux para o cultivo de *Rumohra adiantiformis* (FORST) ching *in vitro*, observaram que o tipo de lâmpada pode ter influenciado na quantidade de folhas emitidas, tendo em vista que as plântulas apresentaram melhores resultados na luz fria.

As orquídeas podem crescer abaixo de luz ou escuro contínuo, ou períodos de luz (fotoperíodo) de várias durações. O fotoperíodo apropriado deve ser testado experimentalmente para gêneros e espécies que não tenham sido trabalhados antes (ARDITTI et al., 1982; ARDITTI; ERNST, 1993).

A adequação do fotoperíodo das culturas é necessário para o ótimo crescimento e desenvolvimento dos explantes *in vitro*. O início de determinado processo morfogênético é manifestado quando as culturas são expostas a um adequado comprimento do dia (TORRES, 2001). Zeigler et al. (1967), ao testar três tipos de fotoperíodos: 12, 16 e 20 horas em *Cattleya Enid alba* x *Laelia anceps* var. *veitchii*, observaram um aumento no crescimento de acordo com o aumento do comprimento do fotoperíodo, isto por causa do aumento da atividade fotossintética, resultante do longo período de iluminação.

Por outro lado, Costa e Carvalho (2003), avaliando a influência dos fotoperíodos de 12 e 16 horas na taxa de micropropagação de bananeira cv. Maçã, encontraram que a taxa de multiplicação foi igual nos dois fotoperíodos, recomendando, portanto, o uso do fotoperíodo de 12 horas, o que proporciona uma redução dos custos na produção das mudas micropropagadas.

Embora a condição padrão para a maioria dos cultivos realizados em laboratório é sob fotoperíodo de 16 horas, Pasqual et al. (2003) observaram que embriões imaturos oriundos de tangerineira “Poncã” x laranjeira “Pêra”, cultivados sob regime de 16 horas de luz contínua, proporcionou o pior resultado em termos de altura e peso da matéria fresca da parte aérea das plântulas, e peso da matéria fresca de raízes, já, os fotoperíodos de oito, 10, 12, 14, 18 e 24 horas proporcionaram melhor desenvolvimento dos embriões.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi constituído de experimentos de crescimento *in vitro* das orquídeas *Cattleya bicolor* e do híbrido de ('BLC *Pastoral Innocence*').

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo de Orquídeas da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, Paraná.

3.1 Efeito de carvão ativado e do grafite no crescimento de *Cattleya bicolor* LINDL. e um híbrido secundário de *Cattleya*

Sementes de *Cattleya bicolor* LINDL., provenientes do Estado de Minas Gerais e estocadas por nove meses, e sementes de um híbrido secundário obtido do cruzamento de espécies de *Brassavola*, *Cattleya*, *Laelia* (BLC) de nome fantasia '*Pastoral Innocence*', proveniente de Mandaguaçu – Paraná estocadas por 11 meses, foram semeadas assimbioticamente sobre o meio de cultura Knudson "C" (KC) suplementado com 150 ml/L de água de coco.

Após oito meses de cultivo, 15 plântulas, em média 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, sob influência de luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas.

Foram realizados quatro experimentos, sendo um para *Cattleya bicolor* sob influência de luz contínua e o outro sob influência de fotoperíodo 14 horas, e os outros dois experimentos para o híbrido secundário de *Cattleya* também sob influência de luz contínua e fotoperíodo 14 horas.

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

3.2 Condução dos experimentos e coleta de dados

Nos quatro ensaios propostos, a fim de mensurar o desenvolvimento alcançado pelas plântulas, 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.

Abaixo, exemplo de como é calculado o IC:

IC	ind	1f	2f	...	5 ou + f	1f	2f	...	5 ou + f	1f	2f	...	5 ou + f	...	5 ou + f	Total
					e	e			e	e	e		e		e	
					1 r	1 r			1 r	2r	2r		2r		5 ou + r	
Classe	1	2	3	...	6	7	8	...	11	12	13	...	16	...	31	31
% do total																
% do total x classe																

f = folha
r = raiz
ind = indiferenciado

O valor do IC para cada réplica foi feito através da % do total x classe e por meio da soma dos resultados de cada classe é dado o valor total do IC. Tanto em *Cattleya bicolor* quanto no híbrido secundário, o número de folhas e raízes ultrapassaram cinco, portanto, foram considerados como pertencentes à classe com cinco ou mais folhas e cinco ou mais raízes. Dessa forma, o número de classes instituídas para o cálculo do IC foi de 31.

Além do índice de crescimento, 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 plântulas 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 de ágar e 2,0 g/L 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 (6 meses), 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 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob influência de luz contínua ou fotoperíodo 14 horas, proporcionados por lâmpadas fluorescentes de 40 Watts, com intensidade luminosa de $14,9 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado e do grafite no desenvolvimento de plântulas de *Cattleya bicolor* (LINDL.)

A adição de diferentes concentrações de carvão ativado ou de grafite, no meio de cultura KC, interferiu com a formação de brotos nas plântulas de *C. bicolor*, mas o estímulo ou inibição das brotações não foram dependentes das condições de manutenção da cultura sob luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas de luz (Tabela 1); não foi verificada, também, interação significativa entre a adição do carvão ativado, ou de grafite, e as condições de manutenção das plântulas. Embora as comparações entre as médias dos números de brotos nas plântulas mantidas nos meios com grafite ou carvão ativado não tenham mostrado diferenças significativas em relação à ausência dos aditivos (meio KC, sem grafite ou carvão), o maior número de brotos (2,81) em plântulas de *C. bicolor* foi observado naquelas mantidas no meio KC que continham 7,5 g/L de grafite, e os menores índices de brotações ocorreram nas plântulas mantidas nos meios que continham 3,0 e 4,5 g/L de carvão ativado, e 1,5 g/L de grafite (Tabela 2).

Tabela 1 – Análise de variância para as características 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*.

Fontes de variação	GL	Quadrados Médios					
		NB	NF	CPA	NR	CR	IC
Tratamentos	10	1,6129 **	0,6942 ns	590,4111 ns	6,1441 **	350,805 **	100028,111 ns
Condição de crescimento	1	0,2585 ns	0,8175 ns	741,821 ns	0,1764 ns	305,5618 ns	37640,909 ns
Trat.x condição de crescimento	10	0,8376 ns	0,7943 ns	1326,3975 ns	3,4331 ns	321,2539 **	78060,234 ns
ERRO	66	0,4134	0,3854	394,5108	1,1591	85,0444	52204,608
CV(%)		32,45	10,74	30,02	17,75	26,38	8,63

** Significativo em nível de 1% de probabilidade , pelo teste F.

Tabela 2 – 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	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	1,49 c	6,49 a	64,964 ab	5,11 c	30,648 abc	2515,0 a
KC + Grafite 3,0 g/L	2,21 abc	5,44 b	65,650 ab	5,26 c	36,041 abc	2505,8 a
KC + Grafite 4,5 g/L	1,82 abc	5,65 ab	69,389 ab	5,20 c	39,284 ab	2599,9 a
KC + Grafite 6,0 g/L	2,59 ab	5,94 ab	81,558 a	5,52 bc	37,153 abc	2638,1 a
KC + Grafite 7,5 g/L	2,81 a	5,71 ab	72,076 ab	6,53 abc	26,405 bc	2696,9 a
KC + Carvão 1,5 g/L	2,28 abc	5,84 ab	64,211 ab	6,47 abc	28,025 abc	2643,0 a
KC + Carvão 3,0 g/L	1,49 c	5,57 ab	66,345 ab	6,46 abc	42,693 a	2741,1 a
KC + Carvão 4,5 g/L	1,51 c	5,97 ab	66,896 ab	7,07 ab	37,920 abc	2754,0 a
KC + Carvão 6,0 g/L	1,92 abc	5,80 ab	65,991 ab	7,70 a	40,740 ab	2858,8 a
KC + Carvão 7,5 g/L	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.

A interferência negativa do carvão ativado na indução de brotos em plântulas cultivadas em meio KC tem sido descrita para orquídeas (ARAÚJO, 2004), e também para outras espécies de plantas (FRÁGUAS, 2003). Na brotação de figueira 'Rocha de Valinhos', Fráguas (2003) aponta para um efeito do carvão ativado na adsorção de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, influenciando negativamente a divisão celular e o crescimento das gemas axilares, com o predomínio da dominância apical. Em plântulas da espécie *Miltonia flavescens*, Moraes et al. (2003) descrevem que o número de brotos formados foi menor em presença de carvão ativado.

O número de folhas formadas em *C. bicolor* não foi diferente nas plântulas mantidas em meio de cultura KC que continham as diferentes concentrações de carvão ativado ou de grafite (Tabela 1), indicando que a adição das diversas concentrações do carvão ativado, ou de grafite, não afetaram o desenvolvimento das folhas nesta espécie. 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 plântulas de *C. bicolor* também não foi dependente das condições de

manutenção da cultura sob luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas de luz (Tabela 1).

Maior número de plântulas de *C. bicolor* que apresentaram comprimento da parte aérea em torno de 2 cm em meio KC que continham 6,0 g/L de grafite, quando comparado com o número de plântulas mantido no mesmo meio na ausência de grafite (experimento-controle; Tabela 2), sugere que a concentração de 6,0 g/L de grafite possa ser recomendada em combinação com algum regulador de crescimento (ácido giberélico, por exemplo) no sentido de promover um crescimento diferencial das plântulas, em relação às demais concentrações de grafite ou de carvão ativado testadas no presente estudo. Chagas et al. (2005) encontraram maior comprimento da parte aérea em plântulas de *Citrus* quando foi adicionado ao meio de cultura 2 g/L de carvão ativado em combinação com as maiores concentrações de ácido giberélico, que estimulou uma proposta para efetuar testes análogos para obter crescimento diferencial significativo para as plântulas de *C. bicolor*.

A adição de carvão ativado no meio de cultura KC estimulou a formação de raízes nas plântulas de *C. bicolor* (Tabela 1). A adição de 4,5 ou 6,0 g/L de carvão ativado ao meio de cultura KC promoveu o desenvolvimento de maior número de raízes nas plântulas (Tabela 2). O efeito favorável da adição de carvão ao meio de cultura para indução de raízes tem sido verificado também para outras espécies de orquídeas (ARAÚJO, 2004). 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 plântulas cultivadas em meio contendo o carvão ativado. De acordo com os relatos de Arditti e Ernst (1993), no sistema radicular das orquídeas ocorre produção de compostos fenólicos tóxicos que podem comprometer o desenvolvimento das raízes; o efeito de tais compostos seriam então, atenuados pela capacidade de adsorção do carvão ativado quando presente no meio de cultura. Assim, é possível que o grafite, por ser um material inerte, não apresente um potencial de adsorção equivalente ao do carvão ativado quando adicionado no meio de cultura KC onde foram mantidas as plântulas de *C. bicolor*.

O número de raízes formadas nas plântulas de *C. bicolor* não foi influenciado pelas condições de manutenção da cultura sob luz contínua ou com fotoperíodo de 14 horas (Tabela 1), 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 (Tabela 1). Um maior número de plântulas apresentando raízes que atingiram um comprimento de até 2 cm foi observado nos meio KC contendo 3,0 e 7,5 g/L de carvão ativado (Tabela 2). O escurecimento do meio de cultura e o suposto potencial de adsorção do carvão ativado considerados previamente por diferentes autores (ARAÚJO, 2004; ARDITTI; ERNST, 1993; CÔRREA et al., 2003), e a ausência de luz periódica nas plântulas mantidas no fotoperíodo de 14 horas, devem ser os fatores que contribuíram para que as plântulas de *C. bicolor* mantidas no meio com carvão ativado apresentem crescimento maior das raízes.

A análise do índice de crescimento que considera o número de raízes e folhas formadas em cada plântula, não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 1). É possível que o efeito positivo da adição de carvão para o desenvolvimento das raízes e comprimento da parte aérea tenha sido atenuado pelo efeito negativo ou ausência de efeitos destes compostos para induzir brotações e produção de folhas, respectivamente. Isto é um aspecto positivo para o cultivo *in vitro* de plântulas de *C. bicolor*, uma vez que qualquer uma das concentrações dos referidos compostos testadas no presente estudo, poderia ser recomendada para manter as plântulas sem provocar alterações nos índices de crescimento das mesmas (Tabela 2), e particularmente interessante quando o objetivo primordial é promover maior desenvolvimento das raízes.



Figura 1 – Plântulas de *Cattleya bicolor*, após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de carvão ativado, sob influência de luz contínua.



Figura 2 – Plântulas de *Cattleya bicolor*, após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de carvão ativado, sob influência de fotoperíodo de 14 horas.



Figura 3 – Plântulas de *Cattleya bicolor*, após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de grafite, sob influência de luz contínua.

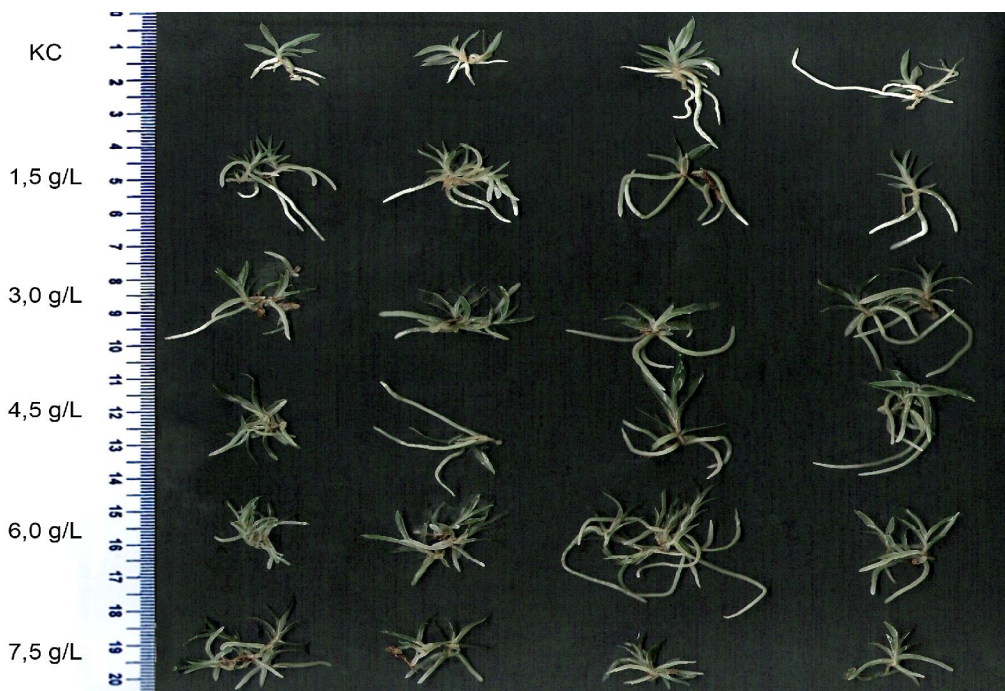


Figura 4 – Plântulas de *Cattleya bicolor*, após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de grafite, sob influência de fotoperíodo de 14 horas.

4.2 Efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado e do grafite no desenvolvimento de plântulas do híbrido '*BLC Pastoral innocence*'

A adição ao meio de cultura Knudson (KC) de diferentes concentrações de carvão ativado e grafite influenciou na formação de brotos do híbrido '*BLC Pastoral Innocence*', enquanto que as condições de manutenção da cultura sob luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas de luz não afetaram no desenvolvimento das brotações. Também não houve interação significativa entre as diferentes concentrações de carvão ativado ou de grafite e as condições de crescimento das plântulas (Tabela 3). A formação de maior número de brotos (3,09) por plântula do híbrido '*BLC Pastoral Innocence*', foi observado no meio KC contendo 4,5 g/L de carvão ativado (Tabela 4). Foi verificado por Silva et al. (2003) em plântulas do híbrido *Brassiocattleya* 'Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow', maior formação de brotos quando adicionado carvão ativado na concentração de 200 mg. L⁻¹ juntamente com 75 g.L⁻¹ de banana.

Tabela 3 – Análise de variância para as características 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 no híbrido '*BLC Pastoral Innocence*'.

Fontes de variação	GL	Quadrados Médios					
		NB	NF	CPA	NR	CR	IC
Tratamentos	10	1,6129 **	0,3877 ns	3248,441 **	0,7066 **	2833,6493 **	92472,427 ns
Condição de crescimento	1	0,2585 ns	0,5648 ns	20397,237 **	3,0563 **	17781,8278 **	668335,92 **
Trat.x condição de crescimento	10	0,8376 ns	0,2711 ns	877,0977 **	0,7121 **	727,9681 ns	203613,695 **
ERRO	66	0,4134	0,3072	212,5552	0,1586	209,9135	42446,577
CV(%)		32,45	12,58	20,68	35,1	50,79	19,4

** Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4 – 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 do híbrido ‘BLC *Pastoral Innocence*’.

Tratamentos g/L	Médias dos tratamentos					
	NB	NF	CPA	NR	CR	IC
KC (controle)	0,9988 b	4,66 a	95,933 a	1,26 abc	4,068 d	1107,3 a
KC + Grafite 1,5 g/L	1,9775 ab	4,12 a	89,688 a	0,71 c	10,313 d	908,0 a
KC + Grafite 3,0 g/L	1,3088 b	4,52 a	92,750 a	0,77 bc	7,250 d	904,8 a
KC + Grafite 4,5 g/L	2,32 ab	4,33 a	78,750 abc	0,94 bc	21,250 bcd	1015,1 a
KC + Grafite 6,0 g/L	1,4075 b	4,23 a	86,250 ab	1,37 abc	13,750 cd	1184,1 a
KC + Grafite 7,5 g/L	1,6613 b	4,12 a	75,625 abcd	0,96 bc	24,375 bcd	980,3 a
KC + Carvão 1,5 g/L	1,6350 b	4,70 a	48,125 ef	1,03 abc	51,875 a	1049,9 a
KC + Carvão 3,0 g/L	1,5913 b	4,51 a	63,323 bcde	1,29 abc	35,361 abc	1138,9 a
KC + Carvão 4,5 g/L	3,0975 a	4,67 a	37,876 f	1,68 a	55,911 a	1172,4 a
KC + Carvão 6,0 g/L	1,6888 b	4,22 a	51,370 def	1,41 ab	45,054 ab	1205,6 a
KC + Carvão 7,5 g/L	2,1513 ab	4,31 a	55,476 cdef	1,01 bc	44,524 ab	1012,6 a

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

As diferentes concentrações de carvão ativado ou grafite, não interferiram na formação de folhas do híbrido ‘BLC *Pastoral Innocence*’ (Tabela 3). Embora o carvão ativado na concentração de 1,5 g/L tenha proporcionado maior média de número de folhas (4,70), a diferença mínima verificada quando comparado ao tratamento-controle (KC) (4,66), não foi significativa. Portanto, a recomendação é utilizar somente o meio KC (controle) para esta variável (Tabela 4), pois embora o carvão ativado não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a sua redução é economicamente favorável, especialmente para a produção comercial de mudas. A formação de folhas não foi influenciada pela manutenção da cultura sob luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas de luz, bem como a interação entre as condições de manutenção da cultura e a adição de carvão ativado ou de grafite ao meio Knudson (Tabela 3).

O comprimento da parte aérea do híbrido ‘BLC *Pastoral Innocence*’ foi influenciado com a adição de carvão ativado ou grafite ao meio de cultura KC (Tabela 3). Um maior número de plântulas que apresentaram comprimento da parte aérea de aproximadamente 2 cm foi verificado no meio KC na ausência de carvão e grafite, e no meio KC contendo 1,5 e 3,0 g/L de grafite (Tabela 4).

Santos et al. (2005), ao testar diferentes concentrações de carvão ativado ao meio Knudson (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g.L⁻¹), verificaram que todas as concentrações de carvão ativado foram deletérias para a formação da parte aérea de *Epidendrum ibaguense*, sugerindo assim, a não-utilização de carvão ativado para o cultivo dessa espécie de orquídea. O comprimento da parte aérea das plântulas do híbrido '*BLC Pastoral Inocence*' também foi influenciado pelas condições de manutenção da cultura sob luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas de luz (Tabela 3). Houve aumento do comprimento da parte do híbrido '*BLC Pastoral Inocence*', quando na presença de luz contínua (Tabela 4).

Maior número de raízes nas plântulas do híbrido '*BLC Pastoral Inocence*' foi obtido quando adicionado o carvão ativado (Tabela 3). A adição de 4,5 g/l de carvão ativado ao meio Knudson promoveu aumento no número de raízes das plântulas, enquanto que a adição de grafite diminui a formação de raízes, principalmente na concentração 1,5 g/L (Tabela 4). O tipo de iluminação bem como sua interação com a adição de diferentes concentrações do carvão ativado e do grafite influenciaram no desenvolvimento das raízes do híbrido '*BLC Pastoral Inocence*'; a presença de luz contínua promoveu maior desenvolvimento das raízes (Tabela 3). Araújo (2004) também verificou em *Laelia tenebrosa* aumento no número e crescimento de raízes quando adicionado o carvão ativado ao meio de cultura. O autor justificou que isso se deve ao carvão ativado possuir impurezas que podem favorecer o crescimento das raízes já existentes, e induzir a emissão de novas raízes.

Além do número de raízes, o comprimento dessas também foi afetado pelas diferentes concentrações de carvão ativado ou grafite ao meio Knudson (KC) (Tabela 3). Maior número de plântulas do híbrido '*BLC Pastoral Inocence*' com raízes atingindo até 2 cm de comprimento foi verificado nos meios KC que continha carvão ativado, principalmente nas concentrações de 4,5 e 1,5 g/L de carvão ativado. Já, na ausência de carvão e grafite e no meio KC contendo 3,0 e 1,5 g/L de grafite, ocorreu diminuição do comprimento das raízes (Tabela 4). Araújo (2004) obteve maior comprimento de raízes em *Laelia tenebrosa* com a concentração de 4,0 g/L de carvão ativado, e sugeriu que com o aumento das concentrações de carvão ativado provavelmente ocorra um aumento linear no comprimento das raízes; o autor recomenda a utilização de concentrações superiores a 4g/L de carvão ativado. Entretanto, os resultados obtidos para o

cultivo do híbrido '*BLC Pastoral Innocence*' indicaram que concentrações maiores que 4,5 g/L de carvão ativado diminuem o comprimento das raízes das plântulas. Assim, é possível que além do efeito do carvão ativado poder variar de acordo com a espécie considerada, a concentração do aditivo também pode ser específico para cada espécie, havendo, portanto, necessidade de pesquisas preliminares de acordo com a espécie com que se deseja trabalhar.

O comprimento das raízes do híbrido '*BLC Pastoral Innocence*' também foi influenciado pelas condições de manutenção da cultura sob luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas, porém a interação entre as condições da manutenção da cultura e as diferentes concentrações de carvão ativado e grafite não apresentaram diferenças significativas. O fotoperíodo de 14 horas de luz promoveu aumento do número de plântulas que apresentam aproximadamente 2 cm de comprimento (Tabela 3).

A adição das diferentes concentrações de carvão ativado ou grafite não produziram efeitos significativos no índice de crescimento (IC) das plântulas do híbrido '*BLC Pastoral Innocence*' (Tabela 3), mas as condições de manutenção da cultura sob luz contínua ou fotoperíodo de 14 horas determinou um aumento do IC na presença de luz contínua (Tabela 6). Houve também influência significativa na interação entre as diferentes concentrações de carvão ativado ou grafite e as condições de manutenção com luz contínua ou com fotoperíodo de 14 horas.

Milaneze (1997) verificou, ao trabalhar com diversas espécies de orquídeas, que a quantidade diária de iluminação recebida pelas plântulas aumentou o número de folhas e raízes formadas, obtendo com isso maior Índice de Crescimento (IC). Pasqual (2003), ao trabalhar com embriões imaturos oriundos do cruzamento entre tangerineira 'Poncã e laranjeira 'Pêra' também verificou tendência de maior número de folhas com 24 horas de luz contínua, e maiores comprimentos da raiz foram obtidos com 14 e 24 horas de luz contínua.



Figura 5 – Plântulas do híbrido 'BLC *Pastoral Inocence*', após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de carvão ativado, sob influência de luz contínua.



Figura 6 – Plântulas do híbrido 'BLC *Pastoral Inocence*', após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de carvão ativado, sob influência de fotoperíodo de 14 horas.



Figura 7 – Plântulas do híbrido ‘BLC *Pastoral Inocence*’, após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de grafite, sob influência de luz contínua.



Figura 8 – Plântulas do híbrido ‘BLC *Pastoral Inocence*’, após 6 meses de cultivo em diferentes concentrações de grafite, sob influência de fotoperíodo de 14 horas.

4.3 Efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado e do grafite no pH inicial e final do meio de cultura KC, para o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya bicolor* e do híbrido 'BLC Pastoral inocence'

A suspeita de que a adição de diferentes concentrações de carvão ativado e de grafite no meio de cultura KC possam alterar o pH inicial e pH final do meio foram confirmadas no presente estudo. Os valores de pH dos meios de cultura onde se desenvolveram as plântulas de *C. bicolor*, previamente aferidos para 5,30 antes do processo de autoclavagem, foram alterados significativamente (Tabela 5) 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 de grafite e com 4,5 g/L do carvão ativado (Tabela 8). O carvão ativado usado na concentração de 3,0 g/L 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 (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Análise de variância para o valor do pH inicial e final do meio de cultura Knudson contendo diferentes concentrações de carvão ativado ou grafite para *Cattleya bicolor* e para o híbrido 'BLC Pastoral Inocence'.

Fontes de variação	<i>Cattleya bicolor</i>				<i>Híbrido</i>	
	GL	pH inicial	pH final	GL	pH inicial	pH final
		Quadrado Médio	Quadrado Médio		Quadrado Médio	Quadrado Médio
Tratamentos	10	0,1578 **	13,4447 **	10	0,0775 **	14,0765 **
Condição de crescimento	1	0,0000 ns	4,6506 **	1	0,0000 ns	4,361 **
Trat.x condição de crescimento	10	0,0000 ns	2,8577 **	10	0,0000 ns	2,0601 **
ERRO	66	0,0013	0,3797	66	0,1561	0,2117
CV(%)		0,68	12,7		2,3	8,72

** Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 6 – Teste de média para os valores de pH inicial e final do meio de cultura Knudson contendo diferentes concentrações de carvão ativado ou grafite para *Cattleya bicolor* e para o híbrido 'BLC Pastoral Innocence'.

Tratamentos g/L	Médias dos tratamentos			
	<i>Cattleya bicolor</i>		Híbrido	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
KC (controle)	5,34 e	3,46 d	5,33 bcd	3,71 f
KC + Grafite 1,5 g/L	5,45 d	3,80 d	5,42 abcd	4,15 f
KC + Grafite 3,0 g/L	5,47 cd	3,55 d	5,43 abcd	3,80 f
KC + Grafite 4,5 g/L	5,45 d	3,75 d	5,39 bcd	4,18 f
KC + Grafite 6,0 g/L	5,62 b	4,17 d	5,27 d	5,04 de
KC + Grafite 7,5 g/L	5,43 d	4,08 d	5,44 abcd	4,35 ef
KC + Carvão 1,5 g/L	5,43 d	5,85 bc	5,61 a	6,65 ab
KC + Carvão 3,0 g/L	5,34 e	7,12 a	5,46 abcd	6,26 bc
KC + Carvão 4,5 g/L	5,83 a	5,41 c	5,51 ab	5,67 cd
KC + Carvão 6,0 g/L	5,42 d	6,52 ab	5,49 abc	7,14 a
KC + Carvão 7,5 g/L	5,53 c	5,60 bc	5,29 cd	7,03 a

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

Alterações no pH do meio de cultura KC, após a adição de carvão ativado foram descritas por outros autores (MORALES et al., 2006). Segundo Morales et al. (2006), os valores de pH dos meios de cultura contendo carvão ativado apresentaram aumento proporcional ao aumento da concentração do composto.

A preocupação com alterações do pH do meio de cultura após a autoclavagem vem sendo especulada desde a década de 80. Skirvin et al. (1986) sugeriram que os pesquisadores fizessem as medições de pH após a autoclavagem dos meios de cultura para o cultivo *in vitro*. Embora isto não seja uma prática rotineira, segundo os referidos autores (SKIRVIN et al., 1986) o valor do pH inicial da cultura não fica explicitamente registrado nos trabalhos; os autores suspeitaram que poderiam ocorrer mudanças no pH após a autoclavagem com ou sem a adição de ágar, quando para as culturas estavam em meio sólido. Os resultados no presente estudo para o cultivo *in vitro* de *C. bicolor* em meio de cultura KC confirmam as especulações e preocupações dos demais autores.

No cultivo *in vitro* de plântulas de *C. bicolor*, em meio de cultura KC, também foi observado que a adição das diferentes concentrações de carvão ativado alterou o pH final dos meios de cultura (Tabela 6). As alterações no pH final foram dependentes das condições de manutenção da cultura com luz contínua ou com fotoperíodo de 14 horas de luz. A Tabela 5 indica que houve interação significativa entre as concentrações do carvão ativado adicionado ao meio de cultura e as condições de manutenção da cultura.

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 de carvão ativado no meio de cultura das plântulas de *C. bicolor* (Tabela 6). 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) e do híbrido '*BLC Pastoral innocence*' (pH = 5,33).

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.

A adição das diferentes concentrações de grafite ou de carvão ativado alterou igualmente (no mesmo sentido) o pH inicial do meio de cultura KC tornando-o mais alcalino, mas o pH final foi alterado somente nos meios contendo o carvão ativado (Tabela 8). A adição das diversas concentrações de grafite não alterou o pH final do meio KC onde foram mantidas por 6 meses as plântulas de *C. bicolor* e do híbrido '*BLC Pastoral Innocence*'. No meio contendo o carvão ativado ocorreu alcalinização, com aumento de 1,95 a 3,66 unidades de pH onde foram mantidas as plântulas de *C. bicolor* e, com aumento de 1,96 a 3,43 unidades de pH onde foram cultivadas as plântulas do híbrido '*BLC Pastoral Innocence*'.

4.4 Efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado e do grafite no desenvolvimento de plântulas de *Cattleya bicolor* e do híbrido 'BLC *Pastoral Inocence*'

A análise do efeito da adição das diferentes concentrações de grafite e de carvão ativado no meio KC para o desenvolvimento das plântulas de *C. bicolor* e do híbrido 'BLC *Pastoral Inocence*' mostrou efeitos diferenciais para ambos aditivos indicando que o grafite não pode ser usado em substituição ao carvão ativado. A suspeita de que o carvão ativado tem efeitos adicionais além de simplesmente determinar o escurecimento do meio de cultura foi reforçada no presente estudo pela evidência de que a adição de 6,0 g/L de grafite ao meio KC estimulou o comprimento da parte aérea das plântulas de *C. bicolor*, mas não promoveu nenhum efeito no desenvolvimento das raízes. O aumento no número de raízes e o número maior de plântulas de *C. bicolor* com raízes maiores foram evidentes nos meios que continham 6,0 e 3,0 g/L, respectivamente, de carvão ativado.

O efeito diferencial de carvão ativado em relação ao grafite pode ser observado também no crescimento das raízes do híbrido 'BLC *Pastoral Inocence*'; no meio KC que continham 4,5 g/L de carvão ativado, foram encontradas o maior número de plântulas do híbrido com raízes maiores (em torno de 2 cm de comprimento).

A evidência de que diferentes concentrações de carvão ativado foram efetivas para promover o crescimento das raízes das plântulas de *C. bicolor* (3,0 g/L) e do híbrido 'BLC *Pastoral Inocence*' (4,5 g/L) é mais uma indicativa de que o carvão ativado tem efeito adicional ao de promover o escurecimento do meio de cultura. É possível que as concentrações específicas de carvão ativado potencialize a função deste composto no sentido de adsorver substâncias do meio de cultura ou de reguladores de crescimento, de modo a estabelecer um equilíbrio de auxina:citocinina adequado para o crescimento das raízes, dependendo da espécie ou genótipo da orquídea. Por isso, para os diferentes genótipos de orquídeas são necessários experimentos preliminares para eleger a concentração adequada do carvão ativado a ser adicionado ao meio de cultura para promover o maior desenvolvimento da estrutura radicular. As raízes são órgãos importantes e imprescindíveis para o estabelecimento e fixação dos indivíduos nos ramos das árvores e/ou substratos e parece que

não é possível recomendar uma concentração média ou uma faixa de concentração de carvão ativado para ser adicionada ao meio de cultura para o cultivo *in vitro* de orquídeas em geral.

No que se refere à utilização do grafite, embora não foram encontrados registros na literatura especializada sobre o efeito da adição deste composto em meio de cultura para o cultivo *in vitro* de plântulas de orquídeas, o efeito positivo da adição de 6,0 g/L de grafite para promover o desenvolvimento da parte aérea de plântulas de *C. bicolor* merece destaque, e abre perspectivas de que a adição desta concentração de grafite em combinação com uma ou mais concentrações de carvão ativado, possa promover o maior desenvolvimento de partes aéreas e radiculares de plântulas desta espécie cultivada *in vitro*.

Apesar de não ter sido possível estabelecer relação entre as variações dos pH inicial e final do meio de cultura KC, decorrentes da adição de grafite ou carvão ativado, com o maior ou menor desenvolvimento das partes aéreas ou radiculares das plântulas de *C. bicolor* e do híbrido 'BLC *Pastoral Innocence*', as variações de pH do meio de cultura merecem destaque porque foram pronunciadas, particularmente, as variações no pH final do meio de cultura KC, contendo as diversas concentrações do carvão ativado. Em princípio, a falta de relação entre as variações do pH do meio de cultura com os efeitos dos aditivos nas características analisadas (NB, NF, CPA, NR, CR e IC), poderia indicar que o pH do meio de cultura não é um fator crítico ou limitante, para o desenvolvimento das plântulas da espécie *C. bicolor* e do híbrido 'BLC *Pastoral Innocence*'. Entretanto, esta seria uma conclusão que contraria os preceitos da fisiologia sobre a importância do pH das soluções e meios de cultura. Portanto, é importante investir em experimentos para esclarecer os efeitos da alteração do pH nos meios de cultura de plântulas ou tecidos cultivados *in vitro* de espécies de orquídeas.

5 CONCLUSÕES

1. O grafite não pode ser utilizado em substituição ao carvão ativado, pois a adição de 6,0 g/L de grafite ao meio KC estimulou o comprimento da parte aérea das plântulas de *C. bicolor*, mas não promoveu nenhum efeito no desenvolvimento das raízes.
2. Houve efeito positivo da adição de 6,0 g/L de grafite para promover o desenvolvimento da parte aérea de plântulas de *C. bicolor*.
3. É necessário experimentos preliminares para eleger a concentração adequada de carvão ativado a ser adicionada no cultivo *in vitro* dos diferentes genótipos de orquídeas.
4. A adição de carvão ativado e grafite promoveu variações pronunciadas no pH inicial e final do meio de cultura KC, principalmente nas diversas concentrações de carvão ativado.

REFERÊNCIAS

AFONSO, V.R.; LIMA, S.S.; SATO, A.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A. Análise do desenvolvimento de *Chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT em diferentes espectros luminosos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14. ; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1.; 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p.107.

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.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids.** New York: J.Wiley, 1993. 704p.

ARDITTI, J.; KRIKORIAN, A. D. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 122, p.183-241, 1996.

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.

BORGES, N.S.S.; CORREIA, D.; LIMA, R. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de brotos de abacaxi ornamental *Ananás porteanus* Hort Veitch ex C. Koch. EMBRAPA, [s.d.]. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-004.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2005.

BRADY, J.E.; HUMISTON, G.E. **Química geral.** 2 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1986. p.333-334. v.1.

BRESSAN, E.A.; LEE, L.L.; SEVERO, V.S.; GERALD, L.T.S. Desenvolvimento de orquídeas *Phalaenopsis in vitro* – efeito do carvão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., 1999, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: [s.n.], 1999. p. 111.

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

CHAGAS, E.A.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; PIO, L.A.S.; DUTRA, L.F.; CAZETTA, J.O. Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciencia Agrotecnica**, v.29, n.6, p.1125-1131, 2005.

COELHO, M.C.F., PINTO, J.E.B.P.; MORAIS, A.R de.; CID, L.P.B.; LAMEIRA, O.A. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (BENTH.) BENTH.] *in vitro* e *ex vitro* Lavras: **Ciencia Agrotecnica**, v.25, n.1, p.38-48, 2001.

CONVENCIÓN sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres. 2002. Disponível em: <<http://cites.org/esp/cttre/plants/12/s-PC/12-10-01annex.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2005.

CÔRREA, R.M.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; REIS, E.S.; SOUZA, A.V. Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação fotoperíodo/temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro*. **Ciência Rural**, v.33, n.3, p. 423-430, 2003.

COSTA, A.M.G.; CARVALHO, A.C.P.P. Avaliação dos efeitos do número de explantes por frasco e do fotoperíodo na taxa de micropropagação de bananeira cv. maçã. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14. ; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1.; 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 143.

DEBERGH, P. *In vitro* culture of ornamentals. In: VASIL, I.K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 561-573.

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

EISFELD, C. de L.; RIBAS, L.L.F.; QUOIRIN, M. Use of the bacterium *Rhodococcus fascians* for optimization of black wattle shoot formation. **Scientia Agraria**, v.5, n.1-2, p. 49-53, 2004.

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

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) "BATUM". **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n.3, p. 488-490, dez. 2005.

ERNST, R. Studies in symbiotic culture of orchids. **American Orchid Society Bulletin**, v.1, p.12-18, 1975.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Informativo do Departamento Econômico da FAESP, n.44, 2001.

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.

FRANCICOS, V. L. F dos S; KIYUNA, I. **Floricultura no estado de São Paulo: novas fronteiras**. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 2004. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1470>>. Acesso em: 01 nov. 2005.

GAMBORG, O.L. Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.38, p. 84-92, 2002.

GREENWOOD, N.N.; EARNSHAW, A. **Chemistry of the elements**. London: Butterworth Heinemann, 1984. p. 298-299.

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.

GROLL, J. GRAY.; V.M.; MYCOCK, D.J. Development of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) somatic embryos during culture with abscisic acid and activated charcoal. **Plant Physiology**, v.159, p. 437-443, 2002.

HADLEY, G. Orchid mycorrhiza. In: Arditti, J. (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives**, II. Ithaca: Cornell University, 1982. cap.3, p. 84-118.

HENAO, L.M.M. **Cultivo de tejidos vegetales**. Medellín: Facultad de Ciências Agropecuárias, 1991. 77p.

HINNEN, M.G. J.; PIERIK, R.L.M.; BRONSEMA, F.B.F. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.41, n.1-2, p. 105-116, 1989.

JOHANSSON, L.; CALLEBERG.E.; GEDIN, A. Correlation between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultures of anthers of *Anemone Canadensis*. **Physiologia Plantarum**, v.80, n.2, p. 243-249, 1990.

KERBAUY, G.B. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. **Plant Cell Report**, v.3, p. 27-39, 1984.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.1, n.1, p. 30-33, 1997.

KIYUNA, I.; ANGELO, J.A.; COELHO, P.J. **Floricultura**: comportamento do comércio exterior brasileiro no primeiro semestre de 2004. Instituto de Economia Agrícola, 2004. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1420>>. Acesso em: 01 nov. 2005.

KIYUNA, I.; ANGELO, J.A.; COELHO, P.J.; ASSUMPÇÃO, R. de. **Floricultura**: desempenho do comércio exterior em 2004. Instituto de Economia Agrícola, 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1742>>. Acesso em 01 nov. 2005.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; OLIVEIRA, M.S.P.; LEDO, C.A. Avaliação da oxidação de segmentos de ráquias de açazeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.) sob diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 35, p 9-14, 2001.

LIMA, G.de P.; WU, C.K.; RODRIGUES, M.M.; STANCATO, G.C. Composição do meio nutritivo e a qualidade da iluminação no cultivo de *Rumohra adiantiformis* (FORST) ching *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1.; 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, p. 207, 2003.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de Louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, v.11, n.2, p.93-101, 2001.

MARTINI, P.C.; WELLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T.S. Propagation of orchid *Gongora quinquenervis* *in vitro* germination. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.10, p. 1319-1324, 2001.

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.

MORAES, L.M.; FARIA, R.T.; CUQUEL, F.L. Activated Charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian orchids. **Acta Horticulturae**, n. 683, p. 383-390, 2003.

MORALES, S. **Efeito de aditivos no cultivo *in vitro* de plântulas de *Catasetum fimbriatum* (E.MORREN) LINDL. & PAXTON, *Encyclia randii* (BARB. RODR.) PORTO & BRADE e de um híbrido de *Laelia* LINDL. x *Cattleya* LINDL.(ORCHIDACEAE).** 2004. 38f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

MORALES, S.; MILANEZE GUTIERRE, M.A.; MACHADO, M. de F.P.S. Effect of Activated Charcoal for Seedlings Development of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Journal of Plant Sciences**, v.1, n.4. p. 388-391, 2006.

OLIVEIRA, I.R. de.; SUDART, A.R.; SILVA JUNIOR, F.A e.; PANDOLFELLI, V.C. Artigo revisão: Estabilização de suspensões aquosas contendo grafite. **Cerâmica**, v.46, n.300, Oct./Nov./Dec. 2000.

OWEN, H.R.; WENGERD, D.; MILLER A.R. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate souce, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. **Plant Cell Reports**, v.10, n. 11, p.583-586, 1991.

PAN, M.J.; VAN STADEN, J. Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. **Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 135-141, 1999.

PASQUA, G.; MANES, F.; MONACELI, B.; NATALE, L.; ANSELMINI, S. Effects of the culture medium pH and ion uptake in in vitro vegetative organogenesis in thin cell layers of tobacco. **Plant Science**, n. 162, p. 947-955, 2002.

PASQUAL, M. **Introdução: fundamentos básicos.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p.

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

PASQUAL, M.; ALVES, G.P.; DUTRA, L.F.; CHAGAS, E.A.; RIBEIRO, L. de O. Desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos oriundos de tangerineira ‘Poncã x Laranjeira ‘Pera’ em diferentes fotoperíodos. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v.27, n.3, p.535-540, maio/jun. 2003.

PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G.R. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações.** Meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997.127p.

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

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** 3.ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PIERIK, R.L.M.; SPRENKELS, P.A.; VAN DER HARST. B.; VAN DER MEYS, Q.G. Seed Germination and Further Development of Plantlets of *Paphiopedilum ciliolar* Pfitz. *In Vitro. Scientia Horticulturae*, v.34, p.139-153, 1988.

PRAXEDES, S.C.; FIGUEIREDO, M. de L.; CÂMARA, F.A.A.; OLIVEIRA, A.K. D de. Efeitos do BAP e do carvão ativado no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídeas. **Expressão**, v.31, n.1, p. 75-80, jan./jun. 2000.

RODRIGUES, T.M.; PAIVA, P.D. de O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Efeito de carvão ativado no meio de cultura para germinação de sementes de bromélia imperial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1.; 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 253.

RUSSEL, J.B. **Química geral**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980, p.669-670.

SANTOS, A.F.; VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; NOVAIS, R.F. de.; CECON, P.R.; FRANCHINI, E. de. A.; LOCATELLI, M.V. Cultivo de *Cattleya walkeriana* em distintos meios de cultivo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 15.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2.; 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2005. p. 613.

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.

SILVA, E.F.; PASQUAL, M.; SILVA, A.B da. Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya* 'Pastoral' X *Laeliocattleya* 'Amber Glow'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1.; 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 321.

SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T.W. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Report**, v.5, n.4, p.292-294, 1986.

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

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V. dos R.; WILLADIONO, L.; GUERRA, M. P.; FERRERIA, C.F.; PAIVA, S.A.V. de. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 2001. 20p. (EMBRAPA-CNPq. Circular Técnica).

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI-CNPH, 1999. v.1.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*musa aab*) *in vitro*. Iv. Concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, 2001.

VACIN, E.; WENT, F.W. **Some pH changes in nutrient solution**. Chicago: Botanical Gazzete, 1949. p. 605-613.

WEATHERHEAD, M.A.; BURDON, J.; HENSHAW, G.G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. **Zeitschrift Fur Pflanzenphysiology**, v.89, p. 141-147, 1978.

YAM. T.W.; WEATHERHEAD, M. A. Germination and seedling development of some Hong Kong orchids. **Lindleyana**, v.3, n.3, p. 156-160, 1988.

ZEIGLER, A.R.; SHEEHAN, T.J.; POOLE, R.T. Influence of various media and photoperiod on growth and amino acid content of orchid seedling. **American Orchid Society**, v. 36, n.2369, p. 195-202, mar. 1967.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)