



ARTIGO

Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae)

Jaqueline de Souza Souto^{1,2}, Juliana Missae Morimoto¹,
Wagner de Melo Ferreira³, Myna Nakabashi⁴ e Rogério Mamoru Suzuki^{1*}

Recebido: 28 de agosto de 2009

Recebido após revisão: 18 de março de 2010

Aceito: 17 de maio de 2010

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1352>

RESUMO: (Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae)). O cultivo *in vitro* permite a produção de grande quantidade de plantas. Entretanto, quando são transferidas para o ambiente natural, estas plantas se tornam susceptíveis ao rápido dessecação. O aumento do número de raízes de orquídeas propagadas por meio dessa técnica possibilitaria maior absorção de água, reduzindo os efeitos da dessecação e aumentando a probabilidade de sobrevivência das plantas. O presente trabalho analisou os efeitos da auxina ácido naftalenoacético (ANA) sobre o desenvolvimento *in vitro* de plantas de *Cattleya bicolor*, especialmente com relação à formação de raízes. Para tanto, foi realizada a análise quantitativa de parâmetros biométricos de plantas incubadas em diferentes concentrações de ANA (0,0; 0,25; 0,5; 1 e 2 mg.L⁻¹) durante 180 e 360 dias. Em 360 dias, a adição de 0,5 mg.L⁻¹ de ANA promoveu significativamente o crescimento, aumentando o comprimento e a massa seca caulinar e radicular em relação ao controle. A concentração de 2 mg.L⁻¹ apresentou indícios de toxicidade. Portanto, a utilização de 0,5 mg.L⁻¹ de ANA promoveu a neoformação e o crescimento longitudinal das raízes, além de estimular o desenvolvimento caulinar em plantas de *C. bicolor*. Os resultados descritos neste trabalho representam um importante avanço científico, uma vez que o crescimento é bastante lento na maioria das espécies da família Orchidaceae, comparativamente às outras famílias de plantas herbáceas.

Palavras-chave: auxina, crescimento, cultivo *in vitro*, hormônio vegetal, orquídea.

ABSTRACT: (Effects of naphthalene-1-acetic acid on the *in vitro* development of *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae)) The techniques of *in vitro* micropropagation allow the production of large amounts of plants. However, when transferred to the natural environment these plants are susceptible to rapid water loss. The induction of a larger number of roots in orchid plants propagated *in vitro* would provide a greater water uptake, thus reducing the effects of water loss and increasing the probability of plant survival. The present study aimed to analyze the effects of the synthetic auxin naphthalene-1-acetic acid (NAA) on the *in vitro* development of plants of *Cattleya bicolor*, especially regarding root formation. A quantitative analysis of biometric variables of plants grown in different concentrations of NAA (0.0; 0.25; 0.5; 1 and 2 mg.L⁻¹) during 180 and 360 days were carried out. In 360 days, addition of 0.5 mg.L⁻¹ NAA significantly promoted plant growth, increasing length and dry mass of shoot and root portion in relation to the control. Toxicity evidences were detected at 2 mg.L⁻¹ NAA. Therefore, the use of 0.5 mg.L⁻¹ NAA not only promoted the *de novo* formation and longitudinal growth of roots, but also stimulated shoot development of *C. bicolor* plants. The results presented in this paper represent an important scientific advance since the growth of most Orchidaceae species is very slow when compared to other herbaceous plant families.

Key words: auxin, growth, *in vitro* culture, plant hormone, orchid.

INTRODUÇÃO

A auxina é a classe de reguladores de crescimento vegetal responsável pelo aumento consistente da formação de primórdios radiciais em tecidos que naturalmente apresentam certa predisposição ao enraizamento (Haissig 1972). O ácido naftalenoacético (ANA) faz parte do grupo de auxinas sintéticas que apresentam grande importância agrícola, sendo utilizada em diversas técnicas para o enraizamento de culturas, principalmente por meio dos processos de estaquia e alporquia. Além disso, possui papel importante em vários protocolos de cultivo *in vitro* (Mercier 2004).

Plantas cultivadas *in vitro* perdem água rapidamente pela transpiração, quando transferidas para a condição *ex vitro* (Grout 1988, Sutter 1988). Além disso, a taxa

fotossintética das plantas *in vitro* é inferior a de plantas cultivadas no ambiente natural. O processo de aclimação auxilia as plantas provenientes do cultivo *in vitro* a atingirem sua taxa fotossintética normal (Wetzstein & Sommer 1982). A eficiência no processo de aclimação poderia ser aumentada com a estimulação da formação de maior quantidade de raízes em plantas crescidas *in vitro*, que possibilitaria o aumento da absorção de água, compensando a perda de água devido à pequena espessura da cutícula no início do processo de aclimação (Dewir *et al.* 2005).

Kerbaux (1998) destaca que, nas orquídeas, as raízes além de serem responsáveis pela fixação de plantas, podem atuar na propagação vegetativa e na realização de fotossíntese. Estimular o enraizamento e, conse-

1. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa - Orquidário do Estado. Av. Miguel Stéfano 3687, CEP 04301-902, São Paulo, SP, Brasil.

2. Bolsista PIBIC-CNPq.

3. Universidade Federal do Tocantins, Núcleo de Estudos Ambientais (Neamb). Caixa postal 111, CEP 77500-000, Porto Nacional, TO, Brasil.

4. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Rua do Matão Travessa 14, 321, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: rogeriomsuzuki@yahoo.com.br

quentemente, um maior acúmulo de nutrientes, permite aumentar a probabilidade de sobrevivência das plantas na fase *ex vitro*.

Cattleya bicolor Lindl. é uma espécie endêmica do Brasil e possui, como características, a presença de pseudobulbos finos, contendo pouco tecido de estocagem de água, duas folhas oblongo-lanceoladas e flores com pétalas espatuladas. As sépalas e pétalas são espessas, uniformemente brilhantes e a coloração varia de verde pálido ou oliva a uma tonalidade cobre-marrom, podendo apresentar pintas verde-marrom. O labelo consiste de um lobo simples de coloração que varia do vermelho ao rosa, algumas vezes emergindo, da extremidade, a cor branca (Braem 1984) (Fig. 1). A beleza de suas flores pode ter impulsionado a sua procura na natureza, levando-a a categoria de espécie vulnerável à extinção no Estado de São Paulo.

Diante da ameaça de extinção e da dificuldade de aclimação de plantas produzidas *in vitro*, esse trabalho teve como objetivos estudar o efeito de diferentes concentrações de ANA no desenvolvimento *in vitro* de plantas de *C. bicolor*, especialmente quanto à indução e o crescimento de raízes, bem como estabelecer parâmetros de referência para a multiplicação *in vitro*, de outras espécies do gênero *Cattleya*, também ameaçadas de extinção ou de grande importância comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Cattleya bicolor*, mantidas *in vitro*, com aproximadamente 540 dias de cultivo em meio Knudson C (1946) sem adição de regulador de crescimento vegetal, foram utilizadas como material inicial do estudo. As plantas apresentavam comprimento e aspectos morfológicos semelhantes e as raízes pré-existentes foram extraídas para facilitar a quantificação daquelas raízes neoformadas.

O meio de cultura utilizado foi o Knudson C, acrescido de quatro concentrações de ANA (0,25; 0,5; 1 e 2 mg.L⁻¹). Como controle, foi utilizado meio sem adição deste regulador de crescimento. Após o preparo, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,05, seguido da adição de 0,4% de ágar bacteriológico. Os frascos contendo os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante 15 minutos. Cada tratamento foi composto por seis frascos de 400 mL, contendo 80 mL de meio de cultura. Foram inoculadas dez plantas em cada frasco, totalizando 60 plantas para cada tratamento. O material vegetal foi cultivado sob 25±2°C, fotoperíodo de 12 horas e iluminação de 20µmol m⁻².s⁻¹.

O estudo foi desenvolvido em duas etapas durante um período de 360 dias. Após 180 dias, portanto, a metade do período de cultivo, sete plantas de cada um dos seis frascos foram retiradas aleatoriamente de cada tratamento para análise e obtenção das médias das seguintes características: comprimento de caules e raízes, número de folhas e raízes e massa seca de caules e raízes. O aspecto e a coloração desses dois órgãos foram também



Figura 1. Aspecto geral da flor de *Cattleya bicolor*.

observados. As plantas restantes foram analisadas quanto às mesmas características mencionadas anteriormente e constituíram a segunda etapa do experimento, concluída aos 360 dias de cultivo. O aspecto e a coloração de caules e raízes foram também avaliados. Semanalmente durante o experimento, as folhas e as raízes das plantas foram analisadas qualitativa e quantitativamente, determinando se estavam vivas (verdes no caso de folhas e raízes) ou mortas (marrom no caso de folhas e raízes), além de senescentes (amarelas no caso das folhas).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Poucos trabalhos foram publicados a respeito dos efeitos de reguladores de crescimento vegetal, especialmente a auxina ANA, sobre o desenvolvimento *in vitro* de plantas da família Orchidaceae. Alguns artigos científicos relatam a regeneração de plantas ou clonagem de orquídeas utilizando fragmentos de raízes. Kerbauy (1984 a,b), trabalhando com *Oncidium varicosum* e *Catasetum fimbriatum*, e Philip & Nainar (1986), com *Vanilla planifolia*, conseguiram regenerar um grande número de plantas a partir de ápices radiciais. No entanto, Tanaka *et al.* (1976) obtiveram poucos protocormóides de *Phalaenopsis amabilis*, a partir de fragmentos de raízes de plantas cultivadas *in vitro*, sem adição de auxinas.

Em 180 dias de cultivo, os resultados demonstraram que o número médio de folhas foi maior nas concentrações de 0,5 e 2mg.L⁻¹ de ANA quando comparados ao controle (Fig. 2A). O controle e as concentrações de 0,25 e 1 mg.L⁻¹ de ANA exibiram médias semelhantes. Além disso, observou-se que a concentração de 0,25 mg.L⁻¹ de ANA inibiu o desenvolvimento das raízes quando comparado ao controle. Resultados diferentes foram encontrados em *Phalaenopsis amabilis*, onde as plantas apresentaram maior número de folhas e raízes em menores concentrações de ANA (0; 0,2 e 1 mg.L⁻¹), sendo que 5 mg.L⁻¹ inibiu a produção de folhas (Ori 2006).

Aos 360 dias (Fig. 2B), observou-se que o aumento na concentração de ANA até 0,5 e 1 mg.L⁻¹ favoreceu positivamente a formação de raízes e folhas, respectivamente.

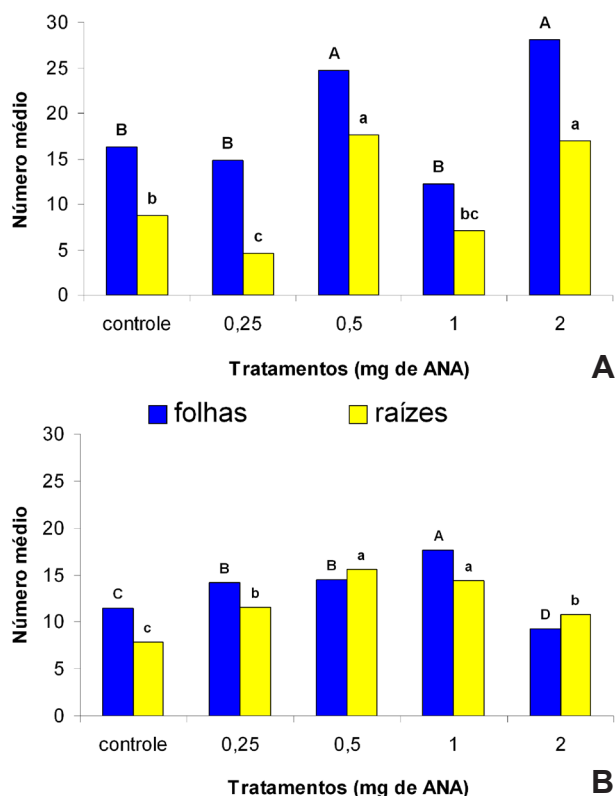


Figura 2. Efeitos de diferentes concentrações de ANA sobre o número médio de folhas e raízes de *Cattleya bicolor* após 180 (A) e 360 (B) dias de cultivo *in vitro*. Colunas seguidas de letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$). ($n=21$).

O maior número de folhas foi obtido na concentração de 1 mg.L⁻¹ de ANA, resultado este contrastante em relação ao obtido em 180 dias. A adição de 2 mg.L⁻¹ de ANA inibiu significativamente a formação e o desenvolvimento de folhas. Os tratamentos com 0,5 e 1 mg.L⁻¹ de ANA promoveram a formação de raízes, sendo significativamente superiores aos demais tratamentos.

Nayak *et al.* (1998) induziram a formação de raízes em explantes de *Cymbidium aloifolium* (Orchidaceae) adicionando 1 mg.L⁻¹ de ANA ao meio MS. Em plantas de *Cymbidium sinensis*, houve maior taxa de sobrevivência quando estas foram aclimatadas após a indução do enraizamento *in vitro* obtido com 1 mg.L⁻¹ de ANA (Xiang *et al.* 2003). No presente trabalho, a ausência de ANA mostrou ser significativamente inibitória ao desenvolvimento radicial (Fig. 2B). Resultados similares foram obtidos utilizando ANA em *Pyrus communis* (Rosaceae) e demonstraram que todos os tratamentos contendo esta auxina apresentaram estimulação na neoformação e no alongamento de raízes (Erig *et al.* 2004). Porém, em ausência de ANA, não houve desenvolvimento radicial, evidenciando a importância deste regulador de crescimento vegetal para a formação de raízes. Da mesma forma, o cultivo de brotos de bananeira Nursey (*Musa sp.*) com adição de 0,4 mg.L⁻¹ de ANA ao meio MS favoreceu a formação de maior número de raízes adventícias quando comparado ao tratamento sem adição de ANA, apesar de

não ter sido detectada diferença quanto ao número de folhas (Bua *et al.* 1998). Em explantes de *Dendrobium* (Orchidaceae), a formação de raízes foi induzida utilizando apenas 0,1 mg.L⁻¹ de ANA (Mujib & Jana 1994).

Os resultados mencionados acima contradizem a conclusão de Pasqual & Hoshika (1992) que afirmaram que o enraizamento de *Mammillaria bocasana* (Cactaceae) ocorre independente da concentração de ANA. Esses autores observaram uma tendência à inibição do desenvolvimento radicial em concentrações mais elevadas de ANA, o que também foi verificado para *Gymnocalicium buldianum*, outra espécie de cacto. No presente trabalho, se tivessem sido utilizadas concentrações superiores a 2 mg.L⁻¹ de ANA, provavelmente o efeito seria deletério tanto para o desenvolvimento radicial quanto para o caulinar, visto que a concentração de 2 mg.L⁻¹ de ANA inibiu a formação de folhas e raízes em *C. bicolor*, aos 360 dias de cultivo (Fig. 2B). As diferenças nas respostas de desenvolvimento podem estar relacionadas com o estágio fisiológico de cada espécie utilizada e, sendo assim, o sucesso da indução de raízes depende do uso de concentrações adequadas de reguladores e da utilização de tecidos ou células aptos a receberem estes estímulos.

Considerando os resultados obtidos em relação à formação de raízes, postula-se a possibilidade das respostas obtidas aos 180 dias refletirem uma fase em que as plantas ainda estão se adaptando às condições de cultivo *in vitro*. Desta forma, as auxinas produzidas principalmente nos ápices caulinares e transportadas para as raízes, juntamente com a auxina absorvida do meio de cultura, podem ter, nessa fase de crescimento, contribuído para a formação de maior quantidade de raízes em 0,5 e 2 mg.L⁻¹ de ANA. Os hormônios ou reguladores de crescimento vegetal atuam não apenas por meio da alteração de suas concentrações endógenas, como também por mudanças na sensibilidade das células receptoras a estes compostos (Trewavas & Cleland 1983).

Aos 360 dias, tanto as raízes quanto as folhas produzidas parecem ser resultado de um metabolismo de crescimento mais ajustado e as respostas observadas decorreram, possivelmente, de condições endógenas mais próximas àquelas naturais, levando à formação equivalente de caules e raízes.

O comprimento médio dos caules e raízes de plantas de *C. bicolor* cultivadas durante 180 dias em diferentes concentrações de ANA indica que as concentrações de ANA utilizadas não representaram diferença significativa no aumento do tamanho caulinar em relação ao controle. A utilização das concentrações 0,25 e 1 mg.L⁻¹ inibiu significativamente o alongamento caulinar (Fig. 3A).

O efeito de ANA sobre o comprimento das raízes durante os primeiros 180 dias deixou evidente que a concentração de 2 mg.L⁻¹ desta auxina estimulou significativamente o crescimento desse órgão. A utilização de 0,25 e 1 mg.L⁻¹ de ANA foram inibitórios ao alongamento radicial, quando comparada ao controle (Fig. 3A).

Os resultados de comprimento médio de caules e raízes de *C. bicolor* aos 360 dias de cultivo são apresentados na

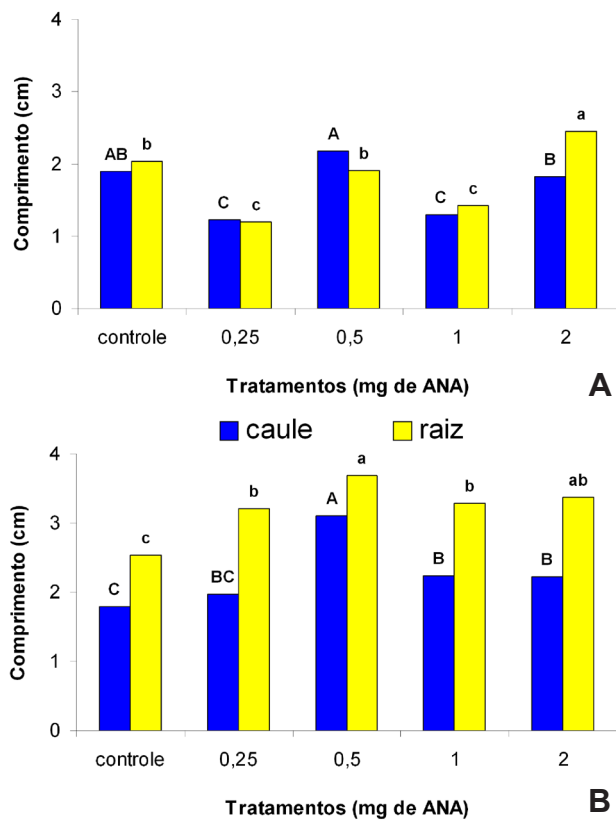


Figura 3. Efeitos de diferentes concentrações de ANA sobre o comprimento médio de caules e raízes de *Cattleya bicolor* após 180 (A) e 360 (B) dias de cultivo *in vitro*. Colunas seguidas de letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$). (n=21).

Fig. 3B. Constatou-se que as plantas cultivadas na ausência de ANA (controle) apresentaram menor crescimento caulinar e radicial. O tratamento com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA foi significativamente superior aos demais tratamentos tanto, em relação ao comprimento de caules quanto de raízes. As plantas incubadas na ausência de ANA (controle) apresentaram redução no crescimento das raízes. Diferentemente, Centellas *et al.* (1999) observaram que concentrações acima de 0,9 mg.L⁻¹ produziram plantas de *Malus domestica* (Rosaceae) com raízes menores.

Os resultados descritos acima mostram que, de maneira geral, a permanência das plantas em cultivo por 360 dias favoreceu o crescimento de caules e raízes, embora desvantagens possam decorrer de um maior tempo de cultivo *in vitro*, como será discutido posteriormente. Segundo Slump (2004), o crescimento das raízes é essencial para o desenvolvimento das orquídeas, pois, além de captar água e sais minerais, fixar a planta ao suporte ou substrato, elas também podem atuar na fixação de carbono. É importante salientar que, em plantas do gênero *Phalaenopsis*, a quantidade de carbono fixado pelas raízes é maior que nas folhas (Avadhani *et al* 1990). Pode-se observar também que a sensibilidade das raízes foi maior na primeira fase do experimento (180 dias), quando se verificou inibição em algumas das concentrações utilizadas. Outro fator que deve ser considerado na

análise dos resultados obtidos no presente trabalho é que, embora as plantas utilizadas como explantes apresentassem comprimento e aspectos morfológicos semelhantes, elas se originaram da germinação de sementes. Por isso, as respostas observadas nas diferentes concentrações de ANA também resultam de sua interação com diferentes genótipos.

A via de desenvolvimento a ser tomada pelos tecidos das plantas pode ser determinada pela sensibilidade das células à auxina, a concentração de auxina ativa e as concentrações relativas de outros hormônios. Isso pode variar amplamente em diferentes tecidos, em diferentes estádios de desenvolvimento e genótipos (Pino-Nunes 2009).

Os resultados da média de massa fresca de plantas de *C. bicolor*, cultivadas durante 180 dias, mostram que os tratamentos contendo 0,5 e 2 mg.L⁻¹ de ANA estimularam significativamente o aumento da massa fresca dos caules das plantas (Fig. 4A). Estes resultados mostraram-se contrários aos obtidos em plantas *P. amabilis*, onde o controle (sem regulador) e 0,2 mg.L⁻¹ de ANA foram os tratamentos que levaram à obtenção de plantas com maior massa fresca caulinar (Ori 2006). No presente trabalho, a maior concentração de ANA (2 mg.L⁻¹) levou ao maior valor da massa fresca radicial sendo significativamente superior às demais concentrações testadas. Os tratamen-

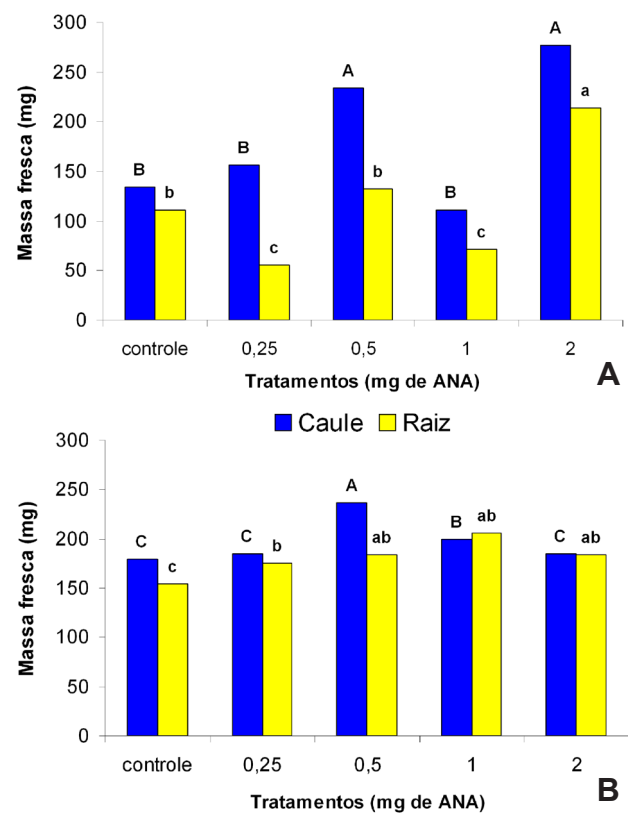


Figura 4. Efeitos de diferentes concentrações de ANA sobre a massa fresca média de caules e raízes de *Cattleya bicolor* após 180 (A) e 360 (B) dias de cultivo *in vitro*. Colunas seguidas de letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$). (n=21).

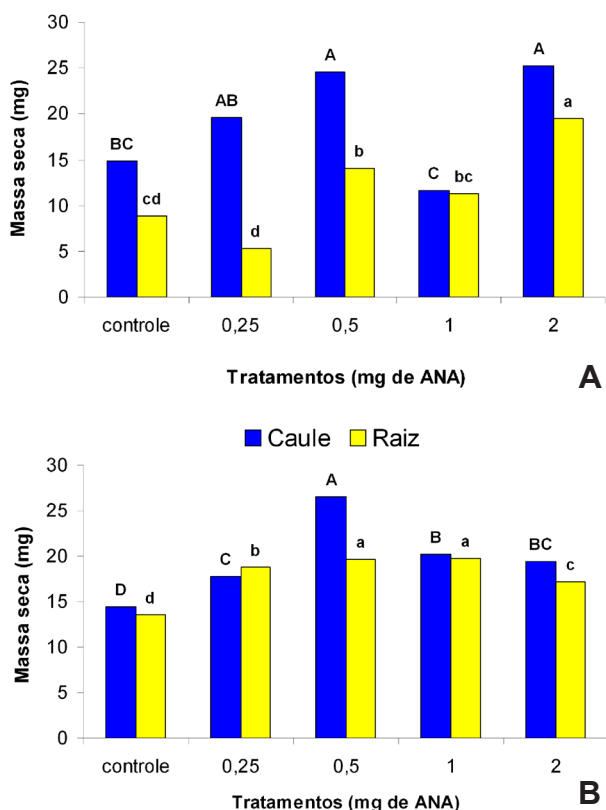


Figura 5. Efeitos de diferentes concentrações de ANA sobre a massa seca média de caules e raízes de *Cattleya bicolor* após 180 (A) e 360 (B) dias de cultivo *in vitro*. Colunas seguidas de letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$). (n=21).

tos de 0,25 e 1 mg.L⁻¹ de ANA foram inibitórios e levaram às plantas a apresentarem os menores valores da massa fresca das raízes.

Os resultados de massa fresca de plantas incubadas durante 360 dias mostraram que houve semelhanças aos resultados obtidos no 180º dia de cultivo, como por exemplo, a maior massa fresca caulinar obtida na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de ANA. Ori (2006) observou que a maior massa fresca da raiz das plantas de *P. amabilis* foi observada no tratamento com 1 mg.L⁻¹ de ANA. O controle (sem ANA) foi inibitório ao acúmulo de massa fresca radicial, quando comparado com os outros meios. Segundo George (1993), o efeito inibitório ou estimulante das auxinas pode estar associado à absorção dos reguladores de crescimento vegetal do substrato.

Os resultados da média de massa seca obtidos aos 180 dias de cultivo *in vitro* permitem observar que a massa seca caulinar foi bastante semelhante ao verificado na massa fresca. As plantas inoculadas com 0,5 e 2 mg.L⁻¹ de ANA exibiram maior acúmulo de matéria seca, sendo significativamente superior aos demais tratamentos (Fig. 5A). Com relação às raízes, a adição de 2 mg.L⁻¹ estimulou significativamente o acúmulo de matéria seca. As raízes das plantas do controle e as cultivadas em 0,25 mg.L⁻¹ de ANA apresentaram os menores valores de massa seca. Assim como observado nas características

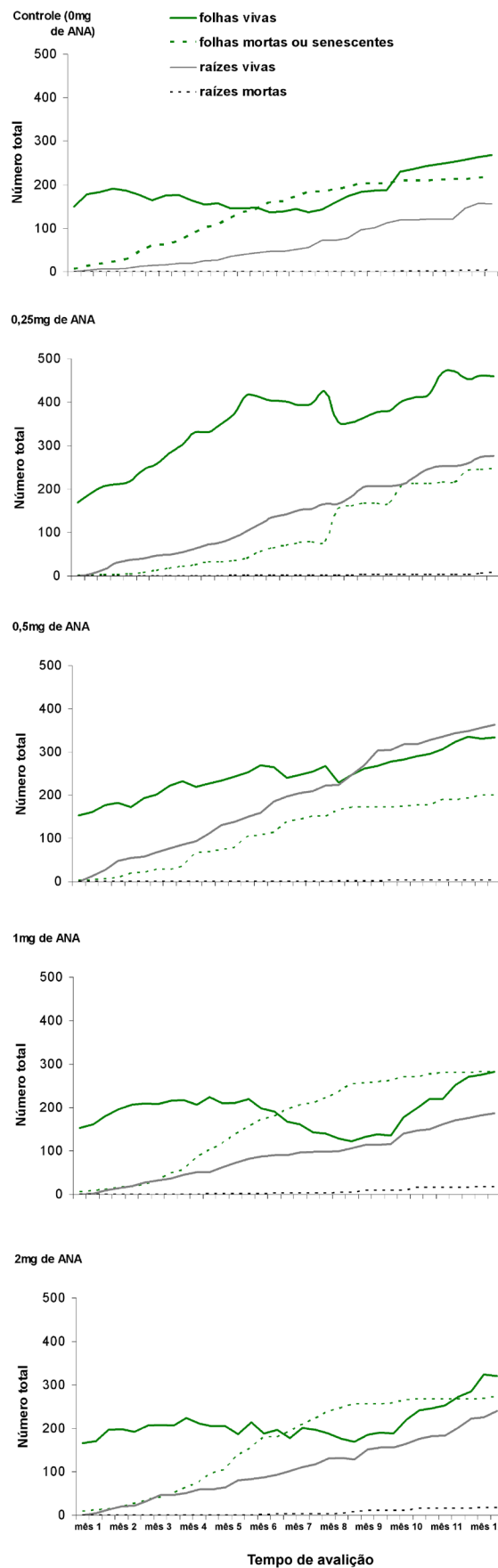


Figura 6. Análise realizada semanalmente sobre os efeitos das diferentes concentrações de ANA sobre o número total de folhas e raízes (vivas, mortas ou senescentes) durante 12 meses.

anteriores, estes resultados diferiram dos encontrados em *P. amabilis*, onde maior massa seca radicial foi obtida com a menor concentração de ANA (Ori 2006).

As médias das massas secas obtidas após 360 dias de incubação permitem observar que o meio contendo 0,5 mg.L⁻¹ de ANA estimulou significativamente o acúmulo de matéria seca dos caules, em relação aos demais tratamentos (Fig. 5B). O controle produziu plantas com o menor acúmulo de massa seca caulinar. Ori (2006) verificou em plantas de *P. amabilis* que a presença de ANA não estimula o acúmulo de matéria seca no caule. Com relação à massa seca radicial, constatou-se que a adição de ANA em todas as concentrações promoveu o acúmulo de matéria seca nas raízes em relação ao controle (Fig. 5B). Este resultado foi também verificado em *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae) onde foi observado o aumento da biomassa das folhas e das raízes no meio MS acrescido de ANA (Mauro *et al* 1994).

As análises mostraram que o acúmulo de massa seca das raízes foi superior nas medições realizadas aos 360 dias de cultivo do que nas realizadas em 180 dias. Isto demonstra que as plantas estariam mais preparadas para suportarem as mudanças descritas anteriormente, as quais são inerentes ao processo de aclimação. Os resultados obtidos para a massa seca caulinar são semelhantes e corroboram o fato de que as plantas de *C. bicolor* estariam mais aptas a serem transferidas para condições *ex vitro* após o período total do experimento. A exceção verificada em 2 mg.L⁻¹ indica os primeiros indícios do efeito tóxico desta concentração de auxina no crescimento *in vitro* de *C. bicolor*.

Os resultados da análise semanal que quantificou o número total de folhas e raízes dos cinco tratamentos

durante 360 dias de cultivo *in vitro* mostram que o tratamento contendo 0,25 mg.L⁻¹ de ANA foi o mais eficaz em relação ao número total de folhas (Fig. 6). Isto poderia ser possivelmente explicado pelo fato deste tratamento ter apresentado o menor índice de mortalidade das plantas. Entretanto, as concentrações de 0,25 e 2 mg.L⁻¹ de ANA, assim como o controle, apresentaram o menor número de raízes. O meio contendo 0,5 mg.L⁻¹ de ANA resultou no maior número de raízes vivas (quantificação total), o que também foi constatado por Ori (2006) em plantas de *P. amabilis*, onde as menores concentrações de ANA estimularam o desenvolvimento das raízes.

Segundo Fachinello *et al.* (1994), o aumento da concentração de auxinas aplicadas nos brotos provoca efeito estimulador de raízes até certo ponto, a partir do qual concentrações maiores têm efeito inibitório. Tal afirmação foi confirmada com o resultado obtido na maior concentração utilizada neste trabalho, aos 360 dias, apresentando efeito inibitório sobre a quantidade de raízes.

O fenótipo das plantas de *C. bicolor* cultivadas por 180 e 360 dias permitem verificar que a ação da concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de ANA estimulou positivamente o desenvolvimento das plantas de *C. bicolor*, apresentando grande número de folhas e raízes (Fig. 7). Isto foi corroborado também pelos parâmetros biométricos analisados, tais como o número médio de folhas e raízes vivas, o comprimento médio de caules e raízes e as médias das massas fresca e seca dos caules e das raízes. De modo geral, a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ resultou em médias superiores aos demais tratamentos promovendo, assim, o melhor desenvolvimento de *C. bicolor*.

As análises de todas as características obtidas neste trabalho apontam que a utilização de 0,5 mg.L⁻¹ de ANA

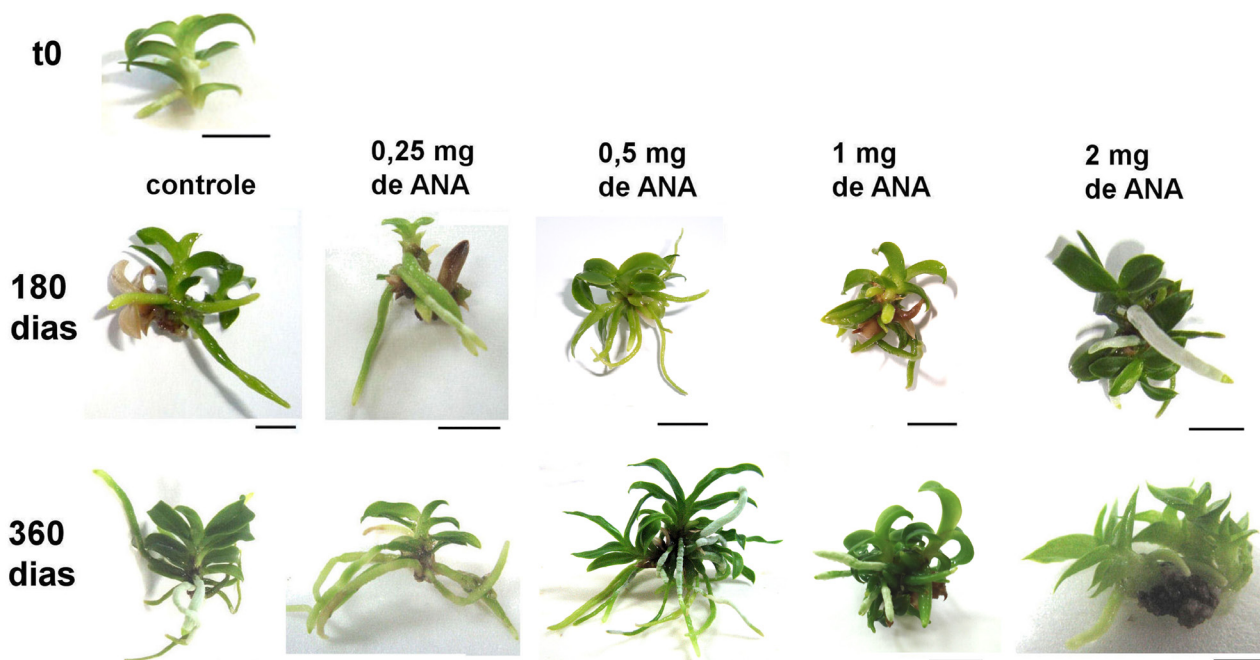


Figura 7. Morfologia geral das plantas de *C. bicolor* após tratamento com diferentes concentrações de ANA, durante 180 e 360 dias (T0 = morfologia (aspecto) da planta utilizada para o experimento). Barras = 1cm.

promove a neoformação e o crescimento longitudinal das raízes, além de estimular o desenvolvimento caulinar, atuando na promoção do alongamento deste órgão e no acúmulo de matéria seca. Além disso, os dados semanais demonstraram também que há uma produção equivalente de caules e raízes de plantas de *C. bicolor*. A utilização de 1 mg.L⁻¹ até 180 dias de cultivo não promoveu o desenvolvimento caulinar e radicial, mas posteriormente houve efeito promotor do crescimento de plantas de *C. bicolor*, principalmente quanto ao número de folhas e raízes desenvolvidas. Por fim, após 360 dias de cultivo, as plantas em presença de 2 mg.L⁻¹ apresentaram os primeiros indícios de inibição de desenvolvimento devido à alta concentração de auxina, não sendo, portanto, indicada a utilização de concentrações mais elevadas.

Considerando-se que o crescimento é bastante lento na maioria das espécies da família Orchidaceae comparativamente às outras famílias de plantas herbáceas, os resultados obtidos apresentam importante avanço científico, pois houve estimulação significativa do desenvolvimento tanto caulinar quanto radicial quando ANA é adicionado ao meio Knudson C, permitindo estudos futuros quanto ao aperfeiçoamento do processo de aclimação dessa espécie ou de outras afins.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP (Processo 2006/61345-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa individual de Iniciação à Pesquisa do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC concedida à Jaqueline de Souza Souto.

REFERÊNCIAS

- AVADHANI, P. N., GOH, C. J., RAO, A. D. & ARDITTI, J. 1990. Carbon fixation. In: ARDITTI, J. (Ed.). *Orchid biology review and perspectives II*. New York: Wiley-Interscience, p. 175-193.
- BUAH, J. N., KAWAMITSU, Y. & MURAYAMA, S. 1998. Nursery growth of banana (*Musa* spp.) plantlets rooted on auxin-free and auxin-supplemented media. *Plant Production Science*, 1: 207-210.
- BRAEM, G. J. 1984. *Cattleya: The Brazilian bifoliate cattleyas*. Brucke-Verlag Kurt Schmersow. 95 p.
- CENTELLAS, A. Q., FORTES, G. R. L., MULLER, N. T. G., ZANOL, G. C., FLORES, R. & GOTTINARI, R. A. 1999. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 181-186.
- DEWIR, Y. H., CHAKRABARTY, D., ALI, M. B., HAHN, E. J. & PAEK, K. Y. 2005. Effects of hydroponic solution EC, substrates, PPF and nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. *Plant Growth Regulation*, 46: 241-251.
- ERIG, A. C., SCHUCH, M. W. & BRAGA, E. J. B. 2004. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. *Ciência Rural*, 34: 275-277.
- FACHINELLO, J. C., HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J. C., KERSTEN, E. & FORTES, G. R. L. 1994. *Propagação de plantas frutíferas de clima temperado*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 179 p.
- GEORGE, E. F. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. 2.ed. Edington: Exegetics. 574 p.
- GROUT, B. W. W. 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets “*in vitro*”, and the stresses of transplanting. *Acta Horticulturae*, 230: 129-155.
- HAISSIG, B. E. 1972. Meristematic activity during adventitious root primordium development: influences of endogenous auxin and applied gibberellic acid. *Plant Physiology*, 49: 886-892.
- KERBAUY, G. B. 1984a. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. *Plant Cell Reports* 3: 27-29.
- KERBAUY, G. B. 1984b. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of root tips of *Catasetum* (Orchidaceae). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 113: 287-291.
- KERBAUY, G. B. 1998. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L. S. (Eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. p. 161-181.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-217.
- MAURO, M., SABAPATHI, D. & SMITH, R. A. 1994. Influence of benzylaminopurine and alpha-naphthaleneacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. *Lindleyana*, 9: 169-173.
- MERCIER, H. 2004. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (ed.) *Fisiologia Vegetal*. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S.A. p. 217-249.
- MUJIB, A. & JANA, B. K. 1994. Clonal propagation of *Dendrobium* ‘Madame Pompadour’ through apical meristem culture. *Advances in Plant Sciences*, 7: 340-346.
- NAYAK, N. R., CHAND, P. K., RATH, S. P. & PATNAIK, S. N. 1998. Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. seed derived rhizomes *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 34: 185-188.
- ORI, S. S. 2006. *Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em Phalaenopsis amabilis (Lineu) Blume (Orchidaceae) cultivada in vitro*. 133f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal) - Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo, 2006.
- PASQUAL, M. & HOSHIKA, E. 1992. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de cactos *Gymnocalicium buldiamur* L. e *Mammillaria bocasana* L. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 24: 589-593.
- PHILIP, V. J. & NAINAR, A. Z. 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using tissue culture. *Journal of Plant Physiology*, 122: 211-215.
- PINO-NUNES, L. E. 2009. *Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (Solanum lycopersicum cv Micro-Tom)*. 140f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP, Piracicaba, 2009.
- SUTTER, E. 1988. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweet gum plants after removal *in vitro* culture. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 113: 234-238.
- SLUMP, K. 2004. Lessons from the roots. *Orchids Magazine*, 74: 252-254.
- TANAKA, M., SENDA, Y. & HASEGAWA, A. 1976. Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. *American Orchid Society Bulletin*, 45: 1022-1024.
- TREWAVAS, A. J. & CLELAND, R. E. 1983. Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances? *Trends in Biochemical Sciences*, 8: 354-357.
- XIANG, Y., YU, F. & PENG, Z. 2003. Tissue culture of *Cymbidium sinensis*. *Forest Research*, 16: 434-438.
- WETZSTEIN, H. Y. & SOMMER, H. E. 1982. Leaf anatomy of tissue-cultured *Hiquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *American Journal of Botany*, 69: 1579-1586.