

INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS NAFTALENO ACÉTICO E ÁCIDO INDOL BUTÍRICO (AUXINAS) NO DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE PLÂNTULAS DE *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. F. (ORCHIDACEAE)

Daniella de Jesus Mendes¹
Sérgio Tadeu Sibov²
Maria Tereza Faria³

RESUMO

A propagação vegetativa *in vitro* mediante a cultura de tecidos favorece o crescimento de uma nova planta fora do seu ambiente natural. Esta técnica vem sendo empregada para a produção e multiplicação de plantas em curto prazo. Contudo, o preparo do meio de cultura é fundamental no desenvolvimento da espécie propagada, sendo importante empregar o tratamento adequado à determinada espécie vegetal. Neste trabalho foi realizado o cultivo *in vitro* de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (Orchidaceae) submetidas a diferentes tratamentos com reguladores de crescimento: ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indol butírico (AIB). O objetivo foi comparar o desenvolvimento da planta sob diferentes concentrações desses reguladores de crescimento. O material vegetal consistiu de plântulas de *C. saintlegerianum* originadas de germinação *in vitro*, e que foram mantidas por 60 dias em meio de cultura MS. Posteriormente, estas plântulas foram submetidas a sete tratamentos – (T1): Meio MS; (T2): MS + 1,0 mg/L de ANA; (T3): MS + 2,0 mg/L de ANA; (T4): MS + 4,0 mg/L de ANA; (T5): MS + 1,0 mg/L de AIB; (T6): MS + 2,0 mg/L de AIB; e (T7): MS + 4,0 mg/L de AIB. Cada tratamento foi composto por 20 tubos de ensaio com 20 ml do meio de cultura. Em cada frasco foram inoculadas duas plântulas, as quais foram submetidas as mesmas condições de iluminação e temperatura. Após 60 dias, foram avaliados o número de folhas, número de raízes, número de brotos, comprimento da maior raiz e altura das plantas. Verificou-se que a presença dos reguladores favoreceu a formação de raízes e brotos. Quanto à formação de raízes, os tratamentos T2, T3, T4, T5 e T6 não se diferiram estatisticamente. Em relação ao número de brotos, T5 obteve média superior. Os resultados indicam, portanto, que o uso de reguladores de crescimento, como as auxinas, pode favorecer o crescimento de plântulas de *C. saintlegerianum in vitro*.

Palavras-chave: cultura de tecidos de plantas, reguladores de crescimento, orquídeas

¹ Aluno do curso de Ciências Biológicas- Licenciatura; Faculdade Araguaia.

² Professor Doutor – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Goiás. Brasil. Programa de Pós – graduação Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Federal de Goiás.

³ Professor Titular do curso de Ciências Biológicas- Licenciatura; Faculdade Araguaia; Professor orientador do Curso Especialização em Tecnologias Aplicadas ao Ensino de Biologia (ETAEB)- UFG.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é numerosa e muito diversificada, sendo subdividida em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae. Compreendendo entre 8% e 10% de todas as plantas com flores, possui ampla distribuição geográfica, e aproximadamente 20.000 espécies em 850 gêneros (APG III, 2009). Desse total, aproximadamente 2.500 espécies são encontradas no Brasil das quais 500 ocorrem no Cerrado (COLOMBO *et al.*, 2004). São plantas herbáceas e bem diversificadas quanto ao habitat, podendo ser terrestres, rupícolas e epífitas.

O gênero *Cyrtopodium* agrupa mais de quarenta espécies que possuem hábito geralmente terrestre ou rupícola e que são encontradas em toda a América tropical e subtropical. Porém, a maior diversidade de espécies deste gênero encontra-se no Cerrado brasileiro (BATISTA; BIANCHETTI, 2004). Geralmente, espécies deste gênero apresentam pseudobulbos, órgão armazenador de água e nutrientes, constituindo uma importante adaptação morfológica ao ambiente. Outra importante adaptação ao ambiente seco consiste na floração de muitas espécies após queimadas, durante os períodos mais secos do ano no Cerrado. Quanto à conservação das espécies deste gênero, a degradação e perda do habitat é um fator preocupante (COLOMBO *et al.*, 2004).

Cyrtopodium saintlegerianum Rchb.f. (Orchidaceae) apresenta hábito epífita, geralmente fixada em troncos de palmeiras. Produz grandes bulbos recobertos por bainhas firmemente aderidas. Sua floração ocorre no terceiro trimestre do ano, apresentando flores amarelas e marrons (Fig. 1-2).

A propagação vegetativa *in vitro* é um procedimento que viabiliza a clonagem de espécies a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta matriz (SOUZA *et al.*, 2006). Trata-se basicamente de uma série de etapas que favorecem o crescimento de uma nova planta, fora do seu habitat natural, em ambiente completamente asséptico. Sendo assim, todo o ambiente físico deve ser considerado. Fatores como luminosidade, temperatura e umidade devem ser adequados para o bom desenvolvimento dos tecidos vegetais *in vitro* (SOUZA *et al.*, 2006).

Neste contexto, a cultura de tecidos constitui um conjunto de técnicas que permitem a produção e multiplicação de um maior número de mudas em curto prazo quando comparado a produção *ex vitro* – no campo. Estas técnicas podem ser aplicadas, principalmente, no melhoramento de plantas, na produção agrícola e na produção de metabólitos secundários para a elaboração de medicamentos (SOUZA *et al.*, 2006).

As auxinas, primeiros hormônios vegetais a serem estudados, são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indol-3-acético (AIA), responsáveis pelo crescimento da planta (GUERRA, 2006). Dentre as substâncias sintéticas com atividades semelhantes à AIA encontram-se os reguladores de crescimento ácido indol butírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA). O conhecimento das funções dos reguladores de crescimento é de fundamental importância para sua devida utilização na cultura de tecidos, visto que sua concentração pode inibir ou promover o crescimento vegetal.

O objetivo deste trabalho foi comparar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas da espécie *C. saintlegerianum* submetidas a diferentes concentrações dos reguladores de crescimento da classe das auxinas ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indol butírico (AIB).



Figura 1. Planta da espécie *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb.f. (Orchidaceae).
Foto: Daniella Mota

METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás (UFG). O experimento teve como material inicial plântulas de *C. saintlegerianum* originadas da germinação de sementes, mantidas *in vitro* por aproximadamente 60 dias, em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (SOUZA *et al.*, 2006) (Fig. 2). As plântulas apresentavam coloração verde em

sua maioria e algumas em estado senescente (aspecto amarelado), além da presença de protocormos.

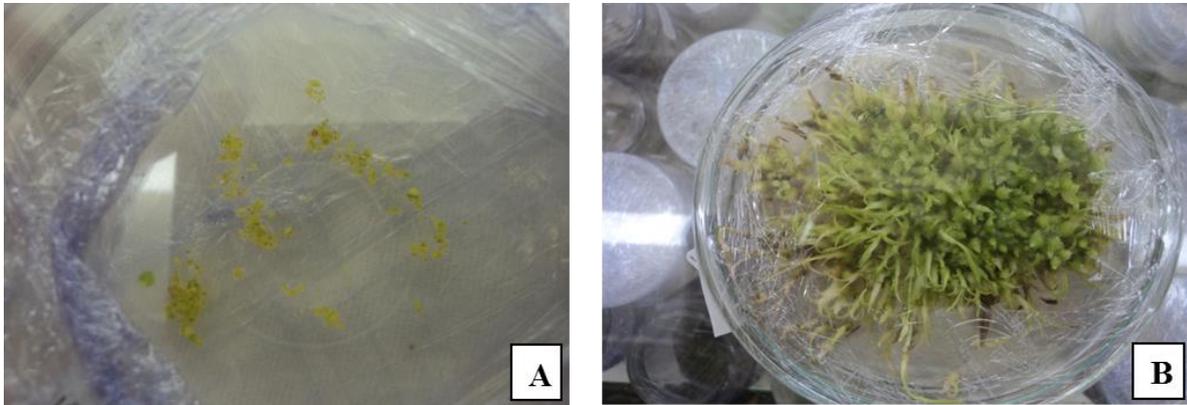


Figura 2. (A) Início da formação de protocormos indicando a primeira fase de desenvolvimento de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum*, logo após a germinação de sementes *in vitro* em meio MS utilizando placas de Petri. (B) Plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum*, após 60 dias de crescimento em meio MS, em frasco de conserva com capacidade de 250 ml.

Tratamentos Utilizados

Foram realizados sete tratamentos utilizando meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Ao primeiro tratamento (T1) não foi adicionado regulador de crescimento, a fim de utilizá-lo como tratamento controle. As concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 mg/L de ácido naftaleno acético (ANA) foram utilizadas nos tratamentos T2, T3 e T4 respectivamente (Fig. 3). Nos tratamentos T5, T6 e T7 foram utilizadas as concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB) (Quadro 1).

Após o preparo do meio de cultura, o pH foi ajustado para 5,8, seguido por adição de ágar (6g/L) para solidificação do meio. Cada tratamento foi composto por vinte tubos de ensaio, cada um contendo aproximadamente 20 ml do meio, totalizando 140 tubos de ensaio. Estes foram lacrados com papel alumínio e esterilizados em autoclave a 120° C por 20 minutos.

Quadro 1. Concentrações dos reguladores de crescimento ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indol butírico (AIB) utilizados nos tratamentos realizados para avaliação do desenvolvimento de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* em meio de cultura MS.

Tratamentos	ANA (mg/L)	AIB (mg/L)
*T1	-	-
T2	1,0	-
T3	2,0	-
T4	4,0	-
T5	-	1,0
T6	-	2,0
T7	-	4,0

*Tratamento Controle: ausência de reguladores de crescimento.

Subcultivo Vegetal

O subcultivo das plântulas foi realizado em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, de forma a evitar a contaminação do meio por microrganismos. Em cada tubo de ensaio contendo o meio, foram inoculadas duas plântulas verdes e sadias com aproximadamente 1 cm, totalizando 40 plântulas para cada um dos sete tratamentos.

O material ficou reservado na sala de crescimento, na presença de iluminação (luz branca fluorescente) e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 60 dias, para posterior avaliação das seguintes variáveis: número de folhas, número de raízes, número de brotos, comprimento da maior raiz e altura da planta.

Análise Estatística

A normalidade dos dados obtidos para os tratamentos foi testada pelo teste de Lilliefors. Os tratamentos foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido por teste Tukey quando paramétricos ou por análise de variância pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes de comparações múltiplas (Teste de Student-Newman-Keuls ou de Dunn) na ausência de normalidade ou homogeneidade de variâncias. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram conduzidas com auxílio dos softwares Biostat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 60 dias de cultivo *in vitro* de *C. saintlegerianum* verificou-se que a variável número de folhas não apresentou diferenças significativas entre o tratamento controle (T1) e os tratamentos T2, T3 e T5 (Tabela 1); para a altura da planta não houve diferenças significativas entre o tratamento controle (T1) e os tratamentos T2, T4 e T5 (Tabela 1). Diante destes resultados, pode-se concluir que a adição dos reguladores de crescimento ANA e AIB não foi relevante. Souto *et al.* (2010) também não relatou diferenças relevantes quanto ao número de folhas entre o grupo controle e o tratamento com 1,0 mg/L de ANA no cultivo *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae), mesmo após um período mais longo de avaliação de 180 dias (Fig. 3).

Para a variável número de raízes, os tratamentos T2, T3, T4, T5 e T6 não se diferiram estatisticamente (Tabela 1). Quanto ao número de brotos os tratamentos T2, T4, T5, T6 e T7 não apresentaram diferenças significativas (Tabela 1). Estes resultados indicam a resposta do explante às concentrações de auxinas utilizadas.

A variável comprimento da maior raiz obteve o melhor desempenho no tratamento controle (T1), superando os demais tratamentos (Tabela 1). Em experimentos com *C. bicolor* obteve-se resultados superiores para esta variável na concentração de 2,0 mg/L de ANA, Souto *et al.* (2010), fato que não foi constatado neste trabalho.

O tratamento acrescido por 4,0 mg/L de AIB (T7) obteve as menores médias do experimento em relação ao número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz e altura da planta, sendo considerado inferior aos demais tratamentos (Tabela 1).

Ori (2006) apontou em seu trabalho com *Phalaenopsis amabilis* (ORCHIDACEAE) que a alta concentração de AIB (5,0 mg/L) inibiu a formação de raízes aos 120 dias de cultivo, obtendo os menores valores quanto ao número de raízes. Tais resultados indicam que concentrações adicionais de reguladores de crescimento podem ser prejudiciais ao desenvolvimento dos tecidos e órgãos vegetais quando alteram o equilíbrio hormonal do explante. Por menor que seja, o explante produz tanto auxinas e citocininas. Em concentrações elevadas a auxina, por exemplo, pode inibir o desenvolvimento de raízes ao invés de estimulá-las (FACHINELLO, 1994 apud SOUTO, 2010).

Tabela 1. Média das variáveis número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotos (NB), comprimento da maior raiz (CMR), e altura da planta (AP) nos diferentes tratamentos após 60 dias de cultivo *in vitro* de *Cyrtopodium saintlegerianum*.

Tratamentos	NF	NR	NB	CMR (cm)	AP (cm)
T1: MS	4,40 ab	3,47 b	0,44 c	4.12 a	2.77 a
T2: MS + 1,0 mg/L de ANA	6,30 a	5,87 a	0,92 abc	2.53 b	2.36 ab
T3: MS + 2,0 mg/L de ANA	6,05 a	6,92 a	0,70 bc	2.24 bc	1.64 b
T4: MS + 4,0 mg/L de ANA	3,75 b	4,95 ab	1,50 ab	1.72 c	2.81 a
T5: MS + 1,0 mg/L de AIB	4,20 ab	6,10 a	1,56 a	2.57 b	2.28 ab
T6: MS + 2,0 mg/L de AIB	3,57 b	6,55 a	1,00 abc	1.87 bc	1.71 b
T7: MS + 4,0 mg/L de AIB	1,55 c	1,17 c	0,96 abc	0.19 d	0.50 c

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

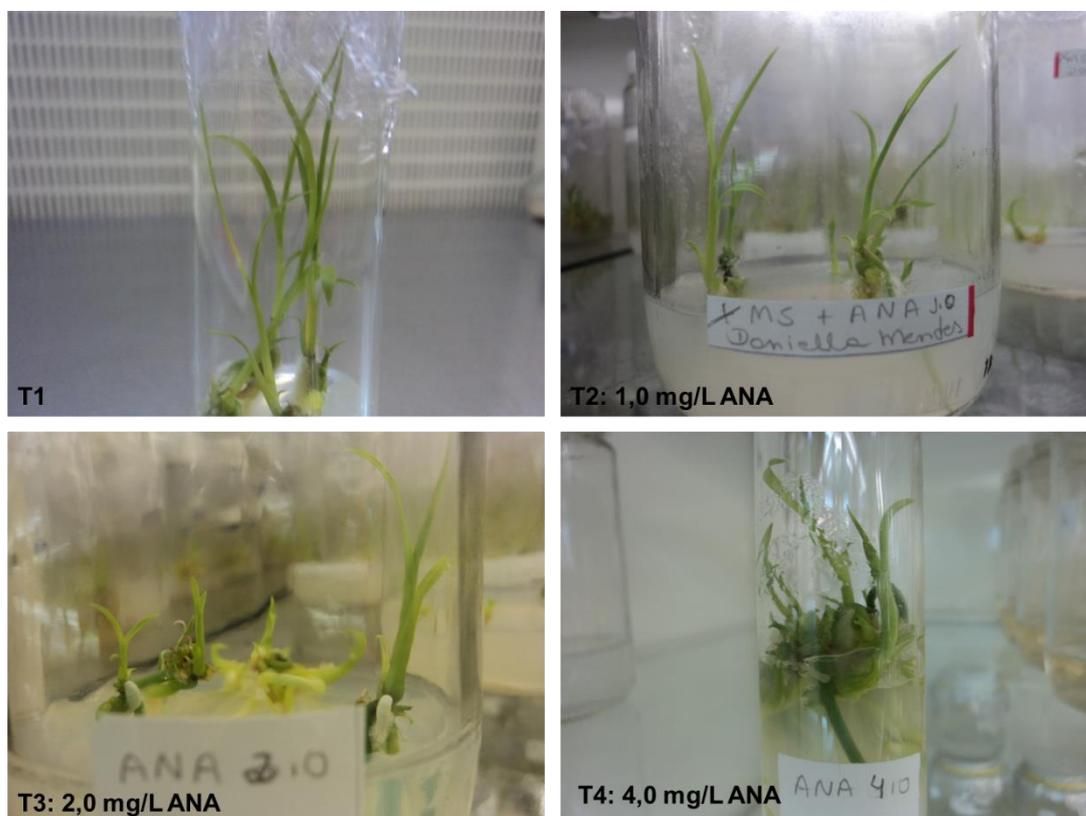


Figura 3. Diferentes concentrações de reguladores de crescimento aplicados no cultivo *in vitro* de *Cyrtopodium saintlegerianum*.

Conclui-se no presente trabalho que a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura MS respondeu quanto ao número de raízes e brotos, quando comparado ao tratamento controle. Os tratamentos T2, T3, T4, T5 e T6 foram eficazes para a formação de raízes, enquanto que para a formação de brotos os tratamentos T2, T4, T5, T6 e T7 se mostraram eficazes.

A adição de auxinas ao meio de cultura favorece a formação de brotos e raízes em plântulas de *C. saintlegerianum*. Embora responda para número de raízes, plântulas de *C. saintlegerianum* não responderam ao estímulo das auxinas com relação ao comprimento das raízes. O tratamento controle, sem adição de reguladores de crescimento, foi o tratamento adequado para o alongamento das raízes. Houve diferenças quanto às médias obtidas entre os tratamentos acrescidos com ácido naftaleno acético e ácido indol butírico, requerendo, portanto, um estudo do comportamento fisiológico destas auxinas, para melhor clareza de resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. The Linnean Society of London, Botanical Journal of the Linnean Society, vol. 161, 105–121, 2009.

AYRES, M.; AYRES-Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/ MCT-CNPq, p. 364, 2007.

BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. B. Três novos táxons de *Cyrtopodium* (Orchidaceae) do Centro-oeste e Sudeste do Brasil. **Brittonia**, v.56. Disponível em: <<http://www.delfinadearaujo.com/on/on28/paginas/joao1.htm>>. Acesso em: 29, agosto de 2012.

COLOMBO, L. A. Estabelecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de Bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v.32, n.4, 2010.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de Biotecnologia. Centro de Ciências Agrárias - UFSC. Steinmacher, 2006.

ORI, S.S. **Influência das auxinas no desenvolvimento e teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* (Lineu) Blume (Orchidaceae) cultivada *in vitro***, 2006. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente)

– Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

SILVA, T. C. Levantamento e dados ecológicos da família Orchidaceae no município de Simão Dias, Sergipe, Brasil. In: X Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço, Minas Gerais, 2011.

SOUTO, J. S.; MORIMOTO, J. M.; FERREIRA, W. M.; NAKABASHI M.; SUZUKY, R. M. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Rev. Bras. Biociências**, Porto Alegre, v.8, n.2, 2010.

SOUZA, A. S. et al. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas: Embrapa, 2006.

Recebido em 02 de fevereiro de 2015.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2015.