

Efeitos do ácido naftalenoacético e benzil-adenina no crescimento in vitro de Bifrenaria tyrianthina (Lodd.) Rchb.f.

Jackeline Jorge⁽¹⁾, Monique C. R. Abrão⁽¹⁾ & Rogério Mamoru Suzuki⁽¹⁾

⁽¹⁾ Núcleo de Pesquisa - Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, São Paulo, SP. E-mail para contato: rogeriomsuzuki@yahoo.com.br

Resumo: *Bifrenaria tyrianthina* é uma espécie rupícola, ornamental e se encontra ameaçada de extinção. O cultivo *in vitro* pode otimizar o processo de multiplicação de plantas visando a conservação desta espécie. Fitormônios são estudados para estimular o desenvolvimento de orquídeas que comparativamente a outras plantas herbáceas apresentam crescimento bastante lento. O objetivo foi de estudar o crescimento *in vitro* de plantas de *B. tyrianthina* submetidas a diferentes balanços de ácido naftalenoacético (ANA) e benzil-adenina (BA) nas concentrações de 0,57 μ M e 2,28 μ M destes fitormônios. Após 360 dias de cultivo *in vitro*, parâmetros biométricos foram analisados. Os resultados mostraram que o comprimento caulinar foi maior no meio adicionado de 2,28 μ M de ANA (5,8 cm) e o comprimento radicular no meio acrescido de ANA (2,28 μ M)+BA(0,57 μ M)(10 cm). A maior quantidade de folhas foi observada no meio de BA isoladamente (0,57 μ M) (7,57) e a menor no controle (3,57). No que diz respeito a quantidade de raízes, verificou-se maior média (10) no meio acrescido de ANA (2,28 μ M)+BA (0,57 μ M) e a menor (1,72) em ANA (0,57 μ M)+ BA (2,28 μ M). A massa fresca caulinar não apresentou diferença significativa entre os meios utilizados, contudo podemos observar um maior acúmulo de matéria fresca no meio adicionado de 2,28 μ M de ANA (458,66 mg). Já a massa fresca radicular foi significativamente maior no meio com ANA (2,28 μ M)+BA (0,57 μ M)(596,90 mg). Não houve diferença significativa na massa seca caulinar. No meio com ANA (2,28 μ M)+BA (0,57 μ M)foi obtida a maior massa seca radicular (168,89 mg). A adição de diferentes concentrações de ANA e BA estimularam diferencialmente o crescimento de caules e raízes de *B. tyrianthina*, portanto para a promoção do desenvolvimento deve-se utilizar um

determinado balanço hormonal para cada órgão da planta.

Palavras-Chave: fitormônios, meios nutritivos, orquídeas.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae apresenta distribuição cosmopolita, estando ausente apenas nos polos e nas regiões desérticas. Podem ser terrícolas, epífitas, rupícolas, saxícolas ou micohetetrotóxicas. Compreende mais de 25.000 espécies em 800 gêneros e, sendo considerada uma das maiores famílias de plantas do grupo das angiospermas (Pinheiro *et al.* 2004). No Brasil, há 236 gêneros e 2.459 espécies, das quais 66% são endêmicas (Barros *et al.* 2014).

Bifrenaria tyrianthina é uma planta herbácea, sendo a única representante do gênero de hábito exclusivamente rupícola. Apresenta a maior flor dentre os membros do gênero *Bifrenaria*. Ocorre em Campos rupestres e vegetações abertas especialmente nos campos rupestres das parcelas mineira e baiana da Cadeia do Espinhaço (Koehler & Amaral 2004). Segundo Simonelli & Fraga (2007), a espécie foi considerada em perigo (EN) em avaliação de risco de extinção empreendida para o estado do Espírito Santo e vulnerável (VU) em avaliação de risco de extinção empreendida para a flora do Estado de São Paulo (SMA-SP 2004).



Figura 1. Aspecto geral das flores de *Bifrenaria tyrianthina* (Orchidaceae). (Fotos: Suzuki, R. M).

O cultivo *in vitro* possibilita o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas, promovem a germinação de sementes, aceleram o crescimento e o desenvolvimento de orquídeas (Suzuki & Ferreira 2007). A propagação de orquídeas é de extrema importância para que seja possível viabilizar a sua multiplicação em coleções vivas e possibilitar tanto a reintrodução na natureza como também a conservação daquelas espécies ameaçadas de extinção (Ferreira & Suzuki 2008).

Auxinas e citocininas interagem em diferentes vias que são fundamentais para o controle de diferentes processos envolvidos no desenvolvimento de plantas, particularmente no crescimento de caules e raízes (Suzuki *et al.* 2010). A auxina conhecida como ácido naftalenoacético (ANA) e a citocinina benziladenina (BA) constituem os fitormônios (reguladores de crescimento) de ampla utilização tanto na estimulação do crescimento *in vitro* de plântulas, quanto na clonagem e nos estudos de organogênese, devido a sua alta estabilidade (não degradação durante o processo de esterilização em autoclave) e acessibilidade devido ao baixo custo (Suzuki & Ferreira 2007). Tendo em visto as considerações acima, o presente trabalho teve como objetivo, estudar o crescimento *in vitro* de plantas de *B. tyrianthina* submetidas a diferentes balanços de ácido naftalenoacético (ANA) e benzil-adenina (BA) nas concentrações de 0,57 μ M e 2,28 μ M destes fitormônios.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultivo *in vitro* do Núcleo de Pesquisas - Orquidário do Estado, do Instituto de Botânica (IBt), em São Paulo - SP.

Utilizou-se plantas de *Bifrenaria tyrianthina* com 450 dias de cultivo *in vitro* após a germinação, que foram transferidas e crescidas em frascos de cultura de 400 mL contendo 80 mL de meio cada um. As plantas apresentavam comprimento e aspectos morfológicos semelhantes e as raízes pré-existentes foram extraídas para quantificar o número de raízes neoformadas estimuladas em cada tratamento.

Os diferentes meios de cultura utilizados foram (Knudson C, 1946) acrescidos de ácido naftalenoacético (ANA) com 0,57 e 2,28 μ M; e benziladenina (BA): 0,57 e 2,28 μ M, adicionados isoladamente; e os seguintes balanços de ANA 0,57 μ M + (BA 0,57 ou BA 2,28 μ M) e ANA 2,28 μ M + (BA 0,57 ou 2,28 μ M) em um total de 9 tratamentos, incluindo o controle (ausente de hormônios). Estes foram mantidos em sala de cultura com temperatura de 25 \pm 2°C, fotoperíodo de 12h e intensidade de luz de 30 μ mol.m⁻².s⁻¹. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 \pm 0,05 anterior a adição de 0,4% de ágar para a geleificação dos meios de cultura e, em seguida, foram esterilizados em autoclave à 120°C e 1,3 atm durante 20 minutos. Cada tratamento consistiu de 3 frascos contendo 15 plântulas.

Após 360 dias de cultivo *in vitro*, parâmetros biométricos como comprimento do caule e da maior raiz, quantidade do número de folhas e raízes bem como a massa fresca e seca dos caules e raízes de sete plantas retiradas aleatoriamente de cada frasco dos tratamentos, foram analisados.

Análise estatística

Cada um dos parâmetros biométricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey com significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o comprimento caulinar foi maior no meio adicionado de 2,28 μ M de ANA (5,8 cm) e o comprimento radicular no meio acrescido de ANA (2,28 μ M)+BA (0,57 μ M)(10 cm)(Figura 2 A).

O número de folhas e raízes é apresentado na figura 2 B. A maior quantidade de folhas foi observada no meio de BA isoladamente (0,57 μ M) (7,57) e a menor no controle (sem adição hormonal) (3,57). Em relação à quantidade de raiz, verificou-se uma maior média (10) no meio acrescido de ANA (2,28 μ M)+BA (0,57 μ M) e a menor (1,72) em ANA (0,57 μ M)+ BA (2,28 μ M).

A respeito dos efeitos de reguladores de crescimento vegetal, especialmente com auxina (ANA), sobre o desenvolvimento *in vitro* de orquídeas, poucos trabalhos foram publicados. Alguns artigos científicos relatam a regeneração de plantas ou clonagem de dessas espécies utilizando fragmentos de raízes. Em espécies de plantas como *Oncidium varicosum* e *Catasetum fimbriatum*, Kerbauy (1984 a,b), regenerou um grande número de plantas a partir de ápices

radiculares. Entretanto, 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.

processo de divisão e alongamento celular radicular.

São apresentados a seguir os dados de massa de matéria fresca e seca (Figura 3 A e B).

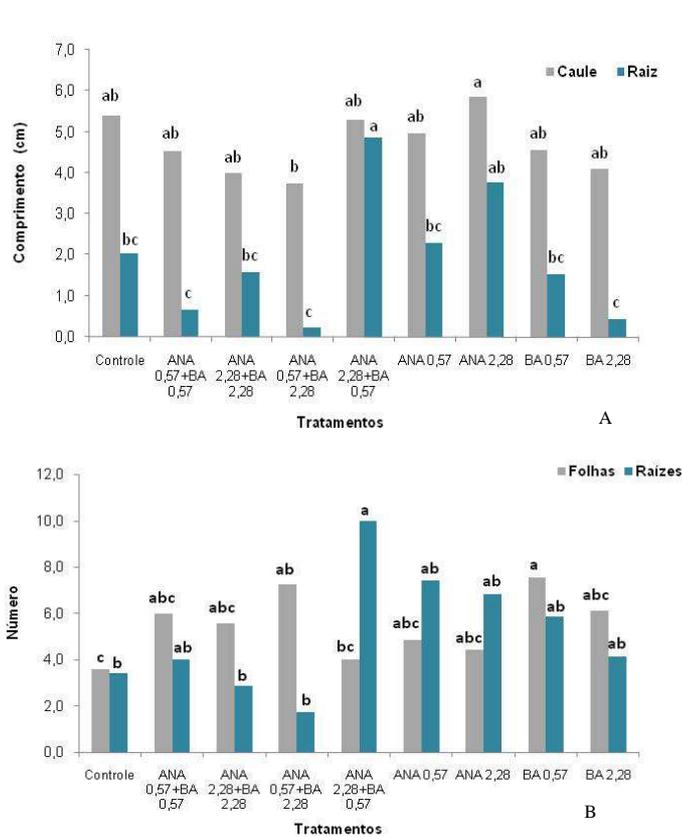
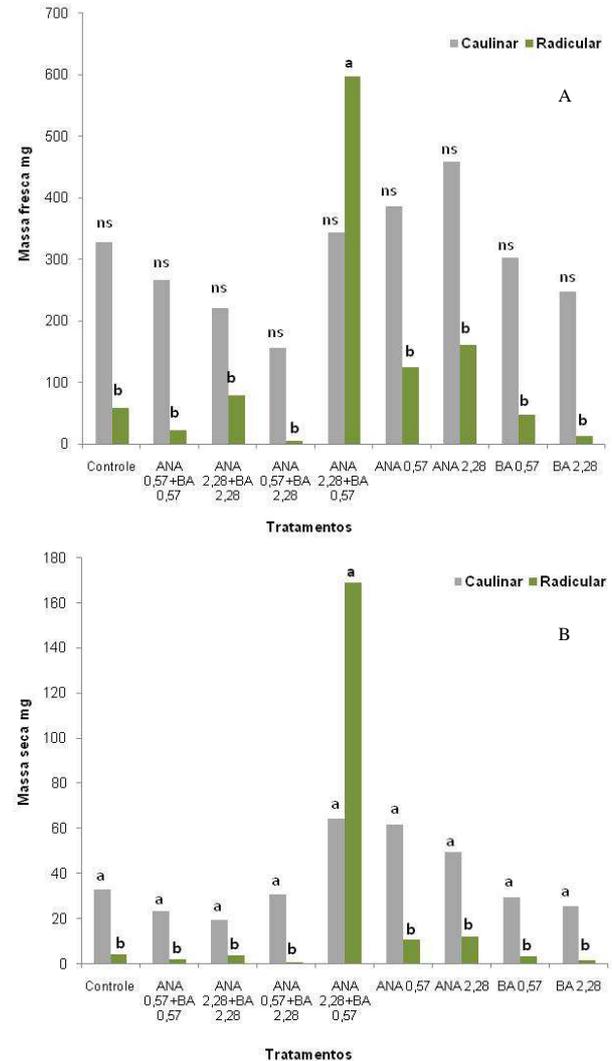


Figura 2. Efeitos de diferentes balanços de ácido naftalenoacético (ANA) e de benziladenina (BA) adicionados ao meio de cultura de Knudson C (1946) (concentração em μM), no número de folhas e raízes (A) e no comprimento médio de caules e média da raiz maior (B) de *B. tyrianthina* após 360 dias de cultivo *in vitro*. Barras seguidas de letras diferentes apresentam variação significativa, segundo teste de Tukey ($P < 0,05$). ($n=7$).

Em *Cyrtopodium glutiniferum*, (Vogel & Macedo 2010), obtiveram de plantas com maior número de raízes nos tratamentos acrescidos de auxina, quando comparados com os tratamentos contendo apenas citocinina.

Em nosso estudo, apenas o balanço de ANA (2,28 μM)+BA (0,57 μM) promoveu maior número de raízes neoformadas.

Segundo Casimiro *et al.* (2001), a formação de raízes adventícias é estimulada pelo fluxo de auxina, que é mobilizado pelas células do periciclo, sendo responsável pela indução do



naftalenoacético (ANA) e de benziladenina (BA) adicionados ao meio de cultura de Knudson C (1946) (concentração em μM), sobre a massa de matéria fresca (A) e seca (B) de caules e raízes de *B. tyrianthina* após 360 dias de cultivo *in vitro*. Barras seguidas de letras diferentes apresentam variação significativa, segundo teste de Tukey ($P < 0,05$). ($n=7$).

A massa fresca caulinar não apresentou diferença significativa entre os meios utilizados, contudo observou-se matéria fresca no meio adicionado de 2,28 μM de ANA (458,66 mg). Diferentemente, a massa fresca radicular foi significativamente maior no meio com ANA (2,28 μM)+BA (0,57 μM)(596,90 mg). Não houve

diferença significativa na massa seca caulinar, entretanto, a maior massa foi observada no meio com ANA (2,28µM)+BA (0,57µM)(64,343 mg). De modo semelhante, esse mesmo tratamento induziu significativamente o acúmulo de massa seca radicular (168,89 mg) em relação aos demais meios.

Esses resultados corroboram com a informação de Kersten (1987) e Skoog & Miller (1957), na qual, o balanço auxina/citocinina promove o equilíbrio para promoção de um desenvolvimento balanceado da planta, ou seja, estimula o crescimento caulinar bem como o radicular. Semelhantemente ao clássico trabalho de Skoog & Miller (1957) em *Nicotiana*, para *B. tyrianthina*, quando a concentração de citocinina é maior que auxina há promoção do desenvolvimento caulinar e quando o balanço é deslocado para a auxina há maior estimulação do crescimento radicular.

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

CONCLUSÕES

A adição de balanços de ANA e BA utilizados estimularam diferencialmente o crescimento de caules e raízes. Deste modo, verificou-se em *B. tyrianthina* a importância da seleção da concentração do balanço destes dois fitormônios para promoção do desenvolvimento de determinada parte da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barros, F. de., Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M., Forster, W., Menini Neto, L., Furtado, S.G., Nardy, C., Azevedo, C.O. & Guimarães, L.R.S. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 11 Ago. 2014
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J. & Bennett, M. 2001. Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant cell* 13:843–52.
- Ferreira, W.M. & Suzuki, R.M. 2008. O cultivo in vitro de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: M.I.B. Loiola, I.G. Baseia & J.E. Lichston (org.). *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Imagem Gráfica, Natal, pp. 67-68.
- Kerbaudy, G.B. 1984a. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. *Plant Cell Reports* 3: 27-29.
- Kerbaudy, G.B. 1984b. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of root tips of *Catasetum* (Orchidaceae). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 113: 287-291.
- Kersten, E. 1987. Propagação vegetativa dos citros por métodos não convencionais. Esalq, Piracicaba.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- Koehler, S. & AMARAL, M.C.E. A taxonomic study of the South American genus *Bifrenaria* Lindl. (Orchidaceae). *Brittonia*, 2004.
- Pinheiro, F., Barros, F. & Lourenço, R.A. 2004. O que é uma Orquídea ? In: F. Barros & G.B. Kerbaudy (org.). *Orquidologia Sul-Americana: uma compilação científica*. Secretaria do Meio Ambiente/Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 11-33.
- 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.
- Secretaria De Estado Do Meio Ambiente, SÃO PAULO. SMA-SP. 2004. Resolução SMA N. 48 DE 2004. Lista oficial das espécies da flora do Estado de São Paulo ameaçadas de extinção, Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, SP.
- Simonelli, M. & Fraga, C. N. (ORG.). 2007. Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo. Vitória, ES: IPEMA, 144 p.
- Skoog, F. & Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11:118–131.
- Suzuki, R.M. & Ferreira, W.M. 2007. Introdução às técnicas de micropropagação de orquídeas. In: L.M. Barbosa & N.A. Santos-Jr, (orgs.). *A Botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais*. 1 ed. Imprensa Oficial do Estado, São Paulo, pp. 655-659.
- Suzuki, R.M., Kerbaudy, G.B., Pescador, R., Purgatto, E., Ceccantini, G.C.T. & Ferreira, W. M. 2010. Dark-induced hormone changes coincide with the resumption of light-inhibited shoot growth in *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Journal of Plant Physiology* 167: 375–381.

- Tanaka, M., Senda, Y. & Hasegawa, A.** 1976. Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. *American Orchid Society Bulletin*, 45: 1022-1024.
- Vogel, I.N. & Macedo, A.F.** 2010. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi, a medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 104:147–155.