

SANDRA SAYURI ORI

**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***

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2006

SANDRA SAYURI ORI

**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***

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: PROF. DR. EDISON PAULO CHU

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Ori, Sandra Sayuri

O69i 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* / Sandra Sayuri Ori -- São Paulo, 2006.
133 p. il.

Dissertação (mestrado)—Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2006
Bibliografia.

1. Orchidaceae. 2. Phalaenopsis amabilis. 3. Auxinas. I. Título

CDU 582.594.2

À Deus pela existência, pela família, pelos amigos, pelos caminhos que percorri e que vou percorrer.

Aos meus queridos pais, Kenji e Mifue, aos meus irmãos Marcia e Ricardo que me apoiaram e estimularam neste árduo caminho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Kenji e Olga e aos meus irmãos Márcia e Ricardo, por estarem presentes em todos os momentos de conquistas e desespero, por terem dado base sólida para vencer os obstáculos e principalmente por me amarem;

Ao pesquisador Prof. Dr. Edison Paulo Chu, pela orientação, pelo voto de confiança, por acreditar no trabalho, pelo incentivo, pelos ensinamentos, pela paciência, pela dedicação;

Ao pesquisador Dr. Armando Reis Tavares, pela orientação, pelas repetitivas correções, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade;

Ao pesquisador Prof. Dr. Fábio de Barros pelas incessantes correções do projeto e principalmente pela paciência;

Ao pesquisador Dr. Shoey Kanashiro pelas sugestões, pelo incentivo e principalmente pela ajuda;

Aos pesquisadores da seção de Ornamentais, Francismar Francisco Alves de Aguiar, Dra. Vívian Tamaki, Dra. Catarina Carvalho Nievola, Doutoranda Vanessa Rebouças Dr. Clovis José Fernando de Oliveira Júnior pelo apoio, atenção e incentivo;

Aos funcionários da seção de Ornamentais Luzia Rodrigues Scarpeta, Cleonice Righetti de Campos, Ivomar Aparecido Medina e Maria da Conceição Maciel Oliveira pelo apoio, carinho, atenção, incentivo e pela amizade;

À Secretaria da Agricultura nas Pessoas Clarice, Carmem, José Carlos por possibilitarem a utilização do ônibus;

À Dra. Márcia Regina Braga, à Dra. Vívian Tamaki, à Dra. Nair Sumie Yokoya e ao Dr. Giulio Cesare Stancato pelas sugestões ao projeto;

Ao pesquisador Dr. Rogério Suzuki pela atenção e principalmente pela paciência;

Aos amigos e colegas Sandra, Adriana, Lílian, Carlos e Rodrigo do curso de pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica;

Aos funcionários da seção de Fisiologia Vegetal em especial Sirley e Helena;

À seção do Orquidário em especial Valdir, Elena e Rosana;

Aos amigos e funcionários João Batista, Adriana, Ivonete e Carlinhos, do Orquidário Ori, pelo trabalho, pela ajuda e principalmente pela amizade;

Aos estagiários da Seção de Ornamentais Maria Aparecida Gobatto Alves, Monaly Sado, Renata Fester Giacometti, Jennifer Almeida Guariento, Gabriela Fiani Veiga, Jorge Luiz Marx Young e Patrícia Giampaoli pela ajuda e pelo auto-astral;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente nas pessoas da Dra. Sônia M. Campos Dietrich e Dra. Solange C. Mazzoni-Viveiros, principalmente a cota de 6 meses de bolsa. A todos os docentes e alunos, em especial a secretária Márcia Regina Ângelo;

Ao Círculo das Associações de Orquidófilos do Brasil, ao Círculo Paulista de Orquidófilos, aos orquidófilos de Poá, à Sociedade Orquidófila de Sorocaba e à Sociedade Bandeirantes de Orquidófilos pelo estímulo e amizade;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

Símbolos e abreviaturas utilizadas

ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indolilacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalenoacético
C ₃	Ciclo de Calvin Benson
CAM	Metabolismo ácido das crassuláceas
CO ₂	Dióxido de carbono
cv	cultivar
D.M.S.	Diferença mínima significativa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
F	Valor do resultado da análise de variância
g	Gravidade
g	Gramas
KC	Knudson, meio
L ⁻¹	Por litro
M	Molaridade
mg	Miligramas
mm	Milímetros
ms	massa seca
N	Normalidade
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetros
ns	Não significativo ($\alpha > 5 \%$)
PAR	Taxa de assimilação fotossintética
R ²	Coefficiente de determinação
RNA	Radiação fotossinteticamente ativa
sp.	espécie
TDZ	Thidiazuron (1-Fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-yl)-urea)
VW	Vacin Went, meio
6-BA	6-Benziladenina
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
°C	graus Celsius
*P 95%	Probabilidade de 95%
**P 99%	Probabilidade de 99%
***P 99,9%	Probabilidade de 99,9%
α	Alfa
+	Material não detectado
μM	Micromolaridade
$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Micromol por metro quadrado por segundo

Índice

1. Introdução	
1.1. Família Orchidaceae.....	01
1.2. Gênero <i>Phalaenopsis</i>	01
1.3. Mercado mundial de flores e plantas ornamentais.....	04
1.4. Cultura de tecidos.....	05
1.4.1. Meios de cultura.....	06
1.5. Trocas gasosas em cultivo <i>in vitro</i>	07
1.6. Fonte e dreno.....	07
1.7. Carboidratos.....	08
1.8. Amido.....	09
1.9. Proteína.....	10
1.10. Enraizamento.....	11
1.10.1. Enraizamento em Orchidaceae.....	13
1.11. Reguladores vegetais no enraizamento.....	14
1.11.1. Auxinas de efeito herbicida.....	16
1.12. Luminosidade.....	19
1.13. Aclimatização.....	19
2. Objetivos.....	21
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Obtenção das plantas de <i>Phalaenopsis amabilis</i>	22
3.2. Inoculação <i>in vitro</i> e condições de cultivo.....	23
3.3. Coleta do material para as análises biométricas e bioquímicas.....	24
3.3.1. Análises biométricas e preparo das amostras.....	24
3.3.2. Extração e determinação dos teores de carboidratos solúveis totais..	25
3.3.3. Extração e determinação dos teores de proteína total solúvel.....	26
3.3.4. Extração e determinação dos teores de amido.....	26
3.4. Análises estatísticas.....	27
4. Resultados.....	28
4.1. Análises biométricas.....	28
4.1.1. Efeito do AIB no número de folhas e raízes	28

4.1.2. Efeito do AIB na massa seca de folhas e raízes.....	32
4.1.3. Efeito do AIB na massa seca de folhas e raízes.....	36
4.1.4. Efeito do ANA no número de folhas, raízes e brotos.....	40
4.1.5. Efeito do ANA na massa fresca de folhas, raízes e dos brotos.....	45
4.1.6. Efeito do ANA na massa seca de folhas, raízes e brotos.....	51
4.1.7. Efeito do 2,4-D no número de folhas, raízes e brotos.....	56
4.1.8. Efeito do 2,4-D massa fresca de folhas, raízes e brotos.....	62
4.1.9. Efeito do 2,4-D na massa seca de folhas, raízes e brotos.....	68
4.2. Análises bioquímicas.....	74
4.2.1. Efeito do AIB nos teores de carboidratos solúveis de folhas e nas raízes.....	74
4.2.2. Efeito do ANA nos teores de carboidratos solúveis de folhas, raízes e brotos.....	76
4.2.3. Efeito do 2,4-D nos teores de carboidratos solúveis nas folhas, raízes e brotos.....	79
4.2.4. Efeito do AIB nos teores de amido de folhas e raízes.....	82
4.2.5. Efeito do ANA nos teores de amido de folhas, raízes e brotos.....	84
4.2.6. Efeito do 2,4-D nos teores de amido de folhas, raízes e brotos.....	87
4.2.7. Efeito do AIB nos teores de proteína total solúvel de folhas e raízes.....	90
4.2.8. Efeito do ANA nos teores de proteína total solúvel de folhas, raízes e brotos.....	92
4.2.9. Efeito do 2,4-D nos teores de proteína total solúvel de folhas, raízes e brotos.....	95
5. Discussão.....	98
5.1. Efeito do AIB no número, massa fresca e seca de raízes e folhas.....	99
5.2. Efeito do ANA no número, massa fresca e seca de raízes, folhas e brotos.....	101
5.3. Efeito do 2,4-D no número, massa fresca e seca de raízes, folhas e brotos.....	103
5.4. Teores de carboidratos solúveis.....	104
5.5. Teores de amido.....	105

5.6. Teores de proteína total solúvel.....	106
6. Conclusões.....	107
7. Resumo.....	114
8. Abstract.....	116
9. Literatura citada.....	118
10. Índice de figuras.....	V
11. Anexos.....	xiii

1. Introdução

1.1. Família Orchidaceae

A família Orchidaceae, uma das maiores e diversificadas entre as angiospermas, é taxonomicamente uma das mais evoluídas entre as monocotiledôneas, sendo representada por 1.800 gêneros (Watanabe 2002), com cerca de 35 mil espécies descritas (Singh 1992), além dos híbridos. Segundo Pridgeon (1995), as orquídeas ocupam quase todo tipo de habitat, exceto tundras e regiões desérticas.

O Brasil possui invejável diversidade e quantidade de espécies da família Orchidaceae (Sachs 2002). A família apresenta inúmeros híbridos intergenéricos, existindo acima de 100.000 híbridos (Sheehan & Sheehan 1994) como *Laelio-Cattleya*, *Brasso-Cattleya*, *Brasso-Laelio-Cattleya*, *Cattleya-Bultonia*, *Sophro-Cattleya*, *Sophro-Laelio-Cattleya*, *Dendro-Phal*, *Milioniopsis*, todos de alto valor comercial.

1.2. Gênero *Phalaenopsis*

A palavra *Phalaenopsis* origina-se do grego *phalaina* que significa mariposa e *opsis* aparência (Pridgeon 1995) e tem procedência no norte da Austrália, sudeste da Ásia, montanhas do Himalaia, Indonésia e Filipinas (Sheehan & Sheehan 1994). O hábito de crescimento é epifítico com 60 espécies descritas (Harper 2004). O gênero *Phalaenopsis* tem alto potencial ornamental e comercial, não só no mercado nacional como também internacional, pois é uma das poucas plantas da família Orchidaceae que floresce a cada 6 meses e apresenta grande durabilidade da inflorescência. Segundo Paul & Starosta (1998), a maioria dos híbridos de *Phalaenopsis* provém de cruzamentos entre *P. amabilis* (Lineu) Blume (Figura 1) e *Phalaenopsis stuartiana* (Rchb. f) (Figura 2). Seu crescimento é monopodial onde as folhas se dispõem de forma alternada sobre as gemas axilares.



Figura 1. Flores de *Phalaenopsis amabilis*, barra = 5 mm (Ori 1999).



Figura 2. Flores de *Phalaenopsis stuartiana* (Pridgeon 1995).

As plantas do gênero *Phalaenopsis* podem ser propagadas de forma sexuada e assexuada. Na propagação sexuada, após a polinização, formam-se frutos do tipo cápsula com sementes que se tornam maduras entre 6 a 8 meses (Figura 3) e, em geral, produzem poucas sementes, quando comparadas às cápsulas do gênero *Cattleya*. Uma cápsula de *Phalaenopsis* produz aproximadamente 4 mil mudas em condições *in vitro*, desde de que sejam feitas 4 repicagens (Figura 4), com aproximadamente 1 ano de cultivo *in vitro*. Não havendo repicagens, os protocormóides não se desenvolvem plenamente (Figura 5).

Segundo Kikuchi (2006), as plântulas do gênero *Phalaenopsis* necessitam de 30 dias entre as repicagens totalizando 6 passagens, sendo este um dos fatores importantes na produção comercial, pois as plantas começam a competir por nutrientes, água, espaço e luminosidade.

A propagação assexuada pode ser *in vivo* e *ex vitro*. A técnica *in vitro* é realizada através da inoculação de fragmentos de folhas, raízes, ponta da raiz, lâminas e nós da haste floral em meio de cultura asséptica, com a adição de reguladores de crescimento. Na propagação assexuada *ex vitro* podem ser utilizados o nó da haste floral, o broto lateral (gemas axilares originam brotos inteiros em detrimento da haste floral) e fragmentos de raiz como é o caso de *Phalaenopsis lueddemanniana* (Rchb. f) (Arditti & Ernst 1993).



Figura 3. Cápsulas de *P. amabilis* com aproximadamente 6 meses após a polinização, barra = 2 cm (Ori 2001).



Figura 4. Mudanças de *P. amabilis* cultivadas *in vitro* com aproximadamente 360 dias de cultivo (quarta repicagem), barra = 1,5 cm (Ori 2003).



Figura 5. Protocormóides de *P. amabilis* com aproximadamente 360 dias de cultivo que não foram repicados, barra = 0,5 cm (Ori 2003).

As gemas axilares do gênero *P. amabilis* podem dar origem a mais de uma haste floral ou a mudas laterais (Arditti & Ernst 1993). A primeira floração de *P. amabilis* ocorre no período de 3 a 4 anos após a aclimatização, apresentando 6 flores, podendo exibir até 18 flores por haste floral (Harper 2004). As flores têm durabilidade aproximada de 45 dias, sendo que após o corte da haste floral, outra inflorescência cresce após 6 meses de cultivo em condições de estufa (Holtum 1996).

1.3. Mercado mundial de flores e plantas ornamentais

O mercado de plantas e flores ornamentais foi denominado como “indústria de flores” por movimentar bilhões de dólares. Esta conotação é apropriada por envolver todos os segmentos da cadeia produtiva, dos insumos aos agentes da intermediação e varejo, até o consumidor final. Países como Noruega, Suíça, Suécia, Dinamarca e Itália são os maiores consumidores com mais de US\$ 100,00 per capita por ano, o que mostra uma importante perspectiva comercial da indústria de flores no mundo (Matsunaga 1997).

As técnicas de cultura *in vitro*, no setor de floricultura, vêm sendo amplamente utilizadas para a propagação de grande número de espécies, apresentando rápida multiplicação em relação aos métodos convencionais, possibilitando o fornecimento de mudas em maior quantidade, qualidade fitossanitária, de alto valor ornamental, produção em curto espaço de tempo e em pequena área cultivada (Bosa *et al.* 2003). A produção *in vitro* a partir de sementes de orquídeas no Brasil mostrou-se viável por obter uma receita líquida de 52 % em uma produção de 3 mil mudas (Stancato *et al.* 2001).

1.4. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos em condições assépticas é um método utilizado em programas de melhoramento, conservação e aumento da variabilidade das espécies para fins de seleção em plantas ornamentais (Ferreira *et al.* 1998). Segundo Bosa *et al.* (2003) a técnica de propagação *in vitro* vem sendo utilizada com amplo sucesso para produção de mudas em escala comercial.

Os tecidos cultivados *in vitro* são mantidos pelos nutrientes orgânicos e minerais do meio de crescimento, enquanto a expressão morfológica das células ou de órgãos vegetais pode ser controlada por fatores como variações nas concentrações nutricionais ou reguladores de crescimento nos meios de cultura, que definem respostas específicas para cada espécie (Caldas *et al.* 1998).

O método consiste em 5 etapas: a) fase zero, com a seleção da planta matriz e preparação do explante (cuidados fitossanitários), b) fase 1, assepsia do material e estabelecimento em cultura asséptica, c) fase 2, multiplicação dos explantes, d) fase 3a, indução da parte aérea e fase 3b, indução radicular e pré-aclimatização, e e) fase 4,

aclimatização em casa de vegetação (Carvalho 1978, Debergh & Maene 1981, Guimarães 1994).

1.4.1. Meios de cultura

Na cultura de tecidos em plantas de *Phalaenopsis* são utilizados vários tipos de meios nutritivos, tanto para propagação vegetativa como através de sementes (Arditti & Ernst 1993). Park *et al.* (2002), avaliaram a taxa de sobrevivência de plantas do gênero *Phalaenopsis*, utilizando diferentes meios de cultura, sendo um deles o adubo comercial Hyponex de fórmula 20-20-20 (N:P:K). Os autores observaram que o meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) foi um dos melhores meios de cultura proporcionando 62 % de sobrevivência dos protocormóides. Chen *et al.* (2000) utilizando a metade da concentração de macronutrientes e micronutrientes do meio de cultura MS obtiveram resultados excelentes no estabelecimento e na regeneração de calos de plantas do gênero *Phalaenopsis*.

O meio MS é utilizado em cultura *in vitro* em vários gêneros da família Orchidaceae podendo citar o trabalho de Martin (2003) com *Ipsea malabarica*, Lu *et al.* (2002) com *Phalaenopsis* sp., Chen *et al.* (2002) com *Paphiopedilum* sp., Sobhana & Rajeevan (2002a) com *Dendrobium* sp., Yang *et al.* (2002) com *Cymbidium* sp. e Torres & Mogollon (2002) com *Cattleya mossie*, entre outros.

No cultivo *in vitro* de orquídeas, compostos orgânicos como água de coco e extrato de frutas são comumente utilizados para estimular o crescimento de protocormóides e mudas *in vitro* (Arditti & Ernst 1993). Estes extratos vegetais podem afetar o desenvolvimento da planta devido à presença de várias substâncias como hormônios vegetais, aminoácidos, peptonas e vitaminas que se apresentam de forma indefinida, podendo alterar a composição química do meio de cultura e que são variáveis conforme o

lote e período de preparo. Segundo Giatti (2005), o uso de componentes orgânicos como água de coco é benéfico nas culturas de tecidos de híbridos de *Cattleya*, mas deve ser dada maior atenção à maneira como se emprega essas substâncias, pois possuem uma química indefinida onde podem gerar alterações no meio de cultura, como oscilações no pH e acréscimo de mais reguladores de crescimento em quantidades não mensuráveis. Sobhana & Rajeevan (2002b) verificaram que no meio de cultura MS, a adição de polpa de banana, água de coco, NAA e IBA foram favoráveis à germinação e desenvolvimento de sementes de híbrido de *Dendrobium*, mostrando melhores resultados, quando comparado aos meios Vacin & Went (1949) e Knudson (1946).

1.5. Trocas gasosas em cultivo *in vitro*

Grout & Aston (1977), trabalhando com rosas cultivadas *in vitro*, observaram uma alta taxa de sobrevivência (84 %) na aclimatização quando se utiliza algodão na vedação dos frascos, reduzindo a umidade e possivelmente estimulando a síntese de cera epicuticular, permitindo maior atividade fotossintética *in vitro* pela disponibilidade de CO₂ da atmosfera interna e reduzindo a concentração de gás etileno. Por outro lado, plantas cultivadas *in vitro* fechadas hermeticamente tiveram redução no nível de clorofila, aumento de CO₂ onde não favorecerão o desenvolvimento dos explantes (De Proft *et al.* 1985).

1.6. Fonte e dreno

A fonte de carbono metabolizado nas angiospermas provém do tecido fotossinteticamente ativo (folhas, caules, frutos e raízes verdes) e a produção de carboidratos oriunda das folhas maduras é utilizada como fonte de energia para tecidos em crescimento e desenvolvimento (dreno) como novas raízes e folhas, flores, bulbos, tubérculos e frutos (Roitsch & Ehneb 2000).

Os carboidratos são uma importante fonte de energia para o crescimento e desenvolvimento de raízes atuando como fonte de energia e de esqueletos de carbono para os tecidos jovens e também na manutenção do potencial osmótico do meio celular (Itai & Birnbaum 1996).

1.7. Carboidratos

Os açúcares solúveis são essenciais ao metabolismo, no desenvolvimento e em muitos processos fisiológicos (Gibson 2000) e metabólicos tais como a fotossíntese e na síntese e degradação de amido em plantas superiores (Koch 1996, Krapp *et al.* 1993). Chu & Figueiredo-Ribeiro (2002) observaram que a utilização de sacarose nas concentrações de 1,5 a 8 % em plantas do gênero *Dioscorea* cultivadas *in vitro*, retardou o desenvolvimento das folhas em relação às plantas que foram cultivadas em ambiente natural, porém estimularam a formação de bulbilhos nos caules.

Segundo Kraus *et al.* (2004), os carboidratos estão envolvidos no processo que antecede a divisão celular, possivelmente servindo como fonte de energia, pois quando cultivaram ápices radiculares isolados de *Catsetum frimbiatum in vitro*, durante 24 a 48 horas, observaram a presença de amiloplastos na região subapical e adjacências, sendo que após 72 horas estas organelas não estavam mais presentes. Léon & Sheen (2003) mostraram que houve uma interação complexa entre açúcares e reguladores vegetais (etileno e ácido abscísico), quando mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. foram cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de açúcares exógenos, onde as raízes apresentaram um desenvolvimento diferenciado e que podem ter sido estimulados por um mesmo sinal em diferentes concentrações de carboidratos.

A sacarose é um componente importante no meio de cultura *in vitro*, servindo como fonte de esqueleto de carbono e energia. Faria *et al.* (2004) cultivando *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sacarose em meio de cultura MS observaram que houve crescimento da parte aérea *in vitro* sem a adição de reguladores de crescimento, porém não estimularam o crescimento de novas raízes adventícias.

White (1934), em seus estudos pioneiros com raízes de tomate, mostrou que a sacarose foi superior a outros tipos de carboidratos no estímulo do crescimento deste órgão. Altos valores na relação de carbono/nitrogênio favorecem o enraizamento, através do balanço das concentrações de carboidratos solúveis como sacarose, frutose e glicose, que conseqüentemente irão atuar na parte aérea (Read 1990). Segundo Van't Hof (1968), os carboidratos possuem papel fundamental no processo de divisão celular no ápice radicular e em seu experimento com *Pisum sativum* L., as células de raízes excisadas não se dividiram até ser adicionada sacarose ao meio de cultura. Arditti (1984) detectou diferentes carboidratos em *P. amabilis*, sendo que os principais foram a xilose, glicose, sacarose, manitol e sorbitol.

Tokuhara & Mii (2001) estabeleceram protocolos para a micropropagação de plantas do gênero *Phalaenopsis*, a partir de gemas das hastes florais, utilizando diferentes fontes de carboidratos como maltose, sorbitol, sacarose, frutose e glicose, estimulando a formação de protocormóides e calos em cultura de células em suspensão.

1.8. Amido

Grande parte do desenvolvimento das células vegetais envolve a degradação do amido, tendo como fonte os carboidratos presentes nas raízes, tubérculos, cotilédones e folhas (Smith *et al.* 2005).

O amido é o composto de reserva em plantas superiores, servindo como fonte de energia para o desenvolvimento inicial da planta e tem como produto de sua hidrólise, a maltose (dissacarídeo) e a glicose (monossacarídeo) que estão presentes tanto nas frações de amilose (solúvel em água) como nas frações de amilopectina (insolúvel em água) (Badenhuizen, 1965).

1.9. Proteína

As proteínas correspondem a aproximadamente 30 % da massa seca total de uma planta típica (Taiz & Zeiger 1998), englobando as estruturas citoesqueléticas (microtúbulos e microfilamentos), as proteínas de reservas principalmente de sementes (globulinas e prolaminas), as enzimas como catalisador biológico e em menor quantidade os peptídeos e os aminoácidos.

A síntese de proteínas ocorre no retículo endoplasmático rugoso (75 % do total), onde o RNA mensageiro permite a correta seqüência de ligações peptídicas de aminoácidos (Sprengli 2000). Os aminoácidos são compostos de esqueleto de carbono (derivado da glicólise, fotossíntese, via pentose ou ciclo do ácido cítrico) e estão associados ao nitrogênio inorgânico (H_3N^+) sendo o glutamato, a glutamina, o aspartato e a asparagina os principais compostos fornecedores do nitrogênio para os demais aminoácidos translocados pelo floema (Coruzzi & Last 2000).

Segundo Peres & Kerbauy (2004), pelo menos 2 proteínas (invertase e transportadora de hexoses) têm participação direta nos drenos, as quais são necessárias para o descarregamento do floema, sendo que a enzima invertase favorece o fornecimento contínuo de carboidratos e, ao mesmo tempo, a hexose é necessária para que os açúcares entrem nas células do tecido dreno.

Altos níveis de proteína podem estar relacionados à grande taxa de divisão mitótica, pois a síntese de novas proteínas acarreta mudanças morfológicas e bioquímicas durante as fases de crescimento e desenvolvimento (Gutmann *et al.* 1996, Silveira *et al.* 2004).

1.10. Enraizamento

A rizogênese ocorre no período de uma a três semanas e pode ser dividida em três etapas: indução, iniciação e alongamento de raízes (Grattapaglia & Machado 1998).

Algumas espécies podem enraizar de forma rápida, outras são lentas ou, também, podem não enraizar *in vivo* (Ford *et al.* 2002), mostrando a importância do estudo bioquímico e fisiológico, quando se trata de indução de raízes adventícias. Em condições de cultura *in vitro*, a fase de enraizamento e posterior desenvolvimento é um dos maiores obstáculos na propagação, podendo-se classificar os explantes em: (a) de fácil enraizamento que ocorre através do tratamento com auxinas, observando-se a desdiferenciação de células e acúmulo de amido em até 24 horas, a indução e a formação de raízes seguindo-se a degradação de amido em 24 a 96 horas e diferenciação, com a visualização de primórdios radiculares após 96 horas; a utilização de reguladores pode ser suspensa na última etapa; e (b) de difícil enraizamento, em que a indução e desenvolvimento ocorrem em um período muito mais extenso (De Klerk 2002).

Novos estudos de indução e desenvolvimento de raízes estão sendo conduzidos, tendo como interesse o acúmulo de compostos secundários nestes órgãos, exsudados que afetam a rizosfera, a fitoremediação de metais tóxicos, micorrizas, interações com outros fungos (Bais *et al.* 2001) e as novas abordagens genéticas no desenvolvimento do sistema radicular em relação aos sítios ativos de auxinas, tendo como base o seqüenciamento do DNA de *Arabidopsis thaliana* (Terasaka *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005), bem como os

aspectos globais, correlacionando a dinâmica das raízes, como aumento de gás carbônico, deposição de nitrogênio e acidificação do solo (Norby & Jackson 2000) e ainda o ciclo de carbono, nas quais as raízes podem ser consideradas reservatórios (Gill & Jackson 2000).

De acordo com Itai & Birnbaum (1996), as raízes produzem hormônios que são translocados para as partes superiores da planta, influenciando a taxa e a natureza do desenvolvimento do sistema caulinar. O aprimoramento da técnica de cultura *in vitro* possibilitou o acesso direto ao tecido radicular e também o controle mais rigoroso das condições de cultivo, abrindo novas perspectivas para o estudo deste órgão. Segundo Torrey (1976), as raízes passaram a despertar interesse dos pesquisadores, não só do ponto de vista morfológico e anatômico, como também fisiológico e ecológico destacando-se: a) as raízes têm uma organização meristemática menos complexa que a do ápice caulinar; b) as raízes produzem hormônios (citocininas, auxinas e ácido abscísico) que são transportados para outras partes da planta e, conseqüentemente, irão influenciar no desenvolvimento destas; c) o ápice radicular possui todos os estágios de diferenciação celular, tornando-se interessante para o estudo no desenvolvimento e crescimento; d) as raízes são órgãos importantes no que se refere à absorção de água e de íons inorgânicos, e na manutenção destes no substrato bem como a interação com fungos; e e) as raízes podem formar gemas como mecanismo de reprodução vegetativa para garantir a sobrevivência da espécie, além de contribuir como reserva de compostos orgânicos e água na família Orchidaceae (Arditti & Ernst 1993, Bais *et al.* 2001).

A indução de sistemas radiculares funcionais *in vitro* é difícil, devido à ausência de pêlos absorventes nesta fase de desenvolvimento ocasionando a morte da planta logo após a transferência *ex vitro*; dessa forma, é necessário que as raízes que serão transplantadas

servam como fonte de energia para produzir novas raízes funcionais na fase de aclimatização (Debergh & Maene 1981).

1.10.1. Enraizamento em Orchidaceae

As raízes das plantas da família Orchidaceae são fasciculadas e não possuem pêlos absorventes, sendo composta por câmbio vascular, córtex e velame (Arditti 1992). A principal característica das raízes de orquídeas epífitas é a presença do velame que em condições *in vivo* e ambiente seco, possuem coloração branca. Em ambiente úmido a coloração se torna esverdeada devido à presença de clorofila, sendo um órgão altamente eficiente na fotossíntese, podendo fixar aproximadamente 73 % de carbono na ausência de estresse hídrico (Winter & Holtum 2002). Kerbauy (1998) destaca que as raízes de orquídeas representam um único sítio ativo de fixação de dióxido de carbono e estes órgãos podem desempenhar outras atividades como propagação vegetativa.

Em plantas do gênero *Phalaenopsis*, o velame é composto por 2 a 3 camadas de células lignificadas. Essas células podem ser tanto longas como curtas, sendo que as primeiras são geralmente células mortas quando atingem a maturidade e as células curtas são vivas. O velame pode servir como órgão de reserva (água e nutrientes) e proteção, principalmente para raízes de orquídeas epífitas, pois estes não possuem a proteção física do solo como as espécies terrestres (Arditti & Ernst 1993).

Segundo Paul & Starosta (1998), as raízes de orquídeas possuem 3 funções: captar água e sais minerais, fixar solidamente a planta ao substrato e fotossíntese pelas raízes, sendo a quantidade de carbono fixado pelas raízes do gênero *Phalaenopsis* é maior do que nas folhas (Avadhani *et al.* 1990). Com relação à fixação de carbono pelas raízes, segundo Tanaka *et al.* (1999) a concentração de CO₂ não interferiu no crescimento de explantes de

híbrido de *Cymbidium* cultivados *in vitro*. Em condições *in vivo*, Li *et al.* (2002) mostraram que as raízes do híbrido de *Oncidium*, após 2 meses de crescimento em ambiente com alta concentração de CO₂, tiveram maior crescimento das raízes em relação às plantas com baixos índices de CO₂. Pindel & Miczynski (1996) trabalhando com fragmentos de folhas e raízes de híbridos de *Cymbidium* cultivados em meio MS após a fase de multiplicação, induziram a formação de raízes nos protocormóides com a utilização de 18 mg L⁻¹ABA.

Segundo Slump (2004), o crescimento das raízes é essencial para o desenvolvimento das orquídeas pois também aumentam a capacidade de absorção de água, nutrientes e associações com fungos.

1.11. Reguladores vegetais no enraizamento

Os hormônios ou reguladores vegetais atuam não só através da alteração de suas concentrações, como também através de mudanças na sensibilidade das células receptoras a estes compostos (Trewavas & Cleland 1983).

Segundo Mercier (2004), a ação das auxinas no alongamento celular depende da afinidade da ligação entre a auxina e a proteína receptora na membrana da célula. A proteína ABP1 (*auxin binding protein1*) é caracterizada como uma proteína receptora que tem alta afinidade com a auxina porém, na membrana plasmática, ela se encontra em menor quantidade. Segundo Napier (2001), a proteína ABP1 está associada à indução de raízes adventícias além do alongamento celular.

Uma outra proteína chamada de RX, ainda não identificada, tem menor afinidade com a auxina e encontra-se em menor quantidade. Neste caso, quando a auxina se encontra

em maior quantidade, há uma ligação entre a proteína receptora RX e auxina que controla a divisão celular (Mercier 2004).

Recentemente, Woodward & Bartel (2005a) trabalhando com *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, encontraram um sítio proteico promotor no próprio DNA. Esta proteína receptora denominada TIR1 (*Transport inhibitor response 1*) esta ligada a fita de DNA que impede o RNA polimerase de se ligar ao sítio de transcrição. Quando a auxina se liga a esta proteína receptora, forma-se um complexo proteína-auxina que se desliga da fita de DNA, possibilitando que a enzima RNA polimerase se ligue ao sítio promotor e desencadeia o processo de formação do RNA mensageiro, seguindo-se a tradução de enzimas e proteínas.

Nos vegetais superiores, os sítios de síntese hormonal não são tão definidos e localizados estruturalmente como nos animais (Trewavas 1981). As auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam a formação de primórdios radiculares (Taiz & Zeiger 1998), sendo predominantemente obtidas em tecidos jovens (Davies 1995) e de forma inversa, as citocininas são produzidas principalmente nas raízes (Itai & Birnbaum 1996), estimulando a iniciação de gemas caulinares (Pillary & Railton 1993).

Segundo Zaidan (1975), o crescimento da raiz, conseqüência do funcionamento do meristema apical, sempre despertou interesse, tanto sob o ponto de vista fisiológico quanto anatômico. Quanto à formação de raízes, é conhecido a observação de que estacas dotadas de folhas e gemas em desenvolvimento formam raízes mais facilmente do que estacas desprovidas de folhas e gemas. A auxina produzida na parte aérea é o principal fator de estímulo à formação de raízes (Vannest *et al.* 2005).

Os reguladores de crescimento na cultura *in vitro* são adicionados para suprir as deficiências dos teores endógenos do próprio explante, estimulando respostas de interesse para diferenciação, crescimento, alongamento e multiplicação celular (Grattapaglia & Machado 1990).

As auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam consistentemente a formação de primórdios radiculares, pelo menos em tecidos que naturalmente apresentam certa predisposição ao enraizamento (Haissig 1972), contudo as respostas às auxinas não são universais (Hartmann & Kester 1983), ou seja, algumas espécies enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo com a utilização deste tipo de regulador.

Segundo Bridges *et al.* (1973), as auxinas presentes nas raízes são de origem caulinar. Outros autores, entretanto, consideram que esta pode ser sintetizada no ápice radicular (Moore 1979). Dore & Williams (1956) verificaram que a alta concentração de auxinas em ápices radiculares de *Armoracea rusticana* inibiu a formação de gemas, todavia, concentrações relativamente baixas deste hormônio foram estimulatórias.

Wardell & Skoog (1969a, 1969b, 1973) verificaram que a utilização exógena de auxinas em altas concentrações *in vitro*, aumentou a formação de gemas em *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin-38. Por outro lado, em baixas concentrações induziu a neoformação de gemas florais.

Uma das auxinas mais utilizadas na indução do enraizamento é o AIB (ácido indolbutírico) (Bachelard & Stowe 1963, Grattapaglia & Machado 1998, Radmann *et al.* 2002), que em associação com outras auxinas podem promover maior número de raízes do que isoladamente (Hartmann & Kester 1983).

Tanaka *et al.* (1976) trabalhando com *P. amabilis* obtiveram poucos protocormóides a partir de fragmentos de raízes de mudas provenientes de semente, sem a adição de reguladores de crescimento. Kerbauy (1984a, b) trabalhando com *Oncidium varicosum* conseguiu regenerar um grande número de plantas a partir de ápices radiculares. O mesmo resultado foi observado em *Catasetum fimbriatum* (Kerbauy 1984b) e *Vanilla planifolia* (Philip & Nainar 1986). Diferentes tipos e concentrações de auxinas em outras espécies de orquídeas promoveram diferentes respostas (Arditti & Ernst 1993).

Radmann *et al.* (2002) observaram que a adição de reguladores de crescimento em porta-enxertos de macieira cultivada *in vitro* apresentou formação de raízes adventícias e maior porcentagem de sobrevivência na fase de aclimatização, indicando que raízes induzidas na fase de cultivo *in vitro* são importantes para o desenvolvimento da planta.

Para regeneração de protocormóides derivados de propagação via semente de *P. amabilis*, Chen & Chang (2004) utilizaram 50 % da concentração de macronutrientes e micronutrientes de MS onde obtiveram 100 % de protocormóides regenerados com a adição de 1,0 mg L⁻¹ de TDZ (Thidiazuron). No entanto, a utilização do mesmo meio com ANA inibiu a formação de protocormóides. A utilização de altas concentrações de AIA (5,0 mg L⁻¹) *in vitro*, inibiu o crescimento e desenvolvimento de *Phalaenopsis* sp. (Arditti 1992).

A utilização de 1,0 mg L⁻¹ ANA e 20 mg L⁻¹ BA formam protocormóides em *Phalaenopsis* sp. (Park *et al.* 2002). Em condições *in vivo* a utilização de ANA na concentração de 0,02 mg L⁻¹ induz a formação de mudas em gemas da haste floral (Arditti & Ernst 1993).

Segundo Arditti & Ernst (1993), diversas respostas foram observadas em plantas de *Phalaenopsis* com aplicação *in vivo* de altas concentrações de AIB (1,0 a 5,0 mg L⁻¹), sendo que Arditti (1992) constatou: a) inibição da haste floral, b) desenvolvimento do óvulo, pois plantas deste gênero produzem poucas sementes, c) quebra da dominância do monopódio, e d) indução de mudas laterais. Em condições *in vitro* pode ocorrer a quebra da dominância do monopódio e indução na formação de mudas laterais.

1.11.1. Auxinas e efeitos herbicidas

As auxinas como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o picloram tem efeito herbicida com respostas similares às altas concentrações de AIA no crescimento da planta. O 2,4-D é usualmente empregado no controle de plantas invasoras de folhas largas e o picloram no controle de pós-colheita devido a sua alta atividade e persistência no solo. Ambos causam epinastia das folhas, expansão radial e alongamento da parte aérea, podendo induzir a formação de calos em cultura *in vitro* (Gianfagna 1988).

O 2,4-D é um herbicida seletivo, induz a morte de dicotiledôneas e de algumas gramíneas descontrolando o seu crescimento, não sendo considerado persistente pois degrada em 10 anos em condições naturais. Em baixas concentrações, estimula a síntese de RNA, de DNA e de proteínas. Com a aplicação contínua leva ao descontrole da divisão celular, do crescimento e ocorre a destruição do tecido vascular com a morte das plantas entre 3 a 5 meses (Tu *et al.* 2001).

O 2,4-D exibe grande atividade auxínica, apresentando menor atividade sobre as gramíneas pois apresentam diferenças nos sítios de ligação do regulador e também induzem a síntese de etileno (Usui 2001).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o 2,4-D induz, *in vitro*, a formação de calos mesmo em baixas concentrações. A utilização de 2,4-D *in vitro* em ação conjunta com TDZ induz a formação de calos (Chen *et al.* 2000). Em condições *in vivo* a utilização de 10 mg L⁻¹ 2,4-D aumenta o comprimento de mudas de *Phalaenopsis* sp., porém inibe o seu desenvolvimento (Arditti & Ernst 1993).

1.12. Luminosidade

As orquídeas podem comportar-se tanto como plantas CAM (em condições de estresse hídrico) ou C₃ (sem estresse hídrico). A mesma luminosidade pode influenciar negativamente na indução das raízes, ocasionando a redução dos teores de AIA endógenos, assim como o acúmulo de fenóis e seus subprodutos que podem inibir o enraizamento (Assis & Teixeira 1998). Segundo Winter & Holtum (2002), 73,3 % da fixação de carbono ocorre durante a fase escura e é comum confundir plantas CAM com plantas C₃. No entanto, elas podem se diferenciar pela quantidade de carbono fixado durante a fase escura, sendo que as plantas CAM fixam 71 a 77 % durante a noite, enquanto que as plantas C₃ fixam apenas 1/3.

As raízes do gênero *Phalaenopsis* são fotossintetizantes e a fixação de carbono é maior do que nas folhas (Avadhani *et al.* 1990). Para o melhor desenvolvimento e a sua propagação, o sistema radicular deve ser o mais amplo possível, com exposição à radiação solar e que nos novos procedimentos de tratos culturais, os vasos são transparentes.

1.13. Aclimatização

A aclimatização é um processo de adaptação de plantas cultivadas *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (Bosa *et al.* 2003). Segundo Naves (2001), este processo tem sido uma das fases mais críticas e são poucos os trabalhos que relatam as dificuldades nesta etapa.

Grattapaglia & Machado (1998) consideram que existem vários fatores que interferem no processo de aclimatização sendo os principais abióticos: luminosidade, nutrientes e umidade relativa.

Cozai & Kitaya (1995) observaram que as condições *in vitro* como umidade relativa, temperatura do ar, alta concentração de CO₂, íons e reguladores de crescimento são alterados quando essas plantas são submetidas a condições de aclimatização, dificultando o seu crescimento, ocorrendo redução na absorção de água e íons pelo sistema radicular.

Os explantes vegetais mantidos *in vitro* absorvem carboidratos e compostos nitrogenados inorgânicos do meio de cultura em que se desenvolve, através da própria raiz ou por difusão nas células em contato com o meio, permitindo obter energia, esqueletos de carbono, nitrogênio e outros íons para o seu desenvolvimento. Na aclimatização, o explante é retirado das condições assépticas e conta somente com os compostos orgânicos acumulados nas partes aérea e radicular, sendo necessário desenvolver novas folhas com o processo fotossintético e estômatos funcionais, novas raízes para fixação e absorção (Hazarica 2003). Segundo Debergii (1991), as plantas em fase de aclimatização utilizam as reservas acumuladas durante o período de cultivo *in vitro* para garantir a sua sobrevivência, durante as alterações morfológicas e fisiológicas em respostas às condições do ambiente de propagação e crescimento.

2. Objetivos

O aumento do número de raízes nas plantas propagadas *in vitro*, é de grande importância econômica e horticultural pois possibilita a sustentação da planta na fase de aclimatização evitando com que as folhas da muda entrem em contato com o substrato. Durante o manejo em casa de vegetação, podem ocorrer perdas por pragas e doenças por tombamento devido a irrigações e pulverizações.

Os tratamentos que possibilitam melhor enraizamento e maior acúmulo de nutrientes (compostos de moléculas de carbono na forma de amido e carboidratos solúveis e moléculas nitrogenadas na forma de proteínas solúveis e peptídeos) permitem maior probabilidade de sobrevivência dos explantes na fase *ex vitro*.

A remobilização dos nutrientes das folhas e das raízes acumuladas na fase *in vitro* possibilitariam a formação *ex vitro* de novas folhas com o processo fotossintético funcional, mecanismos contra perda de água ativos (estômatos, cutícula e tricomas) bem como novas raízes para fixação e sustentação no substrato, e velame fotossintético, tornando um explante autotrófico em um curto período, proporcionando seu melhor desenvolvimento na fase de aclimatização.

O trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes concentrações das auxinas AIB, ANA e 2,4-D na indução, no desenvolvimento e no crescimento de plantas de *P. amabilis* cultivados *in vitro*, avaliando-se os parâmetros biométricos, número, massa fresca e seca de folhas, raízes e brotos e as análises bioquímicas de carboidratos solúveis totais, amido e proteína total solúvel de folhas, raízes e brotos.

3. Material e métodos

O estudo foi desenvolvido no Instituto de Botânica, sendo as análises bioquímicas realizadas no Laboratório da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, o cultivo *in vitro* e as análises biométricas no Laboratório de Cultura de Tecido da Seção de Ornamentais.

3.1. Obtenção das plantas de *Phalaenopsis amabilis*

As plantas de *Phalaenopsis amabilis* (Lineu) Blume utilizadas no estudo, com aproximadamente 360 dias de cultivo *in vitro* (Figura 6), foram obtidas através da sementeira *in vitro* com sementes aptas à inoculação provenientes de cápsulas de plantas matrizes selecionadas e mantidas na coleção do Orquidário Ori de São Paulo (Figura 7). As plantas matrizes foram adquiridas da coleção do Orquidário Habu, onde foram selecionadas através de cruzamentos da espécie *P. amabilis* (Figura 8).



Figura 6. Mudas de *P. amabilis* com aproximadamente 360 dias de cultivo *in vitro*, barra = 3 cm (Ori 2004).



Figura 7. Planta adulta de *P. amabilis* selecionada do Orquidário Ori, barra = 5 cm (Ori 2003).



Figura 8. Planta adulta de *P. amabilis* selecionada no Orquidário Habu, barra = 5cm (Ori 1999).

3.2. Inoculação *in vitro* e condições de cultivo

As plantas com aproximadamente 5,0 cm de altura, 2,0 cm de largura e 2 folhas tiveram as raízes excisadas para uniformização e sua indução com os tratamentos de auxina.

As plantas foram inoculados em meio de cultura MS (Anexo 1) modificado, com 10 % da concentração de macronutrientes, concentrações normais de micronutrientes e

vitaminas, 3 % de sacarose, e 5,0 g L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,8 e acrescido de diferentes concentrações de auxinas.

Com a finalidade de estabelecer o melhor tratamento para o estímulo e emissão de novas raízes das plantas de *P. amabilis*, foram adicionados ao meio MS as auxinas ANA, AIB nas concentrações de 0,2; 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ e 2,4-D nas concentrações de 0,032; 0,160 e 0,800 mg L⁻¹ e os respectivos controles (tratamentos sem adição de reguladores de crescimento).

Foram adicionados 60 mL dos meios de cultura em frascos de vidro transparente, com capacidade de 500 mL, fechados com tampa de polipropileno adaptada com tubete também de polipropileno preenchida de algodão hidrófobo e autoclavados por 20 minutos, a 121 °C e 1,2 atm. Foram inoculadas 5 plantas por frasco em condições assépticas e posteriormente, colocados em sala de crescimento com 25,0 μmol m⁻² s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), temperatura média de 25 °C, fotoperíodo de 12 horas, sendo o intervalo de iluminação das 6h às 18h e incubadas durante 120 dias. As trocas dos meios foram realizadas a cada 30 dias até completar 120 dias de cultivo.

3.3. Coleta do material para as análises biométricas e bioquímicas

3.3.1. Análises biométricas e preparo das amostras

As coletas foram realizadas aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo, onde foram retiradas aleatoriamente 2 frascos, totalizando 10 plantas analisadas por tratamento.

As variáveis biométricas analisadas foram o número, massa fresca e massa seca de raízes, folhas e brotos. Foram considerados como brotos, as massas celulares compactas de coloração esverdeada que surgiram na fase de indução no início do experimento, com

estruturas semelhantes à gemas. As plantas foram pesadas em balança analítica para determinação da massa fresca de cada órgão considerado. Em seguida, cada material foi congelado a uma temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizado, obtendo-se as respectivas massas secas, expressas em gramas.

O material seco de cada planta foi reunido nos respectivos tratamentos, triturado em micromoinho com peneira de malha 0,2 mm e dividido em 3 amostras de 100 mg para realização das extrações e análises bioquímicas.

3.3.2. Extração e determinação dos teores de carboidratos solúveis totais

As extrações para as análises bioquímicas dos períodos de 30 e 120 dias foram realizados nos mesmos indivíduos utilizados nas análises biométricas.

A partir de cada amostra liofilizada e triturada (100 mg de massa), foi realizada 3 extrações com 5 ml de solução de etanol (80 %), homogeneizados durante 10 minutos em cada extração. A seguir foram centrifugados a 1000 g durante 10 minutos em temperatura ambiente, obtendo-se o extrato sobrenadante e o resíduo da extração, sendo estes acrescidos aos respectivos sobrenadantes e o seu volume medido.

Os carboidratos solúveis totais foram determinados, em triplicata, utilizando o método do ácido fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956) e a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm, os valores foram expressos em teores de carboidratos solúveis (mg carboidrato por grama de massa seca), tendo como padrão D-glucose (curva padrão: $y = 0,0185x - 0,0273$; $R^2 = 0,9968$).

3.3.3. Extração e determinação de proteína solúvel total

Ao resíduo resultante da extração etanólica foi adicionado 5 mL de tampão fosfato 0,2 M e pH 6,7, homogeneizado por 10 minutos e centrifugado a 1000 g a temperatura ambiente, com 3 repetições da extração, obtendo-se os sobrenadantes e o resíduo. Os sobrenadantes foram reunidos e o volume final mensurado.

A determinação dos teores de proteína solúvel total foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando o corante Coomassie Blue R e tendo como padrão albumina bovina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm e o teor de proteína solúvel total foi expresso em mg de proteína por grama de massa seca (curva padrão: $y = 0,0095x + 0,0191$; $R^2 = 0,9802$).

3.3.4. Extração e determinação do teor de amido

O resíduo resultante das extrações foi utilizado para extração de amido, adicionado-se 5,0 mL de ácido perclórico 52 %, homogeneizado a 4 °C por 15 minutos com agitação periódica e centrifugado a 1000 g, na temperatura ambiente durante 10 minutos, totalizando duas extrações.

Os sobrenadantes foram reunidos e mensurados, obtendo-se o extrato de amido e o resíduo descartado. Para a análise de amido foi utilizado como padrão D-glucose (McCready *et al.* 1950) multiplicado pelo fator de correção 0,9 (estimativa padrão para amido vegetal). O teor de amido foi expresso em (mg de amido g⁻¹ de massa seca), utilizando-se a curva padrão de D-glucose.

3.4. Análises estatísticas

O espaço amostral do experimento foi de 720 plantas de *P. amabilis* com aproximadamente 360 dias de cultivo *in vitro*, divididos em 3 tratamentos de auxinas (AIB, ANA e 2,4-D) nas diferentes concentrações descritas anteriormente.

As comparações das médias biométricas obtidas nos tratamentos de AIB, ANA e 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias foram analisadas por ANOVA através do programa estatístico SANEST (Zonta & Machado 1991). Foram realizadas as análises de variância de regressões polinomiais de primeiro e segundo grau, sendo que as significâncias estão dispostas nas figuras de cada tratamento e teste TUKEY com nível de significância de 5 %.

As comparações das médias bioquímicas quantitativas de carboidratos solúveis, amido e proteína solúvel total das folhas, raízes e brotos foram realizadas aos 30 e 120 dias. As médias foram comparadas ao nível de significância 5 % utilizando o teste TUKEY.

4. Resultados

4.1. Análises biométricas

As análises biométricas foram realizadas utilizando-se como parâmetros número, massa fresca e seca de folhas, raízes e brotos nas diferentes concentrações de auxinas aos 30, 60, 90 e 120 dias. As figuras dos anexos 2, 3 e 4 mostram aspectos gerais das plantas nos diferentes períodos de cada tratamento.

4.1.1. Efeito do AIB no número de folhas e raízes

A figura 9 mostra a resposta dos explantes de *P. amabilis*, quando submetidos aos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB e analisadas aos 30, 60, 90 e 120 dias, tendo como variável o número de folhas.

O teste TUKEY 5% (Anexo 5) mostra que as médias do número de folhas não foram significativas para o fator tratamento, porém foram significativas para o fator tempo (P 99,9%) e apresentou interação entre os fatores tempo e tratamento (P 99,9%). Aos 30 dias e 60 dias todos os tratamentos foram estatisticamente iguais ao controle. Aos 90 dias os maiores valores ocorreram no controle e na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de AIB, valor intermediário com 0,2 mg L⁻¹ de AIB e menor valor para 5,0 mg L⁻¹ de AIB. Aos 120 dias o maior valor para o número de folhas ocorreu na maior concentração (5,0 mg L⁻¹ de AIB), valores intermediários foram obtidos no controle e em 0,2 mg L⁻¹ de AIB e menor valor para o tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de AIB.

A análise de regressão (figura 9 A - texto) mostrou que todos os tratamentos foram significativos, variando segundo uma regressão linear, com decréscimo do número de folhas com o aumento do período de cultivo, com exceção do tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de AIB que variou segundo a equação do 2º grau e observou-se que houve perda de folhas entre 30 e 60 dias e aumento de folhas entre 90 e 120 dias.

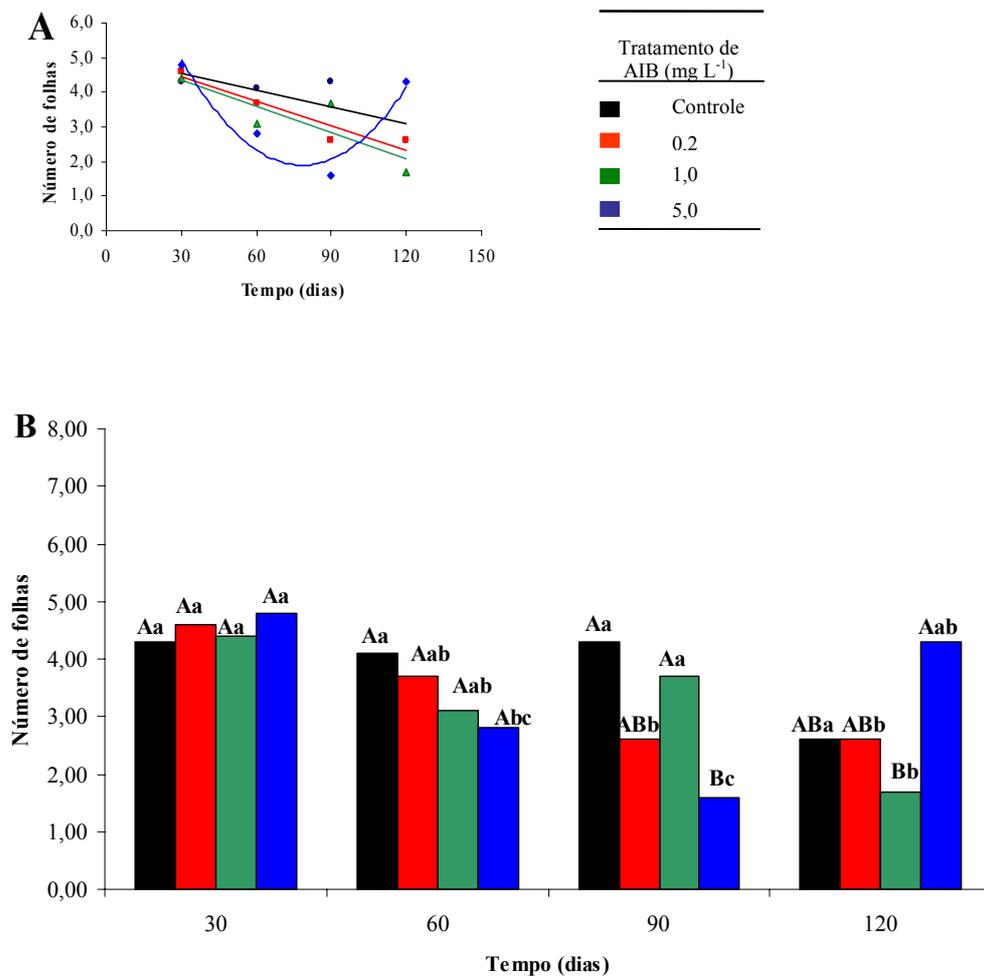


Figura 9. Número de folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $_{0,0 \text{ mg L}^{-1}} y = -0,016x + 5,05$ e $R^2 = 0,59^*$; AIB $_{0,2 \text{ mg L}^{-1}} y = -0,024x + 5,15$ e $R^2 = 0,89^{**}$; AIB $_{1,0 \text{ mg L}^{-1}} y = -0,025x + 5,10$ e $R^2 = 0,71^{***}$; AIB $_{5,0 \text{ mg L}^{-1}} y = 0,0013x^2 - 0,20x + 9,92$ e $R^2 = 0,92^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY $_5\%$ mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.

A figura 10 mostra a resposta dos explantes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB, nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias, tendo como variável o número de raízes. O teste TUKEY 5% (ANEXO 5) mostra que as médias para o número de raízes foram significativas para o fator tempo (P 99,9 %), o fator tratamento (P 99,0 %) e mostrou interação entre os dois fatores (P 99,9 %). O número de raízes foi estatisticamente igual entre os tratamentos dentro dos períodos de 30 dias, 60 e 90 dias e apresentaram diferença significativa aos 120 dias com maior número de raízes no controle e na concentração de 0,2 mg L⁻¹ de AIB e menores valores significativos para 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB (figura 10 B).

A análise de regressão mostra que as médias dos pontos se ajustam às retas no controle e no tratamento com 0,2 mg L⁻¹ de AIB e também se ajustam à curva do tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de AIB, no entanto, não foram significativos para o tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de AIB (figura 10 A - texto). Observa-se um aumento no número de raízes com o tempo para o controle e 0,2 mg L⁻¹. Para o tratamento com 5,0 mg L⁻¹, um aumento de até 60 dias e posterior redução de 60 até 120 dias.

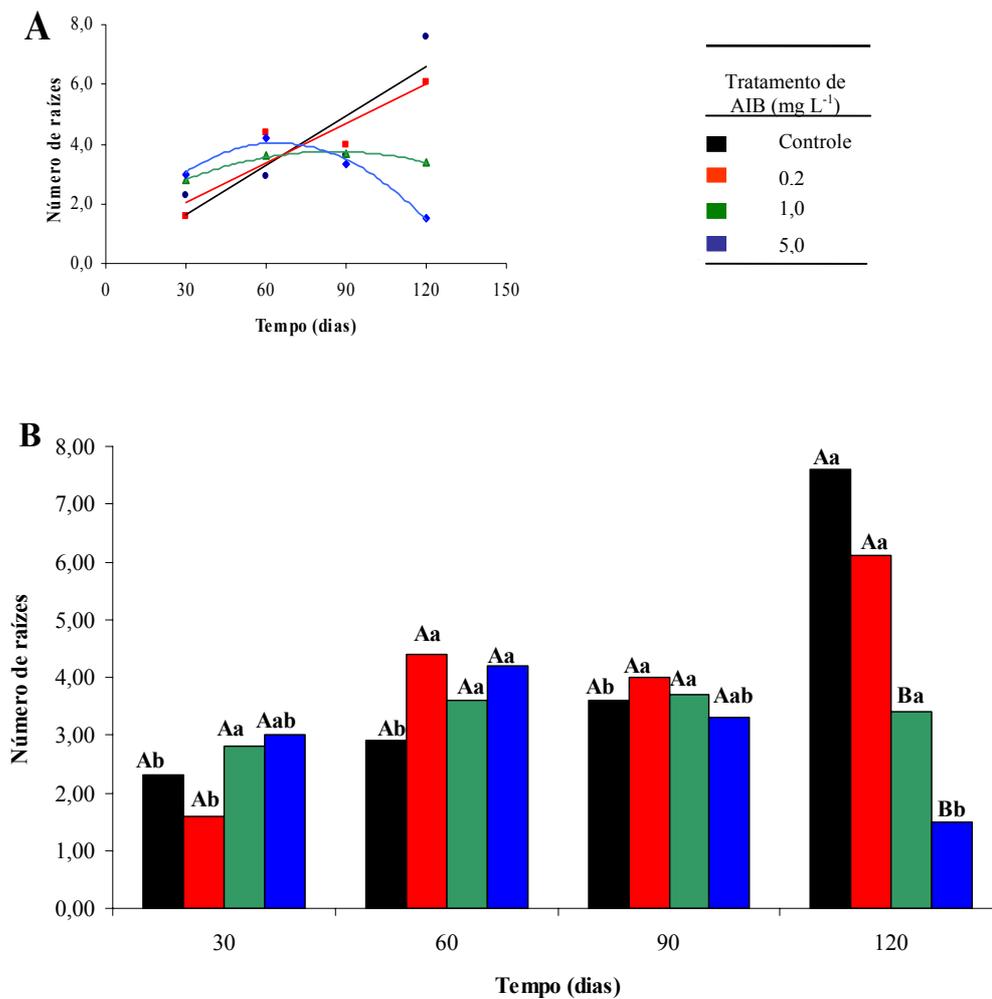


Figura 10. Número de raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $_{0,0 \text{ mg L}^{-1}} y = 0,05x - 0,05$ e $R^2 = 0,80^{***}$; AIB $_{0,2 \text{ mg L}^{-1}} y = 0,04x + 0,75$ e $R^2 = 0,83^{***}$; AIB $_{1,0 \text{ mg L}^{-1}} y = -0,0003x^2 + 0,05x + 1,52$ e $R^2 = 0,99^{ns}$; AIB $_{5,0 \text{ mg L}^{-1}} y = -0,0008x^2 + 0,107x + 0,6$ e $R^2 = 0,981^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, * = significativo a 95 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.

4.1.2. Efeito do AIB na massa fresca de folhas e raízes

A figura 11 mostra a média dos valores de massa fresca das folhas no período de 30 aos 120 dias dos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB, cujas médias foram comparadas pelo teste TUKEY 5% e de análise de variância da regressão das médias ao longo do tempo.

A comparação das médias pelo teste TUKEY 5% (Anexo 5) mostra que houve diferença significativa no fator tempo (P 95%) e no fator tratamento (P 95%). Mostrou também interação entre o tempo e tratamento (P 99%).

A figura 11 B mostra que as médias da massa fresca das folhas no controle foram estatisticamente iguais dos 30 aos 120 dias. O mesmo comportamento foi observado no tratamento com 0,2 mg L⁻¹ de AIB. O tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de AIB obteve maior valor aos 30 dias, valores intermediários aos 60 e 90 dias e menores valores de massa fresca das folhas aos 120 dias. O tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de AIB mostrou o maior valor para a massa fresca das folhas aos 30 dias e menores valores nos períodos seguintes. As médias foram estatisticamente iguais entre os tratamentos aos 30 dias e aos 60 dias, exceto para 5,0 mg L⁻¹. Aos 90 dias o maior valor ocorreu no controle, valores intermediários na concentração de 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB e menor valor para o tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de AIB.

A análise de regressão (figura 11 A - texto) mostrou-se significativo para as concentrações de 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB sendo que o tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de AIB reduziu a massa fresca das folhas dos 30 aos 120 dias. A concentração de 5,0 mg L⁻¹ de AIB teve efeito inibitório dos 30 aos 90 dias com aumento da massa fresca das folhas após este período.

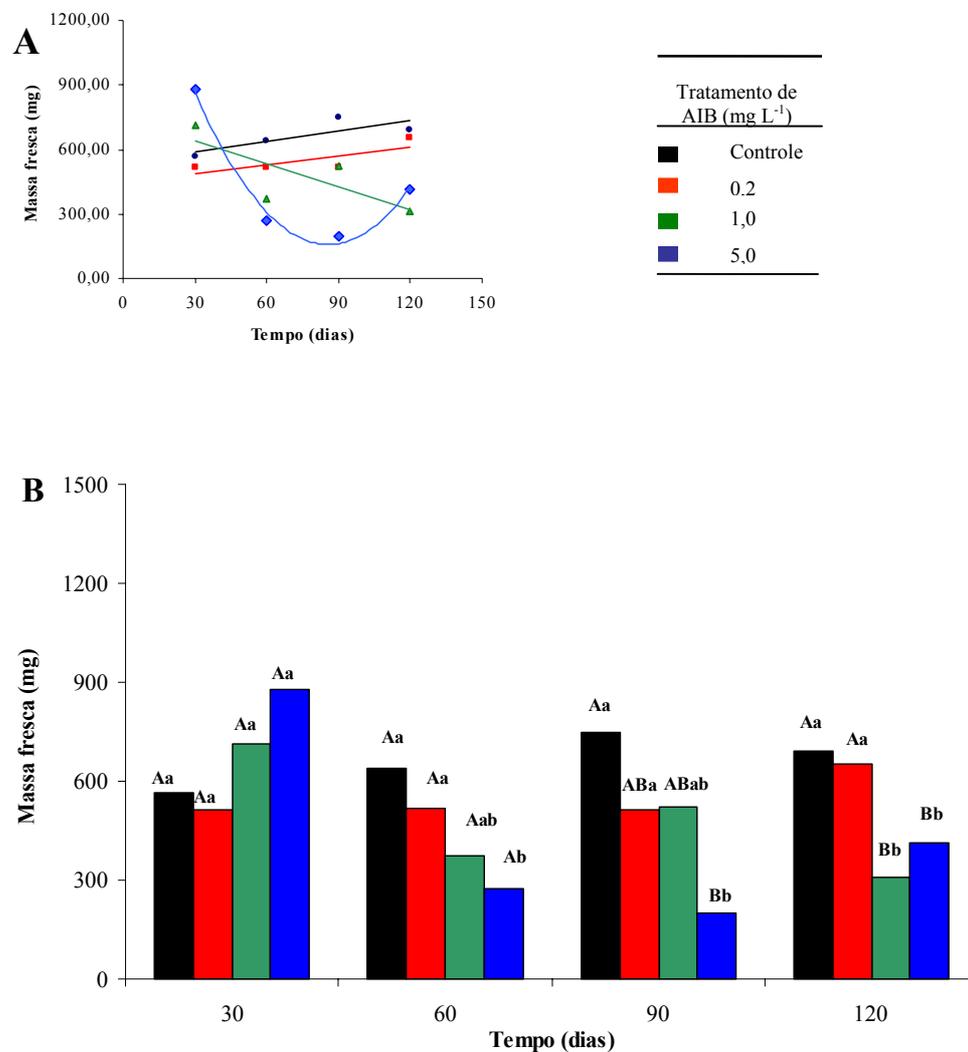


Figura 11. Massa fresca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $y = 1,61x + 539,69$ e $R^2 = 0,63^{ns}$; AIB $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ $y = 1,36x + 447,06$ e $R^2 = 0,60^{ns}$; AIB $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ $y = -3,54x + 745,7$ e $R^2 = 0,58^*$; AIB $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ $y = 0,22x^2 - 39,00x + 1830$ e $R^2 = 0,98^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY $\alpha = 5\%$ mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ns = não significativo, * = significativo a 95 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.

A figura 12 mostra os valores de massa fresca das raízes no período de 30 aos 120 dias dos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB. As médias foram comparadas através do teste TUKEY 5% (figura 12 - legenda) mostrou que a média para a massa fresca das raízes não foi significativa para o fator tratamento, porém foi significativo para o fator tempo (P 99,9%) e não mostrou interação entre os dois fatores.

A maior média para a massa fresca das raízes ocorreu aos 120 dias, valores intermediários aos 60 e 90 dias e valores menores aos 30 dias (figura 12 B).

A análise de regressão mostrou que todas as médias não foram significativas ao longo do tempo (figura 12 A - texto).

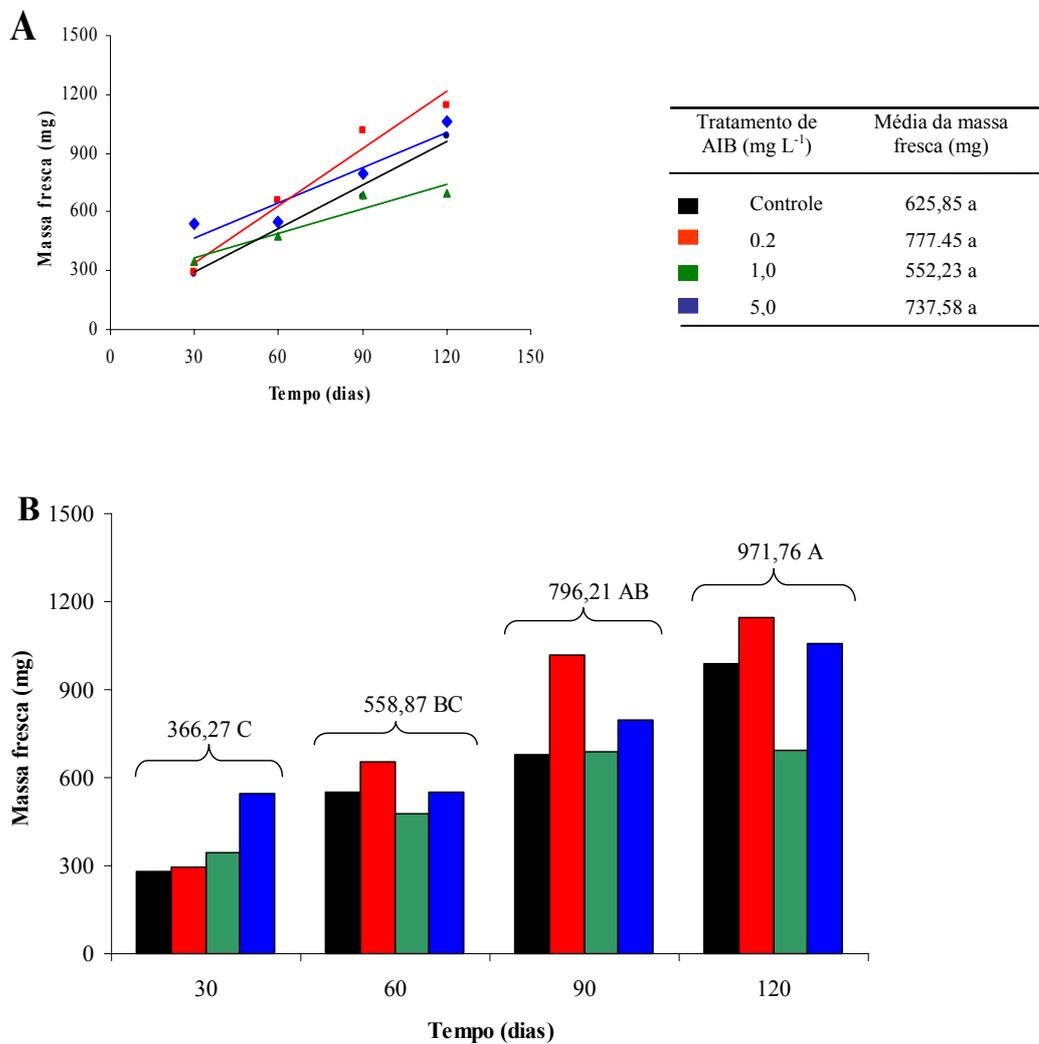


Figura 12. Massa fresca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $y = 7,50x + 63,26$ e $R^2 = 0,98^{ns}$; AIB $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ $y = 9,72x + 48,20$ e $R^2 = 0,96^{ns}$; AIB $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ $y = 4,18x + 238,39$ e $R^2 = 0,90^{ns}$; AIB $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ $y = 5,97x + 289,43$ e $R^2 = 0,89^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.

4.1.3. Efeito do AIB na massa seca de folhas e raízes

A figura 13 apresenta o gráfico com as regressões lineares dos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB, mostrando os valores da massa seca das folhas aos 30, 60, 90 e 120 dias.

O teste TUKEY 5 % (figura 13 B - legenda) mostra que a massa seca das folhas não foi significativa para os fatores tempo e tratamento. Não houve interação entre o fator tempo e tratamento.

A análise de regressão mostrou que todas as médias dos pontos dos tratamentos não foram significativos ao longo do tempo (figura 13 A - texto).

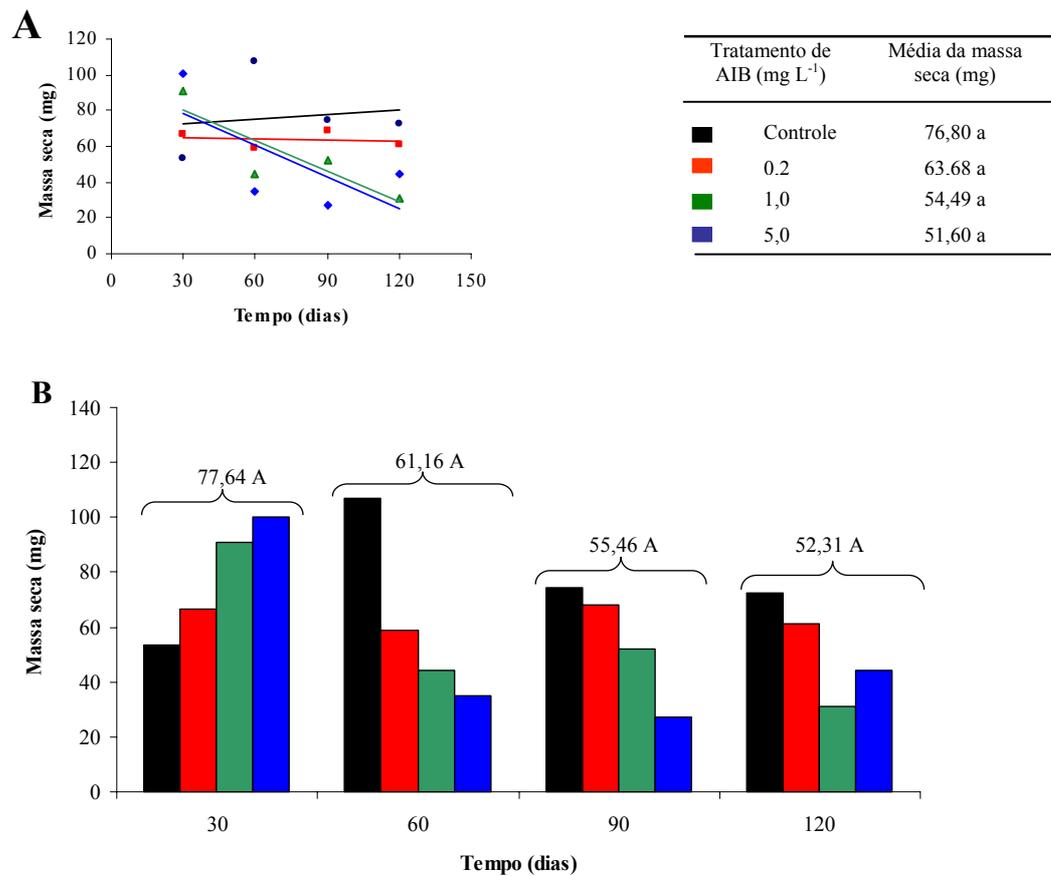


Figura 13. Massa seca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $0,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,08x + 70,41$ e $R^2 = 0,02^{ns}$; AIB $0,2 \text{ mg L}^{-1} y = -0,01x + 64,96$ e $R^2 = 0,02^{ns}$; AIB $1,0 \text{ mg L}^{-1} y = -0,57x + 97,32$ e $R^2 = 0,74^{ns}$; AIB $5,0 \text{ mg L}^{-1} y = -0,58x + 95,56$ e $R^2 = 0,47^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.

A figura 14 mostra a resposta dos explantes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB, nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias, tendo como parâmetro a massa seca das raízes.

O teste TUKEY 5 % (Anexo 5) mostra que as médias para a massa seca das raízes não foram significativas para o fator tratamento, no entanto, foram significativas para o fator tempo (P 99 %) e não mostrou interação entre os dois fatores. Os resultados mostram que as raízes desenvolveram mais aos 120 dias, sendo que os valores intermediários foram obtidos aos 60 e 90 dias e os valores menores aos 30 dias (figura 14 B).

A análise de regressão mostrou que todas as médias dos pontos dos tratamentos não foram significativos ao longo do tempo (figura 14 A - texto).

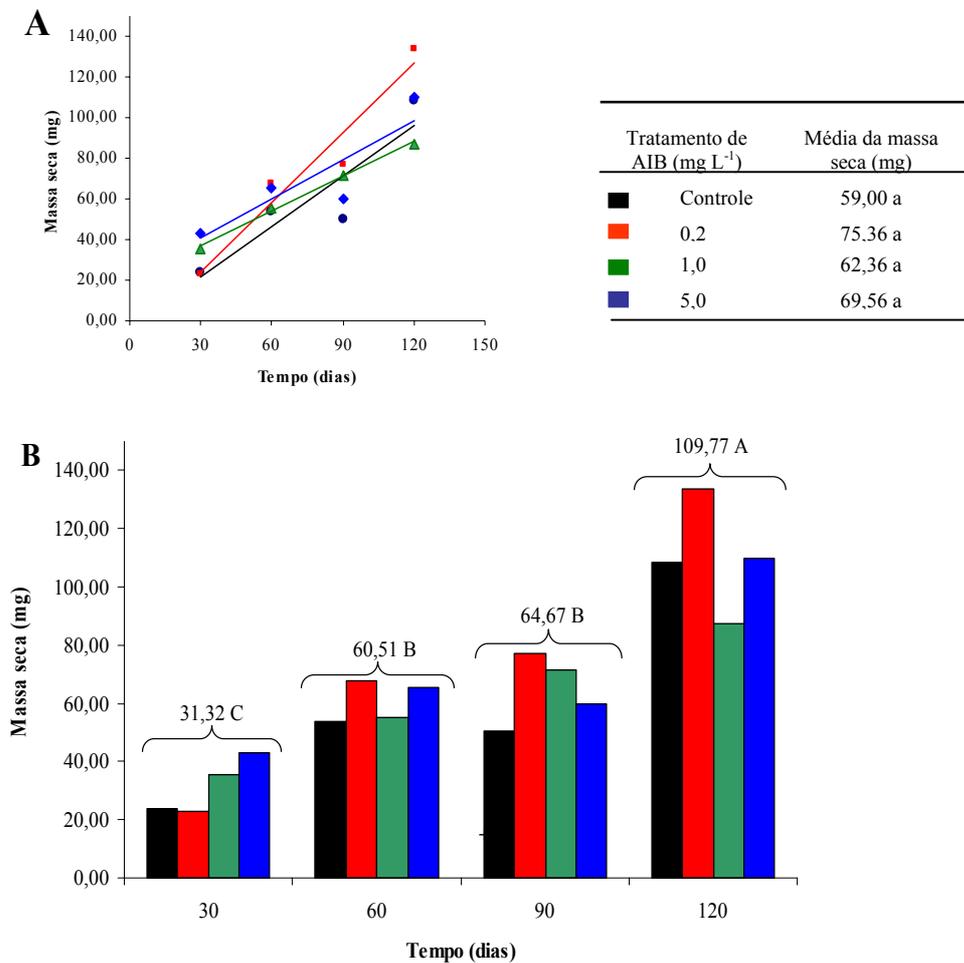


Figura 14. Massa seca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $0,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,83x - 3,51$ e $R^2 = 0,83^{ns}$; AIB $0,2 \text{ mg L}^{-1} y = 1,14x - 10,18$ e $R^2 = 0,94^{ns}$; AIB $1,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,57x + 19,45$ e $R^2 = 0,99^{ns}$; AIB $5,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,647x + 21,03$ e $R^2 = 0,77^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.

4.1.4. Efeito do ANA no número de folhas, raízes e brotos

A figura 15 mostra os valores da variável número de folhas no período compreendido entre 30 a 120 dias, cujos tratamentos variaram nas concentrações 0,0, 0,2, 1,0 e 5 mg L⁻¹ de ANA. A comparação das médias, através do teste TUKEY 5% (Anexo 6), mostra que para o fator tempo e para o fator tratamento os valores médios do número de folhas foram significativos (P 99,9%) e houve interação significativa entre o fator tempo e tratamento (P 99,0%). As médias do controle e das concentrações de 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA foram estatisticamente iguais e superiores comparados ao tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA, que apresentou perda de folhas dos 60 aos 90 dias e que aos 120 dias observou-se a formação de novas folhas (figura 15 B). As menores médias para o número de folhas ocorreram no período de 60 e 90 dias, valores intermediários aos 30 dias e maiores valores aos 120 dias (figura 15 B).

A análise de regressão (figura 15 A - texto) mostrou os mesmos resultados observados pela análise do teste TUKEY 5% onde todos os tratamentos foram significativos e alcançaram o maior número de folhas ao 120 dias, exceto o tratamento com a concentração 5,0 mg L⁻¹ de ANA que apresentou uma inibição na formação de folhas entre 30 e 90 dias.

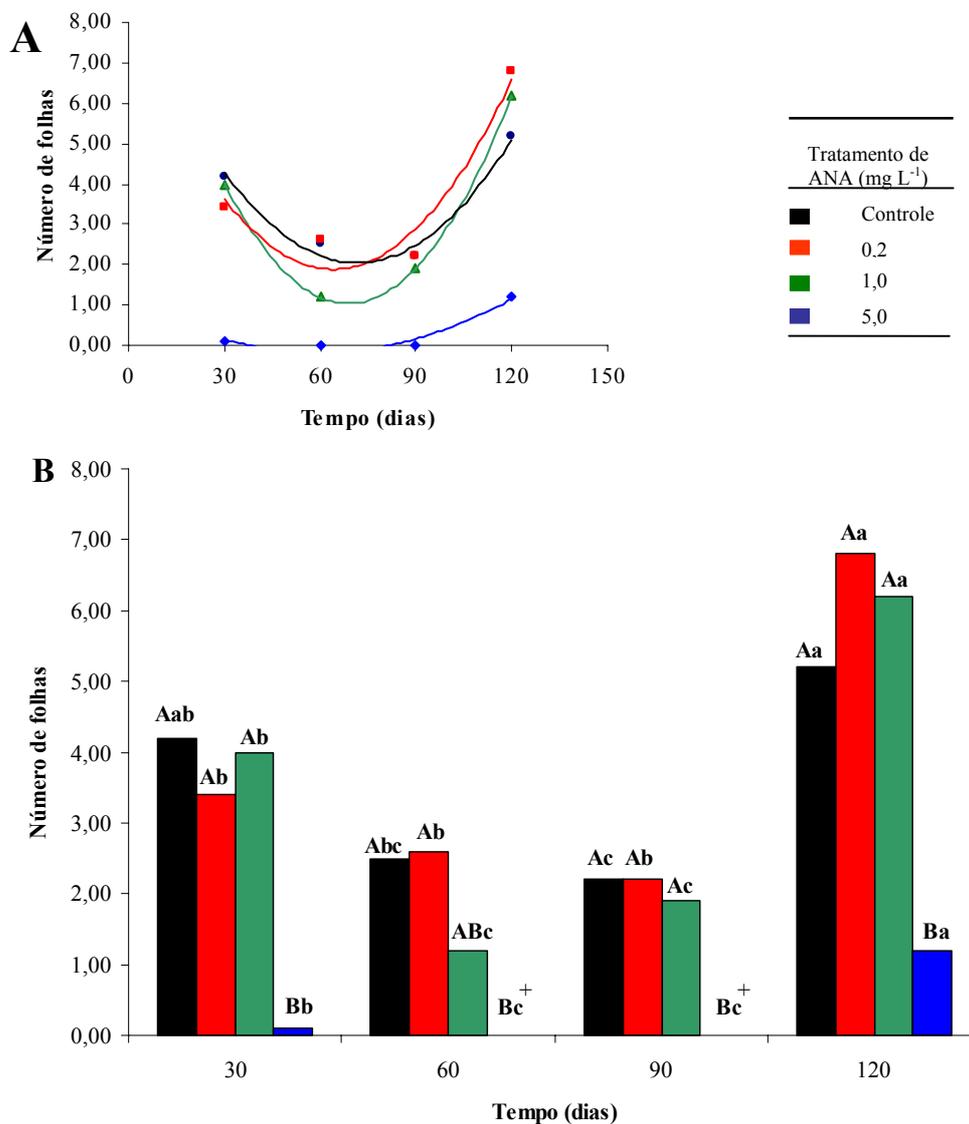


Figura 15. Número de folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $0,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,0013x^2 - 0,18x + 8,72$ e $R^2 = 0,97^{***}$; ANA $0,2 \text{ mg L}^{-1} y = 0,0015x^2 - 0,19x + 8,05$ e $R^2 = 0,92^{***}$; ANA $1,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,002x^2 - 0,27x + 10,38$ e $R^2 = 1^{***}$; ANA $5,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,0004x^2 - 0,0432x + 1,12$ e $R^2 = 0,94^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 16 mostra os valores da variável número de raízes dos 30 aos 120 dias dos explantes tratados nas concentrações 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA. O teste TUKEY 5 % (Anexo 6) mostra que as médias foram significativas para o fator tempo (P 99,9 %), o fator tratamento (P 99,9 %) porém não houve interação significativa entre o fator tempo e o fator tratamento. Observando apenas o fator tempo (figura 16 B), as médias foram maiores e estatisticamente iguais aos 60 e 90 dias sendo que aos 30 e 120 dias foram menores e estatisticamente iguais. As médias entre o controle e os tratamentos nas concentrações de 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA foram maiores e estatisticamente iguais quando comparado com o tratamento de 5,0 mg L⁻¹ de ANA (figura 16 - legenda).

A análise de regressão indicou que as médias dos pontos não foram significativos no ajuste de curvas em todos os tratamentos de ANA para o número de raízes (figura 16 A - texto).

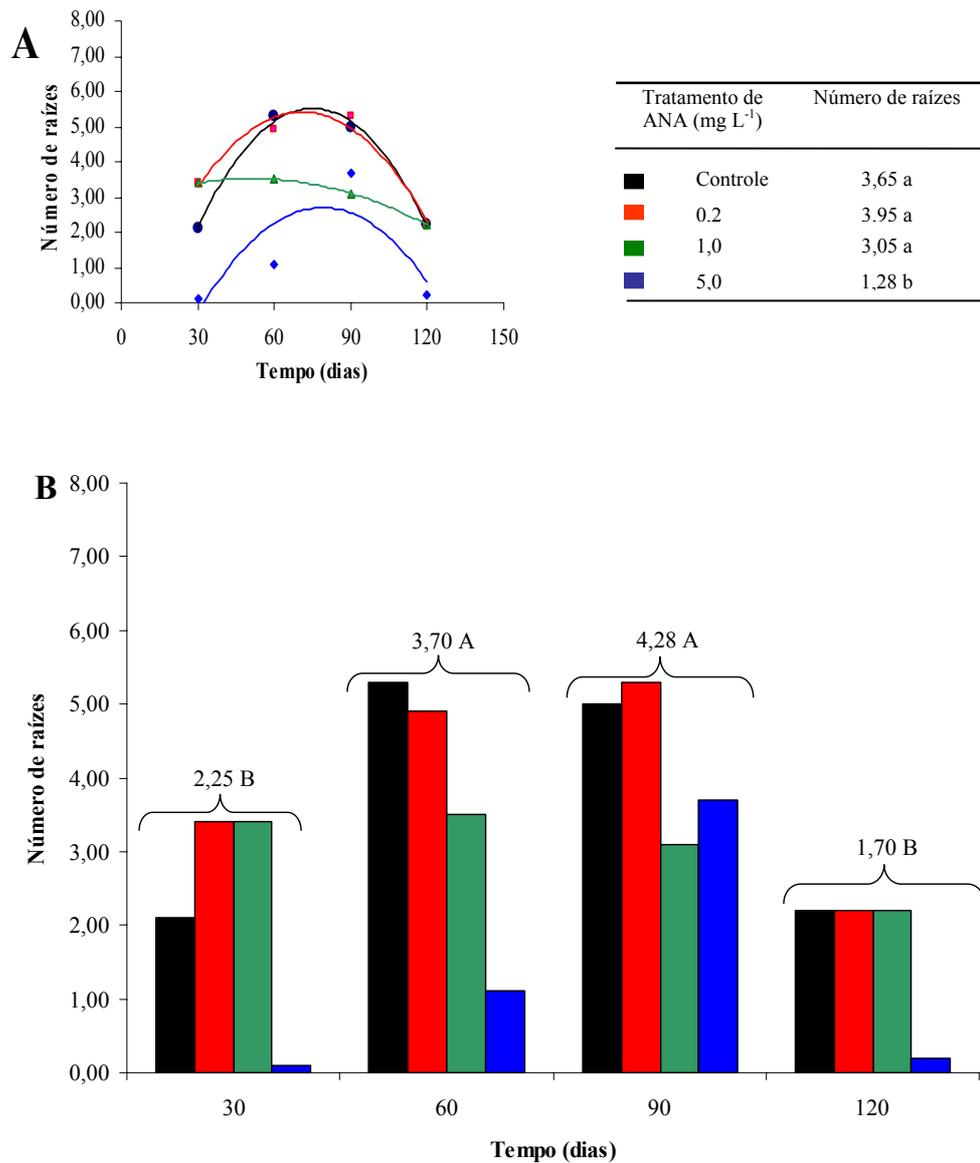


Figura 16. Número de raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = -0,0017x^2 + 0,25x - 3,85$ e $R^2 = 0,99^{ns}$; ANA 0,2 mg L⁻¹ $y = -0,0013x^2 + 0,18x - 1$ e $R^2 = 0,95^{ns}$; ANA 1,0 mg L⁻¹ $y = -0,0003x^2 + 0,03x + 2,80$ e $R^2 = 1,00^{ns}$; ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = -0,0013x^2 + 0,19x - 5,10$ e $R^2 = 0,65^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.

A figura 17 mostra o número de brotos que se formou apenas na concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA aos 60 e aos 90 dias, sendo que após este período houve redução no número de brotos. A análise estatística pelo teste TUKEY 5% (Anexo 6) apresentou resultados significativos para o fator tempo ($P_{99,9 \%$), fator tratamento ($P_{99,9 \%$) e mostrou interação entre os fatores ($P_{99,9 \%$). A análise de regressão mostra que os pontos das médias do número de brotos são significativos e que se ajustam na curva (figura 17 A - texto).

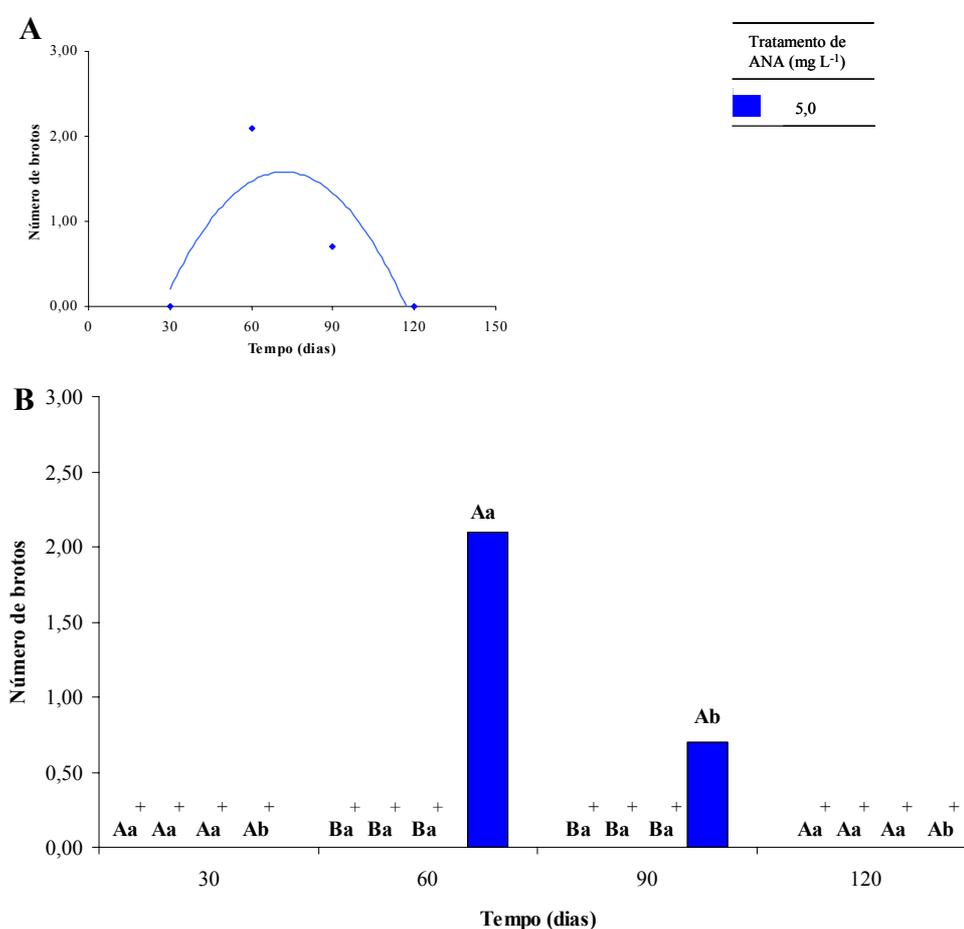


Figura 17. Número de brotos de *P. amabilis* no tratamento com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA no período de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressão: $\text{ANA}_{5,0 \text{ mg L}^{-1}} y = -0,0051x^2 + 0,46x + 15,72$ e $R^2 = 0,74^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos, *** = Significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

4.1.5. Efeito do ANA na massa fresca de folhas, raízes e dos brotos

A figura 18 mostra os valores da massa fresca das folhas no intervalo compreendido entre 30 a 120 dias dos tratamentos variando entre 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA. O teste TUKEY 5 % (Anexo 6) mostra que o fator tempo não foi significativo e não houve interação entre o fator tempo e o fator tratamento. Apenas o fator tratamento foi significativo (P 99,9 %). A comparação dos tratamentos através do teste de TUKEY 5 % permitiu inferir que a maior média da massa fresca de folhas foi encontrada no controle e na concentração de 0,2 mg L⁻¹ de ANA, seguindo-se do tratamento de 1,0 mg L⁻¹ e significativamente menor no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA (figura 18 - legenda).

A análise de regressão mostrou que todas as regressões foram significativas, exceto no tratamento com 0,2 mg L⁻¹ de ANA, que não mostrou tendência significativa (figura 18 - texto). Pela análise de regressão do controle e do tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de ANA pode-se observar que houve redução da massa fresca das folhas dos 30 aos 60 dias sendo que após este período, entre 90 e 120 dias, a massa fresca das folhas cresceu nos dois tratamentos (figura 18 A - texto). O tratamento com 5,0 mg L⁻¹ apresentou uma redução da massa fresca das folhas aos 30 dias, perda total entre 60 e 90 dias e pequeno acréscimo aos 120 dias de tratamento (figura 18 A - texto).

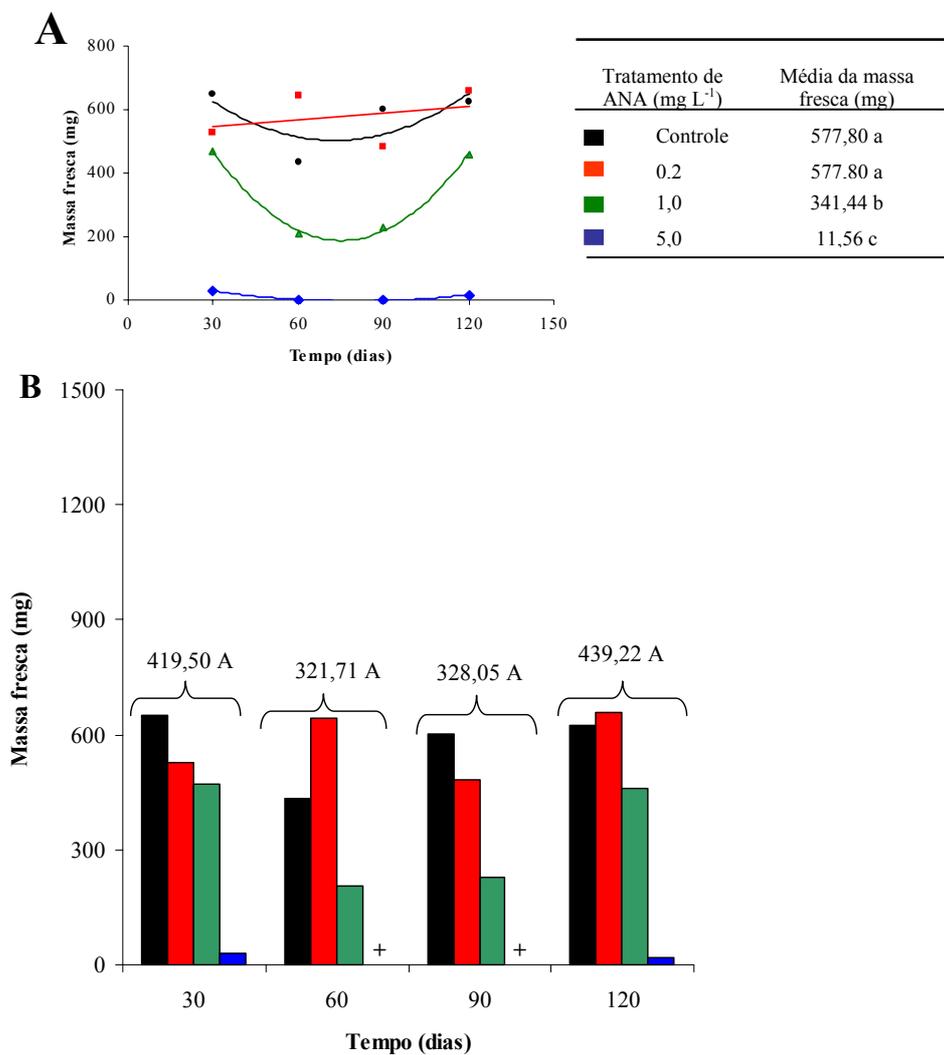


Figura 18. Massa fresca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $_{0,0 \text{ mg L}^{-1}} y = 0,06x^2 - 9,70x + 855,57$ e $R^2 = 0,51^*$; ANA $_{0,2 \text{ mg L}^{-1}} y = 0,75x + 521,40$ e $R^2 = 0,11^{ns}$; ANA $_{1,0 \text{ mg L}^{-1}} y = 0,13x^2 - 20,57x + 960,70$ e $R^2 = 0,99^*$; ANA $_{5,0 \text{ mg L}^{-1}} y = 0,01x^2 - 2,05x + 78,50$ e $R^2 = 0,98^{**}$; (B) as análises estatísticas pelo teste TUKEY $_{5\%}$ mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 19 mostra os valores referentes à massa fresca das raízes no período entre 30 e 120 dias dos tratamentos com ANA nas concentrações de 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹. A comparação entre as médias, através do teste de TUKEY 5 % (Anexo 6) mostra que a massa fresca das raízes foi significativa para o fato tempo (P 99,9 %) e o fator tratamento (P 99,9 %), no entanto, não houve interação significativa entre os dois fatores. Considerando apenas as médias de cada tempo, os menores valores médios significativos foram alcançados aos 30 dias, valores intermediários aos 60 dias e superiores aos 90 e 120 dias da massa fresca das raízes (figura 19 B). Comparando as médias entre os períodos de análise, o maior valor significativo para a massa fresca de raízes foi observado na concentração de 0,2 mg L⁻¹ de ANA, valores intermediários no controle e na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA e o menor valor para o tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA (figura 19 - legenda).

As análises de regressão mostraram que a massa fresca das raízes cresceu significativamente no controle e na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA e os tratamentos nas concentrações 0,2 e 5,0 mg L⁻¹ variaram com o tempo, alcançando os maiores valores entre 60 e 90 dias (figura 19 B – texto).

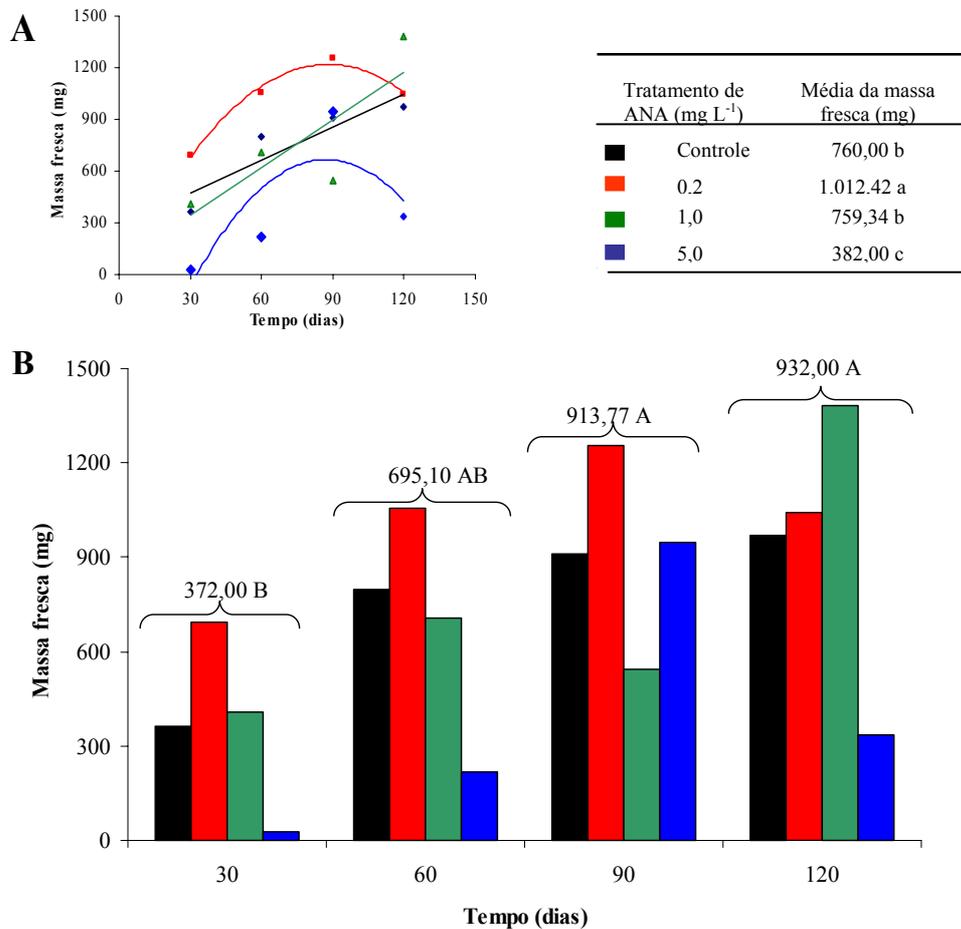


Figura 19. Massa fresca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $0,0 \text{ mg L}^{-1} y = 6,43x + 276,92$ e $R^2 = 0,83^*$; ANA $0,2 \text{ mg L}^{-1} y = -0,16x^2 + 28,23x - 22,85$ e $R^2 = 0,98^*$; ANA $1,0 \text{ mg L}^{-1} y = 9,20x + 69,08$ e $R^2 = 0,68^{**}$ e ANA $5,0 \text{ mg L}^{-1} y = -0,22x^2 + 38,91x - 1033,10$ e $R^2 = 0,63^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 %, ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.

A figura 20 mostra o efeito de diferentes concentrações de ANA na variável massa fresca de brotos em plantas de *P. amabilis*. A formação de brotos ocorreu apenas no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA.

O teste de TUKEY 5% (Anexo 6) mostra que as médias para a massa fresca de brotos foram significativas com relação ao fator tempo (P 99,9 %) e ao fator tratamento (P 99,9 %) e mostrou interação entre os dois fatores (P 99,9 %). A massa fresca dos brotos dos 60 aos 90 dias foi maior em relação aos 30 e 120 dias sendo que aos 120 dias o efeito foi deletério (figura 20 B). No tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA a maior média da massa fresca dos brotos ocorreu aos 60 dias sendo que a partir dos 90 dias, reduziu (figura 20 B).

A análise de variância da regressão (figura 20 - texto) mostrou as médias da massa fresca dos brotos foram significativos e que os pontos das médias da massa fresca dos brotos de cada tempo se ajustam na curva de regressão (figura 20 A).

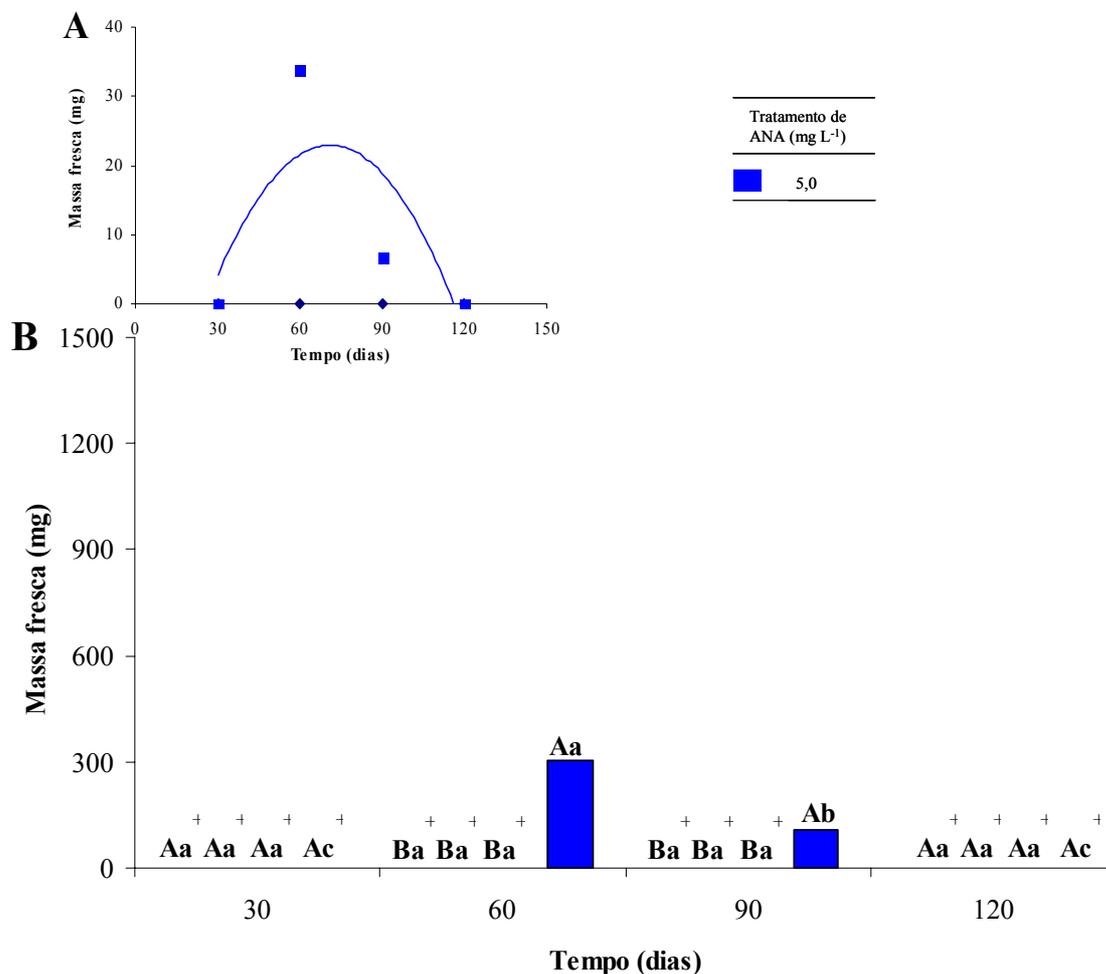


Figura 20. Massa fresca dos brotos de *P. amabilis* no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = -0,11x^2 + 16,45x - 361,30$ e $R^2 = 0,72^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos; *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

4.1.6. Efeito do ANA na massa seca de folhas, raízes e brotos

A figura 21 mostra os valores médios da massa seca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA. As análises estatísticas pelo teste TUKEY 5% (Anexo 6) foram significativas para o fator tempo (P 99%), o fator tratamento (P 99,9%) porém a interação entre o fator tempo e o fator tratamento não foi significativa. A análise somente do fator tempo apresentou o maior valor aos 30 dias, valores intermediários aos 60 e 120 dias e menor valor aos 90 dias (figura 21 B). O fator tratamento apresentou o controle e a concentração de 0,2 mg L⁻¹ de ANA com maior massa seca sendo que os tratamentos com 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ foram menores (figura 21 B - legenda). O tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA foi inibitório para as folhas dos 30 aos 90 dias com ganho de massa seca das folhas aos 120 dias.

A análise de regressão não foi significativa para todos os tratamentos (figura 21 A - texto).

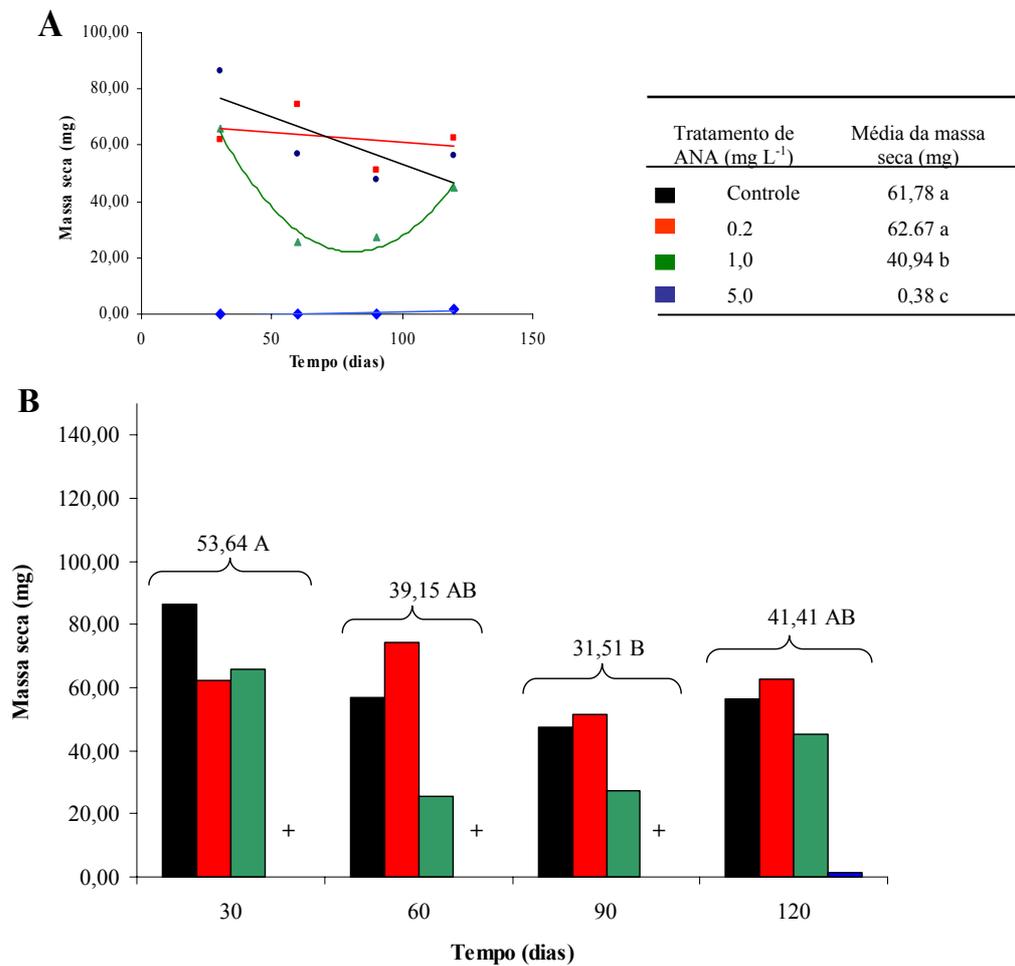


Figura 21. Massa seca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $0,0 \text{ mg L}^{-1} y = -0,33x + 86,73$ e $R^2 = 0,57^{ns}$; ANA $0,2 \text{ mg L}^{-1} y = -0,07x + 67,99$ e $R^2 = 0,0844^{ns}$; ANA $1,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,016x^2 - 2,62x + 128,84$ e $R^2 = 0,97^{ns}$; ANA $5,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,01x - 0,78$ e $R^2 = 0,6^{ns}$. (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo, número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 22 mostra os valores referentes às médias da massa seca das raízes dos 30 aos 120 dias no tratamento com ANA nas concentrações de 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹. A análise estatística pelo teste TUKEY 5% (Anexo 6) mostra que houve diferença significativa no fator tempo (P 99,9%) e no fator tratamento (P 99,9%), no entanto, a interação entre os dois fatores não foi significativa. O teste TUKEY 5% apresentou o tratamento com 0,2 mg L⁻¹ de ANA significativamente maior do que o de 5,0 mg L⁻¹, com os tratamentos de 1,0 mg L⁻¹ e controle com médias intermediárias significativas (figura 22 - legenda).

A análise de regressão mostra que as equações das retas são significativas para o ganho de massa seca que ocorreu em todos os tratamentos (figura 22 A - texto) também observado no fator tempo (figura 22 - B).

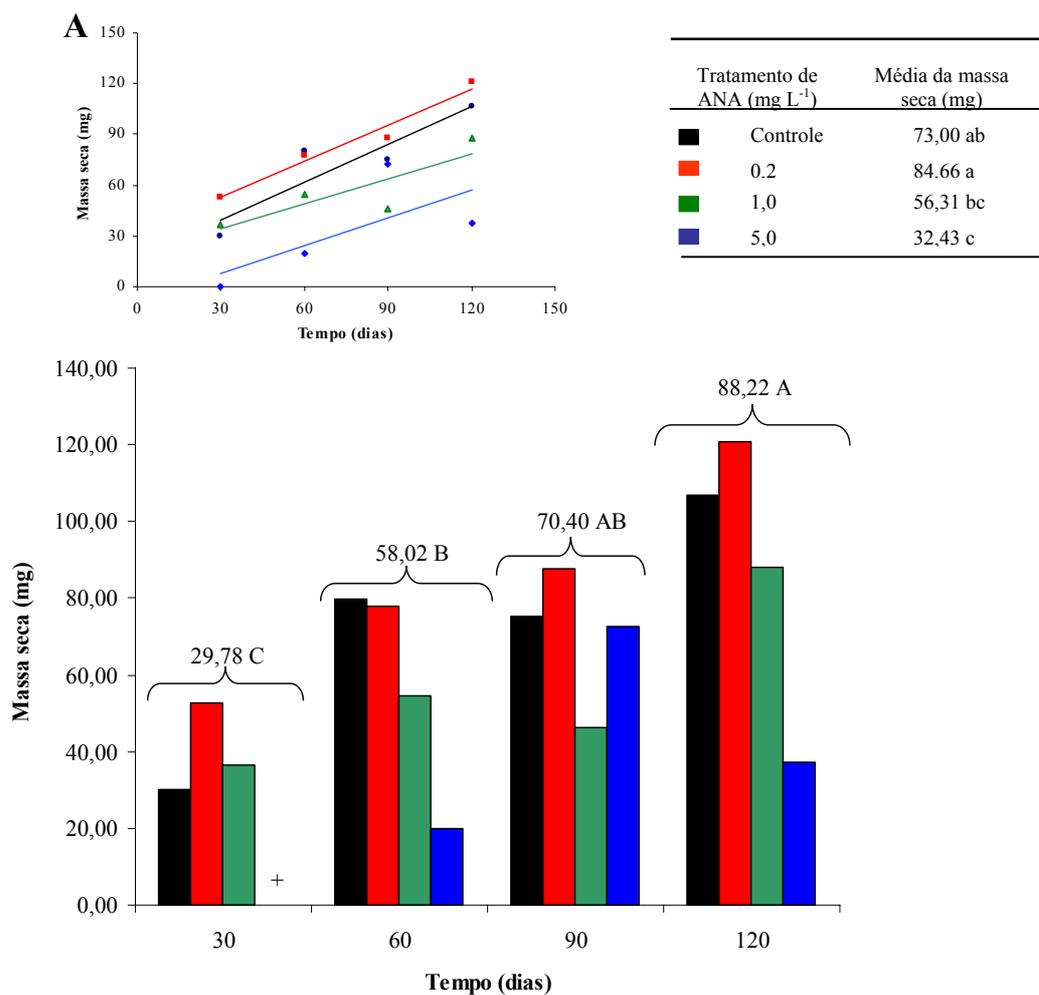


Figura 22. Massa seca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $0,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,75x + 16,495$ e $R^2 = 0,84^*$; ANA $0,2 \text{ mg L}^{-1} y = 0,71x + 31,12$ e $R^2 = 0,96^*$; ANA $1,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,48x + 19,84$ e $R^2 = 0,71^{**}$ e ANA $5,0 \text{ mg L}^{-1} y = 0,55x - 8,74$ e $R^2 = 0,47^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 %, número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 23 mostra que houve formação de brotos apenas no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA. O teste TUKEY 5% (Anexo 6) foi significativo para os fatores tempo (P 95%), tratamento (P 99,9%) e houve interação entre tempo e tratamento (P 99,9%). O fator tempo apresentou-se deletério quanto à massa seca dos brotos aos 30 e aos 120, atingindo a maior massa aos 60 dias sendo que reduziram aos 90 dias (figura 23 B). A análise de regressão foi significativa para a massa seca dos brotos no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA (figura 23 A - texto).

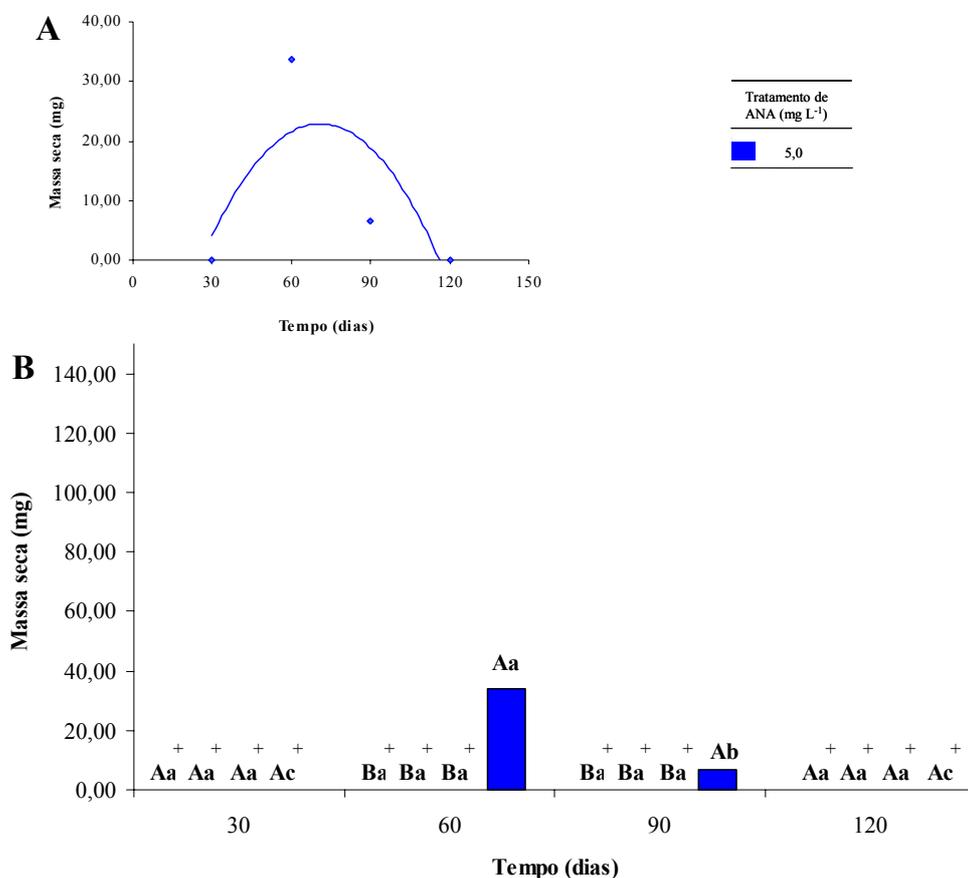


Figura 23. Massa seca dos brotos de *P. amabilis* no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = -0,011x^2 + 1,59x - 33,59$ e $R^2 = 0,57^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos, *** = Significativo a 99,9%. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

4.1.7. Efeito do 2,4-D no número de folhas, raízes e brotos

A figura 24 mostra os valores referentes ao número de folhas nos períodos de 30 aos 120 dias no tratamento com 2,4-D nas concentrações de 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹. A análise estatística pelo teste TUKEY 5% (Anexo 7) mostrou valores significativos para o fator tempo (P 99,9%), o fator tratamento (P 99,9%) e mostrou interação entre os dois fatores (P 99,9%). O teste TUKEY 5% (Figura 24 B e Anexo 7) mostrou que em média a concentração de 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D teve maior número de folhas dos 30 aos 120 dias. A figura 24 B mostra que aos 30 dias o controle e os tratamentos nas concentrações de 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D foram estatisticamente iguais. Aos 60 dias o tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D teve maior número de folhas, valores intermediários para o controle menor valor para o tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D. O controle e os tratamentos com 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D foram estatisticamente iguais aos 90 dias. Aos 120 dias o maior valor para o número de folhas ocorreu no tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D, valor intermediário para o controle e menor valor para o número de folhas na concentração de 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D. O controle teve maior valor para o número de folhas aos 30 dias, valor intermediário aos 60 e 120 dias e menor valor aos 90 dias. O tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D teve maior valor para o número de folhas aos 120 dias e significativamente iguais e menores aos 30, 60 e 90 dias. O tratamento na concentração de 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D obteve maior valor para o número de folhas aos 30 dias, valor intermediário aos 90 dias e menores aos 60 e 120 dias.

A análise de regressão (figura 24 A – texto) mostra que o tratamento na concentração de 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D favoreceu a indução de folhas e a concentração de 0,160 reduziu dos 30 aos 120 dias.

O tratamento com 0,800 mg L⁻¹ de 2,4-D teve efeito inibitório sobre as folhas, raízes e brotos aos 30 dias aos 120 dias.

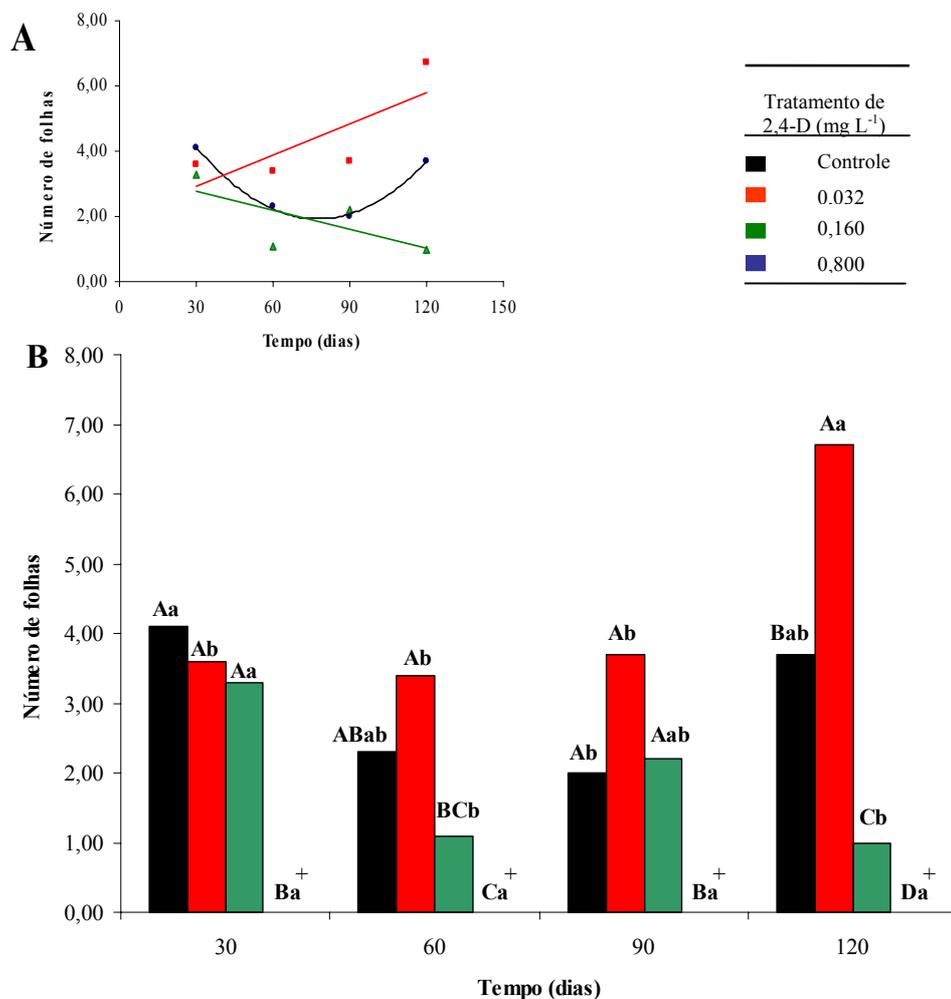


Figura 24. Número de folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,000 mg L⁻¹ $y = 0,001x^2 - 0,15x + 7,78$ e $R^2 = 0,99^{**}$; 2,4-D 0,032 mg L⁻¹ $y = 0,032x + 1,95$ e $R^2 = 0,62^{***}$; 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -0,0193x + 3,35$ e $R^2 = 0,48^{**}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ** = significativo a 99 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 25 mostra os valores referentes às médias do número de raízes dos 30 aos 120 dias no tratamento com 2,4-D nas concentrações de 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹.

A análise estatística pelo teste de TUKEY 5% (Anexo 7) mostra que os valores foram significativos para o fator tempo (P 99,9 %), o fator tratamento (P 99,9 %) e mostra interação entre os dois fatores (P 99,9%). A figura 25 B mostra que as médias para o número de raízes aos 30 dias foram estatisticamente iguais no controle e na concentração de 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D e inibitório para a concentração de 0,160 e 0,800 mg L⁻¹ de 2,4-D. Aos 60 dias a maior média foi na concentração de 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D, não diferindo significativamente do controle e do tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D. Aos 90 dias a maior média foi para o tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D, não diferindo significativamente na concentração de 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D e menor valor para o controle. O maior valor para o número de raízes ocorreu no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D e menores valores para o controle e a concentração de 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D aos 120 dias.

A análise de regressão (figura 25 A - texto) que o controle e o tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D induziu raízes dos 30 aos 60 dias sendo que após este período reduziram. O tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D induziu raízes dos 30 aos 120 dias.

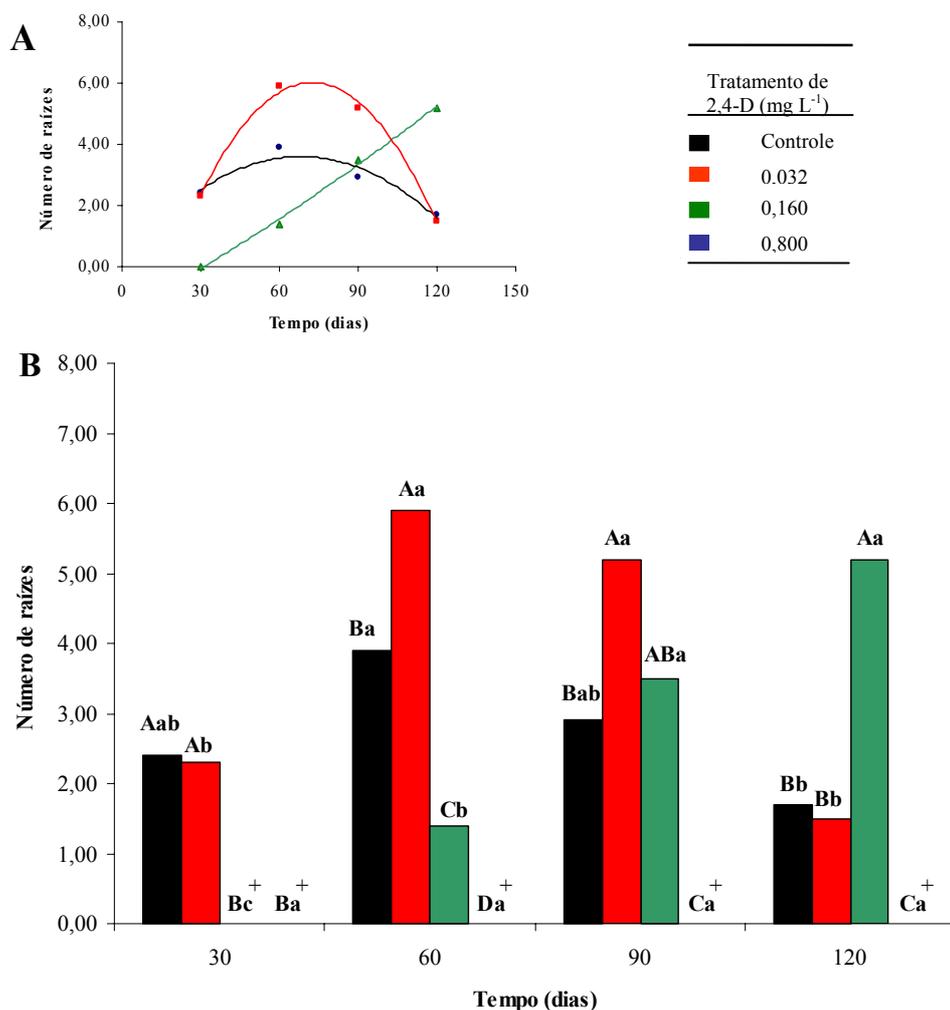


Figura 25. Número de raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $_{0,000\text{mg L}^{-1}} y = -0,0008x^2 + 0,10x + 0,12$ e $R^2 = 0,90^{**}$; 2,4-D $_{0,032\text{ mg L}^{-1}} y = -0,002x^2 + 0,29x - 4,6$ e $R^2 = 0,99^{***}$; 2,4-D $_{0,160\text{ mg L}^{-1}} y = 0,059x - 1,90$ e $R^2 = 0,99^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY $_5\%$ mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ** = significativo a 99 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 26 mostra os valores referentes às médias do número de brotos dos 30 aos 120 dias na concentração de $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Segundo a análise estatística pelo teste TUKEY $_{5\%}$ (Anexo 7) os valores referentes ao número de brotos foram significativos para o fator tempo ($P_{99,9\%}$), fator tratamento e mostrou interação entre os dois fatores. A figura 26 B mostra que o maior número de brotos ocorreu aos 30 dias e valores intermediários aos 60 e 90 dias.

A análise de regressão (figura 26 A – texto) mostra que os pontos das médias do número de brotos foram significativos e se ajustam à reta onde há redução do número de brotos dos 30 aos 120 dias.

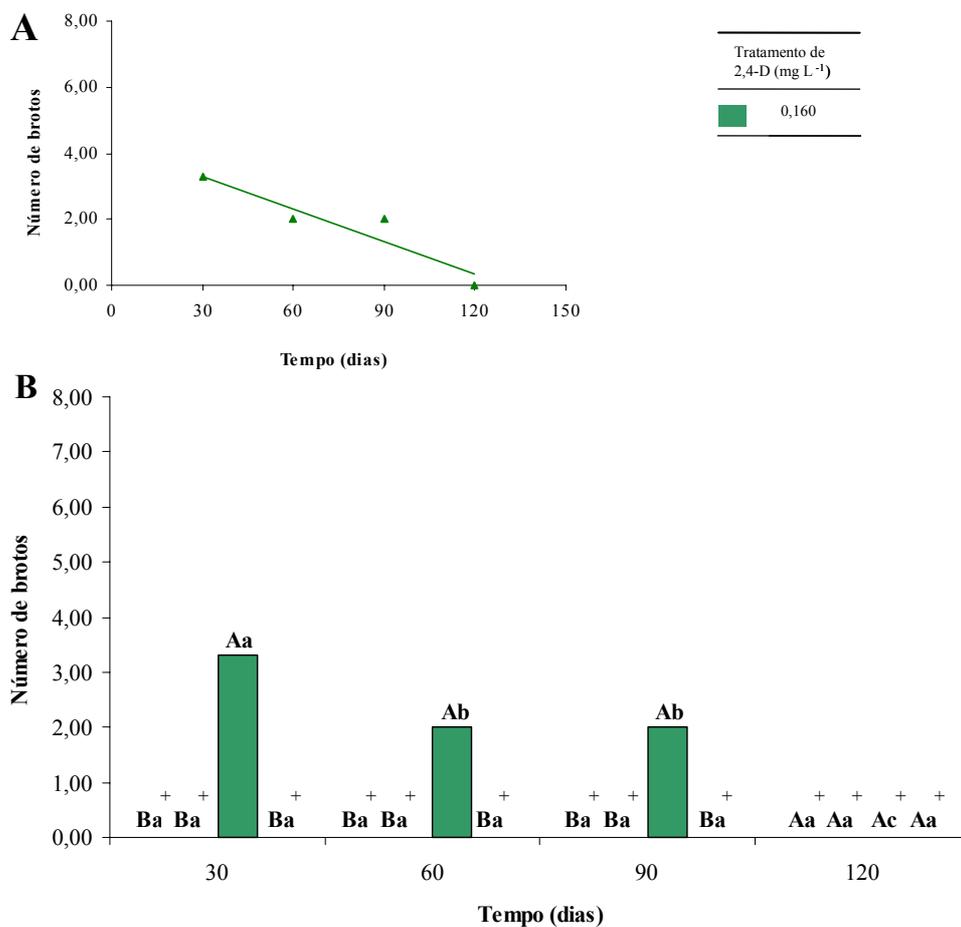


Figura 26. Número de brotos de *P. amabilis* no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressão: 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -0,03x + 4,30$ e $R^2 = 0,88^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos, * = significativo a 95 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

4.1.8. Efeito do 2,4-D massa fresca de folhas, raízes e brotos

A figura 27 mostra os valores referentes às médias da massa fresca das folhas dos 30 aos 120 dias nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D. O teste TUKEY 5 % (Anexo 7) os valores da média da massa fresca das folhas foram significativos para o fator tempo (P 95 %), o fator tratamento (P 99,9%) e mostrou interação entre os dois fatores (P 99,9 %). A análise estatística pelo teste TUKEY 5 % (figura 27 B) mostra que as médias do controle foram estatisticamente iguais dos 30 aos 120 dias. O tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D teve maior valor aos 60 dias, valores intermediários aos 30 e 90 dias e menor valor aos 120 dias. A concentração de 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D teve maior ganho de massa fresca das folhas aos 30 dias e menores no decorrer do período.

A análise de regressão (figura 27 A, B e texto) mostra que os valores se ajustam na curva do tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D onde teve maior ganho de massa aos 60 dias e após este período reduziu.

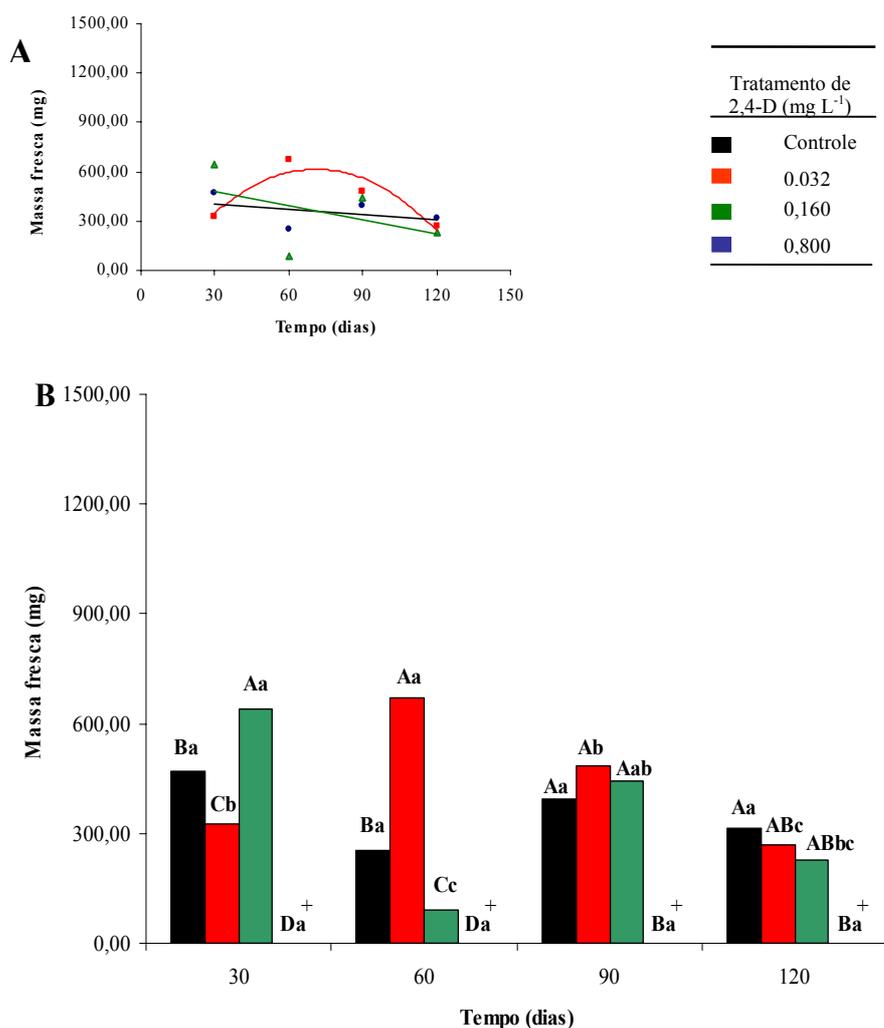


Figura 27. Massa fresca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $0,000 \text{ mg L}^{-1} y = -1,08x + 440,78$ e $R^2 = 0,1978^{ns}$; 2,4-D $0,032 \text{ mg L}^{-1} y = -0,16x^2 + 22,21x - 175,03$ e $R^2 = 0,87^{**}$; 2,4-D $0,160 \text{ mg L}^{-1} y = -2,96x + 572,03$ e $R^2 = 0,22^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY ₅ % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ** = significativo a 99 % e ns = não significativo. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 28 mostra os valores referentes às médias da massa fresca das raízes dos 30 aos 120 dias nas concentrações de 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D. A análise estatística pelo teste TUKEY 5 % (anexo 7) mostra que os valores para a média da massa fresca das raízes foi significativa para o fator tempo (P 99,9 %), o fator tratamento (P 99,9 %) e mostrou interação entre os dois fatores (P 99,9 %). A figura 28 B mostra que aos 30 dias o maior ganho de massa fresca das raízes ocorreu no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D. Aos 60 dias o maior ganho de massa fresca das raízes ocorreu no tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D. Aos 90 e 120 dias o ganho de massa fresca das raízes foi estatisticamente igual em todos os tratamentos exceto no tratamento com 0,800 mg L⁻¹. O controle foi estatisticamente igual dos 30 aos 120 dias. O tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D teve maior valor significativo aos 60 dias, valores intermediários aos 30 e 90 dias e menor valor significativo aos 120 dias. O tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D teve maior valor aos 30 dias e redução da massa fresca das raízes no decorrer do período, com menor valor aos 60 dias.

A análise de regressão (figura 28 A – texto) no controle e no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D houve perda de massa fresca das raízes dos 30 aos 120 dias. O tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D obteve ganho de massa fresca das raízes dos 30 aos 60 dias e redução após este período.

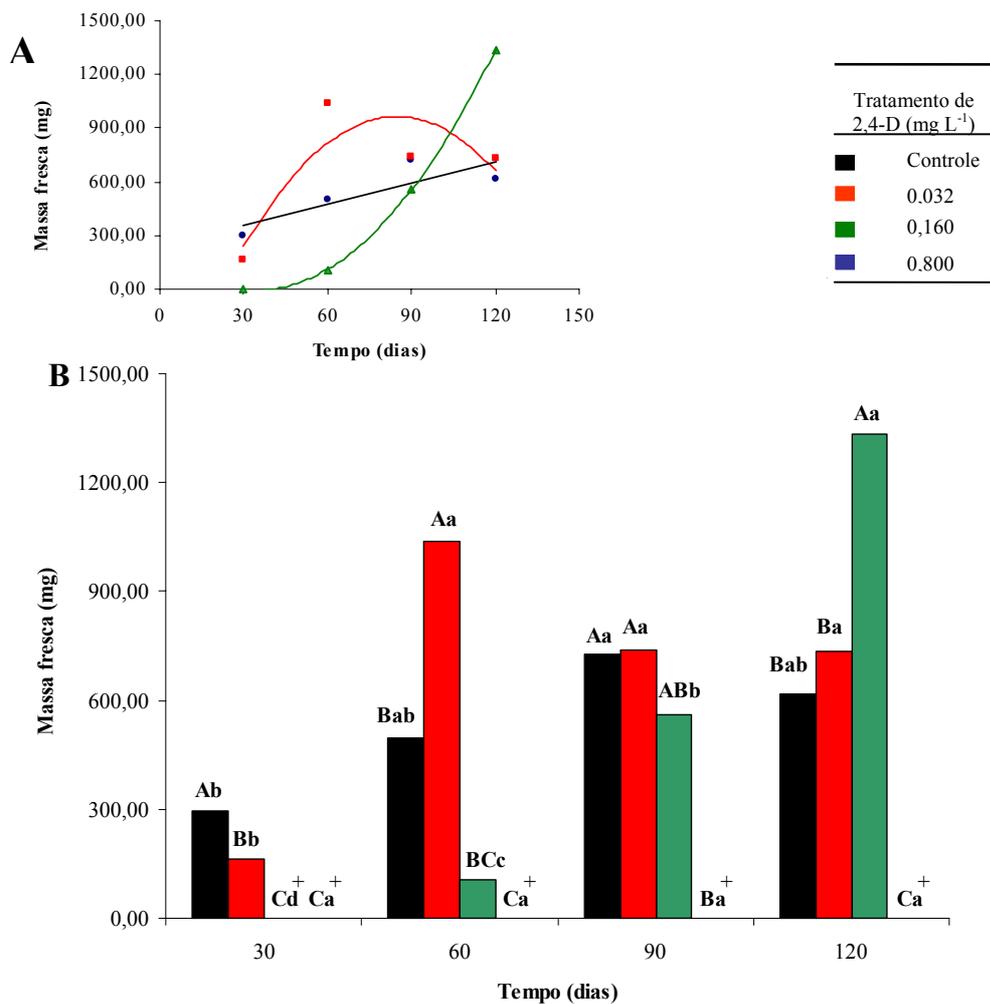


Figura 28. Massa fresca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $0,000 \text{ mg L}^{-1} y = 4,00x + 233,46$ e $R^2 = 0,70^{***}$; 2,4-D $0,032 \text{ mg L}^{-1} y = -0,24x^2 + 41,30x - 782,97$ e $R^2 = 0,73^*$; 2,4-D $0,160 \text{ mg L}^{-1} y = 0,18x^2 - 12,90x + 218,72$ e $R^2 = 0,99^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; * = significativo a 95 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 29 mostra os valores referentes às médias da massa fresca dos brotos dos 30 aos 120 dias na concentração de $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. com emissão de brotos. Pelo teste de TUKEY 5% (anexo 7) os valores para a massa fresca dos brotos foram significativos para o fator tempo ($P_{99,9\%}$), fator tratamento ($P_{99,9\%}$) e mostrou interação entre os dois fatores ($P_{99,9\%}$). A figura 29 B mostra que a maior quantidade de massa fresca dos brotos ocorreu aos 60 dias sendo que de 90 aos 120 dias foi observado a perda total de massa dos brotos.

A análise de regressão (figura 29 A - texto) mostra que os valores das médias da massa fresca dos brotos se ajustam na curva indicando que dos 30 aos 60 dias obteve ganho de massa e após este período a massa fresca dos brotos reduziu.

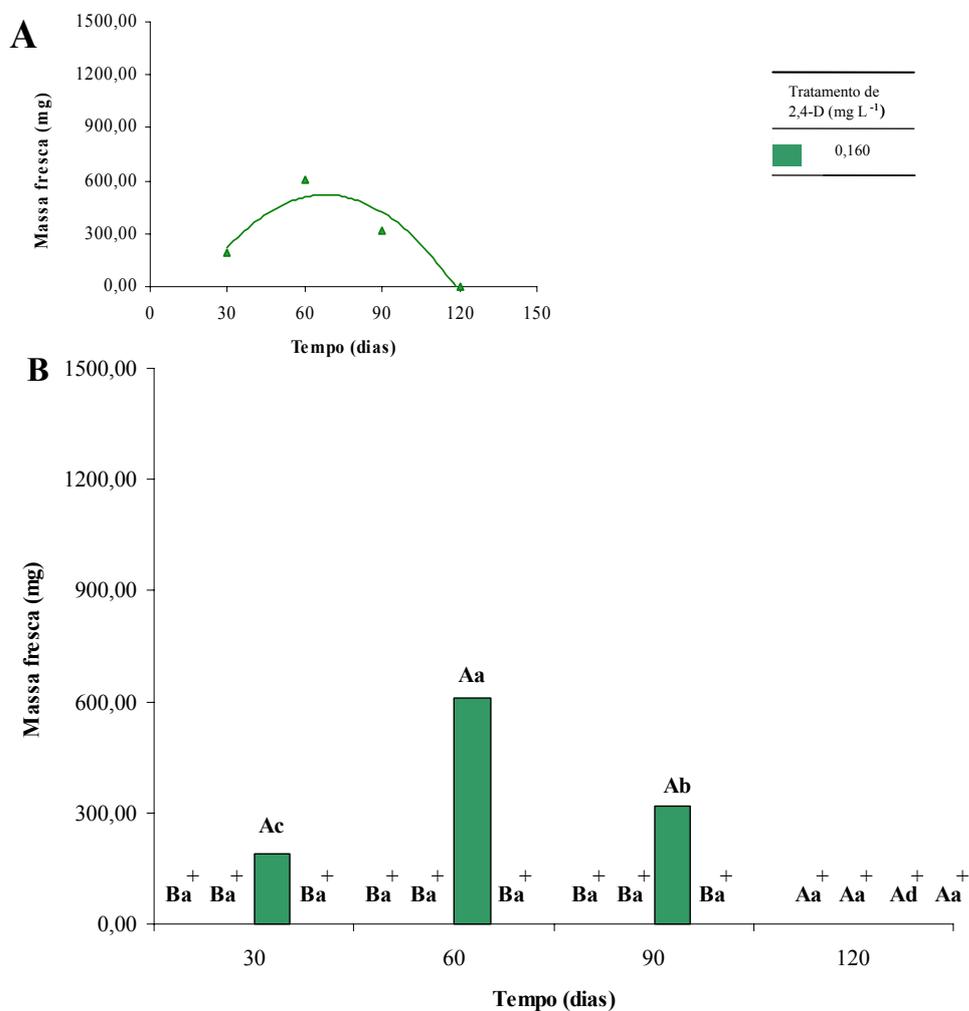


Figura 29. Massa fresca dos brotos de *P. amabilis* no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressão: 2,4-D 0,032 mg L⁻¹ $y = -0,20x^2 + 27,91x - 428,80$ e $R^2 = 0,88^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos, * = significativo a 95 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

4.1.9. Efeito do 2,4-D na massa seca de folhas, raízes e brotos

A figura 30 mostra os valores referentes às médias da massa seca das folhas dos 30 aos 120 dias, no tratamento com 2,4-D, nas concentrações de 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹. A análise estatística pelo teste TUKEY 5 % (Anexo 7) mostra que o fator tempo não foi significativo, no entanto, o fator tratamento foi significativo (P 99,9 %) e mostrou interação entre os dois fatores (P 99,9 %). Aos 30 dias o maior ganho significativo de massa seca de folhas ocorreu no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D, valores intermediários para o controle seguido do tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D. Aos 60 e 90 dias o maior valor para a massa seca de folhas ocorreu para o tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D. Aos 120 dias o maior valor significativo ocorreu no controle seguido das concentrações de 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D.

A análise de regressão (figura 30 A – texto) dos valores foram significativos para a concentração de 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D sendo que o tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D as folhas cresceram dos 30 aos 60 dias e redução nos períodos seguintes. O tratamento na concentração de 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D as folhas reduziram dos 30 aos 120 dias.

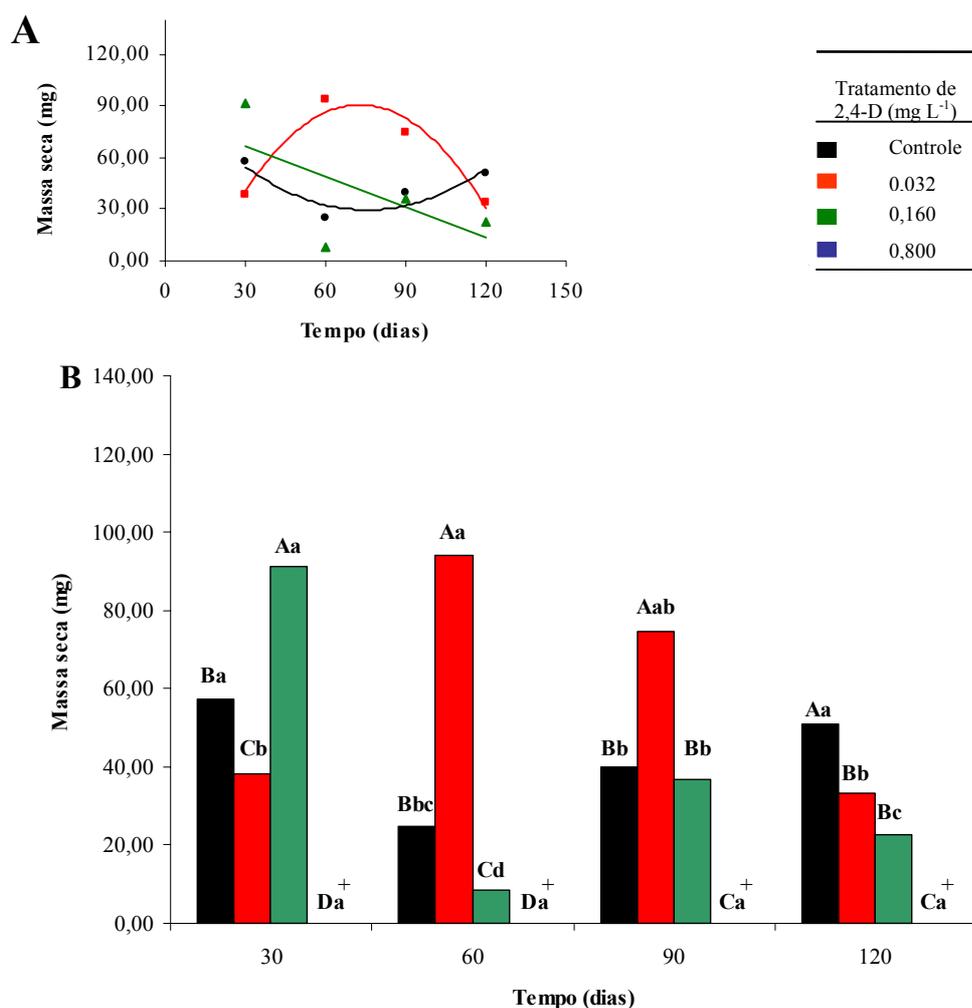


Figura 30. Massa seca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,000 mg L⁻¹ $y = 0,012x^2 - 1,83x + 98,60$ e $R^2 = 0,78^{ns}$, 2,4-D 0,032 mg L⁻¹ $y = -0,027x^2 + 3,94x - 53,18$ e $R^2 = 0,94^{***}$; 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -0,59x + 83,88$ e $R^2 = 0,40^{**}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ** = significativo a 99%, *** = significativo a 99,9% e ns = não significativo. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 31 mostra os valores referentes às médias da massa seca das raízes dos 30 aos 120 dias no tratamento com 2,4-D nas concentrações de 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹. A análise do teste TUKEY 5 % (ANEXO 7) mostra os valores médios da massa seca das raízes foram significativos para o fator tempo (P 99,9 %), o fator tratamento (P 99,9 %) e mostrou interação entre os dois fatores (P 99,9 %). A figura 31 B mostra que aos 30 dias as médias da massa seca das raízes foram estatisticamente iguais no controle e no tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D. Aos 60 e 90 dias o tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D teve maior ganho de massa nas raízes. Aos 120 dias os tratamentos foram estatisticamente iguais. O controle teve maior ganho aos 120 dias. O tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D aos 60 e 90 dias foram significativamente os maiores valores nos respectivos períodos. Comparando somente o tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D, o maior ganho de massa ocorreu aos 120 dias.

A análise de regressão (figura 31 A - texto) mostrou que os valores médios da massa seca das raízes se ajustaram às retas e todos os tratamentos favoreceram o ganho de massa seca nas raízes dos 30 aos 120 dias.

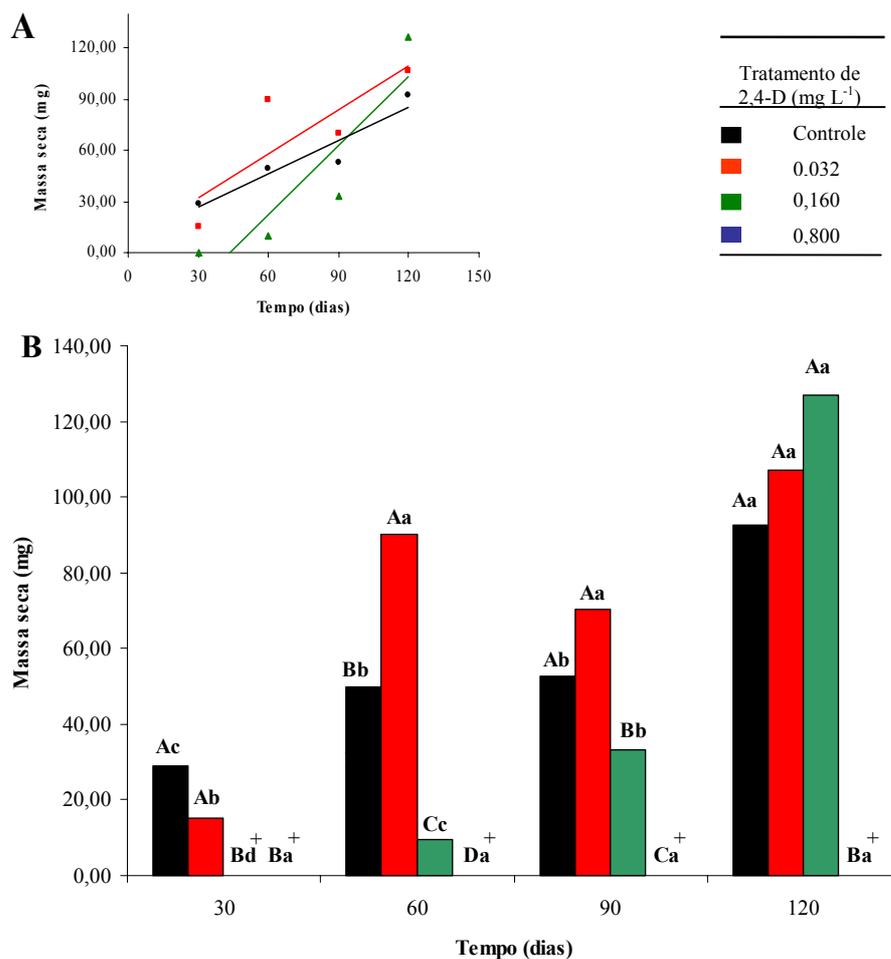


Figura 31. Massa seca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L^{-1} 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle $0,000 \text{ mg L}^{-1}$ $y = 0,65x + 7,52$ e $R^2 = 0,88^{***}$; 2,4-D $0,032 \text{ mg L}^{-1}$ $y = 0,85x + 6,70$ e $R^2 = 0,68^{***}$; 2,4-D $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ $y = 1,35x - 58,65$ e $R^2 = 0,81^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5% mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

A figura 32 mostra os valores referentes às médias da massa seca dos brotos dos 30 aos 120 dias no tratamento com 2,4-D na concentração de 0,160 mg L⁻¹. A análise de regressão pelo teste TUKEY 5 % (Anexo 7) mostra que os valores para a massa seca dos brotos foram significativos para o fator tempo (P 99 %), fator tratamento (P 99,9 %) e mostrou interação entre os fatores (P 99,9 %). A figura 32 B mostra que o maior valor para a massa seca dos brotos no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D ocorreu aos 60 dias.

A análise de regressão (figura 32 A – texto) mostra que os valores da média da massa seca dos brotos foram significativos e se ajustam na curva onde dos 30 aos 60 dias obteve ganho de massa seca e após este período reduziu.

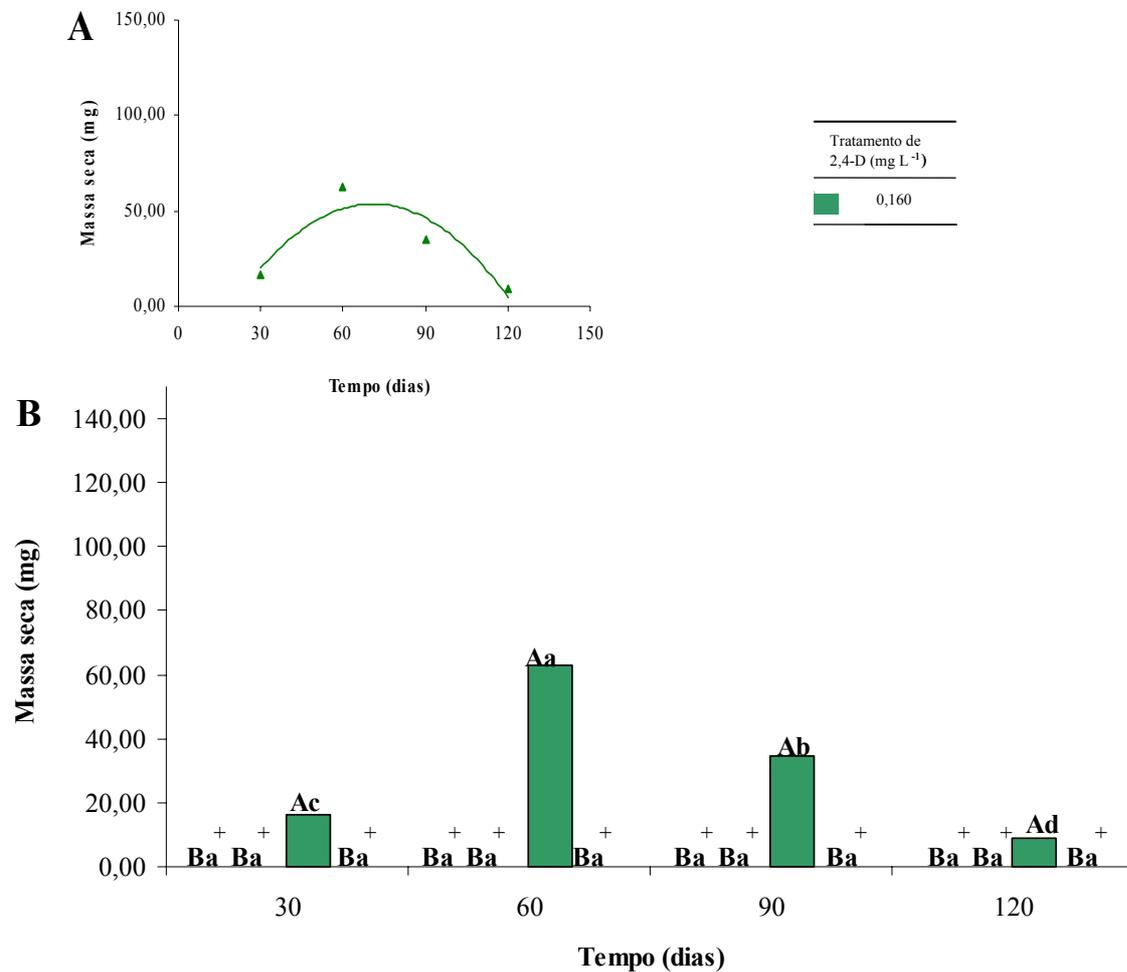


Figura 32. Massa seca dos brotos de *P. amabilis* no tratamento 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressão: 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -0,17x + 43,24$ e $R^2 = 0,07^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos, * = significativo a 95 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado.

4.2. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas referem-se aos teores de carboidratos solúveis, amido e proteína solúvel total nas folhas, raízes e nos brotos nas diferentes concentrações de diferentes auxinas aos 30 e aos 120 dias.

4.2.1. Efeito do AIB nos teores de carboidratos solúveis de folhas e nas raízes

Para analisar os efeitos do AIB nas folhas com relação ao teor de carboidratos solúveis foram adicionados ao meio de cultura MS as concentrações de 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB no período de 30 e 120 dias. Os resultados foram expressos em mg de carboidratos solúveis por grama de matéria seca.

A figura 33 mostra que em todos os tratamentos os teores de carboidratos solúveis nas folhas diminuíram de 30 para 120 dias.

Os tratamentos com 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB tiveram maiores teores de carboidratos solúveis nas folhas aos 30 dias em relação ao controle, porém, aos 120 dias não houve diferença entre os tratamentos.

A figura 34 mostra que aos 30 dias os teores de carboidratos solúveis nas raízes foram maiores nos tratamentos com 0,2 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB em relação ao tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de AIB. Porém aos 120 dias os teores de carboidratos solúveis nas raízes nos tratamentos com 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB foram menores em relação ao controle. Comparando os teores de carboidratos solúveis nas raízes entre 30 e 120 dias nas diferentes concentrações de AIB os tratamentos tiveram redução nos teores de carboidratos solúveis enquanto o controle apresentou aumento significativo.

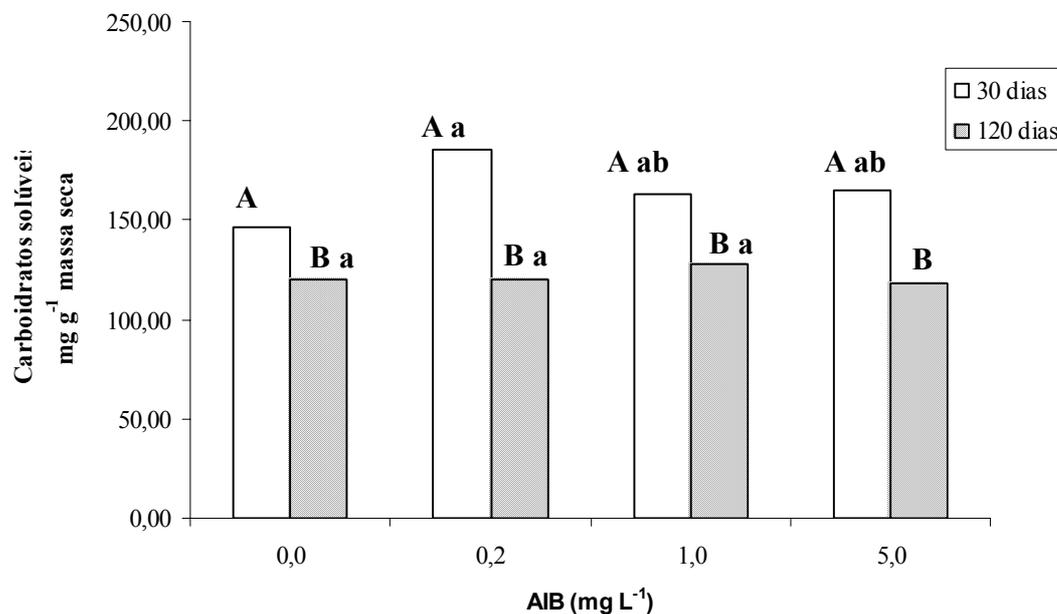


Figura 33. Efeito do AIB nos teores de carboidratos solúveis nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).

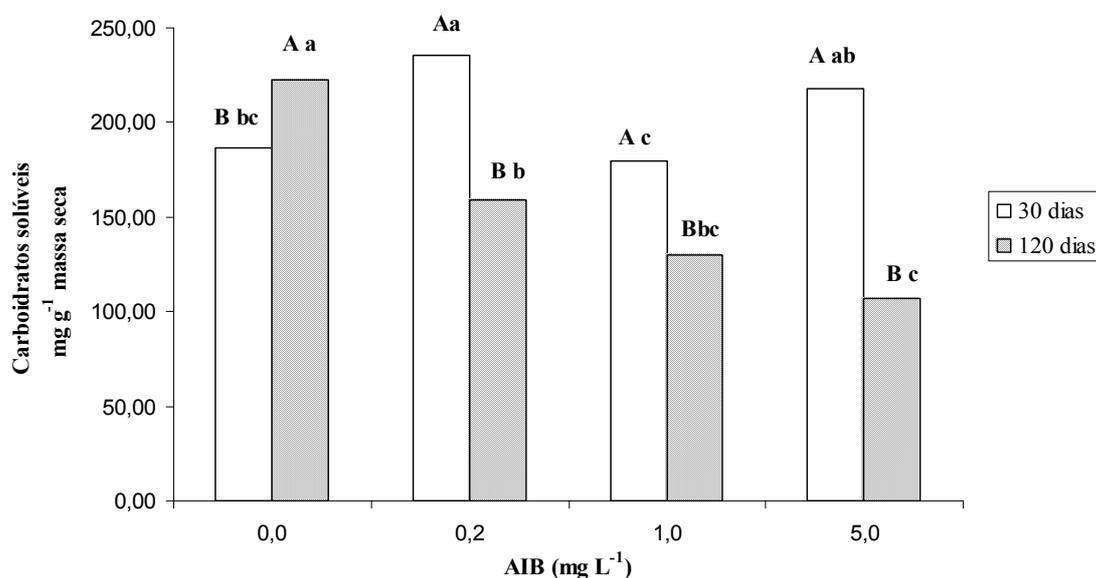


Figura 34. Efeito do AIB nos teores de carboidratos solúveis nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os diferentes, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).

4.2.2. Efeito do ANA nos teores de carboidratos solúveis de folhas, raízes e brotos

A figura 35 mostra que aos 30 dias os teores de carboidratos solúveis nas folhas foram maiores que aos 120 dias, exceto no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA que aos 30 dias apresentou perda da parte aérea. Aos 120 dias a parte aérea dos explantes no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA regeneraram porém os seus teores de carboidratos solúveis nas folhas foram menores quando comparados aos tratamentos com 0,2, 1,0 mg L⁻¹ de ANA e ao tratamento sem reguladores.

As folhas do tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de ANA apresentaram maiores teores de carboidratos solúveis aos 30 dias porém aos 120 dias os teores de carboidratos solúveis reduziram em relação ao controle.

A figura 36 mostra que os teores de carboidratos solúveis nas raízes aos 120 dias foram maiores do que aos 30 dias no controle. Aos 30 dias o tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA não induziu a formação de raízes, no entanto, aos 120 dias constatou-se que os teores de carboidratos solúveis nas raízes foram semelhantes aos teores de carboidratos solúveis no tratamento com 0,2 mg L⁻¹ de ANA e superior ao tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de ANA.

A figura 37 mostra os teores de carboidratos solúveis nos brotos que se formaram no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA aos 30 dias sendo que no controle e demais tratamentos não houve formação de brotos. Aos 120 dias teve efeito inibitório.

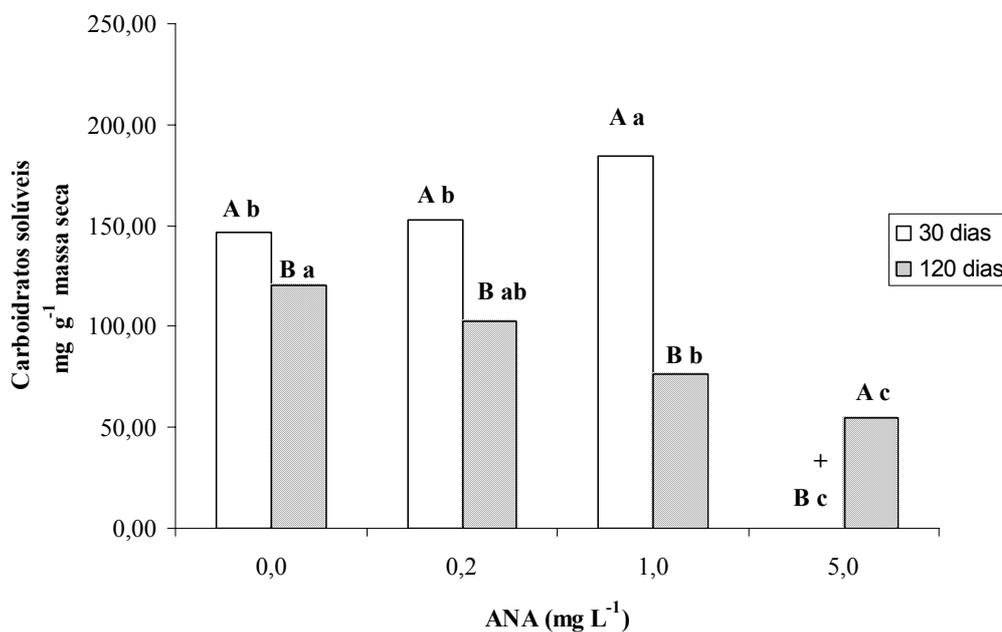


Figura 35. Efeito do ANA nos teores de carboidratos solúveis nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos; letras maiúsculas comparam os diferentes tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não detectado).

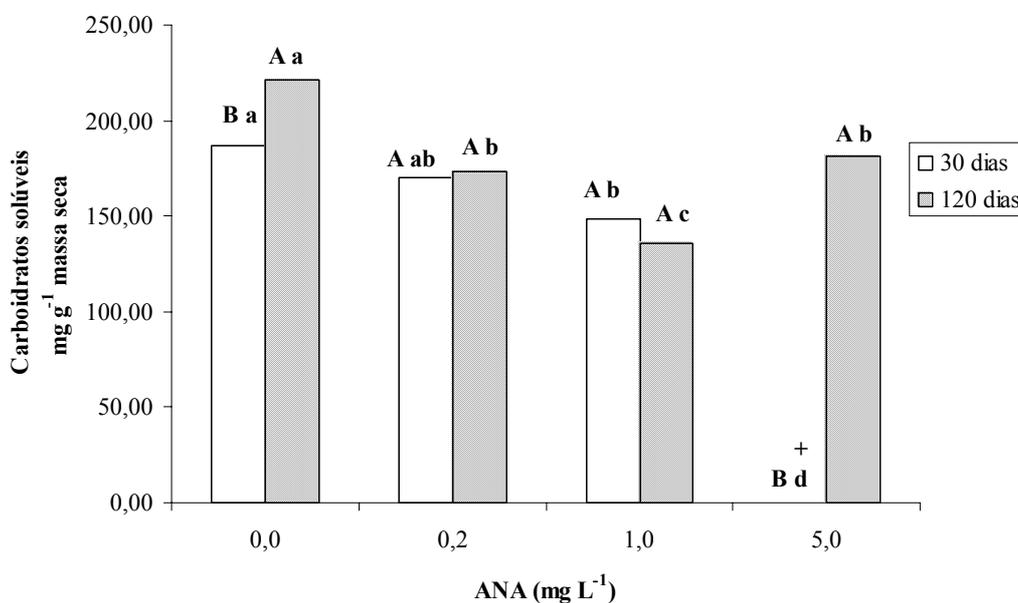


Figura 36. Efeito do ANA nos teores de carboidratos solúveis nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não detectado).

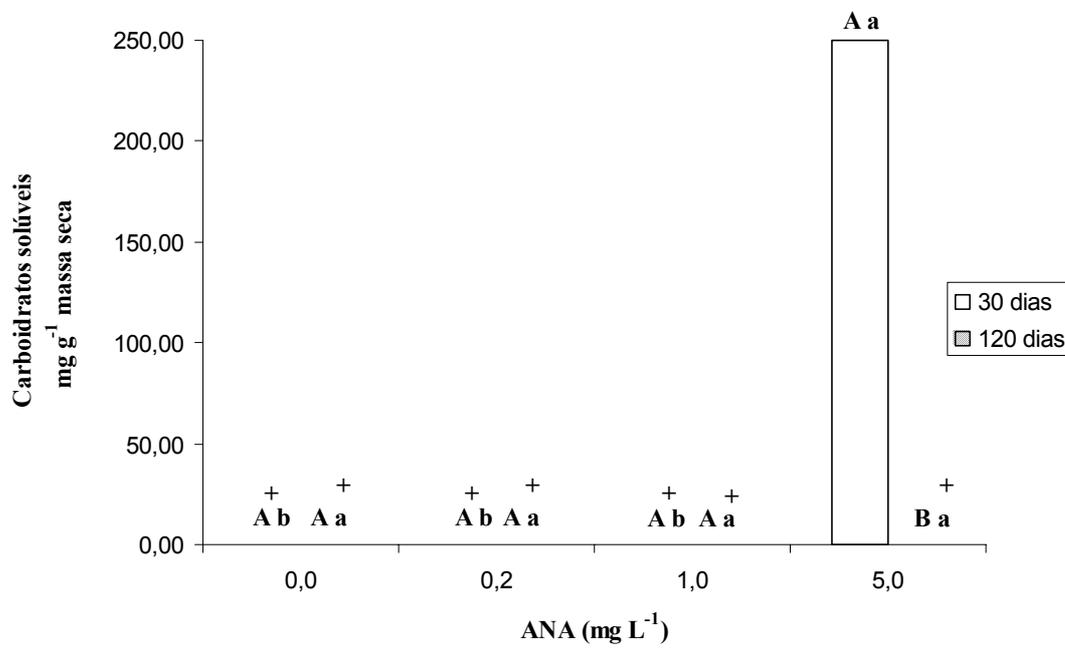


Figura 37. Efeito do ANA nos teores de carboidratos solúveis nos brotos aos 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos, letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não detectado).

4.2.3. Efeito do 2,4-D nos teores de carboidratos solúveis de folhas, raízes e brotos

A figura 38 mostra que aos 30 dias os teores de carboidratos solúveis nas folhas foram maiores em relação aos 120 dias. O tratamento com 0,800 mg L⁻¹ de 2,4-D teve efeito inibitório aos 30 e 120 dias. As folhas do tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D apresentaram maiores teores de carboidratos solúveis aos 30 dias sendo que estes reduziram aos 120 dias em relação ao controle e ao tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de ANA. Aos 120 dias os teores do tratamento com 0,032 mg L⁻¹ foram iguais ao controle.

A figura 39 mostra que o tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D aos 30 dias foi estatisticamente igual ao controle. Aos 120 dias nos tratamentos com 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D os teores de carboidratos solúveis nas raízes reduziram em relação ao controle. No tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D as raízes não cresceram aos 30 dias e após este período houve indução de raízes onde foram detectados teores de carboidratos solúveis nas mesmas proporções do tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D aos 120 dias. No tratamento com 0,800 mg L⁻¹ de 2,4-D houve efeito inibitório aos 30 dias.

A figura 40 mostra que o tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D dos 30 aos 120 dias foi o único tratamento com a indução de brotos. Os teores de carboidratos solúveis nos brotos foram maiores aos 30 dias em relação aos 120 dias no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D.

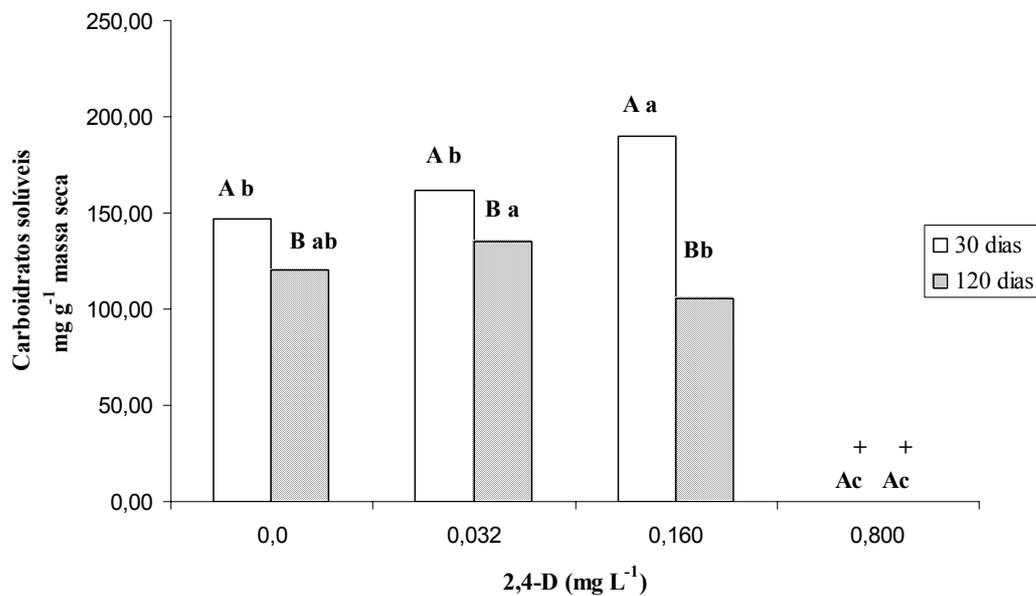


Figura 38. Efeito do 2,4-D nos teores de carboidratos solúveis nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY ^{5%}, + = material não detectado).

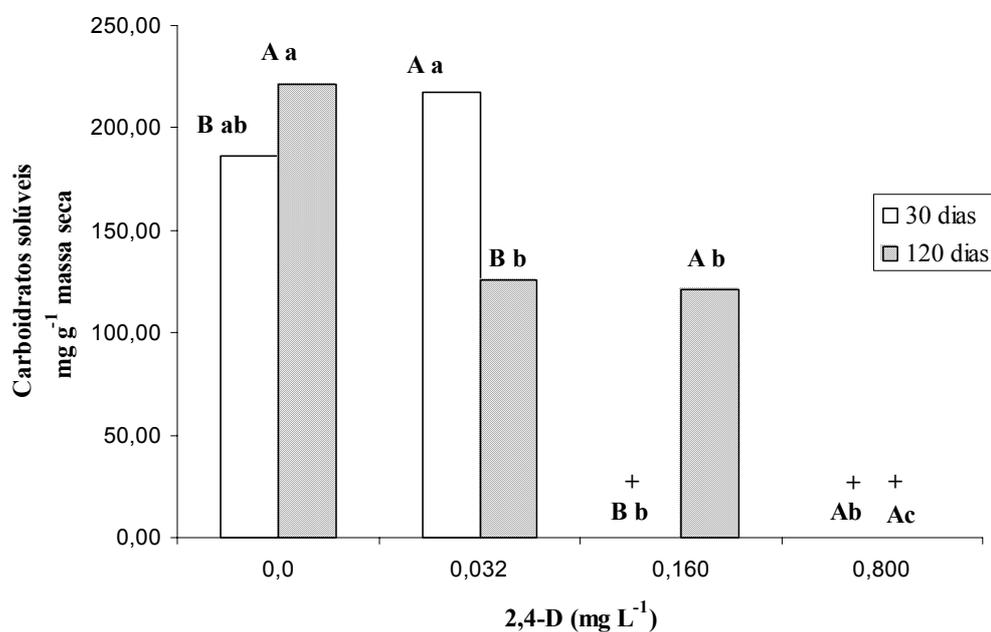


Figura 39. Efeito do 2,4-D nos teores de carboidratos solúveis nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY ^{5%}, + = material não detectado).

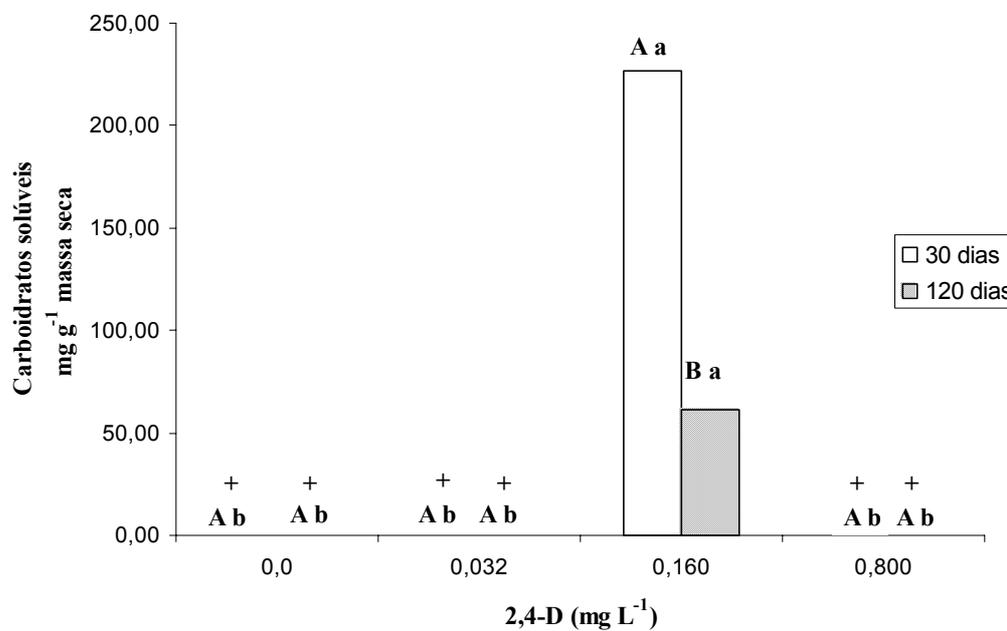


Figura 40. Efeito do 2,4-D nos teores de carboidratos solúveis nos brotos no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não detectado).

4.2.4. Efeito do AIB nos teores de amido de folhas e nas raízes

A figura 41 mostra que aos 30 dias os teores de amido nas folhas foram maiores nos tratamentos com 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB em relação aos 120 dias porém os teores de amido nas folhas aos 30 e 120 dias foram estatisticamente iguais no controle. Aos 30 dias os teores de amido nas folhas foram estatisticamente iguais nos tratamentos com 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB. Aos 120 dias os teores de amido nas folhas foram menores nos tratamentos com 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB em relação ao controle. Comparando-se 30 e 120 dias, os teores de amido nas folhas foram maiores aos 30 dias sendo que aos 120 dias reduziram.

A figura 42 mostra que os teores de amido nas raízes foram menores aos 30 dias em relação aos 120 dias no controle e nos tratamentos com 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB. No tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA, os teores de amido nas raízes foram maiores aos 30 dias em relação aos 120 dias. Aos 30 dias os teores de amido nas raízes foram maiores no tratamento com 0,2 mg L⁻¹ de AIB em relação ao controle. Aos 120 dias os tratamentos com 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB foram estatisticamente iguais ao controle sendo que o tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de AIB teve menor teor de amido nas raízes.

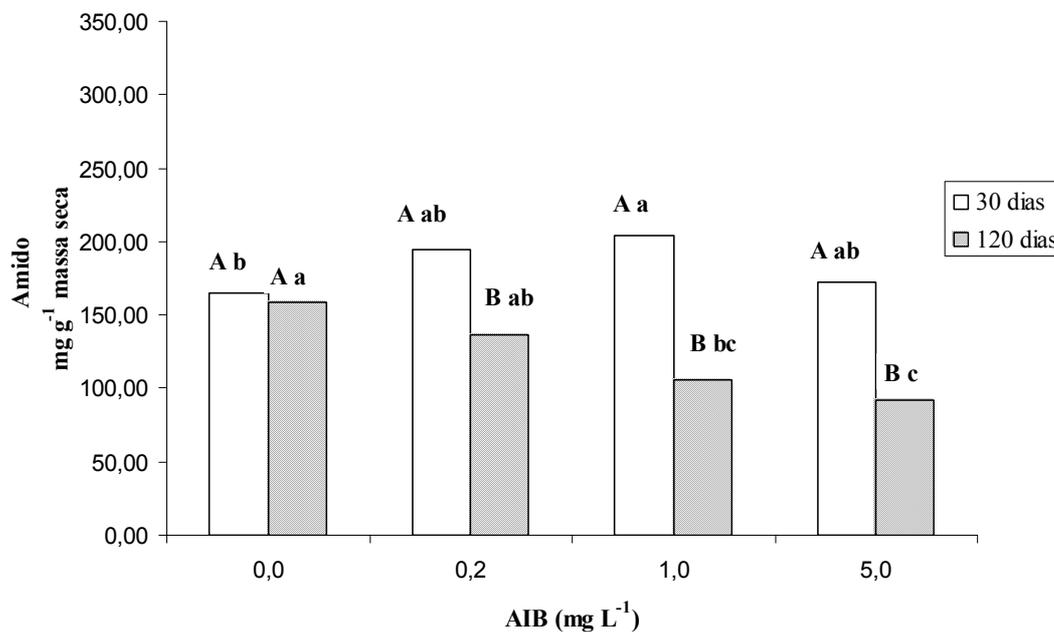


Figura 41. Efeito do AIB nos teores de amido nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).

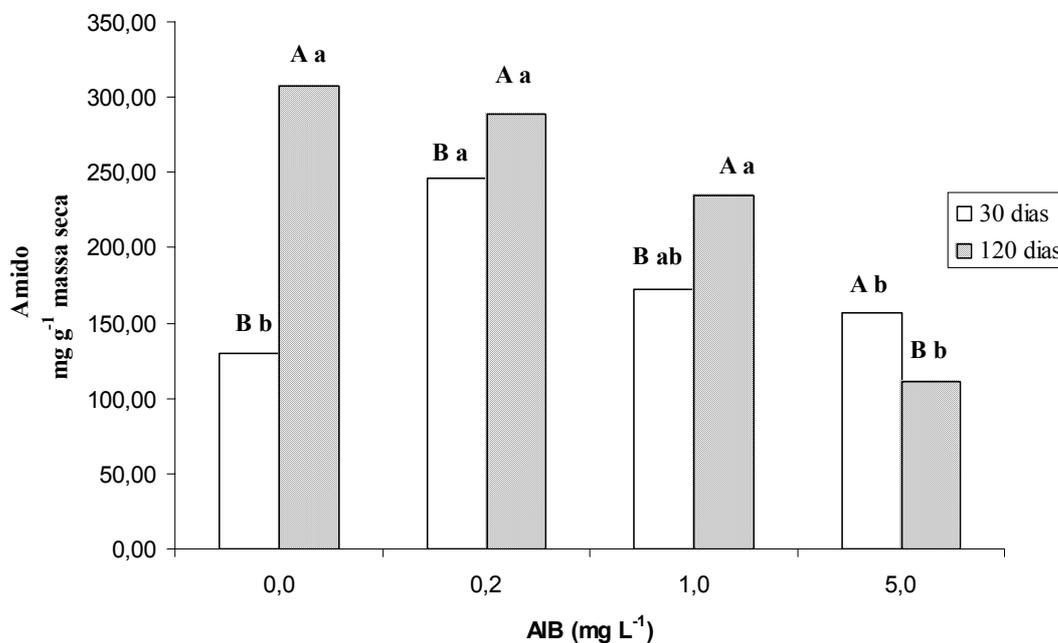


Figura 42. Efeito do AIB nos teores de amido nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).

4.2.5. Efeito do ANA nos teores de amido de folhas, nas raízes e nos brotos

A figura 43 mostra que os teores de amido nas folhas aos 30 dias, nos tratamentos com 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA foram maiores quando comparados ao controle. No entanto, aos 120 dias, os teores de amido nas folhas foram menores nos tratamentos com 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA em relação ao controle. O tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA, aos 30 dias, não havia material da parte aérea para análise. No tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA aos 120 dias mostra que estatisticamente os teores de amido nas folhas foram inferiores aos demais tratamentos.

A figura 44 mostra os teores de amido nas raízes em diferentes concentrações de ANA aos 30 e 120 dias. Os teores de amido nas raízes foram maiores em relação ao controle nos tratamentos com 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA aos 30 dias. O tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA teve efeito inibitório sobre as raízes aos 30 dias. Os teores de amido nos tratamentos de 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA reduziram e foram menores em relação ao controle aos 120 dias. Os tratamentos com 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA foram estatisticamente iguais nos dois períodos sendo que no controle os teores de amido nas folhas aumentaram aos 120 dias.

A figura 45 mostra que o teor de amido nos brotos ocorreu apenas no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA aos 30 dias pois nos demais tratamentos não houve formação de brotos. No entanto, aos 120 dias todos os tratamentos tiveram efeito inibitório sobre a formação de brotos não havendo material para análise dos teores de amido nos brotos.

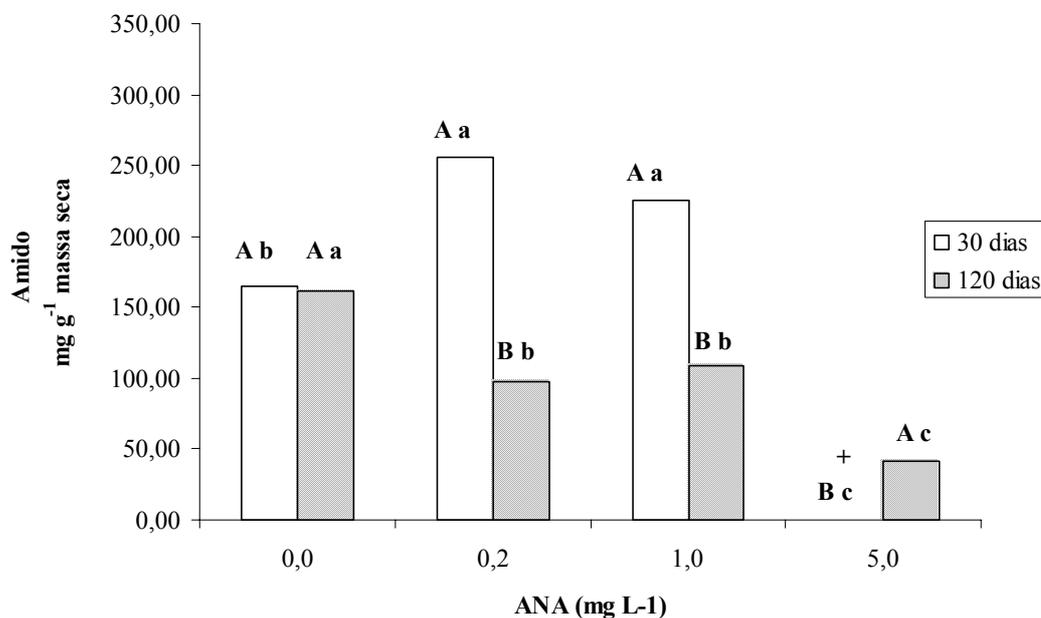


Figura. 43. Efeito do ANA nos teores de amido nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

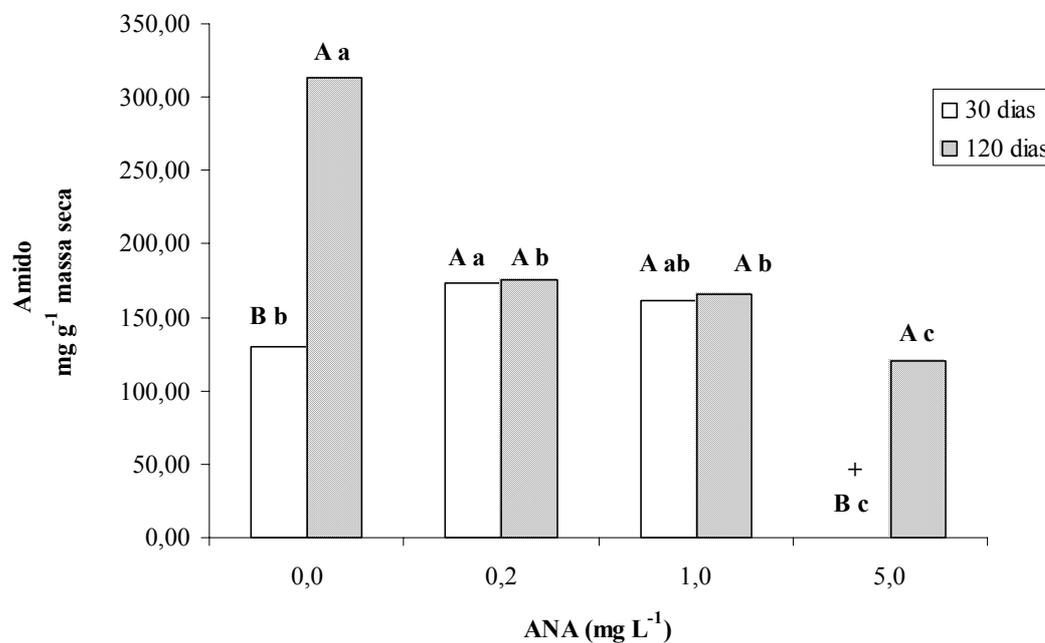


Figura 44. Efeito do ANA nos teores amido nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

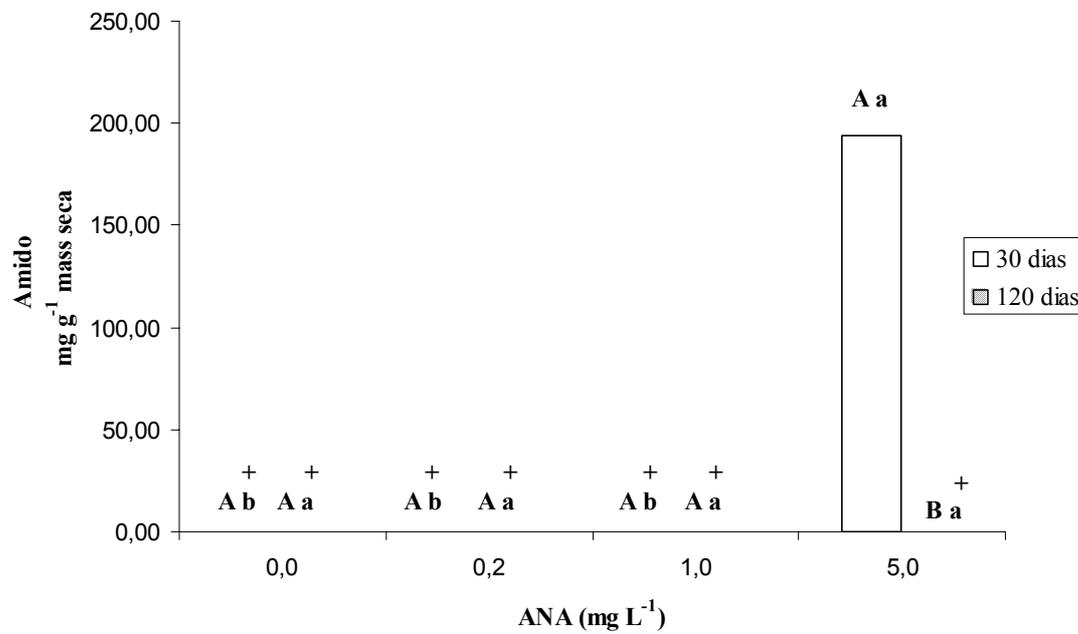


Figura 45. Efeito do ANA nos teores amido nos brotos no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

4.2.6. Efeito do 2,4-D nos teores de amido de folhas, raízes e nos brotos

A figura 46 mostra os teores de amido nas folhas nas concentrações de 0,000, 0,032, 0,160 e 0,800 mg L⁻¹ de 2,4-D aos 30 e 120 dias sendo que no tratamento com 0,800 mg L⁻¹ de 2,4-D o efeito foi deletério. Os teores de amido nas folhas aumentaram em relação ao controle nas concentrações de 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D aos 30 dias. Aos 120 dias os teores de amido nos folhas foram estatisticamente iguais. O controle foi estatisticamente igual nos dois períodos enquanto que os teores de proteína total solúvel nos tratamentos com 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D foram maiores aos 30 dias em relação aos 120 dias.

A figura 47 mostra que aos 30 dias os teores de amido nas raízes no tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D foi maior em relação ao controle. No entanto aos 120 dias os teores de amido nas raízes no tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D foi menor em relação ao controle. No tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D aos 30 dias não houve material para as análises. No período de 120 dias constatou-se que o teor de amido nas raízes no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D foi menor em relação ao controle.

A figura 48 mostra que os teores de amido nos brotos reduziram dos 30 aos 120 no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D. Nos demais tratamentos não houve indução para formação de brotos.

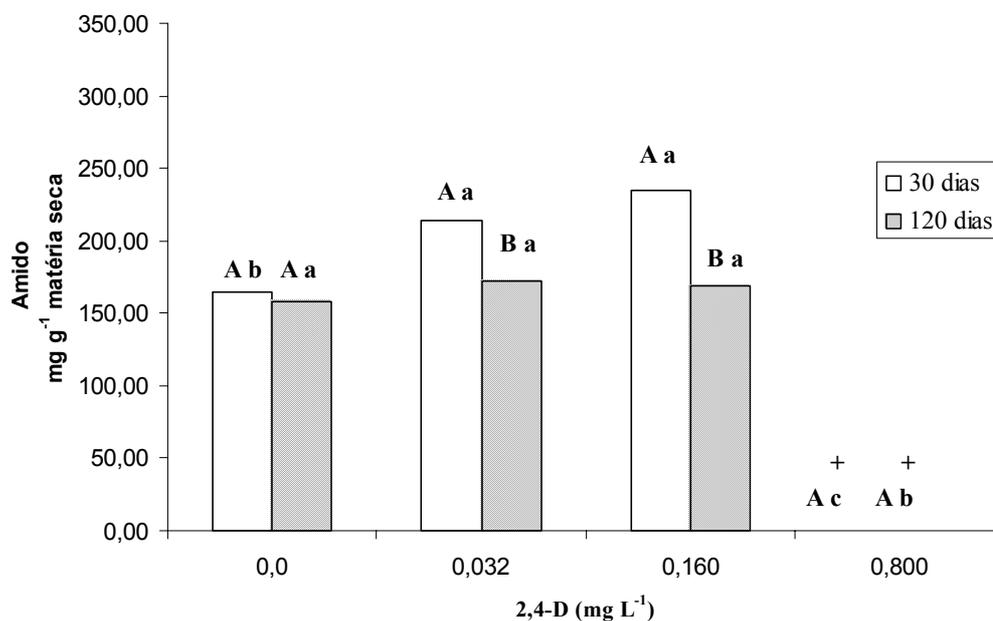


Figura 46. Efeito do 2,4-D nos teores de amido nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

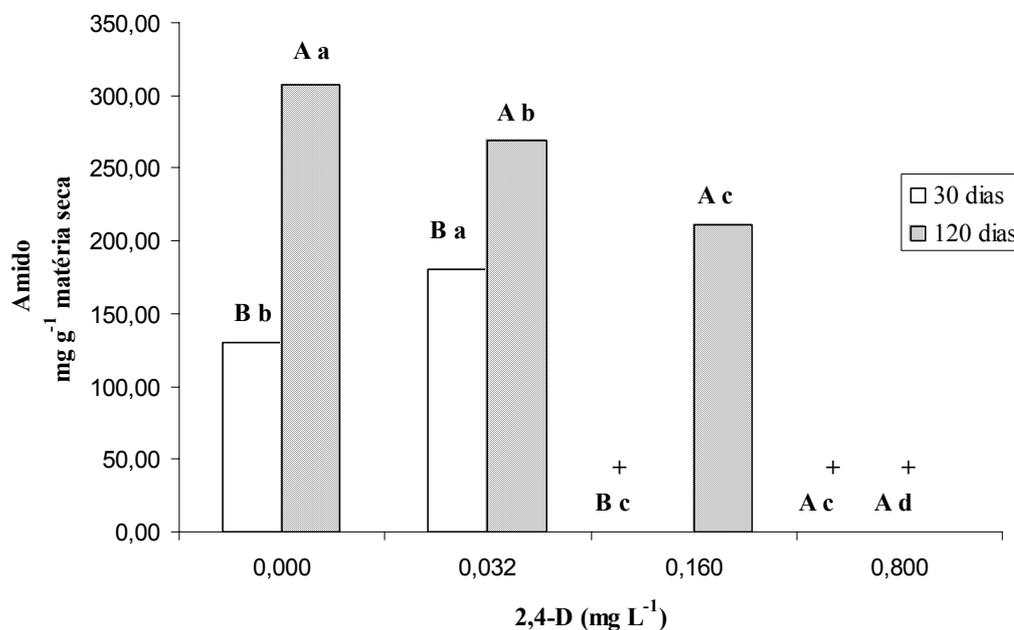


Figura 47. Efeito do 2,4-D nos teores de amido nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

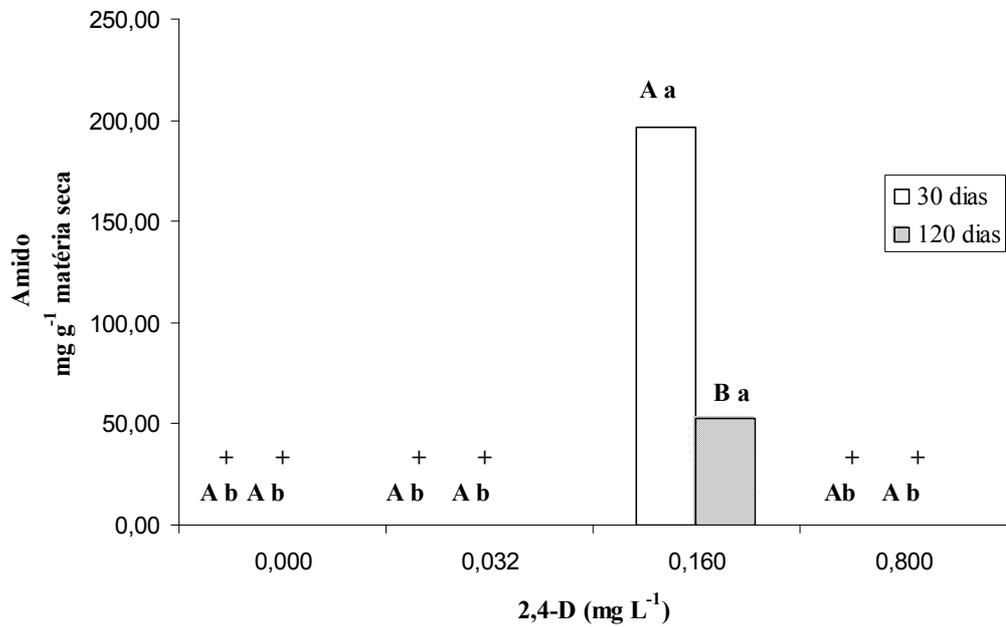


Figura 48. Efeito do 2,4-D nos teores de amido nos brotos no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

4.2.7. Efeito do AIB nos teores de proteína total solúvel de folhas e nas raízes

A figura 49 mostra os teores de proteína total solúvel das folhas nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB aos 30 e 120 dias. Os teores de proteína total solúvel nas folhas na concentração de 5,0 mg L⁻¹ de AIB foram estatisticamente iguais ao controle e foram menores nas concentrações de 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB aos 30 dias. Aos 120 dias com o aumento da concentração de AIB os teores de proteína total solúvel foram estatisticamente iguais ao controle. Os teores de proteína total solúvel nas folhas foram maiores aos 30 dias em relação aos 120 dias no controle e na concentração de 5,0 mg L⁻¹ de AIB sendo que os tratamentos com 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB foram estatisticamente iguais nos dois períodos.

A figura 50 mostra que aos 30 dias o teor de proteína total solúvel nas raízes foi estatisticamente igual em todos os tratamentos em relação ao controle. Aos 120 dias os tratamentos com 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de AIB tiveram menores teores de proteína total solúvel nas raízes em relação ao controle.

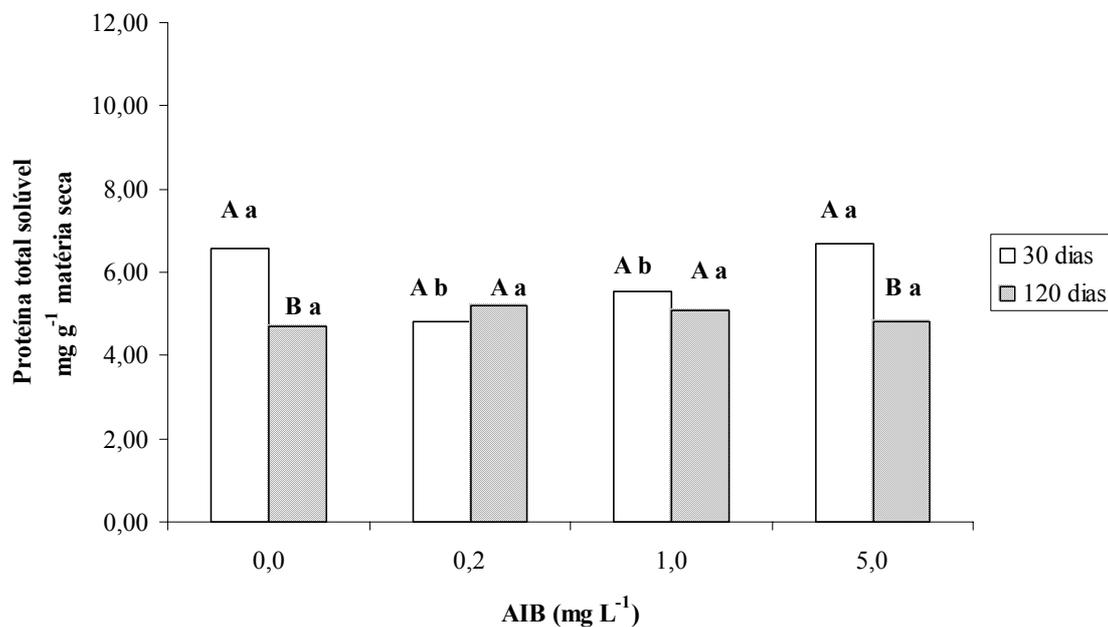


Figura 49. Efeito do AIB no teor de proteína total solúvel nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).

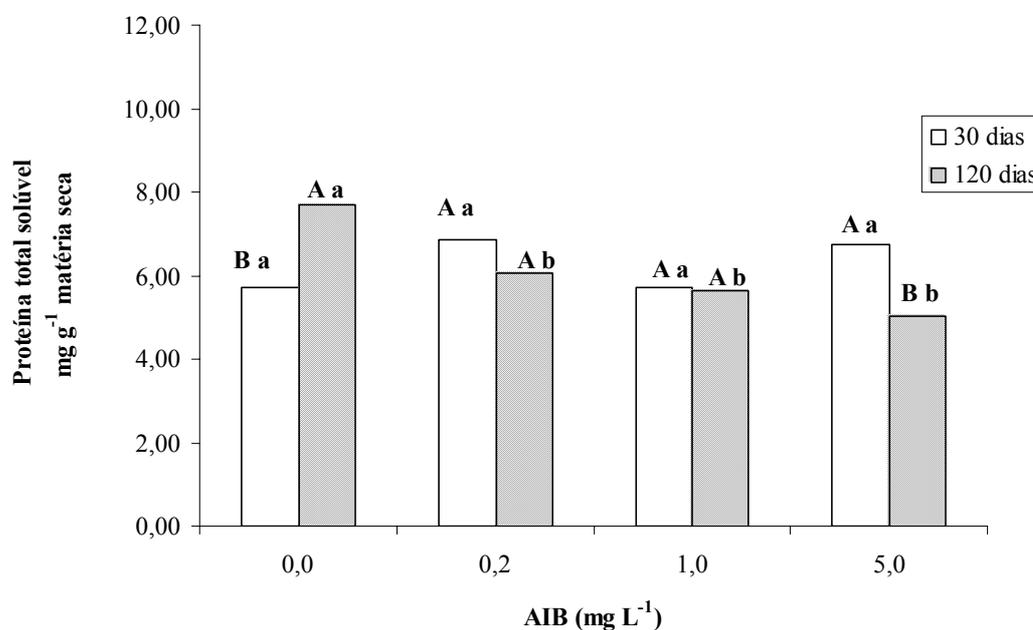


Figura 50. Efeito do AIB no teor de proteína total solúvel nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).

4.2.8. Efeito do ANA nos teores de proteína total solúvel de folhas, raízes e brotos

A Figura 51 mostra que aos 30 dias o teor de proteína total solúvel nas folhas com os tratamentos 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA foi estatisticamente igual ao controle sendo que o tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA não foi possível a coleta de material vegetal. Aos 120 dias o teor de proteína total solúvel nas folhas foi estatisticamente igual entre os tratamentos e comparando-os com 30 dias foram inferiores, exceto no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de AIB.

A figura 52 mostra que aos 30 dias o teor de proteína total solúvel nas raízes foi estatisticamente igual ao controle nos tratamentos com 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA. No entanto aos 120 dias o teor de proteína total solúvel nas raízes foi menor nos tratamentos com 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA em relação ao controle. No tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA aos 30 dias não apresentou teores de proteína total solúvel devido a não formação de sistema radicular. Porém aos 120 dias as amostras de raízes no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA tiveram menor teor de proteína total solúvel nas raízes em relação ao controle.

A figura 53 mostra o teor de proteína total solúvel nos brotos apenas no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA (não houve formação de brotos nas outras concentrações) aos 30 dias sendo que aos 120 dias teve efeito inibitório.

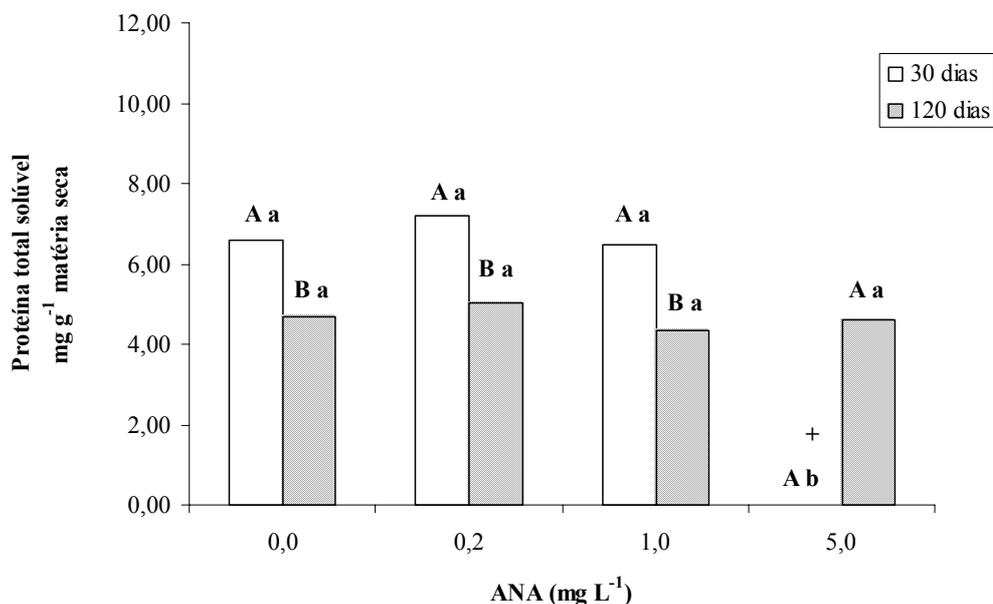


Figura 51. Efeito do ANA no teor de proteína total solúvel nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

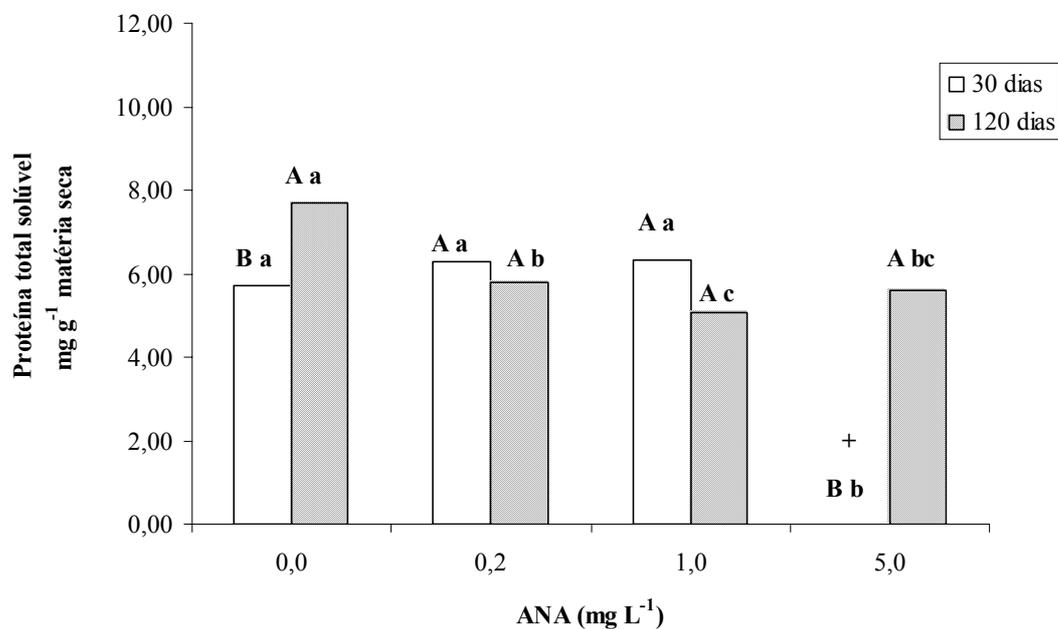


Figura 52. Efeito do ANA no teor de proteína total solúvel nas raízes no período de 30 e 120 dias letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado.

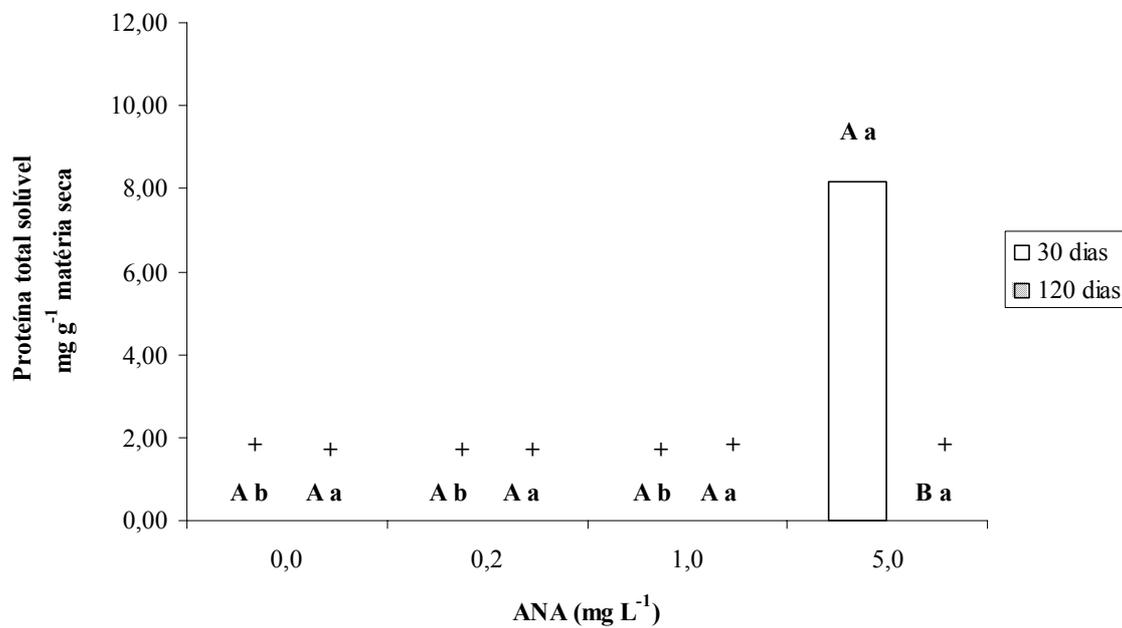


Figura 53. Efeito do ANA no teor de proteína total solúvel nos brotos no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

4.2.9. Efeito do 2,4-D nos teores de proteína total solúvel de folhas, raízes e brotos

A figura 54 mostra que aos 30 dias o teor de proteína total solúvel nas folhas foi igual no tratamento com $0,032 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D em relação ao controle, porém, aos 120 dias o teor de proteína total solúvel nas folhas foi maior no tratamento com $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. No tratamento com $0,800 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D houve efeito inibitório dos 30 aos 120 dias.

A figura 55 mostra que aos 30 dias o teor de proteína total solúvel nas raízes foi maior nos tratamentos com $0,032 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D em relação ao controle. O tratamento com $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D aos 30 dias não foi coletado amostras de raízes pois estas não se desenvolveram. Aos 120 dias os tratamentos com $0,032$ e $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D foram iguais em termos de proteína total solúvel de raízes porém foram inferiores ao controle. No tratamento com $0,800 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D teve efeito inibitório dos 30 dias aos 120 dias.

A figura 56 mostra que aos 30 e 120 dias o maior teor de proteína total solúvel nos brotos ocorreu nos tratamentos de $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, decaindo aproximadamente $1/3$ aos 120 dias. Outros tratamentos não formaram brotos.

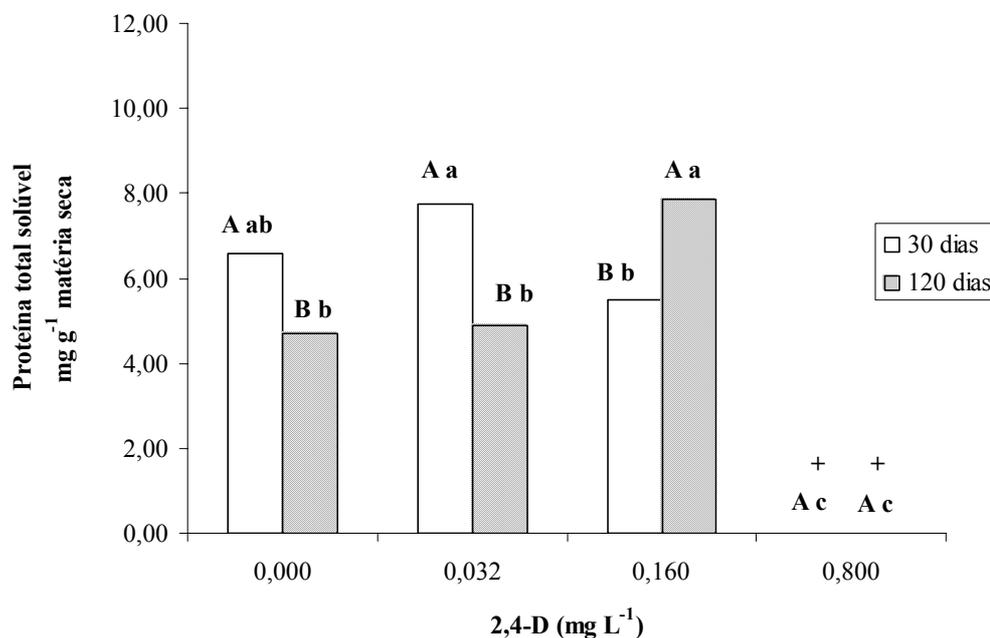


Figura 54. Efeito do 2,4-D no teor de proteína total solúvel nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

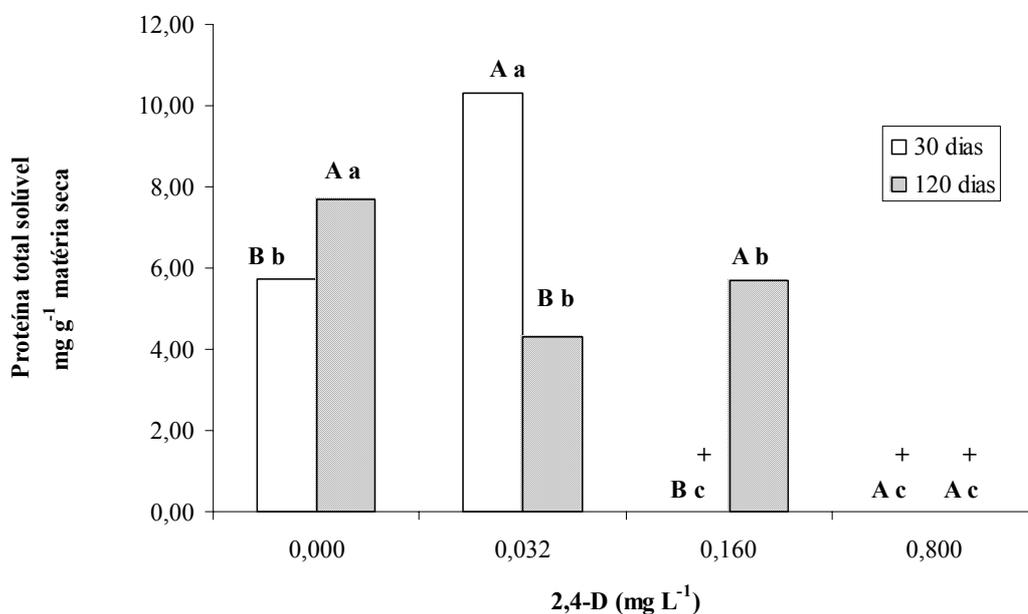


Figura 55. Efeito do 2,4-D no teor de proteína total solúvel nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5% e (+) = material não detectado).

5. Discussão

As auxinas desempenham importantes funções em quase todo o ciclo de vida da planta, como a divisão e expansão celular, desenvolvimento de tecidos vasculares e no processo de indução de raízes laterais, quando utilizadas em concentrações adequadas, nos tecidos ou células de cada espécie aptas a receberem estes estímulos (Friml 2003). As aplicações exógenas das auxinas proporcionam maior porcentagem, velocidade, qualidade e uniformidade de enraizamento (Hartmann *et al.* 1997). As diferentes respostas das auxinas estão relacionadas com o órgão vegetal, sendo que o excesso pode provocar efeitos inibitórios ou deletérios para a planta (Ljung *et al.* 2005).

Outros processos fisiológicos controlados pelas auxinas são o fototropismo, a dominância apical, o gravitropismo, a diferenciação vascular e o desenvolvimento de flores e frutos (Mercier 2004). As raízes são extremamente sensíveis às concentrações de auxinas quando comparadas as gemas ou caules. Para a indução de raízes geralmente utiliza-se um tratamento rápido (de minutos a algumas horas) deste tipo de regulador, iniciando a desdiferenciação de algumas células, tornando-as competentes a responder ao sinal da auxina para a rizogênese, seguindo-se a fase de diferenciação onde o estímulo hormonal não é mais necessário e a auxina, nesta etapa, tem ação inibitória (De Klerk 2002).

As auxinas de efeito herbicida como o 2,4-D (em baixas concentrações) e ANA (em altas concentrações) descontrolam a divisão celular, induzem à formação de calos, expandem as células, promovem o alongamento dos tecidos e podendo ocasionar a morte da planta (Tu *et al.* 2001). Nas dicotiledôneas o efeito herbicida está relacionado com a maior afinidade destas auxinas sobre os sítios ativos que induzem a síntese do etileno (Usui 2001).

O enraizamento *in vitro* é de grande importância econômica, de conservação e de preservação de espécies em coleções vivas pois aumenta a taxa de sobrevivência das

mudas quando estas passam para a fase de aclimatização. Esta etapa é considerada uma das fases mais críticas onde a parte aérea está mais exposta à luminosidade e a perda de água por transpiração além da baixa produção de cutícula na face adaxial das folhas (Pospisilova *et al.* 1999, Naves 2001). Para a reposição de água e nutrientes pelas raízes, poucos trabalhos foram realizados sobre a sua indução e o seu crescimento *in vitro* os quais favorecem o desenvolvimento da planta, proporcionando maior número de raízes novas e de folhas, além do aumento dos compostos de reservas (carboidratos solúveis, amido e proteínas solúveis totais) que poderão servir como fonte de energia e compostos bioquímicos para produção de novas estruturas funcionais (órgãos drenos) durante a fase de aclimatização. Hazarika *et al.* (2001) observaram várias taxas de sobrevivência de microestacas de *Citrus* sp. durante a fase de aclimatização devido a vários fatores limitantes como alta temperatura, baixa umidade relativa e ausência de nutrientes.

No presente trabalho, ocorreu indução e desenvolvimento de raízes em todos os tratamentos utilizados e, devido ao longo período de experimentação com auxinas, apresentou também efeitos inibitórios nos explantes iniciais e que posteriormente ocorreram novas formações das raízes. Estes dados são descritos a seguir.

5.1. Efeito do AIB no número, massa fresca e seca de raízes e folhas

A utilização de AIB para indução de raízes *in vitro* tem sido comercialmente aplicada a muitas espécies além de auxiliar o desenvolvimento da parte aérea, favorecendo a fase de aclimatização (Titon *et al.* 2003). O AIB é uma auxina pouco translocável na planta com efeito localizado na região aplicada (Ludwig-Müller 2000).

Satinder & Sarma (1997), observaram que tanto a parte aérea como a radicular dos explantes de *Dendrobium lindley* Steud se desenvolveram melhor em meio de cultura MS acrescido de 1,0 a 2,0 mg L⁻¹ de AIB. Nayak *et al.* (2002), após obterem a formação de

protocormóides em *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. e *Dendrobium nobile* Lindl., induziram a formação de raízes adicionando ao meio MS 2,0 mg L⁻¹ de AIB e que foram aclimatizados com sucesso. Wang (2002) induziu a formação de raízes após a fase de multiplicação em híbrido de *Dendrobium* com a utilização de 0,3 mg L⁻¹ de AIB.

Segundo Giridhar *et al.* (2003), após a multiplicação clonal de brotos de *Vanilla planifolia* Andr. cultivados em meio MS acrescido de AIB (0,5 mg L⁻¹), tiveram indução de raízes e 70-80 % dos explantes sobreviveram na fase de aclimatização.

Zanol *et al.* (1998) adicionaram 0,61 mg L⁻¹ de AIB ao meio MS antecipando a emergência e aumentando a quantidade de raízes adventícias em microestacas de macieira cultivadas *in vitro*, sendo que na sua ausência a porcentagem reduziu. Karwa & Chikhale (2004), após a germinação de sementes de *Citrus sinense* (L.) Osbeck, onde obtiveram explantes que se regeneraram em embriões com adição de 1,0 mg L⁻¹ BA e ANA no meio MS. Após a fase de multiplicação, foi adicionado ao meio MS de 1,0 a 5,0 mg L⁻¹ de AIB para indução de raízes, sendo que com 5,0 mg L⁻¹ foi o melhor tratamento. Pati *et al.* (2004) induziram o enraizamento *in vitro* em mudas de rosas com 2,0 mg L⁻¹ de AIB em meio MS durante 2 semanas. Após este período, os explantes foram inoculados em meio sem adição de reguladores de crescimento, durante 6 semanas, onde tiveram 90 % de sobrevivência.

Khawar & Özcan (2002) obtiveram maior número de raízes *in vitro* em mudas de lentilhas (*Lens culinaris* Medik) cultivadas durante 4 semanas em meio MS com a adição de 0,25 mg L⁻¹ de AIB, enquanto que na concentração de 0,5 a 2,0 mg L⁻¹ de AIB as raízes não cresceram.

No experimento as plantas de *P. amabilis* cultivadas *in vitro* apresentaram maior número de raízes no controle e no tratamento com de 0,2 mg L⁻¹ de AIB aos 120 dias. A massa fresca (figura 12) e seca (figura 14) das raízes apresentaram maior ganho aos 120

dias e não mostrou diferença significativa entre os tratamentos. Para a espécie *P. amabilis* pode-se concluir que a concentração de 0,2 mg L⁻¹ de AIB foi igual ao controle para o crescimento de raízes. Na prática, durante a passagem da planta para a fase *ex vitro*, quanto menor o número de raízes e maior o seu comprimento, maior a probabilidade de ocorrer injúrias nas raízes. Este fato reduz a base de sustentação da muda no substrato e também aumenta a probabilidade de contaminação devido às injúrias decorridas pelas lesões no contato com o substrato.

Os tratamentos prolongados (60 a 120 dias) com AIB não foram favoráveis ao crescimento e desenvolvimento da parte aérea da espécie *P. amabilis*. A quantidade (figura 9), a massa fresca (figura 11) e seca (figura 13) das folhas apresentaram-se constantes ou reduziram com o decorrer do experimento quando comparando com as plantas do início do tratamento e o controle.

5.2. Efeito do ANA no número, massa fresca e seca de raízes, folhas e brotos

O ANA é utilizado para promover o crescimento e desenvolvimento das raízes e da parte aérea (folhas e brotos) de muitas espécies cultivadas tanto *in vitro* como *ex vitro* (Blazich 1987), sendo um regulador de fácil translocação e atua em todas as partes da planta (Scott & Morris 1970, Woodward & Bartel 2005b).

Mujib & Jana (1994), induziram a formação de raízes em explantes de *Dendrobium* 'Madame Pompadour' utilizando 0,1 mg L⁻¹ de ANA. Mauro *et al.* (1994), trabalhando explantes de *Cattleya aurantiaca* (Bateman), obtiveram crescimento da biomassa das folhas e das raízes em meio MS acrescido de 10,0 mg L⁻¹ de ANA. Pindel & Miczynski (1996), relataram que a adição de 1,0 mg L⁻¹ de ANA e 5,0 mg L⁻¹ de BA no meio MS estimularam a formação de brotos através de fragmentos de folhas e raízes de *Cymbidium sinense* (Andr.) Willd. Satinder & Sarma (1997), trabalhando com *D. lindleyi* Steud,

observaram que os explantes se desenvolveram melhor em meio de cultura MS acrescido com 1,0 a 2,0 mg L⁻¹ de ANA. Lee *et al.* (1999) trabalhando com *Sarcanthus scolopendrifolius* Makino (Orchidaceae), induziram à formação de brotos com meio MS acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de ANA em conjunto com 10,0 mg L⁻¹ de BA.

Nayak *et al.* (1998) induziram raízes em explantes de *Cymbidium aloifolium* (L.) adicionando 1,0 mg L⁻¹ de ANA ao meio MS. Xiang *et al.* (2003), concluíram que houve maior taxa de sobrevivência em plantas de *Cymbidium sinensis* (Andr.) Willd. quando estas foram aclimatizadas após a indução do enraizamento *in vitro* com 1,0 mg L⁻¹ de ANA.

Buah *et al.* (1998), trabalhando com brotos de banana Nursey (*Musa* sp.), observaram que o meio MS acrescido de 0,4 mg L⁻¹ de ANA induziu maior número de raízes adventícias do que o meio sem ANA, porém, os resultados não foram significativos com relação ao número de folhas. Geetha *et al.* (2000), relataram que em meio MS acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de ANA e AIB induziram maior enraizamento em mudas de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) cultivadas *in vitro*.

No experimento, as concentrações de 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA não apresentaram resultados superiores de indução do número de raízes comparando-se com o controle (figura 16). O tratamento com 0,2 mg L⁻¹ favoreceu o ganho de massa fresca (figura 19 - legenda) e seca (figura 22 - legenda) das raízes, sendo superior ao controle e aos demais tratamentos dos 30 aos 120 dias.

O tratamento com ANA nas concentrações de 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ foram indiferentes ou inibitórias para o número (figura 15), massa fresca (figura 18) e seca (figura 21) de folhas dos 30 aos 120 dias quando comparadas ao controle.

O tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA em plantas de *P. amabilis* foi favorável à indução de brotos entre 30 e 60 dias (figura 17), com aumento da massa fresca (figura 20) e seca (figura 23) neste mesmo período, sendo que após este período o número, a massa

fresca e seca dos brotos reduziu devido ao longo tratamento com esta auxina, com efeitos herbicidas.

5.3. Efeito do 2,4-D no número, na massa fresca e seca de raízes, folhas e brotos.

O 2,4-D é uma auxina de baixo custo e de fácil translocação no tecido vegetal, comumente utilizada para controle e emergência de ervas daninhas no cultivo comercial. Aplicada em baixas concentrações induz o crescimento, o desenvolvimento e a expansão dos tecidos vegetais levando a planta a senescência e conseqüentemente à morte (Arditti & Ernst 1993, Tu *et al.* 2001).

Chen *et al.* (2000), trabalhando com *Phalaenopsis* sp. cultivada *in vitro*, concluíram que a utilização de 2,4-D em baixas concentrações (0,3 a 3,0 mg L⁻¹) foi favorável à indução de calos a partir de fragmentos de folhas, porém o mesmo não foi observado em explantes de folhas de plantas de *Oncidium* 'Gower Ramsey', onde a mesma concentração desta auxina não promoveu a produção de calos. Chen *et al.* (2002) observaram que o meio MS acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg L⁻¹ TDZ induziu a formação 60 % maior de protocormóides em híbrido de *Paphiopedilum*, sendo que para indução de raízes não foram adicionados reguladores de crescimento ao meio MS.

Spera *et al.* (1997) relataram que houve maior número da massa de calos de raízes de *Jatropha podagrica* Hook. (*Euphorbiaceae*) quando cultivadas em meio MS e acrescido com 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Foi observado visualmente que as raízes da espécie *P. amabilis* cresceram em extensão no controle e no tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D, confirmado com a razão da massa seca e número do número de raízes (figura 25). As raízes aumentaram em quantidade (figura 25), massa fresca e seca (figura 28 e 30) e obtiveram maior desenvolvimento (figura 28) na concentração de 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D dos 30 aos 60 dias,

sendo que após este período o número de raízes reduziu, porém sua massa seca manteve-se estável, indicando que este aumento de massa estava relacionado ao aumento de comprimento (figura 31).

O maior número de folhas (figura 24) ocorreu também no tratamento com 0,032 mg L⁻¹ aos 120 dias porém a maior massa fresca (figura 27) e seca (figura 30) das folhas foram observadas na concentração de 0,160 mg L⁻¹ aos 30 dias e 0,032 mg L⁻¹ aos 60 dias, respectivamente. Novamente observou-se o efeito herbicida durante o longo tratamento com esta auxina, com redução da massa fresca e seca significativa em 90 e 120 dias.

A indução de brotos ocorreu somente no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D e apresentou aumento do número (figura 26), da massa fresca (figura 29) e seca (figura 32) de brotos dos 30 aos 60 dias, sendo que após este período a massa fresca e seca dos brotos reduziu com visíveis efeitos deletérios deste herbicida.

5.4. Teores de carboidratos solúveis

Stancato *et al.* (2002) descreveram em pseudobulbos de *Cattleya forbesii* Lindl. *X Laelia tenebrosa* Rolf. a translocação de compostos de reserva da parte aérea (madura) para outras partes que estavam em desenvolvimento, mostrando uma relação direta da fonte (partes maduras fotossintetizantes) e dreno (tecidos jovens em desenvolvimento).

Suzuki (2005) comparou as quantidades de carboidratos solúveis da parte aérea de em relação às regiões subapicais de *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl e observou uma relação inversa entre as duas porções analisadas, onde a parte aérea continha aproximadamente 25 mg g⁻¹ de massa fresca de carboidratos solúveis e a parte subapical uma concentração menor com aproximadamente 5,0 mg g⁻¹ de massa fresca.

Os teores de carboidratos solúveis das raízes (figuras 34, 36 e 39) nos controles de *P. amabilis*, aumentaram dos 30 aos 120 dias, sendo que nas folhas (figuras 33) a quantidade de carboidratos solúveis reduziu. Com a adição das auxinas AIB e 2,4-D, os teores de carboidratos solúveis nas raízes reduziram dos 30 aos 120 dias (figuras 34 e 39), para ANA permaneceu constante (figura 36) e nas folhas, para as três auxinas, reduziram (figuras 33, 35 e 38) aos 120 dias quando comparados aos 30 dias.

Os teores de carboidratos solúveis nos brotos induzidos com 5,0 mg L⁻¹ de ANA (figura 37) e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D (figura 40) foram altos (aproximadamente 250 mg g⁻¹ de massa seca para ambos) aos 30 dias quando comparados aos demais órgãos, sendo que em 2,4-D reduziu aos 120 dias para 50 mg g⁻¹ de massa seca.

Os tratamentos com auxinas em folhas e raízes de *P. amabilis* cultivadas *in vitro* apresentaram variações de carboidratos solúveis provavelmente relacionados ao maior desenvolvimento observado na massa seca dos 30 aos 120 dias e os efeitos positivos e/ou inibitórios das diferentes concentrações de auxinas no decorrer do período analisado.

5.5. Teores de amido

Li *et al.* (2003) verificaram que grãos de amido encontrados nos explantes *in vitro* de *Cymbidium sinense* (Andr.) Willd. estavam em maior concentração nas raízes maduras do que em raízes novas. O mesmo foi observado em *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. (Suzuki 2005), onde verificou a ocorrência de um antagonismo entre parte aérea e subapical, com a maior concentração de amido na parte aérea em estágio maduro (aproximadamente 23 mg g⁻¹ de massa fresca) e na parte subapical, em fase de desenvolvimento, com aproximadamente 2,0 mg g⁻¹ de massa fresca.

Schittenhelm *et al.* (2004) observaram que os teores de amido das folhas de batata selvagem e transgênica cultivadas em casa de vegetação com $220 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ tiveram redução dos 20 aos 120 dias evidenciando a translocação quase total destas reservas para o tubérculo, já no final do ciclo de crescimento.

Os teores de amido nos controles de raízes de *P.amabilis* (figura 42, 44 e 47) foram maiores aos 120 dias quando comparados aos 30 dias. Com a adição de reguladores de crescimento, as concentrações de amido nas raízes aumentaram com 30 dias no tratamento com AIB (figura 42), 2,4-D (figura 47). No tratamento com ANA (figura 44), os teores de amido foram estáveis com 0,2 e 1,0 mg L^{-1} em 30 e 120 dias enquanto que a menor concentração foi encontrada com 5,0 mg L^{-1} aos 120 dias.

Os teores de amido nas folhas dos tratamentos com AIB (figura 41), ANA (figura 43) e 2,4-D (figura 46) foram maiores aos 30 dias quando comparados aos 120 dias.

Nos brotos induzidos, no tratamento com 2,4-D (figura 48) na concentração de 0,160 mg L^{-1} , os teores de amido foram altos (200 mg g^{-1} de massa seca) aos 30 dias, sendo que reduziram 4 vezes aos 120 dias, possivelmente devido a ação deletéria desta auxina nestes tecidos.

5.6. Teores de proteína total solúvel

Silveira *et al.* (2004) observaram que os níveis de proteína intracelulares aumentaram durante a fase de crescimento nas células de *Pinus taeda* L. em cultura de suspensão de embriões quando foi adicionado ao meio 2,4-D (0,44 mg L^{-1}) e ao mesmo tempo os níveis de amido reduziram.

A redução dos teores de proteína solúvel total, de 350 para 125 mg g^{-1} de massa seca, também foi observada em folhas fotossintetizantes de batata selvagem (*Solanum tuberosum* L.) e batata transgênica, cultivadas 120 dias em condições *ex vitro*

(Schittenhelm *et al.* 2004), estando relacionadas com o final do ciclo de crescimento com reassimilações dos compostos para o órgão de armazenamento.

Os teores de proteína total solúvel apresentaram pequenas variações, entre 5,0 e 8,0 mg g⁻¹ de massa seca, nas folhas do experimento de *P. amabilis* (figura 49, 51 e 54), nas raízes (figura 50 e 52) e nos brotos (figura 53) dos tratamentos com AIB e ANA. No tratamento com 0,032 mg L⁻¹ de 2,4-D, os teores de proteína solúvel total das raízes foram superiores a 10 mg g⁻¹ de massa seca possivelmente relacionados com a fase inicial do órgão, com tecidos em multiplicação e em diferenciação (figura 55) e nos brotos no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D aos 30 dias (figura 56).

6. Conclusões

O meio Murashige & Skoog (1962) é favorável ao desenvolvimento de explantes do gênero *Phalaenopsis*, com crescimento vegetativo de 62 % dos cultivos *in vitro* (Park *et al.* 2002) e os meios de Lindemann *et al.* (1970) e Knudson (1946) proporcionaram menor desenvolvimento (10 a 25 %). O meio MS é utilizado em cultura *in vitro* em vários gêneros da família Orchidaceae podendo citar o trabalho de Martin (2003) com *Ipsea malabarica*, Lu *et al.* (2002) com *Phalaenopsis* sp., Chen *et al.* (2002) com *Paphiopedilum* sp., Sobhana & Rajeevan (2002a) com *Dendrobium* sp., Yang *et al.* (2002) com *Cymbidium* sp. e Torres & Mogollon (2002) com *Cattleya mossie*, entre outros.

Os tratamentos com as auxinas AIB, ANA e 2,4-D, de um modo geral, promoveram o desenvolvimento das raízes de *P. amabilis* notadamente quando se analisa o aumento da massa seca. As partes aéreas (folhas e brotos) apresentaram-se estáveis ou diminuíram quanto ao número, matéria fresca e seca, evidenciando a partição de nutrientes entre as raízes em pleno desenvolvimento e a parte aérea sem crescimento, em início de processo

de senescência quando cultivadas *in vitro* por longos períodos em tratamento com auxinas principalmente em altas concentrações (Figuras 13, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

Os efeitos das auxinas na produção de gemas e no crescimento também foram observados com a indução de alguns brotos ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D) os quais posteriormente conduziram à formação de uma massa compacta de células, de crescimento radial, de cor esverdeada, sendo este um dos efeitos herbicidas iniciais que interferem no desenvolvimento das plantas além do início do processo de senescência. Não foram observados a perda da dominância apical ou o crescimento de mudas laterais, possivelmente devido ao longo tratamento com auxinas, apresentando os efeitos herbicidas nos tratamentos já relatados anteriormente.

Observa-se que, para a variável biométrica, o controle obteve melhores resultados quanto ao número massa fresca e seca de raízes e folhas dos 30 aos 120 dias, porém o tratamento com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB foi superior em relação à massa seca de folhas aos 120 dias (figura 57 A), o tratamento com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (média geral) para as raízes (figura 57 B) e o tratamento com 2,4-D ($0,032 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ aos 30, 60, 90 e 120 dias) para as folhas e raízes (figura 57 C).

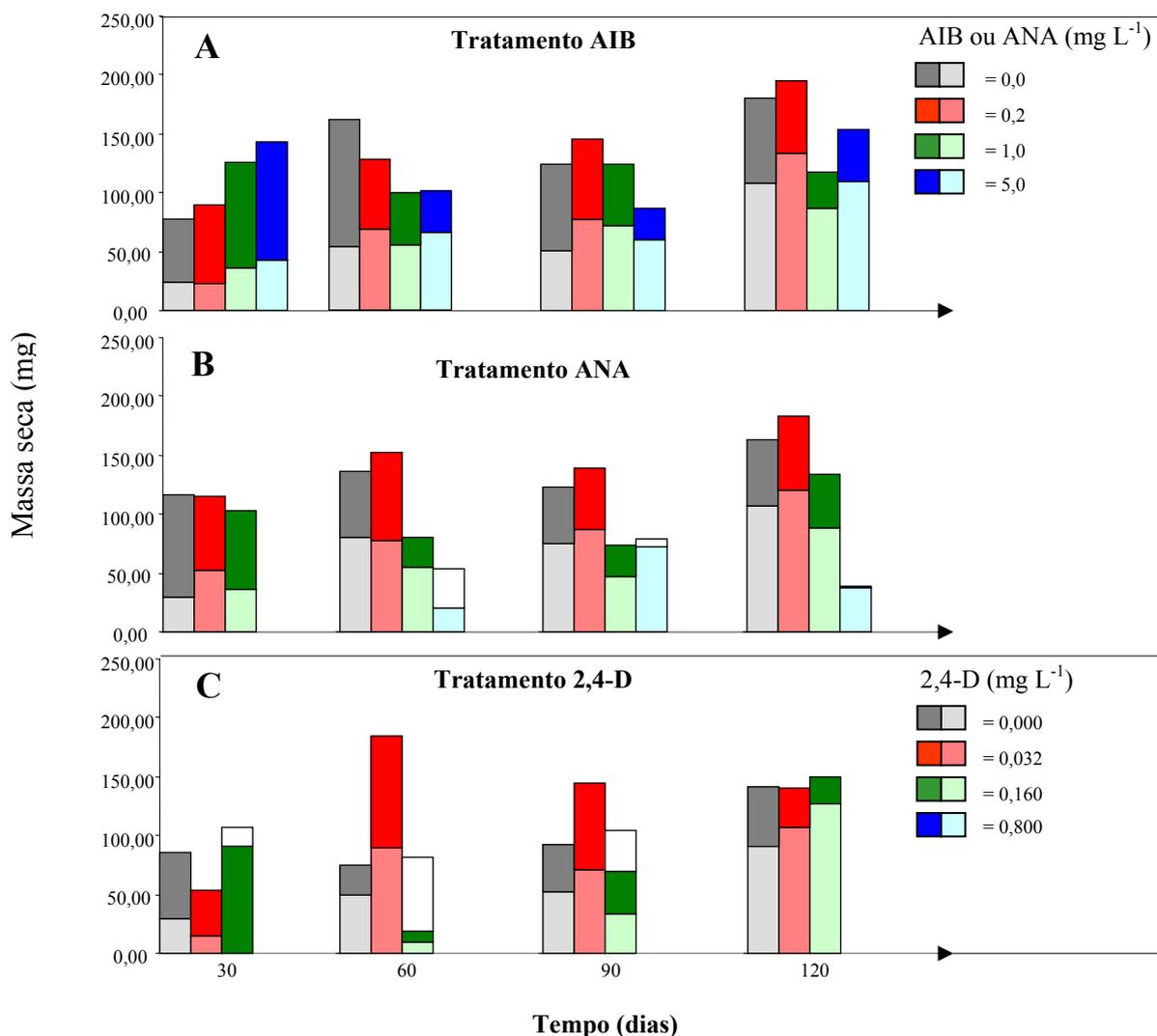


Figura 57 – Comparação da massa seca das folhas, raízes e brotos em diferentes concentrações de AIB (A), ANA (B) e 2,4-D (C) aos 30, 60, 90 e 120 dias; Barras escuras = massa seca de folhas, barras claras = massa seca de raízes e barras em branco = massa seca de brotos.

Em termos de carboidratos de reserva (solúveis e amido), quantificou-se aproximadamente 425 mg g^{-1} de massa seca de folhas no tratamento com $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D aos 30 dias (figura 58 G). Nas raízes a maior quantidade de carboidratos de reserva (solúveis e amido) foi aproximadamente 480 mg g^{-1} de massa seca no tratamento com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB aos 30 dias (figura 58 B).

Os teores de proteína total solúvel de folhas e raízes apresentaram-se constantes (figuras 58 A, B, D, E, G, H e I) exceto os de brotos que foram superiores a 10 mg g⁻¹ de massa seca (figura 56).

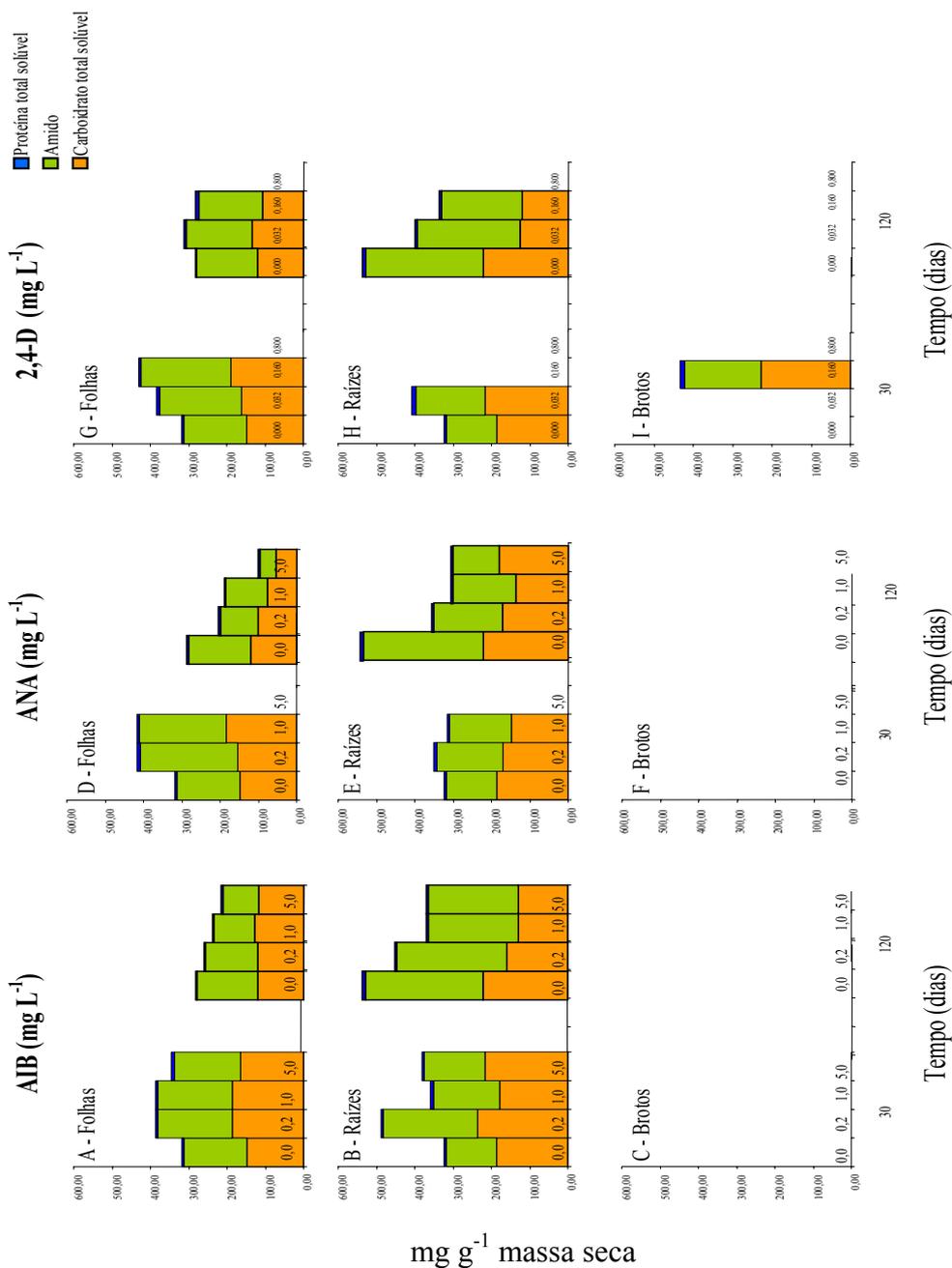


Figura 58 – Comparação dos teores de carboidratos solúveis totais, amido e proteína total solúvel de folhas (A, D e G), raízes (B, E e H) e brotos (C, F e I) em diferentes concentrações (mg L⁻¹) de AIB (A, B e C), ANA (D, E e F) e 2,4-D (G, H e I) aos 30 e 120 dias.

Os trabalhos com a família Orchidaceae relacionando o crescimento em condições de cultura e os compostos bioquímicos encontrados de folhas e raízes são escassos e, comparando-se com *Solanum tuberosum* L., uma dicotiledônea com tubérculo rico em amido (60 a 75 % de peso seco), pode-se considerar tanto a folha e a raiz de *P. amabilis* como rico em carboidratos (solúveis e amido) com possibilidades de re-mobilização nas condições de cultura utilizadas bem como a capacidade fotossintetizante principalmente das raízes nesta espécie. Para a batata inglesa cultivada em casa de vegetação (Schittenhelm *et al.* 2004), a quantidade máxima de carboidratos solúveis totais e de amido nas folhas foi, respectivamente, de 80 mg g⁻¹ de matéria seca aos 90 dias de cultivo e 40 mg g⁻¹ de matéria seca aos 20 dias de cultivo. Folhas de *P. amabilis*, apresentaram maiores quantidades, principalmente em carboidratos solúveis totais em AIB (0,2 mg L⁻¹), ANA (1,0 mg L⁻¹) e 2,4-D (0,160 mg L⁻¹) que corresponderam aproximadamente 180 mg g⁻¹ de massa seca aos 30 dias. Para amido em folhas de *P. amabilis* observa-se também um acúmulo maior (200 e 250 mg g⁻¹ de massa seca) nos tratamentos de AIB (0,2 e 1,0 mg L⁻¹), ANA (0,2 e 1,0 mg L⁻¹) e 2,4-D (0,032 e 0,160 mg L⁻¹) resultando em uma taxa de reserva 5 vezes maior.

As raízes de batata inglesa apresentaram no máximo 50 mg g⁻¹ de matéria seca aos 20 dias (Schittenhelm *et al.* 2004) enquanto que nas raízes de *P. amabilis*, entre quase 240 mg g⁻¹ de matéria seca em AIB (0,2 mg L⁻¹) aos 30 dias e aproximadamente 100 mg g⁻¹ de matéria seca em AIB (5,0 mg L⁻¹) e 2,4-D (0,032 e 0,160 mg L⁻¹) aos 120 dias ambos com concentrações 4 vezes superiores. O teor de amido nas raízes variou de 100 mg g⁻¹ de massa seca no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de AIB aos 120 dias e a quase 280 mg g⁻¹ de matéria seca (AIB 0,2 mg L⁻¹ aos 120 dias), enquanto que em batata inglesa não há descrição, porém pode-se considerar também as raízes como órgão de acúmulo de amido.

As folhas de batata inglesa apresentaram o maior teor de proteína solúvel aos 20 dias de cultura em casa de vegetação ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com 320 mg g^{-1} de matéria seca e as folhas de *P. amabilis*, entre $5,0$ e $8,0 \text{ mg g}^{-1}$ de matéria seca em cultura *in vitro* com $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, bem abaixo de folhas com o processo fotossintetizante em plena atividade. As comparações entre as raízes de *S. tuberosum* aproximadamente 140 mg g^{-1} de matéria seca aos 20 de cultura e *P. amabilis* entre $5,0$ e $8,0 \text{ mg g}^{-1}$ de matéria seca apresentou também uma diferença de 10 vezes. Os resultados mostram que as proteínas totais solúveis presentes nas raízes fotossintetizantes e nas partes aéreas de *P. amabilis* provavelmente não são proteínas de reserva como as encontradas em tubérculos de batata inglesa e em sementes de soja. Possivelmente estão relacionadas com enzimas e sua síntese, coenzimas, ácidos nucleicos e clorofila e do metabolismo primário vegetal.

Segundo Debergh & Maene (1981), as raízes desenvolvidas *in vitro* não são funcionais porém as análises bioquímicas dos explantes de *P. amabilis* cultivados *in vitro* apresentaram acúmulo de compostos orgânicos que na fase de aclimatização poderiam ser re-mobilizados e translocados para novos tecidos em formação.

Arditti (1992) considera que a fisiologia da família Orchidaceae é variada e complexa e as orquídeas epífitas podem ser consideradas modelos interessantes de desenvolvimento vegetal, possuindo características incomuns relacionadas ao controle hormonal do crescimento da parte aérea e das raízes.

A produção de explantes adequados de *P. amabilis* para a fase de aclimação, ou seja, com raízes induzidas que sejam funcionais na fase *ex vitro*, apresentando a maior concentração de compostos orgânicos armazenados tanto em folhas como em raízes, no menor período de tempo e com a mínima manipulação laboratorial é descrito a seguir: (1) o explante a ser propagado deve ter alguns primórdios de raízes ou inocular com todo o

sistema radicular; (2) a indução de raízes, o aumento da massa seca de raízes, o maior acúmulo de carboidratos solúveis neste órgão em 20-30 dias de cultura ocorre com um tratamento de $0,032 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D; (3) o aumento da massa seca das folhas em 30-60 dias ocorre com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB; e (4) possível associação balanceada com os reguladores que apresentaram maior concentração de amido (ANA a $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ou 2,4-D a $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ em 30 dias de cultivo) além da possibilidade de uso conjunto de citocininas para o incremento da massa seca das folhas.

A formação de novas folhas e raízes funcionais dependerá da indução na fase *in vitro* ou já na fase de aclimatização, com a mobilização das reservas existentes nos tecidos vegetais. A sacarose e o amido (fontes de esqueleto de carbono e energia) e as proteínas de peptídeos re-assimiláveis (degradação via proteases e como fonte de amino-ácidos para novas sínteses de enzimas) permitem o aumento da taxa de divisão celular, o seu crescimento inicial e estabelecimento como organismo autotrófico. Por tanto, quanto maior a disponibilidade de compostos orgânicos re-assimiláveis (carboidratos totais solúveis, amido e proteína total solúvel), as chances de sobrevivência destes explantes serão maiores quando estes são passados da fase *in vitro* para *ex vitro*.

7. RESUMO

O objetivo do trabalho foi de estudar os efeitos das auxinas AIB, ANA e 2,4-D na indução de raízes, no crescimento da planta e nos teores endógenos de carboidratos solúveis totais, amido e proteínas totais solúveis no cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume (Orchidaceae).

Plantas de *P. amabilis*, obtidas por semeadura *in vitro*, tiveram suas raízes excisadas e foram inoculadas em meio MS modificado suplementado com AIB e ANA (0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹), e 2,4-D (0,000, 0,032, 0,160 e 0,800 mg L⁻¹). Os parâmetros biométricos avaliados foram: a quantidade, a massa de matéria fresca e seca de raízes, folhas e brotos aos 30, 60, 90 e 120 dias, após o início da experimentação. Os parâmetros bioquímicos analisados foram os teores endógenos de carboidratos solúveis totais, de amido e de proteína solúvel total de raízes, folhas e brotos aos 30 e 120 dias.

Os parâmetros biométricos apresentaram padrões de crescimento diferentes. AIB mostrou efeito deletério para a variável número de folhas, e a tendência de acúmulo de matéria seca e fresca em raízes; ANA mostrou-se tóxico na concentração de 5 mg L⁻¹ e teve efeito deletério no crescimento da parte aérea, porém estimulou seu crescimento quando na concentração de 0,2 mg L⁻¹ e o 2,4-D apresentou efeito herbicida na maior concentração, em baixa concentração o 2,4-D estimulou o crescimento da parte aérea e na concentração de 0,160 mg L⁻¹ a emissão de raízes.

Os teores de carboidratos solúveis nas folhas apresentaram padrões semelhantes para todos os tratamentos, sendo que aos 30 dias houve aumento dos teores endógenos em função do aumento na concentração das auxinas e aos 120 dias uma diminuição, destes teores, em função do aumento da concentração e sua diminuição em função das datas de coleta, indicando a mobilização destes carboidratos. Nas raízes o AIB e 0,032 mg L⁻¹ de

2,4-D diminuíram os teores de carboidratos em função do tempo e das concentrações dos reguladores vegetais, enquanto que em ANA não houve diferença entre datas de coleta.

Os teores de amido nas folhas não variaram para as testemunhas, porém apresentaram diminuição entre datas de coleta (30 dias para 120 dias) em todos os tratamentos; nos tratamentos com AIB e 2,4-D houve acúmulo de amido nas raízes em função do tempo. ANA apresentou os menores valores para amido aos 120 dias.

Os teores de proteínas solúveis totais nas folhas para os tratamentos com AIB permaneceram constantes, diminuíram em função do tempo para ANA e, para 2,4-D aumentaram significativamente na concentração de $0,160 \text{ mg L}^{-1}$; nas raízes, o tratamento 2,4-D apresentou na concentração de $0,032 \text{ mg L}^{-1}$ diminuição significativa da sua concentração.

Os resultados mostram que a espécie apresenta diferentes respostas de crescimento em função dos reguladores vegetais e suas concentrações. As análises bioquímicas mostraram a existência de atividade metabólica com degradação e acúmulo de substâncias em folhas, raízes e brotos, mostrando que mesmo sendo uma espécie epífita, suas raízes além de sustentação, contribuem para a manutenção do metabolismo da planta.

8. ABSTRACT

This work aimed to evaluate the effects of the auxins IBA and NAA and 2,4-D in roots induction, plant growth and soluble carbohydrates, starch and total soluble protein endogenous levels in *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume (Orchidaceae) cultured *in vitro*.

Rootless *P. amabilis* plants, obtained by *in vitro* seed sowing were inoculated in modified MS media supplemented with IBA and NAA (0,0, 0,2, 1,0 and 5,0 mg L⁻¹) and 2,4-D (0,000, 0,032, 0,160 and 0,800 mg L⁻¹). The biometrics parameters evaluated were: roots and leaves number, roots, leaves and shoots fresh and dry weights during 30, 60 90 and 120 days, after the beginning of the experiment. The biochemical parameters: endogenous levels soluble carbohydrates, starch and total soluble protein in roots, leaves and shoots during 30 and 120 days were analyzed.

The auxins showed different biometrics pattern growth. IBA showed a decreased effect in leaves of number, and a tendency of fresh and dry weight accumulation in roots; NAA shown be toxic in the concentration of 5 mg L⁻¹ and an had harmful effect in leaves growth and however the concentration 0,2 mg L⁻¹ stimulated it; high concentration of 2,4-D showed an herbicide effect, low concentration of 2,4-D stimulated leaves growth and the concentration of 0,160 mg L⁻¹ stimulate roots growth.

Carbohydrates levels in leaves showed similar patterns for all treatments, at day 30 data collection there were increase in the endogenous carbohydrates level as the concentration of auxins raised and at the 120 days a decrease of these levels as concentration and collection dates raised, showing the mobilization of these carbohydrates. IBA and 0,032 mg L⁻¹ of 2,4-D decreased carbohydrates levels as collected time and growth regulators concentrations raised, while for NAA there wasn't difference among the collections dates.

The leaves starch levels didn't modify in the control treatment, however in all of the treatments, the starch levels decreased from 30 to 120 days, for AIB and 2,4-D treatments there were starch accumulation in roots in function of collected dates, no variation in starch levels were in NAA treatments, between data collection date. NAA showed the smallest values for starch at 120 days.

The total soluble proteins levels of leaves for AIB treatments stayed constant, they decreased from 30 to 120 days, NAA and 2,4-D had a significantly increased at 0,160 mg L⁻¹; the 2,4-D concentration of 0,0032 mg L⁻¹ decreased total soluble proteins levels in roots.

The results showed that the species presents different growth patterns as growth regulators class and their concentrations changes. The biochemical analyses showed that exist metabolic activity with degradation and accumulation of substances in leaves, roots and shoots demonstrating, in spite of the epiphyt habit, their roots contribute to the maintenance of plant metabolism.

9. Literatura citada

- Arditti, J.** 1984. Orchid biology: review and perspectives. Ed. Joseph Arditti Inc., New York, 432p.
- Arditti, J.** 1992. Fundamentals of orchid biology, Ed. John Wiley & Sons Inc., New York, 691p.
- Arditti, J. & Ernst, R.** 1993. Micropropagation of orchids. Ed. John Wiley & Sons Inc., New York, 682p.
- Assis, T.F. & Teixeira, S.L.** 1998. Enraizamento de plantas lenhosas. *In:* A.C. Torres & L.S. Caldas (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, pp. 261-296.
- Avadhani, P.N., Goh, C.J., Rao, A.D. & Arditti, J.** 1990. Carbon fixation. *In:* J. Arditti (ed.). Orchid biology review and perspectives, II. Wiley-Interscience, New York, pp. 175-193.
- Bachelard, E.P. & Stowe, B.B.** 1963. Growth in vitro of roots of *Acer rubrum* L. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Physiologia Plantarum* 16: 20-30.
- Badenhuizen, N.P.** 1965. Occurrence and development of starch in plants. *In:* R.L. Whistler & E.P. Paschall (eds.). Starch chemistry and technology: Fundamental aspects. Academic Press, New York, pp. 65-70.
- Bais, H.P., Loyola-Vargas, V.M., Flores, H.E. & Vivanco J.M.** 2001. Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 37: 730-741.

- Blazich, F.A.** 1987. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. *In:* T.D., Davies, B.E., Haissig & N., Sankhla, (eds). Adventitious root formation in cutting, Discorides Press, Portland, pp. 132-149.
- Bosa, N., Calvete, E.O., Nienow, A.A. & Suzin, M.** 2003. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. *Horticultura Brasileira* 21: 207-210.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-252.
- Bridges, I.G., Hilmann, J.R. & Wilkins, M.B.** 1973. Identification and localisation of auxin in primary roots of *Zea mays* by mass spectrometry. *Plant* 115: 189-192.
- 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.
- Caldas, L.S., Haridasan, P. & Ferreira, M.E.** 1998. Meios nutritivos. *In:* A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, I. Embrapa, Brasília, pp. 87-132.
- Carvalho, M.M.** 1978. Formação de mudas. *Informe Agropecuário* 4: 14-18.
- Chen, Y.C., Chang, C. & Chang, W.C.** 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 36: 420-423.
- Chen, T.Y.; Chen, J.T. & Chang, W.C.** 2002. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* Orchids. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 38: 595-597.

- Chen, J.T. & Chang, W.** 2004. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* Shimadzu. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 40: 290-293.
- Chu, E.P. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 241-249.
- Coruzzi, G. & Last, R.** 2000. Amino acids. *In: B.B. Buchanan, W. Gruissem & L. Russel Jones* (eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 358-411.
- Cozai, T. & Kitaya, Y.** 1995. Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. *In: M. Terzi, R. Cella, A. Falavigna* (eds.). *Current Issues in Plant Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Londres, pp. 659-667.
- Davies, P.J.** 1995. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. *In: P.J. Davies* (ed.). *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-12.
- De Klerk, G.J.** 2002. Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 38: 415-422.
- De Proft, M.P., Maene, L.J. & Deberg, P.C.** 1985. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* sp. culture *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 65: 375-379.
- Debergh, P.C. & Maene, L.J.** 1981. A scheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* 14: 35-345.
- Debergii, P.C.** 1991. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. *Acta horticulturae* 289: 291-300.

- Dore, J. & Williams, W.T.** 1956. Studies in the regeneration of horseradish. II - correlation phenomena. *Annals of Botany* 20: 231-249.
- Dubois, M., Gille, K.A., Hamilton, J.K., Rebes, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determinations of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Faria, R.T., Rodrigues, F.N., Oliveira, L.V.R. & Müller, C.** 2004. Crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) sob diversas concentrações de sacarose. *Horticultura Brasileira* 22: 780-783.
- Ferreira, M.E., Caldas, L.S. & Pereira, E.A.** 1998. Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. *In*: A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, pp. 21-43.
- Ford, Y.Y., Bonham, E.C., Cameron, P.S., Blake, Judd, H.L. & Harrison-Murray, R.S.** 2002. Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy and a difficult to root plant. *Plant Growth Regulation* 36: 149-159.
- Friml, J.** 2003. Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 7-12.
- Geetha, S., Padmanabhan, D., Manuel, W.W. & Ayyamperumal, A.** 2000. *In vitro* production of sugarcane plants. *Sugar Tech* 2: 47-48.
- Gianfagna, T.J.** 1988. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops. *In*: P.J., Davis (ed.). *Plant Hormones and their role in plant growth and development*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 614-635.
- Giatti, L.** 2005. Estabelecimento e regeneração de gemas do híbrido *BLC*. Owen Holmes Ponkan x *Brassavola digbiana* n^o 2 em diferentes concentrações de BAP (6-Benzilaminopurina). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 58p.

- Gibson, S.I.** 2000. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology* 124: 1532-1539.
- Gill, R.A. & Jackson, R.B.** 2000. Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytologist* 147: 13-31.
- Giridhar, P., Ramu, D.V. & Ravishankar, G.A.** 2003. Phenyl acetic acid induced *in vitro* shoot multiplication of *Vanilla planifolia*. *Tropical Science* 43: 92-95.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A.** 1990. Micropropagação. *In*: A.C. Torres & L.S. Caldas (eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, pp. 99-169.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A.** 1998. Micropropagação. *In*: A.C. Torres & L.S. Caldas (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, pp. 183-260.
- Grout, B.W.W. & Aston, M.J.** 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture, I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Horticulture Research* 17: 1-7.
- Guimarães, R.J.** 1994. Análise do crescimento e da quantificação de nutrientes de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) durante seus estádios de desenvolvimento em substrato padrão. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras 113p.
- Gutmann M., Von Aderkas, P., Label, P. & Lelu M.** 1996. Effects of abscisic acid on somatic embryomaturation of hybrid larch. *Journal Experimental Botany* 47: 1905-1917.
- Haissig, B.E.** 1972. Meristematic activity during adventitious root primordium development: influences of endogenous auxin and applied gibberellic acid. *Plant Physiology* 49: 886-892.

- Harper, T.** 2004. *Phalaenopsis* culture: advice for growing 20 species. Orchids magazine 73: 118-127.
- Hartmann, H.T. & Kester, D.E.** 1983. Plant propagation: principles and practices, 4 ed., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, 727 p.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, J.R. & Geneve, R.L.** 1997. Plant propagation: Principles and Practices, 6 ed., Prentice-Hall Inc., New Jersey, 770 p.
- Hazarica, B.N., Parthasarathy, V.A. & Nagaraju, V.** 2001. Influence of *in vitro* preconditioning of *Citrus* microshoots with paclobutrazol on *ex vitro* survival. Acta Botanica Croatica 60: 25-29.
- Hazarica, B.N.** 2003. Acclimatization of tissue culture plants. Current Science 85: 1174-1712.
- Holtum, R.E.** 1996. Orchid growing in the tropics. Times Ediction, Singapore, 207 p.
- Itai, C. & Birnbaum, H.** 1996. Synthesis of plant growth regulators by roots. *In*: Y. Waisel, A. Eshel & V. Kafkafi (eds.) Plant roots: the hidden half. Marcel Dekker, New York, pp. 273-284.
- Karwa, A.S. & Chikhale, N.J.** 2004. Effect of various growth hormones on *in vitro* clonal propagation of *Citrus sinense* (L.) Osbeck. Recent trends in biotechnology, India, pp. 192-195.
- 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.

- Kerbaudy, G.B.** 1998. Cultura de raízes e regeneração de plantas. *In*: A.C. Torres & L.S. Caldas (eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, pp. 161-181.
- Khawar, K.M. & Özcan, S.** 2002. Effect of indole-3-butyric acid on *in vitro* root development in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Turk Journal Botany* 26: 109-111.
- Kikuchi, S.** 2006. Semeadura, multiplique. *Como cultivar orquídeas* 16: 16-19.
- Knudson, L.** 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- Koch, K.E.** 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review Plant Physiology* 47: 509-540.
- Krapp, A., Hofmann, B., Schäfer, C. & Stitt, M.** 1993. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the “sink regulation” of photosynthesis ?. *Plant Journal* 3: 817-828.
- Kraus, J.E., Kerbaudy, G.B. & Monteiro, W.R.** 2004. Aspectos histoquímicos da formação de protocormóides em ápices radiculares de *Catasetum pileatum* cultivados *in vitro*. *In*: F. Barros, & G.B. Kerbaudy (eds.). *Orquidologia Sul Americana: uma compilação científica*. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 85-89.
- Lee, J.S., Lee, J.M., So, I.S. & Kang, K.W.** 1999. Effect of medium and plant growth regulators on *in vitro* growth of *Sarcanthus scolopendrifolius*. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 40: 742-746.
- Léon, P. & Sheen, J.** 2003. Sugar and Hormones connections. *Trends in Plant science* 8: 110-115.

- Li, C.R., Liang, Y.H. & Hew, C.S.** 2002. Responses of Rubisco and sucrose-metabolizing enzymes to different CO₂ in a C₃ tropical epiphytic orchid *Oncidium goldiana*. *Plant Science* 163: 313-320.
- Li, A., Ye, X. & Chen, Z.** 2003. Developmental anatomy of *Cymbidium sinense* *in vitro*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 11: 161-165.
- Lindemann, E.G.P., Gunckel, J.E. & Davidson, O.W.** 1970. Meristem culture of *Cattleya*. *American Orchid Society Bulletin* 39: 100-127.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. & Sandberg, G.** 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* 17: 1090-1104.
- Lu, X.H., Guo, W.J., Xu, L.H. & Lin, X.H.** 2002. The preliminary research on the rapid propagation of *Phalaenopsis* by using the joint-points of flower-stems as explants. *Acta Horticulturae Sinica* 29: 491-492.
- Ludwig-Müller, J.** 2000. Indol-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 32: 219-230.
- Martin, K.P.** 2003. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipea malabarica* (Reichb. f.) J.D. Hook., an endangered orchid. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39: 322-326.
- Matsunaga, M.** 1997. A indústria da flor no mundo e o comércio internacional no Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 3: 1-4.
- 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.

- McCready, R.M.J., Guggolz, J., Silveira, V. & Owens, H.H.** 1950. Determination of starch and amylose in vegetables applications to peas. *Analytical Chemistry* 22: 1156-1158.
- Mercier, H.** 2004. Auxinas. *In: G.B Kerbauy (ed.). Fisiologia Vegetal*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 217-249.
- Moore, T.C.** 1979. Auxins *In: T.C. Moore (ed.) Biochemistry and physiology of plant hormones*. Springer-Verlag, New York, p. 32-89.
- Mujib, A. & Jana, B.K.** 1994. Clonal propagation of *Dendrobium* 'Madame Pompadour' through apical meristem culture. *Advances in Plant Sciences* 7: 340-346.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Napier, R.M.** 2001. Models of auxin binding. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 244-254.
- Naves, V.C.** 2001. Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras 58p.
- 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.
- Nayak, N.R., Susmita, S., Satyanarayan, P. & Rath, S.P.** 2002. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Scientia Horticulturae* 94: 107-116.

- Norby, R. & Jackson, R.B.** 2000. Root dynamics and global change: seeking an ecosystem perspective. *New Phytologist* 147: 3-12.
- Park, S.Y., Murthy, H.N. & Paek, K.Y.** 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 38: 168-172.
- Pati, P.K., Sharma, M., Sood, A. & Ahuja, P.S.** 2004. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Rosa damascena* Mill. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 40: 192-195.
- Paul, M. & Starosta, P.** 1998. *Orchids*. Evergreen Press, London, 126p.
- Peres, L.E.P. & Kerbauy, G.B.** 2004. Citocininas. *In*: G.B. Kerbauy (ed.). *Fisiologia Vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 250-278.
- Philip, V.J. & Nainar, A.Z.** 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 122: 211-215.
- Pindel, A. & Miczynski, K.** 1996. Regeneration of *Cymbidium* orchids from leaf and root explants. *Folia Horticulturae* 8: 95-105.
- Pillary, I. & Railton, I.D.** 1993. Complete release of axillary buds from apical dominance in intact, light-grown seedlings of *Pisum sativum* L. following a single application of cytokinin. *Plant Physiology* 71: 972-974.
- Pospisilova, J., Tichá, I., Kadlec, P., Haisel, D. & Plzakova, S.** 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42: 481-497.
- Pridgeon, A.H.** 1995. *The illustrated encyclopedia of orchids*. Timber Press, Singapore, 304 p.
- Radmann, E.B., Fachinelo, J.C. & Peters, J.A.** 2002. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24: 624-628.

- Read, P.E.** 1990. Environmental effects in micropropagation. *In*: P.V. Ammirato, D.A. Evans Sharp & W.R. Bajaj (eds.). Handbook of Plant Cell Culture in Ornamental Species. v.5, Mcgraw-Hill, New York, 833 p.
- Roitsch, T. & Ehneb, R.** 2000. Regulation of source/sink relation by cytokinins. *Plant Growth Regulation* 32: 359-367.
- Sachs, O.V.J.** 2002. Cultivo de orquídeas. *Brasil orquídeas* 2: 23-28.
- Satinder, K. & Sarma, C.M.** 1997. Selection of best medium for *in vitro* propagation of *Dendrobium lindleyi* Steud. *Advances in Plant Sciences* 10: 1-5.
- Schittenhelm, S., Hartmann, U.M. & Oldenburg, E.** 2004. Photosynthesis, carbohydrate metabolism, and yield of phytochrome-B overexpressing potatoes under different light regimes. *Crop Science* 44: 131-143.
- Scott, P.C. & Morris, R.O.** 1970. Quantitative distribution and metabolism of auxin herbicides in roots. *Plant Physiology* 46: 680-684.
- Sheehan, T. & Sheehan, M.** 1994. An illustrated survey of orchid genera. Timber Press, Portland, pp. 288-293.
- Silveira, V, Floh, E.I.S., Handro, W. & Guerra, M.P.** 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 53-60.
- Singh, F.** 1992. Micropropagation of orchids: *Spathoglottis plicata* and *Epidendrum radicans*. *In*: Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. 20 ed. Springer-Verlag, Londres, pp. 223-245.
- Slump, K.** 2004. Lessons from the roots. *Orchids Magazine* 74: 252-254.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C. & Smith, S.M.** 2005. Starch degradation. *Annual Review of Plant Physiology* 56: 73-97.

- Sobhana, A. & Rajeevan, P.K.** 2002a. Refinement of embryo culture medium in *Dendrobium*. Floriculture Research Trend in India Proceedings of the National Symposium on Indian Floriculture in the New Millennium, M/sNarosa Publishers, New Delhi, pp. 134-138.
- Sobhana, A. & Rajeevan, P.K.** 2002b. Refinement of embryo culture medium in *Dendrobium*. Floriculture Research Trend in India Proceedings of the National Symposium on Indian Floriculture in the New Millennium, M/sNarosa Publishers, New Delhi, pp. 134-138.
- Spera, M.R.N., Pasqual, M., Maciel, A.L.R. & Salvador, E.D.** 1997. Effect of different concentrations of kinetin and 2,4D on the *in vitro* cultivation of *Jatropha podagrica* Hook' roots. *Ciência e Agrotecnologia* 21: 386-389.
- Spremulli, L.** 2000. Protein synthesis, assembly and degradation. *In*: B.B. Buchanan, W. Gruissem & R.L. Jones (eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 412-455.
- Stancato, G.C., Bemelmans, P.F. & Vegro, C.L.R.** 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: Estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 7: 25-33.
- Stancato, G.C., Mazzafera, P. & Buckeridge, M.S.** 2002. Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 229-235.
- Suzuki, R.M.** 2005. Efeitos da Luz, fitormônios e alguns nutrientes sobre o comportamento do meristema caulinar de *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. (Orchidaceae). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 143p.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 1998 *Plant Physiology*, 2^a ed., Sinauer Associates Inc., Sunderland, 792 pp.

- Tanaka, M., Yap, D.C.H., Ng, C.K.Y. & Hew, C.S.** 1999. The physiology of *Cymbidium* plantlets cultured *in vitro* under conditions of high carbon dioxide and low photosynthetic photon flux density. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74: 632-638.
- Tanaka, M., Senda, Y. & Hasegawa, A.** 1976. Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. *American Orchid Society Bulletin* 45: 1022-1024.
- Terasaka, K., Blakeslee, J.J., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bandyopadhyay A., Makam, S.N., Lee, O.R., Richards, E.L., Murphy, A.S., Sato, F. & Yazaki, K.** 2005. PGP4, an ATP-binding cassette P-glycoprotein, catalyses auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* 17: 2922-2939.
- Titon, M., Xavier, A., Otoni, W.C. & Reis, G.G.** 2003. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *Revista Árvore* 27: 1-7.
- Tokuhara, K. & Mii, M.** 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 37: 457-461.
- Torres, J. & Mogollon, N.** 2002. Effect of PBZ on budbreak and development *in vitro* of the leaf epidermis of *Cattleya mossiae* Parker ex Hooker previous to acclimatization. *Bioagro* 14: 25-28.
- Torrey, J.G.** 1976. Roots hormones and plant growth. *Annual Review of Plant Physiology* 27: 435-459.
- Trewavas, A.** 1981. How do plant growth substances work? *Plant, Cell and Environment* 4: 203-228.

- 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.
- Tu, M., Hurd, C.A. & Randall, J.M.** 2001. *Weed Control Methods Handbook: The Nature Conservancy*. <http://tncweeds.ucdavis.edu>, version april 2001.
- Usui, K.** 2001. Metabolism and selectivity of rice herbicides in plants. *Weed Biology and Management* 1: 137-146.
- Vacin, E. & Went, F.** 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanica Gazette*. 110: 605-613.
- Vannest, S., Maes L., De Smet, I., Himanen, K., Naudts, M., Inzé, D. & Beeckman, T.** 2005. Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation *Physiologia Plantarum* 123: 139-146.
- Van't Hof, J.** 1968. Control of cell progression through the mitotic cycle by carbohydrate provision. *Journal of Cell Biology* 37: 773-780.
- Wang, C.** 2002. Study on tissue culture and quick propagation of *Dendrobium*. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology* 22: 38-40.
- Wang, J.W., Wang L.J., Mao Y.B., Cai W.J., Xue H.W. & Chen X.Y.** 2005. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 2204-2216.
- Wardell, W. & Skoog, F.** 1969a. Flower formation in excised tobacco stem segments. I. Methodology and effects of plants hormones. *Plant Physiology* 44: 1402-1406.
- Wardell, W. & Skoog, F.** 1969b. Flower formation in excised tobacco stem segments. II. Reversible removal of IAA inhibition by RNA base analogs. *Plant Physiology* 44: 1407-1412.

- Wardell, W. & Skoog, F.** 1973. Flower formation in excised tobacco stem segments. III. Deoxyribonucleic acid content in stem tissue of vegetative and flowering tobacco plants. *Plant Physiology* 52: 215-220.
- Watanabe, D.** 2002. Orquídeas: manual de cultivo. AOSP, São Paulo, 296p.
- White, P.R.** 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology* 9: 585-600.
- Winter, K. & Holtum J.** 2002. How closely do the delta13c values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO₂ fixed during day and night? *Plant Physiology* 129: 1843-1851.
- Woodward, A.W. & Bartel, B.** 2005a. A receptor for auxin. *The Plant Cell* 17: 2425-2429.
- Woodward, A.W. & Bartel, B.** 2005b. Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.
- Xiang, Y., Yu, F. & Peng, Z.** 2003. Tissue culture of *Cymbidium sinensis*. *Forest Research* 16: 434-438.
- Zaidan, L.B.P.** 1975. Enraizamento de folhas de *Pereskia grandifolia* Haward. Tese de mestrado, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 81 p.
- Zanol, G.C., Fortes, G.R.L., Campos, A.D., Silva, J.B. & Centellas, A.Q.** 1998. Enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' tratado com ácido indolbutírico e floroglucinol. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10: 65-68.
- Zonta, E.P. & Machado, A.A.** 1991. Manual do SANEST: sistema de análise estatística para microcomputadores. UFPel, Pelotas, 102p.

Yang, Y.Z., Sun, T.Z., Sun, T. & Lei, C. 2002. Tissue culture and rapid propagation techniques for *Cymbidium* hybridum. Journal of Beijing Forestry University 24: 86-88.

10. Índice de figuras

Figura 1. Flores de <i>Phalaenopsis amabilis</i> , barra = 5 cm (Ori 1999).....	02
Figura 2. Flores de <i>Phalaenopsis stuartiana</i> (Pridgeon 1995).....	02
Figura 3. Cápsulas de <i>P. amabilis</i> com aproximadamente 6 meses após a polinização, barra = 2 cm (Ori 2001).....	03
Figura 4. Mudanças de <i>P. amabilis</i> cultivadas <i>in vitro</i> com aproximadamente 360 dias de cultivo (quarta repicagem), barra = 1,5 cm (Ori 2003).....	03
Figura 5. Protocormóides de <i>P. amabilis</i> com aproximadamente 360 dias de cultivo que não foram repicados, barra = 0,5 cm (Ori 2003).....	04
Figura 6. Mudanças de <i>P. amabilis</i> com aproximadamente 360 dias de cultivo <i>in vitro</i> , barra = 3 cm (Ori 2004).....	22
Figura 7. Planta adulta de <i>P. amabilis</i> selecionada do Orquidário Ori, barra=5 cm (Ori 2003).....	23
Figura 8. Planta adulta de <i>P. amabilis</i> selecionada no Orquidário Habu, barra = 5 cm (Ori 1999).....	23
Figura 9. Número de folhas de <i>P. amabilis</i> nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L ⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L ⁻¹ y = -0,016x + 5,05 e R ² = 0,59*; AIB 0,2 mg L ⁻¹ y = -0,024x + 5,15 e R ² = 0,89**; AIB 1,0 mg L ⁻¹ y = -0,025x + 5,10 e R ² = 0,71***; AIB 5,0 mg L ⁻¹ y = 0,0013x ² - 0,20x + 9,92 e R ² = 0,92***; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.....	29
Figura 10. Número de raízes de <i>P. amabilis</i> nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L ⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L ⁻¹ y = 0,05x - 0,05 e R ² = 0,80***; AIB 0,2 mg L ⁻¹ y = 0,04x + 0,75 e R ² = 0,83***; AIB 1,0 mg L ⁻¹ y = -0,0003x ² + 0,05x + 1,52 e R ² = 0,99 ^{ns} ; AIB 5,0 mg L ⁻¹ y = -0,0008x ² + 0,107x + 0,6 e R ² = 0,981*; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, * = significativo a 95 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.....	31

- Figura 11. Massa fresca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = 1,61x + 539,69$ e $R^2 = 0,63^{ns}$; AIB 0,2 mg L⁻¹ $y = 1,36x + 447,06$ e $R^2 = 0,60^{ns}$; AIB 1,0 mg L⁻¹ $y = -3,54x + 745,7$ e $R^2 = 0,58^*$; AIB 5,0 mg L⁻¹ $y = 0,22x^2 - 39,00x + 1830$ e $R^2 = 0,98^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ns = não significativo, * = significativo a 95 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas..... 33
- Figura 12. Massa fresca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = 7,50x + 63,26$ e $R^2 = 0,98^{ns}$; AIB 0,2 mg L⁻¹ $y = 9,72x + 48,20$ e $R^2 = 0,96^{ns}$; AIB 1,0 mg L⁻¹ $y = 4,18x + 238,39$ e $R^2 = 0,90^{ns}$; AIB 5,0 mg L⁻¹ $y = 5,97x + 289,43$ e $R^2 = 0,89^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas..... 35
- Figura 13. Massa seca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = 0,08x + 70,41$ e $R^2 = 0,02^{ns}$; AIB 0,2 mg L⁻¹ $y = -0,01x + 64,96$ e $R^2 = 0,02^{ns}$; AIB 1,0 mg L⁻¹ $y = -0,57x + 97,32$ e $R^2 = 0,74^{ns}$; AIB 5,0 mg L⁻¹ $y = -0,58x + 95,56$ e $R^2 = 0,47^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas..... 37
- Figura 14. Massa seca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ AIB nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = 0,83x - 3,51$ e $R^2 = 0,83^{ns}$; AIB 0,2 mg L⁻¹ $y = 1,14x - 10,18$ e $R^2 = 0,94^{ns}$; AIB 1,0 mg L⁻¹ $y = 0,57x + 19,45$ e $R^2 = 0,99^{ns}$; AIB 5,0 mg L⁻¹ $y = 0,647x + 21,03$ e $R^2 = 0,77^{ns}$; (B)) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas..... 39
- Figura 15. Número de folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = 0,0013x^2 - 0,18x + 8,72$ e $R^2 = 0,97^{***}$; ANA 0,2 mg L⁻¹ $y = 0,0015x^2 - 0,19x + 8,05$ e $R^2 = 0,92^{***}$; ANA 1,0 mg L⁻¹ $y = 0,002x^2 - 0,27x + 10,38$ e $R^2 = 1^{***}$; ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = 0,0004x^2 - 0,0432x + 1,12$ e $R^2 = 0,94^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 41

- Figura 16. Número de raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = -0,0017x^2 + 0,25x - 3,85$ e $R^2 = 0,99^{ns}$; ANA 0,2 mg L⁻¹ $y = -0,0013x^2 + 0,18x - 1$ e $R^2 = 0,95^{ns}$; ANA 1,0 mg L⁻¹ $y = -0,0003x^2 + 0,03x + 2,80$ e $R^2 = 1,00^{ns}$; ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = -0,0013x^2 + 0,19x - 5,10$ e $R^2 = 0,65^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas..... 43
- Figura 17. Número de brotos de *P. amabilis* no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ ANA no período de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressão: ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = -0,0051x^2 + 0,46x + 15,72$ e $R^2 = 0,74^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos, *** = Significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 44
- Figura 18. Massa fresca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = 0,06x^2 - 9,70x + 855,57$ e $R^2 = 0,51^*$; ANA 0,2 mg L⁻¹ $y = 0,75x + 521,40$ e $R^2 = 0,11^{ns}$; ANA 1,0 mg L⁻¹ $y = 0,13x^2 - 20,57x + 960,70$ e $R^2 = 0,99^*$; ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = 0,01x^2 - 2,05x + 78,50$ e $R^2 = 0,98^{**}$; (B) as análises estatísticas pelo teste TUKEY 5% mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 46
- Figura 19. Massa fresca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = 6,43x + 276,92$ e $R^2 = 0,83^*$; ANA 0,2 mg L⁻¹ $y = -0,16x^2 + 28,23x - 22,85$ e $R^2 = 0,98^*$; ANA 1,0 mg L⁻¹ $y = 9,20x + 69,08$ e $R^2 = 0,68^{**}$ e ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = -0,22x^2 + 38,91x - 1033,10$ e $R^2 = 0,63^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 %, ns = não significativo e número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas..... 48
- Figura 20. Massa fresca dos brotos de *P. amabilis* no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = -0,11x^2 + 16,45x - 361,30$ e $R^2 = 0,72^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos; *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 50

- Figura 21. Massa seca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = -0,33x + 86,73$ e $R^2 = 0,57^{ns}$; ANA 0,2 mg L⁻¹ $y = -0,07x + 67,99$ e $R^2 = 0,0844^{ns}$; ANA 1,0 mg L⁻¹ $y = 0,016x^2 - 2,62x + 128,84$ e $R^2 = 0,97^{ns}$; ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = 0,01x - 0,78$ $R^2 = 0,6^{ns}$. (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo, número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 52
- Figura 22. Massa seca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,0, 0,2, 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,0 mg L⁻¹ $y = 0,75x + 16,495$ e $R^2 = 0,84^*$; ANA 0,2 mg L⁻¹ $y = 0,71x + 31,12$ e $R^2 = 0,96^*$; ANA 1,0 mg L⁻¹ $y = 0,48x + 19,84$ e $R^2 = 0,71^{**}$ e ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = 0,55x - 8,74$ e $R^2 = 0,47^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as médias seguidas de letras maiúsculas que comparam as diferenças significativas entre o fator tratamento e médias seguidas de letras minúsculas comparam as diferenças significativas entre o fator tempo; ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 %, número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 54
- Figura 23. Massa seca dos brotos de *P. amabilis* no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: ANA 5,0 mg L⁻¹ $y = -0,011x^2 + 1,59x - 33,59$ e $R^2 = 0,57^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos, *** = Significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 55
- Figura 24. Número de folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,000 mg L⁻¹ $y = 0,001x^2 - 0,15x + 7,78$ e $R^2 = 0,99^{**}$; 2,4-D 0,032 mg L⁻¹ $y = 0,032x + 1,95$ e $R^2 = 0,62^{***}$; 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -0,0193x + 3,35$ e $R^2 = 0,48^{**}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ** = significativo a 99 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 57
- Figura 25. Número de raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,000mg L⁻¹ $y = -0,0008x^2 + 0,10x + 0,12$ e $R^2 = 0,90^{**}$; 2,4-D 0,032 mg L⁻¹ $y = -0,002x^2 + 0,29x - 4,6$ e $R^2 = 0,99^{***}$; 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = 0,059x - 1,90$ e $R^2 = 0,99^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ** = significativo a 99 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 59

- Figura 26. Número de brotos de *P. amabilis* no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressão: 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -0,03x + 4,30$ e $R^2 = 0,88^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos, * = significativo a 95 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 61
- Figura 27. Massa fresca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,000 mg L⁻¹ $y = -1,08x + 440,78$ e $R^2 = 0,1978^{ns}$; 2,4-D 0,032 mg L⁻¹ $y = -0,16x^2 + 22,21x - 175,03$ e $R^2 = 0,87^{**}$; 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -2,96x + 572,03$ e $R^2 = 0,22^{ns}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ** = significativo a 99 % e ns = não significativo. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 63
- Figura 28. Massa fresca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,000 mg L⁻¹ $y = 4,00x + 233,46$ e $R^2 = 0,70^{***}$; 2,4-D 0,032 mg L⁻¹ $y = -0,24x^2 + 41,30x - 782,97$ e $R^2 = 0,73^*$; 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = 0,18x^2 - 12,90x + 218,72$ e $R^2 = 0,99^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; * = significativo a 95 % e *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 65
- Figura 29. Massa fresca dos brotos de *P. amabilis* no tratamento com 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressão: 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -0,20x^2 + 27,91x - 428,80$ e $R^2 = 0,88^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos, * = significativo a 95 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 67
- Figura 30. Massa seca das folhas de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,000 mg L⁻¹ $y = 0,012x^2 - 1,83x + 98,60$ e $R^2 = 0,78^{ns}$; 2,4-D 0,032 mg L⁻¹ $y = -0,027x^2 + 3,94x - 53,18$ e $R^2 = 0,94^{***}$; 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -0,59x + 83,88$ e $R^2 = 0,40^{**}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; ** = significativo a 99 %, *** = significativo a 99,9 % e ns = não significativo. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 69

- Figura 31. Massa seca das raízes de *P. amabilis* nos tratamentos com 0,000, 0,032 e 0,160 mg L⁻¹ 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressões: controle 0,000 mg L⁻¹ $y = 0,65x + 7,52$ e $R^2 = 0,88^{***}$; 2,4-D 0,032mg L⁻¹ $y = 0,85x + 6,70$ e $R^2 = 0,68^{***}$; 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = 1,35x - 58,65$ e $R^2 = 0,81^{***}$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre os tratamentos representados pelas diferentes letras maiúsculas e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos; *** = significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 71
- Figura 32. Massa seca dos brotos de *P. amabilis* no tratamento 0,160 mg L⁻¹ de 2,4-D nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias; (A) regressão: 2,4-D 0,160 mg L⁻¹ $y = -0,17x + 43,24$ e $R^2 = 0,07^*$; (B) análise estatística pelo teste TUKEY 5 % mostra as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes tempos,* = significativo a 95 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (+) = material não detectado..... 73
- Figura 33. Efeito do AIB nos teores de carboidratos solúveis nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%)...... 75
- Figura 34. Efeito do AIB nos teores de carboidratos solúveis nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os diferentes, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%)...... 75
- Figura 35. Efeito do ANA nos teores de carboidratos solúveis nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos; letras maiúsculas comparam os diferentes tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não detectado). 77
- Figura 36. Efeito do ANA nos teores de carboidratos solúveis nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não detectado). 77
- Figura 37. Efeito do ANA nos teores de carboidratos solúveis nos brotos aos 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos, letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não detectado). 78
- Figura 38. Efeito do 2,4-D nos teores de carboidratos solúveis nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não 80

detectado).....	
Figura 39. Efeito do 2,4-D nos teores de carboidratos solúveis nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não detectado).	80
Figura 40. Efeito do 2,4-D nos teores de carboidratos solúveis nos brotos no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%, + = material não detectado).	81
Figura 41. Efeito do AIB nos teores de amido nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).....	83
Figura 42. Efeito do AIB nos teores de amido nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).....	83
Figura. 43. Efeito do ANA nos teores de amido nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	85
Figura 44. Efeito do ANA nos teores amido nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	85
Figura 45. Efeito do ANA nos teores amido nos brotos no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	86
Figura 46. Efeito do 2,4-D nos teores de amido nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	88
Figura 47. Efeito do 2,4-D nos teores de amido nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	88
Figura 48. Efeito do 2,4-D nos teores de amido nos brotos no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si	89

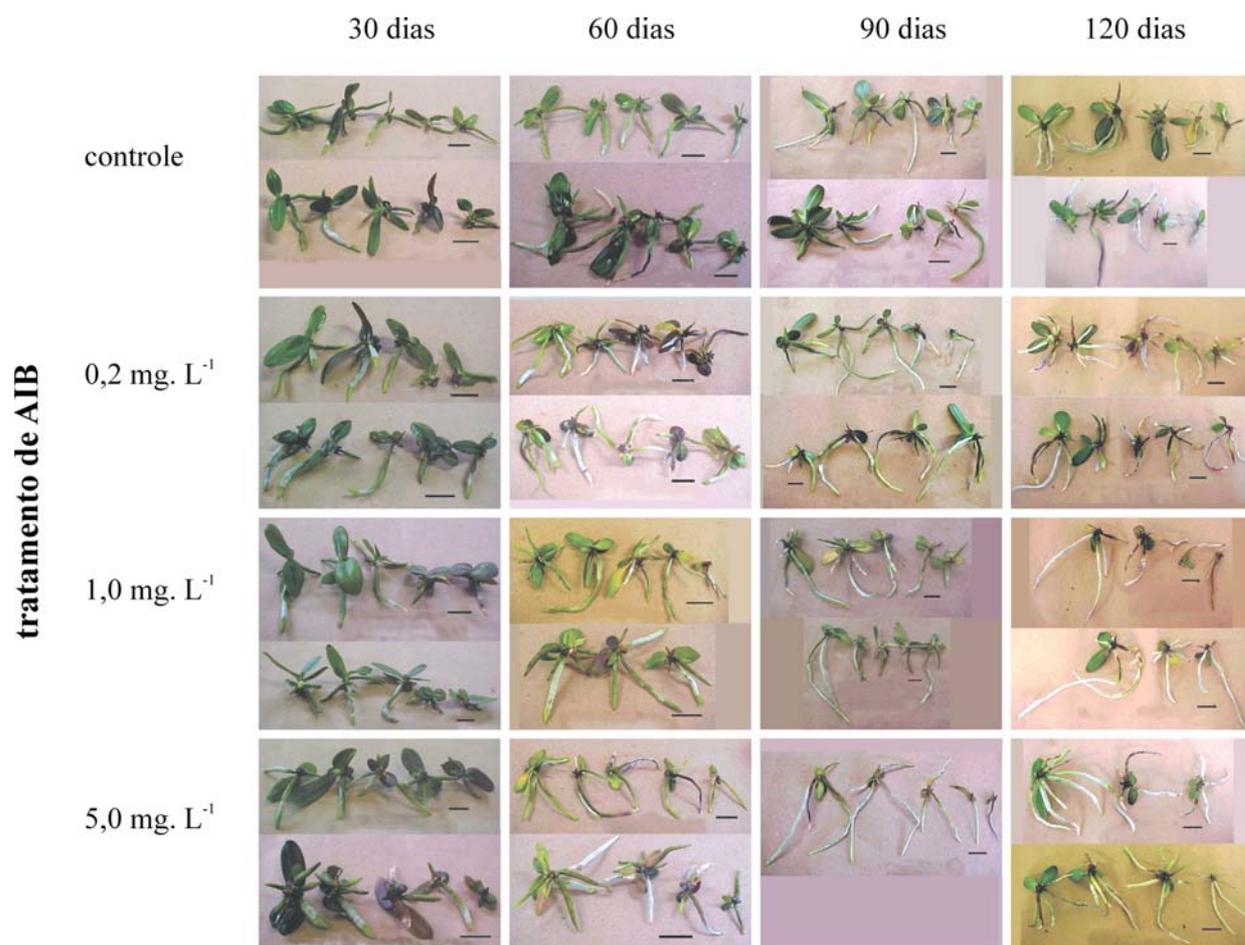
de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).....	
Figura 49. Efeito do AIB no teor proteína total solúvel nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).....	91
Figura 50. Efeito do AIB no teor proteína total solúvel nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%).....	91
Figura 51. Efeito do ANA no teor proteína total solúvel nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	93
Figura 52. Efeito do ANA no teor proteína total solúvel nas raízes no período de 30 e 120 dias letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	93
Figura 53. Efeito do ANA no teor proteína total solúvel nos brotos no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	94
Figura 54. Efeito do 2,4-D no teor proteína total solúvel nas folhas no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	96
Figura 55. Efeito do 2,4-D no teor proteína total solúvel nas raízes no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	96
Figura 56. Efeito do 2,4-D no teor de proteína total solúvel nos brotos no período de 30 e 120 dias (letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas os tempos, médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si de acordo com o teste TUKEY 5%. + = material não detectado).	97
Figura 57 – Comparação da massa seca das folhas, raízes e brotos em diferentes concentrações de AIB (A), ANA (B) e 2,4-D (C) aos 30, 60, 90 e 120 dias; Barras escuras = massa seca de folhas, barras claras = massa seca de raízes e barras em branco = massa seca de brotos.....	109
Figura 58 – Comparação dos teores de carboidratos solúveis totais, amido e proteína total solúvel de folhas (A, D e G), raízes (B, E e H) e brotos (C, F e I) em diferentes concentrações (mg L-1) de AIB (A, B e C), ANA (D, E e F) e 2,4-D (G, H e I) aos 30 e 120 dias.....	110

11. Anexos

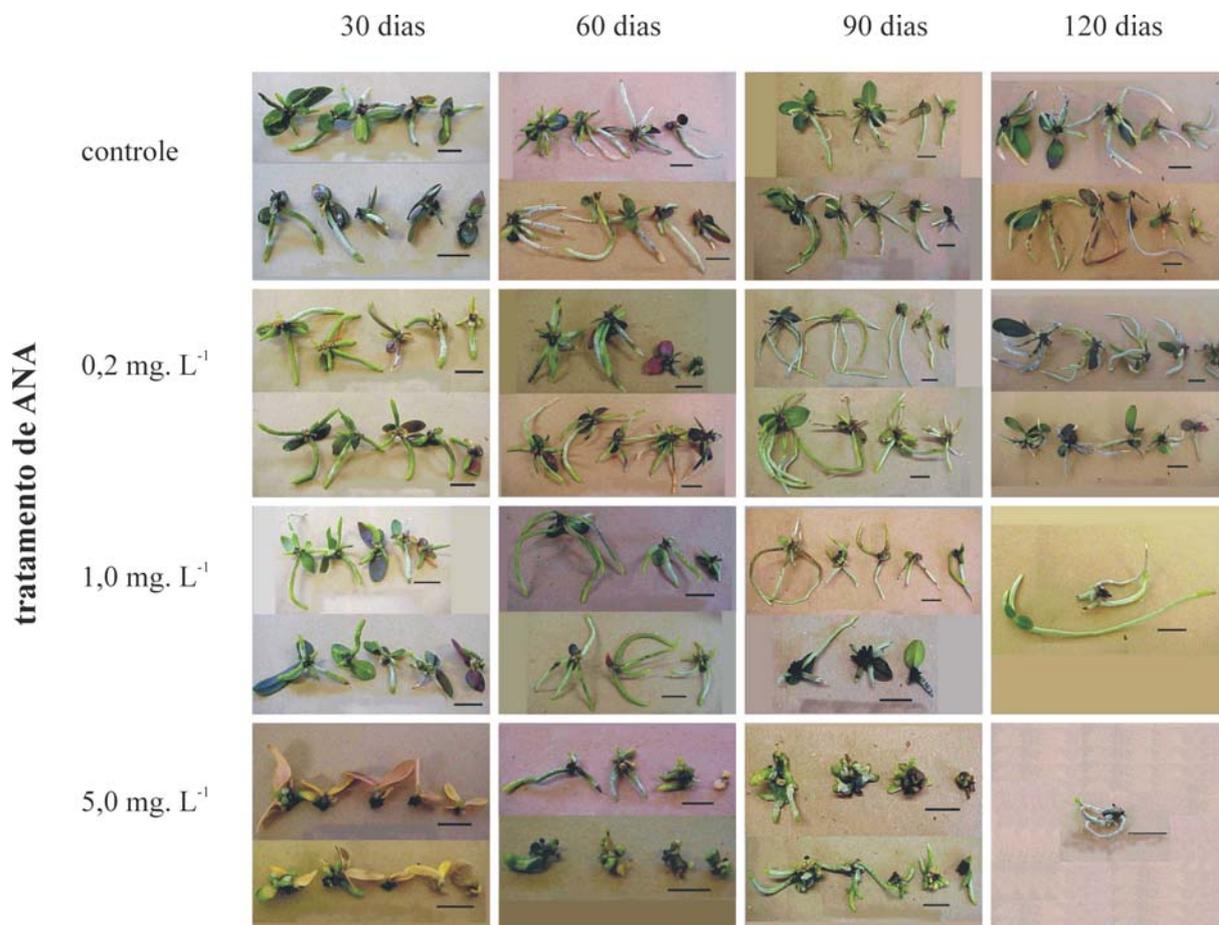
Anexo 1: Composição do meio de cultura utilizado com macronutrientes e micronutrientes de Murashige & Skoog (1962) completo.

Solução	Componentes	Concentração
Macronutrientes		(g L⁻¹)
A	NH ₄ NO ₃	1,65
B	KNO ₃	1,90
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44
D	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37
E	KH ₂ PO ₄	0,17
Micronutrientes		(mg L⁻¹)
F	MnSO ₄ .H ₂ O	1,690
	H ₃ BO ₃	0,620
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,860
	KI	0,083
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
FeEDTA		(mg L⁻¹)
G	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,73
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78
Mistura orgânica		(mg L⁻¹)
H	Tiamina.HCl	0,02
	Ácido nicotínico	0,1
	Piridoxina.HCl	0,1
	Glicina	0,4
		(g L⁻¹)
	Sacarose	30,0
	Ágar	5,0
	pH	5,8

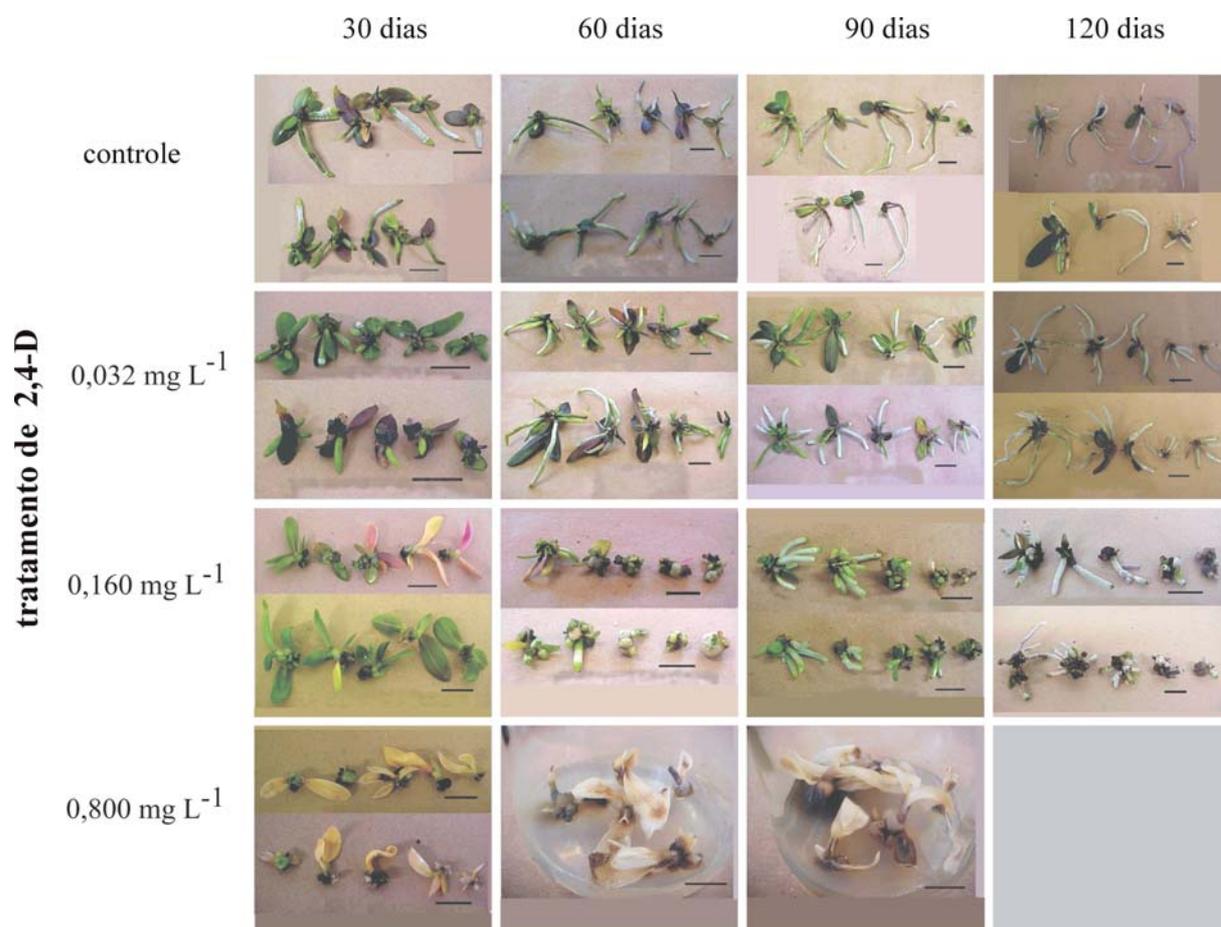
Anexo 2 – Aspectos gerais de plantas de *Phalaenopsis amabilis* do tratamento de AIB em diferentes períodos de análise (barra = 2,0 cm).



Anexo 3 – Aspectos gerais de plantas de *Phalaenopsis amabilis* do tratamento de ANA em diferentes períodos de análise (barra = 2,0 cm).



Anexo 4 – Aspectos gerais de plantas de *Phalaenopsis amabilis* do tratamento de 2,4-D em diferentes períodos de análise (barra = 2,0 cm).



Anexo 5 – Número, massa fresca e seca de folhas, raízes e brotos em *Phalaenopsis amabilis* cultivada *in vitro* em diferentes períodos e concentrações de AIB.

Tempo (dias)	Concentrações (mg L ⁻¹)	NF	NR	NB	MFF (mg)	MFR (mg)	MFB (mg)	MSF (mg)	MSR (mg)	MSB (mg)
30	0,0	4,30 Aa	2,30 Ab	-	565,69 Aa	282,37	-	53,24	23,69	-
	0,2	4,60 Aa	1,60 Ab	-	513,16 Aa	292,68	-	66,36	22,90	-
	1,0	4,40 Aa	2,80 Aa	-	714,95 Aa	345,92	-	90,76	35,49	-
	5,0	4,80 Aa	3,00 Aab	-	876,69 Aa	544,10	-	100,22	43,22	-
60	0,0	4,10 Aa	2,90 Ab	-	637,29 Aa	551,26	-	106,96	53,82	-
	0,2	3,70 Aab	4,40 Aa	-	519,05 Aa	655,18	-	58,65	67,69	-
	1,0	3,10 Aab	3,60 Aa	-	371,85 Aab	478,86	-	44,12	55,07	-
	5,0	2,80 Abc	4,00 Aa	-	272,57 Ab	550,18	-	34,89	65,47	-
90	0,0	4,30 Aa	3,60 Ab	-	749,46 Aa	680,31	-	74,41	50,28	-
	0,2	2,60 ABb	4,00 Aa	-	514,40 ABa	1017,79	-	68,26	76,99	-
	1,0	3,70 Aa	3,70 Aa	-	522,32 ABab	690,23	-	52,08	71,72	-
	5,0	1,60 Bc	3,30 Aab	-	198,68 Bb	796,52	-	27,09	59,69	-
120	0,0	2,60 ABa	7,60 Aa	-	689,30 Aa	989,47	-	72,62	108,22	-
	0,2	2,60 ABb	6,10 Aa	-	651,26 Aa	1144,14	-	61,44	133,86	-
	1,0	1,70 Bb	3,40 Ba	-	310,36 Bb	693,92	-	30,99	87,15	-
	5,0	4,30 Aab	1,50 Bb	-	413,64 Bb	1059,53	-	44,20	109,85	-
DMS 5% Tratamento		0,86	1,06	-	196,57	295,45	-	34,70	27,51	-
DMS 5% Tempo		0,86	1,06	-	196,57	295,45	-	34,70	27,51	-
Valor F Tratamento		1,23 ^{ns}	3,59**	-	3,25*	1,64 ^{ns}	-	1,44 ^{ns}	0,95 ^{ns}	-
Valor F Tempo		10,63***	9,94***	-	3,10*	10,91***	-	1,42 ^{ns}	18,74***	-
Interação Tempo x Tratamento		4,18***	7,07***	-	2,92**	0,52 ^{ns}	-	1,65 ^{ns}	0,65 ^{ns}	-

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas representam as diferenças significativas entre os tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos pelo teste TUKEY 5%; NF = número de folhas, NR = número de raízes, NB = número de brotos, MFF = massa fresca de folhas, MFR = massa fresca de raízes, MFB = massa fresca de brotos, MSF = massa seca de folhas, MSR = massa seca de raízes, MSB = massa seca de brotos, DMS= diferença mínima significativa, ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 % e *** = Significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas e (-) = material não detectado.

Anexo 6 – Número, massa fresca e seca de folhas, raízes e brotos em *Phalaenopsis amabilis* cultivada *in vitro* em diferentes períodos e concentrações de ANA.

Tempo (dias)	Concentrações (mg L ⁻¹)	NF	NR	NB	MFF (mg)	MFR (mg)	MFB (mg)	MSF (mg)	MSR (mg)	MSB (mg)
30	0,0	4,20 Aab	2,10	0,00 Aa	650,94	362,67	0,00 Aa	86,53	29,93	0,00 Aa
	0,2	3,40 Ab	3,40	0,00 Aa	527,20	692,08	0,00 Aa	62,14	52,59	0,00 Aa
	1,0	4,00 Ab	3,40	0,00 Aa	470,65	405,96	0,00 Aa	65,91	36,61	0,00 Aa
	5,0	0,10 Bb	0,10	0,00 Ab	29,22	27,29	0,00 Ac	0,00	0,00	0,00 Ac
60	0,0	2,50 Abc	5,30	0,00 Ba	434,07	796,92	0,00 Ba	56,67	79,95	0,00 Ba
	0,2	2,60 Ab	4,90	0,00 Ba	645,24	1057,18	0,00 Ba	74,46	77,80	0,00 Ba
	1,0	1,20 ABc	3,50	0,00 Ba	207,53	707,16	0,00 Ba	25,47	54,48	0,00 Ba
	5,0	0,00 Bc	1,10	2,10 Aa	0,00	219,12	304,17 Aa	0,00	19,83	33,81 Aa
90	0,0	2,20 Ac	5,00	0,00 Ba	601,56	909,99	0,00 Ba	47,66	75,32	0,00 Ba
	0,2	2,20 Ab	5,30	0,00 Ba	481,50	1256,23	0,00 Ba	51,32	87,53	0,00 Ba
	1,0	1,90 Ac	3,10	0,00 Ba	229,15	543,33	0,00 Ba	27,32	46,15	0,00 Ba
	5,0	0,00 Bc	3,70	0,70 Ab	0,00	945,56	106,54 Ab	0,00	72,58	6,59 Ab
120	0,0	5,20 Aa	2,20	0,00 Aa	624,61	968,42	0,00 Aa	56,27	106,82	0,00 Aa
	0,2	6,80 Aa	2,20	0,00 Aa	656,84	1044,18	0,00 Aa	62,76	120,73	0,00 Aa
	1,0	6,20 Aa	2,20	0,00 Aa	458,43	1380,92	0,00 Aa	45,06	88,01	0,00 Aa
	5,0	1,20 Ba	0,20	0,00 Ab	17,00	335,70	0,00 Ac	1,55	37,31	0,00 Ac
DMS _{5%} Tratamento		0,90	1,27	0,35	147,24	350,38	53,03	17,08	28,13	7,32
DMS _{5%} Tempo		0,90	1,27	0,35	147,24	350,38	53,03	17,08	28,13	7,32
Valor F _{Tratamento}		43,86***	12,00***	13,84***	44,74***	7,48***	12,66***	39,38***	8,77***	15,30***
Valor F _{Tempo}		40,44 ***	12,11***	6,92***	2,31 ^{ns}	7,43***	6,17***	3,88**	10,30***	3,66*
Interação _{Tempo x Tratamento}		3,14**	1,66 ^{ns}	6,92***	1,18 ^{ns}	1,85 ^{ns}	6,17***	1,54 ^{ns}	1,20 ^{ns}	3,66***

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas representam as diferenças significativas entre os tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos pelo teste TUKEY_{5%}; NF = número de folhas, NR = número de raízes, NB = número de brotos, MFF = massa fresca de folhas, MFR = massa fresca de raízes, MFB = massa fresca de brotos, MSF = massa seca de folhas, MSR = massa seca de raízes, MSB = massa seca de brotos, DMS= diferença mínima significativa, ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 % e *** = Significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.

Anexo 7 – Número, massa fresca e seca de folhas, raízes e brotos em *Phalaenopsis amabilis* cultivada *in vitro* em diferentes períodos e concentrações de 2,4-D.

Tempo (dias)	Concentrações (mg L ⁻¹)	NF	NR	NB	MFF (mg)	MFR (mg)	MFB (mg)	MSF (mg)	MSR (mg)	MSB (mg)
30	0,000	4,10 Aa	2,40 Aab	0,00 Ba	471,46 Ba	293,69 Ab	0,00 Ba	57,21 Ba	28,99 Ac	0,00 Ba
	0,032	3,60 Ab	2,30 Ab	0,00 Ba	325,70 Cb	163,02 Ab	0,00 Ba	38,01 Cb	15,24 Ab	0,00 Ba
	0,160	3,30 Aa	0,00 Bc	3,30 Aa	639,71 Aa	0,00 Bc	189,93 Ac	91,04 Aa	0,00 Bd	16,20 Ac
	0,800	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Da	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Da	0,00 Ba	0,00 Ba
60	0,000	2,30 ABab	3,90 Ba	0,00 Ba	254,28 Ba	497,78 Bab	0,00 Ba	24,82 Bbc	49,78 Bb	0,00 Ba
	0,032	3,40 Ab	5,90 Aa	0,00 Ba	671,36 Aa	1037,08 Aa	0,00 Ba	94,07 Aa	90,10 Aa	0,00 Ba
	0,160	1,10 BCb	1,40 Cb	2,00 Ab	90,83 Cc	105,78 BCc	609,34 Aa	8,42 Cd	9,66 Cc	62,86 Aa
	0,800	0,00 Ca	0,00 Da	0,00 Ba	0,00 Da	0,00 Ca	0,00 Ba	0,00 Da	0,00 Da	0,00 Ba
90	0,000	2,00 Ab	2,90 Bab	0,00 Ba	395,83 Aa	725,79 Aa	0,00 Ba	39,79 Bb	52,74 Ab	0,00 Ba
	0,032	3,70 Ab	5,20 Aa	0,00 Ba	484,90 Ab	738,17 Aa	0,00 Ba	74,54 Aab	70,25 Aa	0,00 Ba
	0,160	2,20 Aab	3,50 ABa	2,00 Ab	444,11 Aab	561,36 ABb	319,31 Ab	36,69 Bb	33,07 Bb	34,69 Ab
	0,800	0,00 Ba	0,00 Ca	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ca	0,00 Ca	0,00 Ba
120	0,000	3,70 Bab	1,70 Bb	0,00 Aa	315,65 Aa	618,25 Bab	0,00 Aa	50,97 Aa	92,71 Aa	0,00 Ba
	0,032	6,70 Aa	1,50 Bb	0,00 Aa	269,05 ABc	734,34 Ba	0,00 Aa	33,36 Bb	107,17 Aa	0,00 Ba
	0,160	1,00 Cb	5,20 Aa	0,00 Ac	226,20 ABbc	1333,01 Aa	0,00 Ad	22,73 Bc	126,96 Aa	0,00 Ad
	0,800	0,00 Da	0,00 Ca	0,00 Aa	0,00 Ba	0,00 Ca	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Ba	0,00 Ba
DMS 5% Tratamento		0,98	0,91	0,49	142,03	206,10	70,38	22,02	20,02	9,05
DMS 5% Tempo		0,98	0,91	0,49	142,03	206,10	70,38	22,02	20,02	9,05
Valor F _{Tratamento}		47,80***	40,67***	46,07***	25,52***	27,27***	53,33***	18,00***	31,27***	36,16***
Valor F _{Tempo}		4,55***	10,26***	6,42***	3,43*	17,40***	11,17***	2,02 ^{ns}	28,79***	5,08**
Interação _{Tempo x Tratamento}		4,00***	11,06***	6,42***	4,44***	8,39***	11,17***	4,81***	6,32***	6,99***

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas representam as diferenças significativas entre os tratamentos e as diferentes letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tempos pelo teste TUKEY 5%; NF = número de folhas, NR = número de raízes, NB = número de brotos, MFF = massa fresca de folhas, MFR = massa fresca de raízes, MFB = massa fresca de brotos, MSF = massa seca de folhas, MSR = massa seca de raízes, MSB = massa seca de brotos, DMS= diferença mínima significativa, ns = não significativo, * = significativo a 95 %, ** = significativo a 99 % e *** = Significativo a 99,9 %. Número de repetições em cada tempo e tratamento = 10 plantas.