**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise morfofisiológica de microplântulas de *Cattleya labiata* Lindley
e *Cattleya eldorado* Linden (Orchidaceae) sob efeito do paclobutrazol**

Marcos Vinícius Latanze Righeto

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2011**

Marcos Vinícius Latanze Righeto
Engenheiro Agrônomo

Análise morfofisiológica de microplântulas de *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden (Orchidaceae) sob efeito do paclobutrazol

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Righeto, Marcos Vinícius Latanze

Análise morfofisiológica de microplântulas de *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden (Orchidaceae) sob efeito do paclobutrazol / Marcos Vinícius Latanze Righeto. - - Piracicaba, 2011.

84 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Anatomia vegetal 2. Micropropagação vegetal 3. Morfologia vegetal 4. Orquídea
5. Reguladores de crescimento vegetal I. Título

CDD 635.93415
R571a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*À minha família, exemplo de amor,
carinho e caráter, que me permitiu
ser o que sou.
À Patrícia, essa pessoa maravilhosa,
que esteve ao meu lado em todo
momento.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por fornecer a estrutura necessária para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pelo incentivo, orientação, confiança e amizade.

Ao Antônio Francisco de Campos Amaral, pela amizade, incentivo, auxílio e conhecimentos transmitidos.

Aos Professores Drs. Murilo Melo e Daniel Scherer de Moura, pela disponibilidade do laboratório e equipamentos.

Ao Departamento de Ciências Biológicas e aos seus professores, por todo ensinamento transmitido durante a graduação e mestrado.

Ao Núcleo de Apoio a Pesquisa e Microscopia Eletrônica (NAP/ESALQ/USP), por permitir a execução das análises em microscopia eletrônica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Aos amigos de pós-graduação, Katherine, Lívia, Érika, Gabriela, Germana e, principalmente ao Gilvano, pelo grande auxílio na execução e análises realizadas neste trabalho.

Aos amigos Willian, George, Marcelo e Giovani, pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos meus pais Maria do Carmo e Marcos e minha irmã Marina, pelo grande amor, incentivo e compreensão, e por estarem sempre ao meu lado nesta caminhada.

A Patricia, que sempre acreditou no meu potencial, me incentivou, apoiou e esteve presente nos momentos que eu mais precisei.

A Leoniderse, tendo sempre palavras de incentivo e exemplo de perseverança.

E a todos, que direta ou indiretamente estiveram presente e colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Tudo é fluxo, nada é estático.
Nenhum homem tomará banho
duas vezes no mesmo rio,
porque o homem não será o mesmo
e o rio não será o mesmo”

Heráclito de Éfiso
(540 a.c. - 470 a.c.)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 <i>Cattleya labiata</i> Lindley e <i>Cattleya eldorado</i> Linden	21
2.2 Micropropagação (cultivo “ <i>in vitro</i> ”)	22
2.3 Paclobutrazol	24
2.3.1 Efeitos do PBZ <i>in vitro</i>	26
2.4 “Pulse”	27
2.5 Aclimatização	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Local de realização de experimentos e análises	33
3.2 Material vegetal	33
3.3 Meio de cultura, dosagens e tempo de exposição aos reguladores de crescimento	33
3.4 Teste de “Pulse”	35
3.4.1 Análises anatômicas	35
3.4.1.1 Contagem estomática em MEV e análise do tecido radicular	35
3.4.1.2 Área de tecido radicular	36
3.4.2.3 Caracterização do tecido radicular em MEV	36
3.5 Análise Estatística	37
4 RESULTADOS e DISCUSSÃO	39
4.1 Interações dos fatores espécie, combinação de reguladores de crescimento e tempo de avaliação	39
4.1.1 Comprimento da parte aérea (CPA) e da lâmina foliar (CLF)	43
4.1.2 Comprimento da maior raiz (CMR)	46
4.1.3 Número de brotos (NB)	49
4.2 Efeitos do “Pulse”	51
4.2.1 Comprimento da parte aérea (CPA) e lâmina foliar (CLF)	52

4.2.2 Matéria fresca (MF) e matéria seca (MS)	53
4.2.3 Área do tecido radicular	55
4.2.4 Caracterização radicular	57
4.2.5 Contagem e caracterização de estômatos	61
5 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69

RESUMO

Análise morfofisiológica de microplântulas de *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden (Orchidaceae) sob efeito do paclobutrazol

As espécies *Cattleya labiata* Lindley e a *Cattleya eldorado* Linden, nativas da Mata Atlântica e Amazônia, respectivamente, encontram-se sob forte risco de desaparecimento na natureza, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de métodos eficientes de propagação de suas mudas, dentre os quais se destaca a micropropagação. A eficiência do cultivo *in vitro* de orquídeas está associada aos meios de cultura utilizados e, principalmente, aos reguladores de crescimento. O trabalho teve como objetivo avaliar a influência de paclobutrazol (PBZ) no desenvolvimento das microplântulas cultivadas *in vitro*. Plântulas provenientes de germinação *in vitro*, com $1,0 \pm 0,2$ cm de comprimento, foram utilizadas no estudo. No primeiro experimento, utilizou-se como controle o meio de cultura MS isento de reguladores de crescimento vegetal. Nos tratamentos, o meio MS foi suplementado com quatro concentrações de PBZ 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹; com ácido naftalenoacético (ANA) 1,0 mg.L⁻¹ associado a 6-benzilaminopurina (BAP) 1,0 mg.L⁻¹ e com a combinação de 4,0 mg.L⁻¹ PBZ, com 1,0 mg.L⁻¹ ANA e 1,0 mg.L⁻¹ BAP. As avaliações morfológicas, número de brotos, comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR) e comprimento da lâmina foliar (CLF), foram realizadas no início do experimento e nos subcultivos a cada 40 dias, durante 160 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo trifatorial com parcelas subdivididas no tempo, com seis repetições por tratamento. Um segundo experimento foi realizado utilizando a técnica de “pulse”. Como controle foi utilizado meio de cultura MS, e para os tratamentos foi utilizado o mesmo meio acrescido de concentrações crescentes de PBZ com diferentes tempos de exposição, sendo: T0= controle (MS); T1= 1,0 mg.L⁻¹ PBZ por 40 dias; T2= 10,0 mg.L⁻¹ PBZ por 4 dias e T3= 100,0 mg.L⁻¹ PBZ por 4 horas. Foram feitas as avaliações de CPA, CLF, CMR, número de raízes, massa fresca e massa seca da parte aérea, massa fresca e massa seca de raiz, massa fresca e massa seca total, contagem e caracterização estomática e avaliação anatômica do tecido radicular. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado totalizando quatorze repetições por tratamento. O tratamento com 1,0 mg.L⁻¹ de PBZ por 40 dias promoveu maior desenvolvimento e vigor do sistema radicular, aumentando a espessura das raízes, podendo contribuir para a fase de aclimatização das microplântulas. Os tratamentos com “pulse” reduziram significativamente a parte aérea das microplântulas, não sendo recomendado na micropropagação da *C. labiata*.

Palavras-chave: Orquídea; Cultivo *in vitro*; Regulador de crescimento vegetal; Micropropagação; Anatomia; Morfologia

ABSTRACT

Morphophysiological analysis of microplantlets of *Cattleya labiata* Linden and *Cattleya eldorado* Lindley (Orchidaceae) under the effect of paclobutrazol

The Species *Cattleya labiata* Lindley and *Cattleya eldorado* Linden, native to the Atlantic Forest and Amazon, respectively, are under high risk of extinction in nature, therefore, necessary to develop efficient methods of spreading their seedlings, among which highlights micropropagation. The efficiency of *in vitro* cultivation of orchids is associated with culture media, and especially the growth regulators. The study aimed to evaluate the influence of paclobutrazol (PBZ) in the development of *in vitro* microplantlets. Seedlings from germination *in vitro*, with 1.0 ± 0.2 cm in length, were used in the study. In the first experiment, we used to control the MS culture medium free of plant growth regulators. In the treatments, MS medium was supplemented with four concentrations of PBZ 1.0, 2.0, 4.0 and 6.0 mg L⁻¹, with naphthaleneacetic acid (NAA) 1.0 mg L⁻¹ associated with 6-benzylaminopurine (BAP) 1.0 mg L⁻¹ and with the combination of 4.0 mg L⁻¹ PBZ with 1.0 mg L⁻¹ NAA and 1.0 mg L⁻¹ BAP. The morphological evaluations, number of shoots, shoot length (CPA), longest root length (CMR) and leaf blade length (CLF) were performed at the beginning of the experiment and in subcultures every 40 days during 160 days. The experimental design was completely randomized in three-factor split-plot arrangement in time, with six replicates per treatment. A second experiment was performed using the technique of "pulse". It was used as control MS medium, and the treatments we used the same medium plus increasing concentrations of PBZ with different exposure times, as follows: T0 = control (MS), T1 = 1.0 mg L⁻¹ PBZ for 40 days, T2 = 10.0 mg L⁻¹ PBZ for 4 days and T3 = 100.0 mg L⁻¹ PBZ for 4 hours. Assessments were made CPA, CLF, CMR, number of roots, fresh and dry mass of shoots, fresh weight and dry weight of root, fresh weight and total dry matter, stomatal counting and characterization and evaluation of the anatomic root tissue. The experiment was conducted in a completely randomized a total of fourteen replicates per treatment. Treatment with 1.0 mg L⁻¹ of PBZ for 40 days promoted further development and vigor of the root system, increasing the thickness of the roots and may contribute to the acclimatization phase of microplantlets. Treatments with "pulse" significantly reduced the shoot microplantlets and It's not recommended to the micropropagation of *C. labiata*.

Keywords: Orchid; *in vitro* culture; Plant growth regulator; Micropropagation; Anatomy; Morphology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Características morfológicas de microplântulas de *C. labiata* avaliadas aos 0, 40, 80, 120 e 160 dias, sob efeito das diferentes combinações de reguladores de crescimento.
- Figura 2 - Características morfológicas de microplântulas de *C. eldorado* avaliadas aos 0, 40, 80, 120 e 160 dias, sob efeito das diferentes combinações de reguladores de crescimento.
- Figura 3 - Comprimento da parte aérea de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação ao tempo, de acordo com as diferentes combinações de reguladores de crescimento.
- Figura 4 - Comprimento da lâmina foliar de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação ao tempo, de acordo com as diferentes combinações de reguladores de crescimento.
- Figura 5 - Comprimento da maior raiz de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação ao tempo, de acordo com as diferentes combinações de reguladores de crescimento, controle.
- Figura 6 - Comprimento médio das raízes de *C. eldorado* e *C. labiata* avaliadas aos 160 dias de exposição às diferentes combinações de reguladores de crescimento.
- Figura 7 - Número de brotos de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação ao tempo, de acordo com as diferentes combinações de reguladores de crescimento.
- Figura 8 – Visão geral em MEV do corte transversal por criofratura da raiz de *C. labiata* desenvolvidas no tratamento 1,0 mg.L⁻¹ PBZ por 40 dias.
- Figura 9 - Detalhe em MEV do velame (Ve) e da exoderme (Ex) da raiz de *C. labiata* desenvolvidas no tratamento com 1,0 mg.L⁻¹ PBZ por 40 dias.
- Figura 10 – MEV do cilindro vascular poliarco de *C. labiata* apresentando a disposição do conjunto de pólos de floema (setas) intercalados aos xilema, o córtex (Ct) e a medula (Md).
- Figura 11 - Visão geral em MEV da superfície adaxial de folhas de *C. labiata*. (A) Controle; (B) Representativo aos tratamentos com uso de PBZ; (C) Padrão de estômatos abertos; (D) Padrão de estômatos fechados; (E) Padrão de estômatos alterados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipo e concentração dos reguladores de crescimento.

Tabela 2 - Análise de variância para o número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR) e comprimento da lâmina foliar (CLF) de explantes de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação aos tratamentos avaliados.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para CPA, CMR, CLF, NR, MFA, MSA, MFR, MSR, MFT e MST para *C. labiata* em relação aos tratamentos avaliados.

Tabela 4 - Valores médios do CPA e CLF de *C. labiata* em relação aos tratamentos avaliados.

Tabela 5 - Valores médios da massa fresca da parte aérea (MFA), raiz (MFR) e total (MFT) de *C. labiata* em relação aos tratamentos avaliados.

Tabela 6 - Valores médios da massa seca da parte aérea (MSA), raiz (MSR) e total (MST) de *C. labiata* em relação aos tratamentos avaliados.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para área do velame (Ve), exoderme (Ex), córtex (Ct), endoderme (En), cilindro vascular (CV) e total de *C. labiata*.

Tabela 8 - Valores médios para as áreas do velame (Ve), exoderme (Ex), córtex (Ct), endoderme (En), Cilindro vascular (CV) e área total da raiz (total) de *C. labiata*.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para estômatos abertos (EA), estômatos fechados (EF), estômatos alterados (EAL) e estômatos totais (ET) em folhas de *C. labiata* em relação aos tratamentos testados.

Tabela 10 - Valores médios para estômatos abertos (EA), estômatos fechados (EF), estômatos alterados (EAL) e estômatos totais (ET) em folhas de *C. labiata* em relação aos tratamentos testados.

1 INTRODUÇÃO

A Família Orchidaceae é a maior família de todo o reino vegetal, sendo taxonomicamente dividida em duas subfamílias, duas subséries, 85 tribos e aproximadamente 800 gêneros, com cerca de 24.000 espécies, as quais são distribuídas em quase todos os continentes (FAY et al., 2009). No Brasil são conhecidos aproximadamente 203 gêneros e 2.350 espécies de orquídeas, formando um rico patrimônio orquidológico de incalculável valor e beleza (MENEZES, 1987), sendo o principal centro de dispersão, onde ocorre mais da metade das espécies (TOSCANO DE BRITO e CRIBB, 2005).

A Mata Atlântica e a região Amazônica são consideradas os principais habitats brasileiros das orquídeas, onde estão presentes espécies endêmicas de relevante valor ornamental e comercial, como *Cattleya warneri*, *Cattleya labiata* e *Laelia purpurata* (FARIAS e RIBEIRO, 2000), *C. araguaensis*, *C. eldorado*, *C. luteola* e a *C. violacea* (LACERDA, 1995). A *Cattleya labiata* e a *Cattleya eldorado* estão sob risco de desaparecimento na natureza, sendo respectivamente reconhecidas, como espécie em extinção e espécie vulnerável à extinção (GELL et al., 2003).

Considerando a dificuldade de obtenção de sementes e os processos de extinção das espécies vegetais, é necessário o desenvolvimento de métodos eficientes de propagação de mudas. A micropropagação é uma técnica que possibilita a produção de grande número de plantas em ambiente reduzido e controlado, em curto espaço de tempo. Além disso, garante a manutenção e preservação do material genético em bancos de germoplasma por longos períodos, contribuindo para a propagação da espécie.

O método de micropropagação de orquídeas geralmente se faz pela germinação assimbiótica de suas sementes e pelo cultivo *in vitro*, até a fase de aclimatização. No cultivo *in vitro*, os meios de cultura utilizados oferecem as condições necessárias ao crescimento e desenvolvimento das plantas (BUTCHER, 1976; DIXON, 1985) e o uso adequado de reguladores de crescimento nas diferentes fases do processo pode ser considerado como essencial para sua realização, propiciando amplo avanço das técnicas de biotecnologia (SOUZA et al., 2003).

Dentre os reguladores de crescimento que normalmente são utilizados destacam-se as auxinas e citocininas, mas não menos importantes são os inibidores de

crescimento, como o paclobutrazol (PBZ), que atua na síntese de ácido giberélico (regulador de crescimento), promovendo não apenas mudanças morfológicas no crescimento das plantas, mas também maximizando a taxa de brotação (SMITH et al., 1990; ROBERTS et al., 1992; SMITH et al., 1992). Além disso, o PBZ está também associado com a redução da transpiração, altura da planta, biomassa e área foliar, aumento na resistência estomática e na quantidade de clorofila (CHANEY, 2004). No cultivo *in vitro* o PBZ aumenta a resistência ao estresse e promove o engrossamento das raízes, favorecendo o processo de aclimatização das mudas (CANTO et al., 2004).

Poucos trabalhos relatam protocolos para micropropagação de *Cattleya*, e a dificuldade de se obter um protocolo adequado deve-se, em grande parte, à falta de conhecimento das interações fisiológicas da regeneração e do desenvolvimento *in vitro* (GIATTI e LIMA, 2007).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden

Dentro da imensa diversidade de orquídeas brasileiras, encontra-se o gênero *Cattleya*, pertencente à subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae e subtribo Laeliinae (DRESSLER, 1981), apresenta aproximadamente 50 espécies distribuídas nos trópicos das Américas do Sul e Central, sendo considerado por Arditti & Ernst (1992) sinônimo de orquídea, e por Menezes (1987), a rainha das orquídeas, em função de sua notável exuberância e tamanho da flor. O nome *Cattleya* foi uma homenagem ao botânico William Cattley, cultivador e especialista em plantas desse gênero.

As orquídeas costumam habitar diferentes ambientes, ocorrendo em todos os continentes com exceção à Antártica, sendo particularmente numerosas e diversificadas na região tropical (FAY e CHASE, 2009). A Mata Atlântica é considerada o principal habitat desta família, onde se encontram espécies endêmicas de relevante valor ornamental e comercial, como *Cattleya warneri*, *Cattleya labiata* e *Laelia purpurata* (FARIAS e RIBEIRO, 2000).

Não menos importante que o bioma anterior, a Floresta Amazônica brasileira, correspondente a cerca de 60% de toda a região Amazônica, apresenta 709 espécies de orquídeas catalogadas, distribuídas em 131 gêneros (SILVA & SILVA, 2004). Nesta vasta área de aproximadamente 4.196.493 km² (50% do território brasileiro) são encontradas seis espécies de *Cattleya*, a *C. araguaensis*, a *C. eldorado*, a *C. jenmanii*, a *C. lawrenceana*, a *C. luteolae* e a *C. violacea* (LACERDA, 1995). Diante do exposto, cabe salientar que dentro destes importantes biomas sul-americanos, destacam-se duas espécies: *Cattleya labiata* e *Cattleya eldorado*.

A espécie *C. labiata* é encontrada principalmente nos Estados de Alagoas, Ceará, Paraíba e Pernambuco. Esta espécie foi descrita em 1821 por John Lindley, apresentando como principais características o epifitismo, a presença de pseudobulbos de 15 a 20 cm de comprimento com apenas uma folha em seu ápice e flores de 15 a 25 cm de diâmetro. Esta espécie, embora comumente encontrada no comércio, foi incluída pelo Ministério do Meio Ambiente, de acordo com a Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008, na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção.

A *C. eldorado* ocorre em uma área relativamente pequena da Amazônia brasileira, restringindo-se aos estados do Amazonas e Pará (BRAGA, 1982). Recebeu este nome por Linden em 1867 quando milhares de exemplares foram enviados a Europa. É uma espécie epífita, unifoliada, com pseudobulbos rijos e sulcados de até 20 cm de comprimento e inflorescências com uma a três flores de 18 cm de diâmetro. Devido ao seu alto potencial ornamental e sua grande variedade de cores e perfumes, elas foram quase dizimadas, tendo sido enquadrada na categoria de vulnerável à extinção (GELL et al., 2003).

2.2 Micropropagação (cultivo *in vitro*)

Os meios nutritivos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*, baseando-se nas proporções exigidas para cada espécie (CALDAS et al., 1998). Sua composição, em geral, é dada por macro e micronutrientes minerais, vitaminas, açúcares, reguladores de crescimento e suplementos orgânicos (KNUDSON, 1946; VACIN e WENT, 1949; WHITE, 1951; MURASHIGE e SKOOG, 1962; GAMBORG, 1984). Assim, vários compostos são adicionados para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais da célula. Um dos meios mais conhecido e largamente utilizado é o MS, desenvolvido por Murashige e Skoog em 1962.

No caso de plantas da família Orchidaceae este meio é utilizado para o cultivo *in vitro* de espécies de vários gêneros, como *Ipsea malabarica* (MARTIN, 2003), *Phalaenopsis* sp. (LEE et al., 2010), *Paphiopedilum* sp. (CHEN et al., 2002), *Dendrobium* sp. (SOBHANA e RAJEEVAN, 2002), *Cymbidium* sp. (YANG et al., 2009), *Cattleya mossie* (TORRES & MOGOLLON, 2002), entre outros. Cadavid & Salazar (2008), trabalhando com diversos meios de cultura na micropropagação de *Cattleya quadricolor*, observaram maior taxa germinação de sementes e crescimento mais rápido das plântulas utilizando MS sem adição de reguladores de crescimento.

Os reguladores de crescimento são substâncias que, mesmo em baixas concentrações, atuam em vários processos do desenvolvimento das plantas, interferindo na biossíntese dos hormônios vegetais (REDDY et al., 1995; LAMAS, 2001). Com isso, são capazes de afetar o crescimento e o equilíbrio entre as partes reprodutivas e vegetativas, melhorando a eficiência na distribuição de fotoassimilados

(MEREDITH JR. e WELS, 1989; ATAHYDE E LAMAS, 1999). Os mais utilizados reguladores de crescimento pertencem ao grupo das auxinas e das citocininas, sendo considerados vitais às plantas, e sua interação promove o crescimento e a divisão celular. (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1990; MALAURE et al., 1991). As auxinas podem ser de ocorrência natural, como o ácido indolacético (AIA), ou então sintéticas, como o ácido α -naftalenoacético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998). Auxinas sintéticas são produzidas em laboratório, apresentando respostas fisiológicas semelhantes às de ocorrência natural e são adicionadas aos meios de cultura em concentrações que variam conforme a espécie e/ou cultivar. As concentrações mais frequentes estão na faixa de 0,5 a 5,0 μM (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998), podendo ser utilizadas isoladamente ou em combinação com outros reguladores de crescimento, como as citocininas.

Dentre as citocininas mais usadas destacam-se a cinetina, 6-benzilaminopurina (BAP), a zeatina e o thidiazuron (TDZ). As concentrações destas substâncias utilizadas nos meios de cultura variam entre 0,03 e 30,0 mg L^{-1} (TORRES et al., 2001), sendo o BAP, a mais potente e estável para promover o desenvolvimento da parte aérea das plântulas (ZAERR E MAPES, 1985).

A combinação ótima entre auxina e citocinina para a planta, varia entre as diferentes espécies, e até mesmo entre cultivares dentro da mesma espécie (MALAURE et al., 1991). No entanto é certo que uma alta relação citocinina/auxina resulta na indução direta de brotações em explantes, enquanto o processo de rizogênese exige menor relação (GEORGE & SHERRINGTON, 1984; THORPE E PATEL, 1984; TAIZ E ZEIGER, 2009).

Das (2007), estudando crescimento e desenvolvimento de protocormos de *Cymbidium devonianum* obteve melhores resultados para número de brotos em meio MS, utilizando a concentração de 1,0 mg.L^{-1} de BAP. Bons resultados também foram alcançados por Latha (1999), induzindo alta frequência da formação de brotos em *Habenaria crinifera*, com a adição de 1,0 mg.L^{-1} de BAP.

Ao se combinar ANA e BAP em diferentes concentrações e aplicá-las em bromélia *Dyckiamacedoi*, Mercier e Kerbaux (1993) obtiveram protuberâncias que resultaram no desenvolvimento de brotos adventícios na região basal das plantas. Essa combinação também foi utilizada em micropropagação e regeneração de orquídeas, como apresentado por Pindel e Miczynskik (1996) os quais utilizaram 5,0 mg L^{-1} de BAP

e 0,9 mg L⁻¹ de ANA e observaram, após 2 meses de cultivo, a formação de perfilhos em 86% dos explantes de *Cymbidium*.

Carvalho (2002) observou que a partir de gemas axilares e apicais de plantas adultas do híbrido *Brassolaeliocattleya* La Tuilerie x *Laeliocattleya* Lina Cavalieri, tratadas com 1,0 mg.L⁻¹ de ANA e 0,2 mg L⁻¹ de cinetina, 16% dos explantes apresentaram resposta morfogênica aos 50 dias de cultivo. Na regeneração *in vitro* de *Brassolaeliocattleya* Owen Holmes 'Ponkan' x *Brassavola digbiana* n2, Giatti & Lima (2007) obtiveram melhores resultados ao utilizarem concentrações de BAP superiores a 0,5 mg L⁻¹, sendo que o maior perfilhamento ocorreu no tratamento com 1,0 mg L⁻¹.

2.3 Paclobutrazol

Os inibidores do crescimento vegetal são combinações sintéticas que têm sido aplicadas em culturas para reduzir o crescimento longitudinal de brotos, sem diminuir a produtividade da planta. Temos como exemplo de inibidores os triazóis, que afetam a rota dos terpenos causando alterações no equilíbrio hormonal das plantas. Dentre os hormônios vegetais afetados estão as giberelinas (GA's), ácido abscísico (ABA) e citocininas (Fletcher et al.,2000).

Um dos principais representantes da classe dos triazóis é o paclobutrazol (PBZ) [(2RS, 3RS)-1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1,2,4-triazol-1-il)pentan-3-ol], que na forma pura, consiste de cristal branco com peso molecular de 293,8 g mol⁻¹, ponto de fusão de 165-166C°, massa específica de 1,22 g.cm⁻³, pressão de vapor a 25 C° de 1x10⁻⁶Pa (MAGNITSKIY, 2004).

No interior da planta, o PBZ apresenta a mesma rota passiva por translocação apoplástica que a água absorvida do solo (BARRETT & BARTUSKA, 1982; WATSON, 2001), com pouco ou nenhum movimento no floema (RICHARDSON et al., 1986), constituindo assim um movimento acrópeto. O acúmulo do PBZ ocorre principalmente na raiz e tecido foliar, sendo rápidas sua absorção e circulação no tecido, com níveis significativos dentro de 12 horas de tratamento (EARLY e MARTIN, 1988).

Conhecido por atuar sobre monooxigenases do tipo citocromo P450, (Köller, 1987; Fletcher et al., 2000; Rademacher, 2000; Chizhova et al., 2005) o PBZ interfere no segundo estágio da biossíntese das GA's, quando um grupo metil do ent-caureno é oxidado para ácido carboxílico (CH₃→CH₂OH→CHO→COOH) e em seguida, o anel B

de seis átomos de carbono, muda sua conformação ficando, então, com cinco carbonos para formar o GA₁₂ –aldeído, sendo esta a primeira giberelina formada em todas as plantas, e portanto, a precursora de todas as demais.

A redução da biossíntese de giberelina ocorre de forma competitiva, quando o anel heterocíclico do PBZ liga-se ao citocromo P450 por um par de elétrons livres do átomo de nitrogênio. Este par de elétrons está localizado na região central de sua estrutura de ferro porfirina, interagindo com o sítio e impedindo que a molécula de oxigênio das monooxigenases, as ative (Grossman, 1990; Sadhu e Gupta, 1997).

As giberelinas têm participação importante no desenvolvimento dos ápices radiculares, como comprovado em mutantes de *A. thaliana* deficientes na produção dessa classe hormonal (FU e HARBERD, 2003). Este fitormônio age através da oposição à ação das proteínas DELLA, que são inibidoras do alongamento celular. As giberelinas desestabilizam estas proteínas, fazendo com que a concentração desses repressores da sinalização de GA seja reduzida e, conseqüentemente, sejam diminuídos os efeitos inibitórios sobre o crescimento (GUBLER et al., 2002). Além de mediar respostas em GA, estudos sugerem que as proteínas DELLA podem mediar respostas a outros fitormônios como ABA, etileno, auxinas e também ao estresse abiótico (Fu e Harberd, 2003; Achard et al. 2003, 2006; Weiss e Ori, 2007).

Além de afetar a ação das GA's, o PBZ pode também afetar a atividade de enzimas similares às monooxigenases como a ACC oxidase (SAUERBREY et al., 1988; GROSSMANN et al., 1989; MIN e BARTHOLOMEW, 1996), ou ainda, a atividade da ACC sintase (ABBAS et al., 1989), interferindo, assim, na rota biossintética do etileno. Isso pôde ser observado em plântulas de *Cucumis sativus*, tratadas com triadimefon, também um triazol, que apresentaram uma redução na produção de etileno e nos níveis de ACC em raízes primárias (ABBAS et al., 1989). A redução nos níveis de ACC é atribuída à aplicação de triazóis, que inibiram a atividade da ACC sintase, ou ainda, por sua conjugação a ácido Nmalonil- 1-carboxílico-1- aminociclopropano (MACC). A aplicação de PBZ em sementes de *Malus domestica*, submetidas a estresse hídrico reduziu o acúmulo de ACC e MACC, diminuindo a produção de etileno, evidenciando a ação deste triazol na síntese de ACC (Wang e Steffens, 1985). A ação inibitória do PBZ sobre a atividade da ACC sintase, também pode ser observada em tecidos foliares basais de *Ananas comosus* (MIN e BARTHOLOMEW 1996).

2.3.1 Efeitos do PBZ *in vitro*

O uso do paclobutrazol (PBZ) no cultivo *in vitro* tem sido estudado como alternativa para maior sucesso da aclimatização de mudas, contribuindo para adaptação rápida e ainda para altas taxas de sobrevivência (Kozak, 2006; Thakur et al, 2006;. Glozieris et al, 2007), devido principalmente a sua capacidade de retardar o crescimento das plântulas e aumentar a resistência ao estresse, como estresse hídrico (BANON et al, 2001; BEROVA e ZALTEV, 2002; ZHU et al., 2004), inundações (LIN et al, 2006), refrigeração (LIN et al. 2006) e salinidade (ELAIDY et al, 1992;. EL-KHASHAB et al, 1997;. OZMEN et al., 2003; SAEED, 2005; KISHOR et al, 2009). Além disso, o PBZ apresenta efeitos bioquímicos como a redução de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (KRAUS e FLETCHER, 1994), aumento dos níveis de prolina (MACKAY et al., 1990) e teor de clorofila (FLETCHER e HOFSTRA, 1988).

Panaia et al. (2000) trabalhando com *Symonanthus bancroftii* observaram que o meio suplementado com 10,2 μM de PBZ aumentou a sobrevivência para 90% quando comparado a tratamentos controles de 50%. Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que o PBZ proporcionou maior número de raízes por broto, associado a um significativo aumento de resposta ao enraizamento. A alteração nas raízes como o engrossamento induzido pela aplicação do PBZ, foi verificado em *Chrysanthemum morifolium*, *Vitis vinifera* (SMITH et al., 1990; ROBERTS et al., 1992; SMITH et al., 1992) e em *Lilium longiflorum* (THAKUR et al., 2006) podendo representar um excelente benefício na etapa de aclimatização, pois raízes mais vigorosas tendem a aumentar a sobrevivência das mudas. Apesar de seu efeito inibitório no crescimento das microplântulas, o PBZ não impede a divisão celular, sendo provável que as raízes tenham aumentado em diâmetro devido à ocorrência de divisões celulares radiais (NEPOMUCENO et al., 2007).

Plântulas de *Cattleya mossiae* submetidas a 0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 $\text{mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ de PBZ, apresentaram redução da espessura da epiderme e do comprimento da lâmina foliar, principalmente nas doses de 1,0 e 2,0 $\text{mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$. Foi observado também aumento na capacidade de controlar a perda de umidade pelas folhas nas plantas tratadas sem, no entanto, alterar a densidade e índice estomático (TORRES & MOGOLLÓN, 2002). Contudo, folhas tratadas com paclobutrazol sofreram modificações morfológicas como poros estomáticos menores e folhas mais espessas (CHANEY,

2004), além de menor abertura estomática, diferindo de estômatos normais (HAZARIKA et al., 2002).

A utilização de diferentes doses de PBZ em *Dendrobium* sp. também resultou em folhas mais grossas e menores, além de uma alteração na coloração das folhas para um verde mais escuro. Com relação ao caule, todas as plântulas tratadas com PBZ apresentaram internódios mais curtos e caules mais grossos, demonstrando serem caules mais fortes (TE-CHATO et al., 2009).

Além dos efeitos supracitados, o PBZ também é capaz de promover o aumento da taxa de brotação. Em cana-de-açúcar a aplicação de 3,4 μ M de PBZ resultou em 57,8 brotos, enquanto o controle apresentou apenas 23,9 brotos (LORENZO et al., 1998). As espécies de bromélias *Aechmea blumenvii*, *Cryptanthus bromelioides* e *Neoregelia carolina* também apresentaram aumento na taxa de multiplicação de brotos após 60 dias de cultivo em imersão temporária, com uso de regulador de crescimento como ANA, BAP e PBZ (DAQUINTA et al., 1999). Em orquídeas do gênero *Phalaenopsis*, a utilização *in vitro* do triazol (UCZ) mostrou-se eficiente na produção de mudas saudáveis levando a uma rápida adaptação e crescimento contínuo em condições *ex vitro*. O tratamento com 6,86 mM de UCZ proporcionou aumento dos níveis de pigmentos fotossintéticos e maiores taxas de fotossíntese líquida, além de baixo teor de prolina e grande quantidade de pigmentos (SURIYAN et al., 2009).

2.4 “Pulse”

O “pulse”, como ferramenta na micropropagação, baseia-se na exposição do material vegetal a um determinado estresse externo visando uma resposta biológica, podendo variar em intensidade, duração e concentração do fator estudado (EYMAR, 2000; SRIVASTAVA et al., 2001; VIKRANTI, 2003; BENNETT, 2003; STOJICIC et al., 2004; ANTHONY et al., 2004; ANDRADE et al., 2006). Seu uso na cultura de tecidos é pouco relatado, principalmente quando o explante não é constituído de órgãos embriogênicos, sendo mais comumente aplicado na indução de rizogênese (FLYGH, 1993; KOVAC, 1993; SHEKHAWAT et al., 1993; DEORA; SHEKHAWAT, 1995; PUROHIT; SINGHVI, 1998; DAS, PRAKASH e BHALLA-SARIN, 1999). A importância nos estudos da aplicação desta técnica na micropropagação está associada à redução

do tempo de exposição da cultura ao regulador de crescimento, do período de indução e do custo do material usado no laboratório (MATHUR e NADGAUDA, 1999).

Vários são os tipos de “pulse” utilizados como, por exemplo, “pulse” de luz (PINKER, 2002), “pulse” de pulverização (LIGHT et al., 2002) e “pulse” de reguladores de crescimento (MATHUR; NADGAUDA, 1999; EYMAR, 2000; SRIVASTAVA et al., 2001; VIKRANTI; BENNETT, 2003; RASHID, 2003; STOJICIC et al., 2004; ANTHONY et al., 2004; ANDRADE et al., 2006).

Para “pulse” de reguladores de crescimento, Das; Prakash e Bhalla-Sarin (1999) observaram 8 brotos por plântula de *Litchi chinesis* Sonn. durante 7 semanas de cultivo, utilizando $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP durante dias alternados. A mesma auxina foi testada em plantas micropropagadas de *Achras sapota* usando concentrações de 0,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 500,0 mg L^{-1} durante os períodos de 1, 2, 3 e 4 horas, sendo que, a maior taxa de enraizamento foi de 77% após 15 dias do pré-tratamento com 200,0 mg L^{-1} por 2 horas (PUROHIT; SINGHVI, 1998).

Na tentativa de desenvolver uma metodologia eficaz para propagação de *Pinus heldreichii*, Budimir e Stojicic (2004) utilizaram hipocótilos e cotilédones como explantes tendo como tratamento doses crescentes de BAP (0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 mg L^{-1}) fornecidas como “pulse” durante 1 hora. Os explantes submetidos à dose de 50 mg L^{-1} apresentaram maior frequência de gemas axilares (4,6 brotos por explante) e maior índice de desenvolvimento de brotos quando comparados aos outros tratamentos.

Para Drake et al. (1997) o método de “pulse” (100 mg L^{-1} de BAP por 2 horas) na multiplicação vegetativa de *Picea sitchensis* foi mais eficaz que o uso de reguladores de crescimento no meio de cultura. Andrade et al. (2006), ao avaliarem o efeito de BAP empregando-se a técnica de “pulse” em *Eucalyptus grandis*, observaram que concentrações de 200 mg L^{-1} de BAP por 1 e 2 horas promoveram aumento no número de brotações, sendo mais eficiente na multiplicação *in vitro* desta espécie. Vikranti e Rashid (2003) estudando o efeito de “pulse” na organogênese de *Paspalum scrobiculatum* induziram culturas de calos embriogênicas em embriões usando tratamentos de 2,4-D (100 $\mu\text{M L}^{-1}$) durante 4 e 7 dias. Sua rota, seja por embriogênese ou organogênese, é dependente do tempo e da concentração a que a cultura é submetida.

Embriogênese somática também foi induzida através de “pulse” quando inflorescências de *Liquidambar styraciflua* tiveram como fator de indução “pulse” de TDZ ($0.01^{-1}\text{mg L}^{-1}$) durante o período de uma semana e posterior cultivo em meio isento de reguladores de crescimento. Com isso ficou demonstrado que tecidos maduros dessa espécie tem habilidade para produzir culturas embriogênicas quando fornecido o estímulo apropriado (MERKLE et al., 1997).

2.5 Aclimatização

No processo de micropropagação de orquídeas, um dos maiores entraves encontra-se na elevada taxa de mortalidade das plântulas na etapa de aclimatização em função da perda excessiva de água (BRAINERDE & FUCHIGAMI, 1982) e também da baixa qualidade da raiz formada *in vitro* (GROUT & ASTON, 1977; ZIMMERMAN, 1981). Estes fatores acabam por torná-las vulneráveis ao cultivo em ambiente *ex vitro*.

Plântulas em condições *in vitro* são cultivadas em frascos sob baixa intensidade de luz (1200-3000 lux), atmosfera com alto nível de umidade (90 a 100%), temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), e em meio contendo açúcar e nutrientes em quantidade suficiente para permitir o crescimento heterotrófico. Estas condições conferem às plântulas folhas geralmente tenras, fotossinteticamente pouco ativas e com o mesófilo pouco diferenciado. Além disso, apresentam frágil sistema vascular, tornando-as altamente suscetíveis ao estresse (HAZARIKA, 2006). A cutícula é pouco desenvolvida, devido à elevada umidade relativa, sendo desta forma, mal adaptada às condições que lhe serão impostas após o transplante *ex vitro* (PIERIK, 1990). Outra característica é a estrutura e forma alterada dos estômatos, que se apresentam maiores quando comparados aos de plantas germinadas e crescidas de forma natural, com as paredes celulares das células-guardas mais finas e, contendo mais amido e cloroplastos no citoplasma (MARIN et al., 1988).

Durante a aclimatização, ocorrem modificações como o espessamento da folha, redução da densidade e alterações na forma estomática de circular para elíptica. Também ocorre o desenvolvimento de cutícula, ceras epicuticulares, e aumento na eficácia da regulação da transpiração pelos estômatos, levando à estabilização do potencial hídrico das plântulas transferidas para casa de vegetação (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999).

Além das mudanças ocorridas em função do controle hídrico pela plântula, durante o processo de aclimatização, ocorre também a passagem de uma condição heterotrófica, em que o meio de cultura oferece todo suprimento necessário à sua sobrevivência, a uma condição autotrófica (GEORGE, 1993). Como a concentração de carboidratos influencia o processo de aclimatização, a redução gradativa da concentração de sacarose no meio pode contribuir para que as plântulas mudem de um crescimento heterotrófico para autotrófico aumentando a capacidade fotossintética antes do transplante (WAINWRIGHT e SCRACE, 1989).

Além disso, outra estratégia para se promover a adaptação gradativa das plântulas é manter os recipientes de cultivo na estufa com as tampas abertas ou na sombra por 3-6 dias, sob luz natural difusa para promover adaptação às condições do novo ambiente (HAZARIKA, 2003). Plântulas de *Nicotiana tabacum*, na etapa de aclimatização passam primeiramente por casa de vegetação com baixa irradiação ($30-90 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e, em seguida, ar livre ($200-1400 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), não apresentando fotoinibição durante o crescimento na casa de vegetação (POSPI'SILOVA et al., 1999).

O importante para que as plantas sobrevivam ao processo de aclimatização é desenvolver características adaptativas a resistência ao estresse hídrico, realização da fotossíntese de forma mais eficiente, maior absorção de nutrientes, que possibilitem que as plântulas suportem o estresse abiótico (alterações na temperatura, intensidade luminosa e condições de umidade) e biótico (micro-organismos, micro, meso e macrofauna) das condições *ex vitro*, como por exemplo o amplo espectro da luz solar (4000-12000 lux) e temperatura (26-36°C) que podem causar carbonização das folhas, fotoinibição e fotobranqueamento da clorofila (Chl), além de murchamento, (MORAIS; DIAS; FARIAS, 2002). Em plântulas de tabaco, Ticha et al. (1999) constataram que a aclimatização reduziu a densidade estomática e também alterou o tamanho e a morfologia dos estômatos em ambas as regiões das folhas recém-formadas (abaxial e adaxial). Em outro estudo, duas semanas após o transplante de diversas plântulas de espécies ornamentais como *Ficus* (Moraceae) e *Bromeliaceae*, as raízes produzidas por estas em meio de cultura tinham, na maioria dos casos, morrido, enquanto que novas raízes começaram a se desenvolver. Isso indica que, para algumas espécies, as raízes *in vitro* não são funcionais após transferência para a condição *ex vitro*. Porém foi verificado que no caso de plantas que morreram, a morte foi precedida pela morte das

raízes, e as plantas sobreviventes apresentavam desenvolvimento de algumas das raízes existentes ou emissão de novas raízes (DEBERGH e MAENE, 1981).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização de experimentos e análises

Os experimentos *in vitro* foram desenvolvidos no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), as análises anatômicas em microscopia de luz foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, ambos do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba/SP e as análises anatômicas em microscopia de varredura no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA - ESALQ/USP).

3.2 Material vegetal

As plântulas de *C. labiata* e *C. eldorado* utilizadas neste trabalho, foram obtidas por germinação *in vitro* de sementes de cápsulas oriundas de autofecundação e cultivadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) isento de reguladores de crescimento em sala de crescimento, com temperatura e luminosidade controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; irradiância de $42 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e fotoperíodo de 16 horas) até altura de $1,0 \pm 0,2$ cm de comprimento, quando foram submetidas a diferentes tratamentos, sendo as raízes retiradas visando avaliar unicamente aquelas desenvolvidas após a inoculação.

3.3 Meio de cultura, dosagens e tempo de exposição aos reguladores de crescimento

O meio de cultura MS foi utilizado como meio básico em todos os experimentos, tanto no controle, como nas combinações com o acrescido de paclobutrazol (PBZ) isoladamente ou associado com ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP), conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Tipo e concentração dos reguladores de crescimento

Níveis	Tipo de Regulador de crescimento e concentrações (mg.L ⁻¹)		
	ANA	BAP	PBZ
C1	0,0	0,0	0,0
C2	1,0	1,0	0,0
C3	0,0	0,0	1,0
C4	0,0	0,0	2,0
C5	0,0	0,0	4,0
C6	0,0	0,0	6,0
C7	1,0	1,0	4,0

O meio de cultura foi geleificado com 10,0 g.L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,7 e autoclavado a 120°C por 20 minutos. Foram utilizados seis frascos de 180 mL contendo 40 mL de meio de cultura, onde foram inoculadas três plantas por frasco. Cada frasco foi considerado como uma unidade experimental.

As plântulas inoculadas permaneceram sob ação dos reguladores de crescimento por 160 dias em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (25±2°C; irradiância de 42 µmol.m⁻².s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e fotoperíodo de 16 horas) .

As avaliações morfológicas, número de brotações por microplântula (NB), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR) e comprimento da lâmina (CLF) do segundo par de folhas foram realizadas no início do experimento e também em cada subcultivo (0,40, 80, 120, 160 dias) sob condições de câmara de fluxo laminar, sendo as medidas de comprimento, obtidas por meio de papel milimetrado autoclavado.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo trifatorial (2x7x5) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por espécies, combinações de reguladores de crescimento e períodos de avaliação (0, 40, 80, 120, 160 dias). Foram realizadas seis repetições por tratamento, sendo cada uma composta por uma unidade experimental.

3.4 Teste de “Pulse”

De acordo com o melhor resultado obtido no experimento de dosagens e tempo de exposição ao PBZ (3.3) realizou-se um segundo experimento com *C. labiata* utilizando a técnica de “Pulse”. Como controle foi utilizado meio de cultura MS, e para os tratamentos utilizou-se o meio de cultura MS acrescido de concentrações crescentes de paclobutrazol (PBZ) com diferentes tempos de exposição, sendo: T0= controle (MS); T1= 1,0 mg.L⁻¹ de PBZ por 40 dias; T2= 10,0 mg.L⁻¹ de PBZ por 4 dias e T3= 100,0 mg.L⁻¹ de PBZ por 4 horas. Para cada tratamento utilizou-se quatorze frascos de 180 mL contendo 40 mL de meio de cultura, onde foram inoculadas três plantas de *C. labiata* por frasco, sendo esse considerado como uma unidade experimental.

Decorrido o tempo de exposição ao PBZ as plantas foram transferidas para MS isento de PBZ, onde permaneceram até completar os 40 dias de cultivo, quando foram feitas as avaliações de comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da lâmina foliar do segundo par de folhas (CLF), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), massa fresca (MFA) e massa seca (MSA) da parte aérea, massa fresca (MFR) e massa seca de raiz (MSR), massa fresca total (MFT) e massa seca total (MST). Além disso, também foram realizadas as análises anatômicas do material de cada tratamento.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado totalizando quatorze repetições por tratamento, sendo cada uma composta por uma unidade experimental.

3.4.1 Análises anatômicas

3.4.1.1 Contagem estomática em MEV e análise do tecido radicular

As amostras foliares foram compostas por três plantas de *C. labiata* para cada tratamento, das quais foram cortados segmentos com aproximadamente 25,0 mm² do terço médio do bordo foliar esquerdo do segundo par de folhas. O material foi fixado em solução de Karnovsky (1965) modificado (glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2,5%) e lavados em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2.

Em seguida, as amostras de folhas foram desidratadas em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100%) e secadas ao ponto crítico com CO₂ utilizando o Baltec CPD 030. As amostras foram aderidas, com fita dupla face de carbono, a um suporte adequado (stubs) e submetido ao recobrimento com ouro em metalizador Baltec SCD 050 por 180 segundos. Finalmente, o material foi examinado em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP.

Para avaliação estomática, dez micrografias com aumento de 500x foram obtidas aleatoriamente de cada tratamento, onde se realizou a contagem em área de 0,25mm² de estômatos abertos (EA); estômatos fechados (EF) e estômatos alterados (EAL), para aqueles em que não foi possível identificar o ostíolo e nem as células guardas.

3.4.1.2 Área de tecido radicular

Utilizando o micrôtom de deslize e material fresco, secções transversais foram realizadas com espessura de 80-120µm no terço médio das raízes de *C. labiata*. Foram utilizados três raízes para cada tratamento e os cortes obtidos foram clarificados com hipoclorito de sódio a 20% (v/v) e coloridos com fucsina básica 0,0125% e azul de Astra 1,0% (ALVES de BRITO; ALQUINI, 1996). Uma vez efetuada a dupla coloração, confeccionou-se as lâminas semipermanentes, com gelatina-glicerina (Kaiser 1880, apud Kraus & Arduin 1997).

Em estereomicroscópio, utilizando o mesmo aumento para todas as observações, seis cortes de cada tratamento foram fotografados para análise dos tecidos radiculares totalizando seis repetições. Posteriormente, utilizando software Anati-Quant, foram feitas as medições do cilindro vascular, da endoderme, do córtex, da exoderme e do velame.

3.4.1.3 Caracterização do tecido radicular em MEV

As amostras radiculares, compostas por duas raízes de *C. labiata* de cada tratamento, foram fixadas em solução de Karnovsky (1965) modificado (glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2,5%) e lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, sendo que, antes da desidratação foi feita a fratura na região central das raízes em nitrogênio líquido, utilizando o glicerol 30% como crioprotetor. Em seguida, foram

desidratadas em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100%), secas ao ponto crítico com CO₂ utilizando o Baltec CPD 030 e metalizadas com metalizador Baltec SCD 050 por 180 segundos, e em seguida examinadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP.

3.5 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a 5 e 1% de probabilidade de erro. De acordo com a significância, foi feito a análise de regressão polinomial a 5% e a 1% e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, através do programa SOC (EMBRAPA, 1990).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Interações entre os fatores espécie, combinação de reguladores de crescimento e tempo de avaliação

Conforme a análise de variância (Tabela 2) todos os fatores isolados apresentaram influência significativa sobre ao menos uma das características isoladas. O tempo de avaliação foi significativo para todos os fatores analisados, mostrando que durante estes períodos houve alterações no desenvolvimento das plantas no que tange a produção de brotos, desenvolvimento de raízes ou parte aérea.

Avaliando-se a interação entre espécie e combinação de reguladores de crescimento observou-se resposta significativa para o número de brotos (NB) e comprimento da maior raiz (CMR), a interação entre espécie e tempo foi significativa para o número de brotos (NB), comprimento da maior raiz (CMR) e comprimento da lâmina foliar (CLF). Diferenças estas aceitáveis, pois mesmo sendo espécies distintas, com características morfológicas próprias, pertencem ao mesmo gênero, o que pode explicar tendências comportamentais similares, tais como, apresentarem o mesmo padrão de resposta para o mesmo tratamento. Dessa forma, foi possível trabalhar apenas com *C. labiata* no segundo experimento.

Ao considerar a interação entre a combinação de reguladores de crescimento e tempo de avaliação houve efeito significativo para todas as características de crescimento avaliadas, mostrando que dependendo da dose de PBZ e combinação de reguladores de crescimento testados, as plantas apresentaram características diferentes nos tempos avaliados. Não houve interação trifatorial das causas de variação para nenhuma das características avaliadas.

Tabela 2 - Análise de variância para o número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR) e comprimento da lâmina foliar (CLF) de explantes de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação aos tratamentos avaliados

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios			
		NB ⁽¹⁾	CPA ⁽¹⁾	CMR ⁽¹⁾	CLF ⁽¹⁾
Tempo (T)	4	9,319**	0,072**	0,589**	1,195**
Subparcela (T)	30	0,069 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,018 ^{ns}	0,013*
Espécie (E)	1	0,405 ^{ns}	0,058**	0,279**	0,419**
Combinação (C)	6	2,376**	0,200**	0,293**	0,402**
E * C	6	0,303*	0,005 ^{ns}	0,121**	0,015 ^{ns}
E * T	4	0,288*	0,001 ^{ns}	0,082**	0,069**
C * T	24	0,291**	0,024**	0,047**	0,100**
E * C * T	24	0,067 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,013 ^{ns}	0,010 ^{ns}
Resíduo	250	0,104	0,002	0,020	0,007
Média	-	1,07	0,86	0,27	0,87
CV _{exp.} (%)	-	28,27	4,57	16,71	7,62

^{ns} valor não significativo a 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

* e ** valor significativo a de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $(x+0,5)^{0,5}$ pelo teste de Bartlett a 5% de probabilidade de erro. x = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

O tempo de avaliação foi importante para traçar uma tendência de comportamento das plantas com relação às diferentes combinações de reguladores de crescimento, determinando o período de 160 dias. As plantas utilizadas no experimento encontravam-se na fase final de desenvolvimento *in vitro* ou pré-aclimatização, quando apresentam crescimento acelerado, evidenciando quaisquer diferenças em seu desenvolvimento, como inibição ou estimulação de crescimento.

Desta forma, a significância do fator tempo era esperada, e foi confirmada em todas as condições aplicadas no experimento. Nota-se que os explantes tratados com PBZ, independente das concentrações aplicadas, não apresentaram alterações morfológicas significativas até os primeiros 40 dias de exposição. No entanto, a partir da avaliação aos 80 dias de cultivo, as plantas incubadas nos meios com adição do PBZ começaram a apresentar aspecto rosetado (Figuras 1 e 2). O mesmo fenômeno

também foi observado por Canto et al. (2004) aos 30 dias da aplicação de diversas concentrações de PBZ no cultivo *in vitro* de abacaxi (*Ananas comosus*). O aspecto rosetado é decorrente do menor desenvolvimento dos entrenós, como resultado da inibição da síntese de giberelinas causada pelo PBZ, tendo em vista que este hormônio atua no alongamento da parte aérea das plantas (Souza et al., 2010).

Figura 1 - Características morfológicas de microplântulas de *C. labiata* avaliadas aos 0, 40, 80, 120 e 160 dias, sob efeito das diferentes combinações de reguladores de crescimento: controle (C1); $1,0\text{mg.L}^{-1}$ ANA + $1,0\text{mg.L}^{-1}$ BAP (C2); $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de PBZ (C3); $2,0\text{mg.L}^{-1}$ PBZ (C4); $4,0\text{mg.L}^{-1}$ PBZ (C5); $6,0\text{mg.L}^{-1}$ PBZ (C6) e $1,0\text{mg.L}^{-1}$ ANA + $1,0\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $4,0\text{mg.L}^{-1}$ PBZ (C7)

Figura 2 - Características morfológicas de microplântulas de *C. eldorado* avaliadas aos 0, 40, 80, 120 e 160 dias, sob efeito das diferentes combinações de reguladores de crescimento, controle (C1); $1,0\text{mg.L}^{-1}$ ANA + $1,0\text{mg.L}^{-1}$ BAP (C2); $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de PBZ (C3); $2,0\text{mg.L}^{-1}$ PBZ (C4); $4,0\text{mg.L}^{-1}$ PBZ (C5); $6,0\text{mg.L}^{-1}$ PBZ (C6) e $1,0\text{mg.L}^{-1}$ ANA + $1,0\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $4,0\text{mg.L}^{-1}$ PBZ (C7)

Além do aspecto rosetado apresentado por todas as plantas tratadas com PBZ, outra alteração morfológica notável foi o maior desenvolvimento das raízes. Segundo Pompelli e Guerra (2005) o desenvolvimento das raízes em plantas está ligado à ação das auxinas e citocininas, porém, no presente experimento, a aplicação de ANA e BAP não foi a responsável por este efeito e sim o PBZ. Em outro estudo com plântulas de *Lillium* sp. a aplicação de PBZ foi responsável pelo estímulo da formação de diversas raízes normais, porém, quando aplicado em concentrações mais altas também se observou o engrossamento incomum das raízes (Thakur et al., 2006). O engrossamento das raízes apresentados pelas plântulas de *C. labilata* e *C. eldorado* pode ser considerado um indicativo de que mesmo a dose mínima de PBZ aplicada neste estudo, representa uma dose superior à considerada ótima para a formação de raízes nestas espécies, porém, cabe salientar que este engrossamento pode representar um

resultado interessante, uma vez que pode gerar maior vigor à planta, aumentando a sobrevivência durante a aclimatização.

Outro aspecto apresentado pelas plantas submetidas aos tratamentos com PBZ refere-se a alteração da coloração das folhas, as quais adquiriram uma tonalidade verde escuro mais intenso. Esta mudança nos permitiu inferir que, sob influência dos tratamentos com o PBZ, ocorreu aumento na quantidade de clorofila. Isso se torna plausível, uma vez que a redução da síntese de giberelina por ação deste inibidor favorece a rota para produção de fitol, que é um terpenóide presente na molécula de clorofila (CHANEY, 2004). Nizam e Te-chato (2009) avaliaram a quantidade de clorofila em plântulas de palmeira tratadas com PBZ e encontraram uma quantidade quase que dobrada deste pigmento comparando-se com o controle sem aplicação do regulador de crescimento. Outros autores como Thakur et al. (2006) encontraram um aumento na produção de clorofila de *Lilium longiflorum* var. Pollyanna após a aplicação de PBZ, e enfatizam este aumento como benéfico à planta ao ser transplantada para o ambiente *ex vitro*, pois garantirá a autotrofia. Fletcher et al. (2000) propõe que o PBZ estimula a síntese de citocininas, o que aumenta a diferenciação de cloroplastos, síntese de clorofila e previne a degradação da clorofila. Este aspecto é especialmente interessante para a cultura de tecidos, tendo em vista que os meios de cultura possuem açúcar em sua composição, contribuindo para ampliar o heterotrofismo das microplantas, e consequentemente aumentando a dificuldade de aclimatização das mesmas.

Outra consequência da redução na biossíntese de giberelina é a queda no metabolismo vegetal (ASARE-BOAMAH et al., 1986; MARSHALL et al., 1991; MARSHALL et al., 2000; FLETCHER et al., 2000), ou seja, menor taxa respiratória e consequentemente redução do ATP disponível. A menor quantidade de ATP disponível acaba ocasionando a redução do crescimento das plantas (BAI e CHANEY, 2001), pois será reduzida tanto a divisão celular, quanto a elongação celular, ambos os processos que demandam uma quantidade considerável de energia.

4.1.1 Comprimento da parte aérea (CPA) e da lâmina foliar (CLF)

A análise de regressão polinomial revelou que o tratamento controle e o tratamento com a aplicação de apenas ANA + BAP apresentaram comportamento oposto aos tratamentos que receberam PBZ, tanto para o CPA quanto para a CLF.

Todos os tratamentos que receberam PBZ, no entanto, apresentaram resultados similares entre si. A aplicação do PBZ resultou em uma redução do CPA e da CLF, em todas as concentrações avaliadas, resultando na redução de 47% da parte aérea (Figura 3) e 73% da lâmina foliar (Figura 4) em relação ao controle, aos 160 dias de experimento.

Figura 3 - Comprimento da parte aérea de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação ao tempo, de acordo com as diferentes combinações de reguladores de crescimento, controle (C1), 1,0mg.L⁻¹ ANA + 1,0mg.L⁻¹ BAP (C2), 1,0mg.L⁻¹ de PBZ (C3), 2,0mg.L⁻¹ PBZ (C4), 4,0mg.L⁻¹ PBZ (C5), 6,0mg.L⁻¹ PBZ (C6) e 1,0mg.L⁻¹ ANA + 1,0mg.L⁻¹ BAP + 4,0mg.L⁻¹ PBZ (C7)

Figura 4 - Comprimento da lâmina foliar de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação ao tempo, de acordo com as diferentes combinações de reguladores de crescimento, controle (C1), 1,0mg.L⁻¹ ANA + 1,0mg.L⁻¹ BAP (C2), 1,0mg.L⁻¹ de PBZ (C3), 2,0mg.L⁻¹ PBZ (C4), 4,0mg.L⁻¹ PBZ (C5), 6,0mg.L⁻¹ PBZ (C6) e 1,0mg.L⁻¹ ANA + 1,0mg.L⁻¹ BAP + 4,0mg.L⁻¹ PBZ (C7)

Estes resultados corroboram com Te-chato et al. (2009), que ao utilizar diversas concentrações de PBZ em *Dendrobium*, observaram que as plântulas apresentaram internódios mais curtos e pseudobulbos mais grossos. Efeitos semelhantes também foram relatados para cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (Lorenzo et al., 1998; Lorenzo et al., 2001), abacaxi (*Ananas comosus*) (Escalona et al., 1999; Feuser et al., 2001) e bromélias (*Vriesea brusquensis* e *Aechmea fasciata*) (Rech Filho et al., 2003a; Rech Filho et al., 2003b). Contudo, resultados mais expressivos foram encontrados por Ritchie et al. (1991) utilizando a concentração de 10,2 μ M (3,0mg.L⁻¹) de paclobutrazol em culturas de *Chrysanthemum moriflorum* e *Beta vulgaris*, as quais representaram redução de 230% no comprimento da parte aérea e também por Nepomuceno et al. (2007), utilizando 13,6 μ M (4,0mg.L⁻¹) de paclobutrazol em *Anadenanthera colubrina*, observando redução de 290% na parte aérea, em relação ao meio de cultura sem adição de PBZ.

A redução do comprimento da parte aérea possivelmente é consequência da estimulação da síntese de citocininas e inibição da síntese de giberelinas. Tefera e Wannakrairo (2006) aplicaram diferentes doses de thidiazuron (TDZ), uma citocinina

sintética, e PBZ em *Aframomum corrorima* separadamente e em conjunto, e constataram que estes dois reguladores diminuíram o crescimento da parte aérea, tanto quando aplicados individualmente, quanto em conjunto. A inibição da parte aérea resultante da aplicação de PBZ também reduz a competição pelos assimilados que, conseqüentemente, ficam mais disponíveis para o enraizamento (HABERMANN et al., 2006). As citocininas apresentam papeis opostos nas raízes e na parte aérea, com isso o aumento na produção de citocininas mudará o balanço de crescimento entre estas porções da planta (RIEFLER et al., 2006). Estes autores trabalharam com plantas mutantes para três receptores de citocinina com diferentes distribuições na parte aérea e raízes, demonstrando desta forma que os mutantes para estes receptores apresentavam um número reduzido de células das folhas. Assim, podemos conferir à interferência do PBZ na síntese deste hormônio como um dos fatores para a redução no crescimento da parte aérea das microplântulas no presente trabalho.

4.1.2 Comprimento da maior raiz (CMR)

Com relação ao comprimento radicular, considerando a combinação de reguladores de crescimento e o tempo, independentemente das espécies, os melhores resultados para os tratamentos ocorreram aos 80 dias de cultivo (Figura 5), sendo que a presença de PBZ no meio de cultivo, mesmo reduzindo o comprimento da raiz em relação ao controle, promoveu aumento do diâmetro radicular (Figuras 1 e 2). Khunachak et al. (1987), ao incorporar PBZ ao meio de cultura, verificaram o engrossamento das raízes e redução do crescimento das hastes em aspargo (*Asparagus officinalis*), além do aumento no vigor das plântulas. Thakur et al. (2006) também encontraram espessamento de raízes em *Lillium* sp. com aplicação de PBZ, e afirma que o espessamento pode ser uma característica benéfica, sendo capaz de aumentar a sobrevivência *ex vitro*.

Figura 5 - Comprimento da maior raiz de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação ao tempo, de acordo com as diferentes combinações de reguladores de crescimento, controle (C1), 1,0mg.L⁻¹ ANA + 1,0mg.L⁻¹ BAP (C2), 1,0mg.L⁻¹ de PBZ (C3), 2,0mg.L⁻¹ PBZ (C4), 4,0mg.L⁻¹ PBZ (C5), 6,0mg.L⁻¹ PBZ (C6) e 1,0mg.L⁻¹ ANA + 1,0mg.L⁻¹ BAP + 4,0mg.L⁻¹ PBZ (C7)

Avaliando as espécies (*C. labiata* e *C. eldorado*) com relação a combinação de reguladores de crescimento, aos 160 dias de cultivo, o melhor resultado observado para CMR em ambas, ocorreu na concentração de 1,0mg.L⁻¹ de PBZ (C3), porém, foi significativamente superior ao controle somente para *C. eldorado* (Figura 6).

Figura 6 - Comprimento médio das raízes de *C. eldorado* (CE) e *C. labiata* (CL) avaliadas aos 160 dias de exposição às diferentes combinações de reguladores de crescimento. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade de erro. Letras maiúsculas = comparação entre espécies. Letras minúsculas = comparação entre tratamentos

O crescimento das raízes é regulado principalmente pelas auxinas e giberelinas, sendo esta última responsável por manter as raízes longas e finas, e a falta deste hormônio pode causar expansão anormal e supressão do alongamento das raízes (TANIMOTO, 2005). No entanto, as citocininas também participam do desenvolvimento das raízes, o que foi demonstrado por Riefler et al. (2006), os quais verificaram que plantas mutantes para receptores de citocininas com localização nas raízes apresentaram maior comprimento, maior ramificação e maior massa de matéria seca. Isso mostra que a privação de citocininas nas raízes estimula o seu crescimento. Por outro lado, o aumento da concentração de citocininas nos tecidos radiculares reduz o comprimento das raízes.

A diminuição no crescimento das raízes pelos tratamentos C2 e C7 pode ser atribuída à aplicação de ANA e BAP, já que C5, que apresenta a mesma concentração de PBZ presente no tratamento C7, porém, sem a presença de ANA e BAP, apresentou aos 80 dias de cultivo, o maior crescimento das raízes, no entanto, este crescimento cessou aos 160 dias, igualando-se ao observado em C5 e C7. A redução no crescimento, no entanto, pode estar mais ligada à aplicação de BAP, que é uma citocinina sintética, do que a ANA, pois a aplicação do BAP aumentou a concentração

de citocinina na raiz, além de também alterar o equilíbrio entre auxinas e citocininas, o que pode ter resultado nesta diminuição de desenvolvimento das raízes.

Já os melhores resultados obtidos pelo tratamento C3 ocorreram aos 160 dias, e podem ser resultado do melhor equilíbrio entre os três fitormônios, auxinas, giberelinas e citocininas, proporcionado pelo PBZ. Além disso, a realocação de carbono para raízes resultante da aplicação de PBZ também pode influenciar o crescimento das mesmas (TODIC et al., 2005).

Nizam e Te-chato (2009), em experimento *in vitro* com dendê (*Elaeis quineensis* Jacq.), observaram que a suplementação com PBZ e ANA ao meio de cultura foi capaz de induzir a formação de raízes, ao passo que sem a suplementação, somente uma raiz curta se desenvolveu. Utilizando a combinação de 6,0 mg.L⁻¹ ANA e 9,0 mg.L⁻¹ PBZ, os autores obtiveram raízes saudáveis e vigorosas, enquanto que, doses acima dessa combinação desencadearam a produção de raízes muito grossas e curtas, inadequadas para o plantio. Isso demonstra que existe uma dose certa em que o PBZ pode estimular a formação de raízes.

4.1.3 Número de brotos (NB)

Além das características supracitadas, o PBZ também promoveu o aumento da taxa de brotação em ambas as espécies avaliadas de orquídeas, corroborando as observações de Lorenzo et al. (1998) na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) em biorreator de imersão temporária com o uso de 3,4 µM (1,0mg.L⁻¹) de PBZ, obtendo 57,8 brotos, e na ausência de PBZ 23,9 brotos. Em bromélias relatou-se aumento da taxa de multiplicação de brotos em *Aechmea blumenavii*, *Cryptanthus bromelioides* e *Neoregelia carolina*, após 60 dias de cultivo em imersão temporária, com uso de reguladores de crescimento ANA, BAP e PBZ (DAQUINTA et al., 1999).

Os resultados obtidos para ambas as espécies de orquídeas, em relação a NB nos diferentes períodos foi semelhante para todas as combinações com PBZ, sendo que, estes tratamentos até os 40 dias não apresentaram diferenças inclusive em relação ao controle. No entanto, a partir dos 80 dias as combinações com PBZ apresentaram número de brotações maiores que o controle (Figura 7), podendo representar desvantagens no desenvolvimento das plantas, já que estas encontravam-se na fase de enraizamento, e não de multiplicação.

Figura 7 - Número de brotos de *C. labiata* e *C. eldorado* em relação ao tempo, de acordo com as diferentes combinações de reguladores de crescimento, controle (C1), 1,0mg.L⁻¹ ANA + 1,0mg.L⁻¹ BAP (C2), 1,0mg.L⁻¹ de PBZ (C3), 2,0mg.L⁻¹ PBZ (C4), 4,0mg.L⁻¹ PBZ (C5), 6,0mg.L⁻¹ PBZ (C6) e 1,0mg.L⁻¹ ANA + 1,0mg.L⁻¹ BAP + 4,0mg.L⁻¹ PBZ (C7)

A combinação de ANA (1,0mg.L⁻¹) e BAP (1,0mg.L⁻¹) resultou em maior número de brotações em relação aos demais tratamentos em todos os períodos, corroborando com as observações de Galvanese et al. (2007) que, ao trabalhar com *Aechmea blanchetiana*, observou maior taxa de brotação (62,00) sob as mesmas condições em meio de cultura MS semi sólido contendo 6,0mg.L⁻¹ de ágar. A associação desses dois reguladores de crescimento está sendo utilizada com muita eficiência para a indução de brotos adventícios em conjunto com os sais de MS, perfazendo protocolos eficientes para a multiplicação *in vitro* de bromélias (MERCIER e KERBAUY, 1997).

O aumento no nível de citocininas é uma provável razão para maior formação de brotos nos tratamentos com a aplicação de PBZ e principalmente no tratamento com aplicação de ANA + BAP. A obtenção de maior número de brotos em função da

aplicação de PBZ também foi reportada por diversos autores em experimentos utilizando diferentes espécies vegetais (ALBANY et al., 2005; TEFERA e WANNAKRAIROJ, 2006; NIZAM e TE-CHATO, 2009). Com o aumento da produção de citocininas provocada pela adição dos triazóis, ocorre a diminuição da dominância apical sobre as gemas laterais, as quais começam a se desenvolver. Tefera e Wannakrairoj (2006) aplicaram diferentes reguladores de crescimento, sendo duas citocininas sintéticas (BAP e TDZ) e o PBZ, para multiplicação *in vitro* de Korarima (*Aframomum corrorima*). Todos os reguladores aplicados foram capazes de aumentar o número de brotos, no entanto, efeitos consideráveis foram obtidos nas combinações 0,5 mg.L⁻¹ TDZ e 3,0 mg.L⁻¹ PBZ.

No presente experimento, como o tratamento C2 foi o que induziu maior número de brotações, pode-se atribuir este efeito à aplicação da combinação citocininas e auxinas. Já o tratamento C7, provavelmente a dose de PBZ combinada suprimiu o efeito da aplicação do ANA e BAP, causando um balanceamento hormonal menos favorável a brotações.

No trabalho de Albany et al. (2005), o aumento de brotações para diversas espécies foi atribuído à aplicação de inibidores de crescimento, dentre eles o PBZ, confirmando o potencial deste regulador de crescimento na multiplicação de plantas *in vitro*.

4.2 Efeitos do “Pulse”

O “pulse” foi significativo para o comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da área foliar (CLF), massa fresca da parte aérea (MFA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da raiz (MSR), massa fresca total (MFT) e massa seca total (MST) (Tabela 3). Tendo em vista que uma das intenções da aplicação do “pulse” é reduzir o tempo de cultivo *in vitro*, torna-se interessante salientar que os parâmetros avaliados tenham, em sua maioria, sofrido alterações significativas.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para CPA, CMR, CLF, NR, MFA, MSA, MFR, MSR, MFT e MST para *C. labiata* em relação aos tratamentos avaliados

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios									
		CPA	CMR	CLF	NR	MFA	MSA ⁽¹⁾	MFR ⁽¹⁾	MSR ⁽¹⁾	MFT	MST ⁽¹⁾
Tratamento	3	0,3002 [*]	0,1147 _{ns}	0,2282 [*]	0,7921 _{ns}	0,0351 [*]	0,0000001 _{3^{ns}}	0,000013 _{**}	0,000000 _{44^{**}}	0,1712 [*]	0,000000 _{43^{**}}
Resíduo	42	0,0544	0,0508	0,0732	0,7283	0,0039	0,0000000 ₇	0,000001	0,000000 ₀₆	0,0052	0,000000 ₀₈
Média	-	1,25	0,73	1,20	1,55	0,2251	0,0183	0,1036	0,0071	0,3288	0,0254
CVexp.(%)	-	18,59	30,66	22,51	54,78	28,05	19,85	34,27	31,81	21,99	17,72

^{ns} valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F

^{*} e ^{**} valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F

⁽¹⁾ dados transformados por $(n^{0,5})/100$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro. n = dado amostrado

4.2.1 Comprimento da parte aérea (CPA) e lâmina foliar (CLF)

Tanto para CPA, quanto para CLF os três tratamentos com PBZ não diferiram entre si, porém, T3 e T4 em relação à CPA e apenas T4 em relação ao CLF foram inferiores ao controle. Estes resultados mostram que o “pulse” foi efetivo na redução do crescimento da parte aérea de *C. labiata* (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios do CPA e CLF de *C. labiata* em relação aos tratamentos avaliados

Tratamento	CPA	CLF
T1	1,45±0,28 A	1,33±0,30 A
T2	1,30±0,20 AB	1,29±0,16 AB
T3	1,08±0,22 B	1,12±0,22 AB
T4	1,15±0,22 B	1,03±0,36 B

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. T1 = MS (controle); T2 = MS+1,0mg L⁻¹ PBZ por 40 dias; T3 = MS+10,0mg L⁻¹ PBZ por 4 dias; T4 = MS+100,0mg L⁻¹ PBZ por 4 horas

Kishorekumar et al. (2006) verificaram diversas alterações no desenvolvimento das folhas de *Solenostemon rotundifolius* induzidas pela aplicação de PBZ e hexaconazol, como aumento na produção de células, espessura da epiderme, parênquima paliçádico e lacunoso. Os autores atribuíram as modificações à elevação nos níveis de citocinina que estes reguladores de crescimento provocam. Entretanto, a área foliar de *Chrysanthemum* sp não foi afetada pela aplicação de PBZ em três concentrações crescentes, porém, o comprimento da parte aérea foi reduzido quando

utilizado $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, e menor ainda na concentração de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (KUCHARSKA e ORLIKOWSKA 2008).

Werner et al. (2001) analisou o desenvolvimento de plantas mutantes deficientes em citocinina endógena e viu que estas apresentavam folhas pouco desenvolvidas, além de internódios curtos, quando comparadas com plantas não mutantes, comprovando assim a importância deste regulador de crescimento no desenvolvimento da parte aérea. Holst et al. (2011) verificaram que plantas mutantes deficientes em citocinina endógena apresentavam a divisão celular diminuída e até cessada antes das plantas não mutantes, mostrando que as citocininas controlam a duração da divisão celular.

Segundo Fletcher et al. (2000), a aplicação de PBZ aumenta a quantidade de citocinina endógena, aumentando assim a divisão celular. Seria então esperado um aumento no desenvolvimento da parte aérea, porém, a inibição da produção das giberelinas faz com que as células produzidas não se expandam, resultando na diminuição do crescimento da parte aérea que foi verificado nos tratamentos T3 e T4, e também a diminuição do comprimento foliar em T4. Em T2 para o comprimento da parte aérea, e T2 e T3 para comprimento da folha, o tempo de exposição e concentração do regulador de crescimento não foram suficientes para alterar o desenvolvimento da planta. Já T4 foi capaz de alterar o desenvolvimento geral da parte aérea da planta.

Considerando a avaliação de CPA e CLF concomitantemente, T2 foi o único tratamento que não diferiu do controle para os dois parâmetros. Isso representa que outros benefícios podem ser obtidos utilizando esse tratamento com PBZ, sem prejudicar o desenvolvimento da parte aérea.

4.2.2 Matéria fresca (MF) e matéria seca (MS)

Em se tratando da influência do “pulse” na biomassa vegetal, todos os parâmetros relacionados à massa de matéria fresca apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, enquanto que para os parâmetros avaliados relacionados à massa de matéria seca, apenas a massa de raiz (MSR) e a massa total (MST) apresentaram diferenças significativa.

Para massa fresca da parte aérea (MFA), o maior valor foi atingido por T4, enquanto os menores foram os obtidos em T1 e T2. Já as massas frescas da raiz e total tiveram os maiores valores obtidos por T3 e T4 (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios da massa fresca da parte aérea (MFA), raiz (MFR) e total (MFT) de *C. labiata* em relação aos tratamentos avaliados

Tratamento	MFA	MFR	MFT
T1	0,2084±0,0864 BC	0,0520±0,0323 B	0,2604±0,0775 B
T2	0,1679±0,0437 C	0,0472±0,0291 B	0,2151±0,0406 B
T3	0,2493±0,0541 AB	0,1597±0,0629 A	0,4089±0,0875 A
T4	0,2930±0,0647 A	0,1763±0,0817 A	0,4693±0,0833 A

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. T1 = MS (controle); T2 = MS+1,0mg L⁻¹ PBZ por 40 dias; T3 = MS+10,0mg L⁻¹ PBZ por 4 dias; T4 = MS+100,0mg L⁻¹ PBZ por 4 horas

A massa seca da parte aérea não apresentou diferenças entre as médias dos quatro tratamentos, já as massas secas da raiz e total foram maiores em T4 (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios da massa seca da parte aérea (MSA), raiz (MSR) e total (MST) de *C. labiata* em relação aos tratamentos avaliados

Tratamento	MSA	MSR	MST
T1	0,0188 A	0,0051±0,0017 B	0,0239±0,0071 B
T2	0,0169 A	0,0049±0,0030 B	0,0218±0,0041 B
T3	0,0146 A	0,0058±0,0041 B	0,0204±0,0064 B
T4	0,0230 A	0,0133±0,0115 A	0,0363±0,0178 A

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. T1 = MS (controle); T2 = MS+1,0mg L⁻¹ PBZ por 40 dias; T3 = MS+10,0mg L⁻¹ PBZ por 4 dias; T4 = MS+100,0mg L⁻¹ PBZ por 4 horas

O fato da massa seca da parte aérea não apresentar diferença significativa entre os tratamentos, enquanto que a massa fresca apresenta, mostra que a diferença existente é o resultado de uma maior porcentagem de água nos tecidos das plantas com aplicação do PBZ. Desta forma podemos deduzir que T3 e T4 que apresentaram as maiores massas frescas, proporcionaram maior acúmulo de água nos tecidos da parte aérea. Nos tratamentos T3 e T4, as porcentagens de água na parte aérea foram de 94,1% e 92,2%, respectivamente, enquanto que no tratamento T2, com menor

massa fresca, a porcentagem de água foi de 89,9%, sendo que o tratamento controle apresentou 91% de água.

A diferença de massa fresca e seca da parte aérea e raízes apresentadas pelos tratamentos, provavelmente tem ligação com a influência do PBZ sobre a produção de fitormônios. Kucharska e Orlikowska (2008) trabalhando com três concentrações diferentes de PBZ (0,5; 1,0 e 3,0 mg.L⁻¹) em crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*), observaram diminuição da massa fresca da parte aérea nas concentrações 1,0 e 3,0 mg.L⁻¹ e diminuição da matéria fresca da raiz no tratamento com 1,0 mg.L⁻¹. A aplicação de duas doses de uniconazol por dois períodos diferentes em sementes de duas variedades de tomate causou aumento no valor de massa fresca das raízes. Já as massas fresca e seca da parte aérea diminuíram com a aplicação deste triazol (SIVANESAN et al, 2011). Resultado semelhante foi obtido por Yim et al (1997) com a aplicação de PBZ em arroz, que apresentou diminuição da massa seca da parte aérea e aumento da massa seca das raízes.

No entanto, Inada e Shimenn (2000) afirmam que o crescimento das raízes é controlado principalmente pelas giberelinas, de forma que a inibição da produção deste hormônio resulta em uma inibição do crescimento da raiz. Em *Arabidopsis thaliana* a redução da giberelina endógena causado pelo tratamento das plantas com PBZ resultou em uma redução na taxa de crescimento da raiz. Medições feitas ao microscópio comprovaram que o PBZ, causou diminuição no tamanho do meristema radicular e comprimento de células maduras, mas a aplicação de giberelinas nestas plantas resgatou o crescimento normal, mostrando que a diminuição do meristema assim como a elongação das células é resultado da privação de giberelina (UBEDA-TOMÁS et al. 2009).

4.2.3 Área do tecido radicular

A área do tecido radicular foi influenciada, em todos os parâmetros avaliados, pelo “pulse” (Tabela 7).

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para área do velame (Ve), exoderme (Ex), córtex (Ct), endoderme (En), cilindro vascular (CV) e total de *C. labiata*

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios					
		Ve ⁽¹⁾ (mm ²)	Ex ⁽¹⁾ (mm ²)	Ct ⁽¹⁾ (mm ²)	En ⁽¹⁾ (mm ²)	CV ⁽¹⁾ (mm ²)	Total ⁽¹⁾ (mm ²)
Tratamento	3	0,0187**	0,0227**	0,3467**	0,00038**	0,0027**	0,3834**
Resíduo	20	0,0005	0,0010	0,0071	0,00003	0,0001	0,0077
Média	-	0,1051	0,0893	0,9114	0,0034	0,0108	1,1201
CV _{exp.} (%)	-	7,10	10,92	9,09	9,51	11,83	8,54

** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. ⁽¹⁾ dados transformados por $(n)^{0,5}$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro, onde n = dado amostrado

A área do velame aumentou em todos os tratamentos com PBZ, apresentando médias com mais do dobro do valor apresentado pelo controle. Da mesma forma, o PBZ aumentou a área da exoderme e córtex em relação ao tratamento sem PBZ (T1). A endoderme teve o maior valor no tratamento T3, e o menor valor em T1. A área do cilindro vascular foi incrementada apenas nos tratamentos T3 e T4, e a área total foi maior em todos os tratamentos com aplicação de PBZ (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios para as áreas do velame (Ve), exoderme (Ex), córtex (Ct), endoderme (En), Cilindro vascular (CV) e área total da raiz (total) de *C. labiata*

Tratamento	Área (mm ²)		
	Ve	Ex	Ct
T1	0,05±0,01 B	0,04±0,01 B	0,32±0,02 B
T2	0,11±0,01 A	0,10±0,02 A	1,03±0,26 A
T3	0,13±0,02 A	0,10±0,01 A	1,12±0,18 A
T4	0,11±0,02 A	0,10±0,02 A	1,16±0,13 A
	En	CV	Total
T1	0,002±0,0001 C	0,005±0,0005 B	0,43±0,04 B
T2	0,003±0,0011 B	0,009±0,0027 B	1,26±0,29 A
T3	0,004±0,0005 A	0,014±0,0031 A	1,37±0,21 A
T4	0,003±0,0004 B	0,014±0,0036 A	1,40±0,17 A

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

As áreas do velame, exoderme, córtex e total da raiz, apesar de terem sido influenciadas pela aplicação do PBZ, não foram influenciadas pelo “pulse”, pois o efeito observado foi igual em todos os períodos e concentrações avaliados desde regulador de crescimento. Já para a área da endoderme e do cilindro vascular houve influência do

“pulse”, tendo T3 como o tratamento com maior influência no aumento das áreas destes tecidos das raízes.

A aplicação de PBZ em *Citrus sinensis* aumentou a expansão radial das extremidades de raízes, assim como o diâmetro do talo e largura do córtex. A deficiência de giberelina aumentou o número e largura das células, gerando células corticais mais curtas e largas na zona de crescimento (TADEO et al. 1997). Yaxley et al. (2001) também afirmaram através de experimento com plantas mutantes para produção de giberelina, que este fitormônio é importante no desenvolvimento das raízes. Tadeo et al. (1997) afirmam que o etileno é o hormônio responsável pela expansão radial das raízes, e as giberelinas são responsáveis por modular o etileno. Estes autores aplicaram inibidores de etileno em *Citrus sinensis*, e constataram que estes induziram a formação de células finas e compridas. Com isso os autores concluíram que os inibidores de etileno suprimiram o inchaço celular resultante da deficiência de giberelina. A proliferação do córtex tem como principal regulador as giberelinas, porém outros hormônios como ácido abscísico e etileno também participam deste processo junto com regulação epigênica (CUI E BENFEY, 2009).

4.2.4 Caracterização radicular

Nas análises de criofratura, as plantas submetidas aos diferentes tratamentos de “pulse” mantiveram a estrutura dos tecidos radiculares, velame (Ve), córtex, (Ct) exoderme (Ex) e cilindro vascular (CV), com características bem definidas e típicas da família Orchidaceae (Figura 8).

Figura 8 – Visão geral em MEV do corte transversal por criofratura da raiz de *C. labiata* desenvolvidas no tratamento $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ PBZ por 40 dias. CV = cilindro vascular; Ct = córtex; Ex = exoderme; Ve = velame

O velame consiste de uma a várias camadas de células responsáveis pela captação de água na atmosfera e proteção contra dessecação, que se originam de divisões periclinais das iniciais da protoderme (FAHN, 1974; MAUSETH, 1998) compondo o tecido de revestimento da raiz. As raízes de *C. labiata*, independente dos tratamentos apresentaram duas camadas de células (Figura 9), o que pode ser caracterizada pelo fato de que plantas provenientes de cultivo *in vitro*, não desenvolveram bem essa estrutura, pois o ambiente em que se encontravam era de elevada umidade relativa. Característica observada também por Mayer et al. (2008) que descrevem que o velame das orquidáceas funciona como uma esponja, permitindo que a raiz guarde temporariamente água e sais minerais. Nas plantas cultivadas no ambiente natural, o velame é formado por cerca de cinco camadas de células (BONA et al, 2004).

Figura 9 - Detalhe em MEV do velame (Ve) e da exoderme (Ex) da raiz de *C. labiata* desenvolvidas no tratamento com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ PBZ por 40 dias

Logo abaixo do velame, a primeira camada do córtex, a exoderme, é formada por células alongadas longitudinalmente e com espessamento nas paredes anticlinais e periclinal externa, mais evidente nas porções mais maduras do órgão. Tanto o velame, quanto o complexo velame-exoderme possui a função de proteção mecânica das raízes e prevenção da perda de água pelo córtex (DYCUS e KNUDDSON, 1957).

Compondo o córtex propriamente dito, logo abaixo da exoderme (Figura 8), estão as camadas de células alongadas no sentido maior do órgão e apresentando paredes muito finas, semelhantes às descritas por Shushan (1959) no córtex de um híbrido de *Cattleya*, por Mejstřík (1970) para *Dendrobium cunninghamii* Lindl. e por Stern e Judd (2001) para algumas espécies de *Catasetinae*.

O cilindro vascular da raiz é composto, na porção central, pelo tecido medular, formado por células parenquimáticas, e na porção externa à medula estão presentes células floemáticas, intercaladas com células xilemáticas, configurando assim, uma raiz poliarca. As raízes poliarcas são características das orquídeas, tendo Shushan (1959)

observado a presença de 15 a 25 polos de xilema para um híbrido de *Cattleya*, enquanto que Holtzmeier et al. (1998) observaram de 9 a 26 arcos de tecidos vasculares nas raízes das 24 espécies analisadas de *Maxillaria*, *Mormolyca* e *Trigonidium*.

Como resultados foram observados aproximadamente 10 polos de xilema alternado com floema (Figura 10), o que se deve às condições de cultivo *in vitro*, já que não é exigido da planta maior número de polos para suprir suas necessidades fisiológicas, uma vez que esse número é considerado inferior quando comparado com plantas de *Cattleya* cultivada no ambiente natural, que apresenta cerca de 17 polos de xilema e floema alternados (BONA et al, 2004).

Figura 10 – MEV do cilindro vascular poliarco de *C. labiata* apresentando a disposição do conjunto de pólos de floema (setas) intercalados aos de xilema, o córtex (Ct) e a medula (Md)

4.2.5 Contagem e caracterização de estômatos

A avaliação do impacto do tratamento “pulse” com PBZ nos estômatos é importante para o trabalho em função da maior parte da água perdida pelas plantas ocorrer principalmente por meio da difusão do vapor d’água pelos estômatos. As características apresentadas pelas plantas antes de passarem para um ambiente *ex vitro* são importantes, pois definirão se a plântula sobreviverá ou não ao novo ambiente a que será exposta. O melhor entendimento da aplicação de reguladores de crescimento sobre os estômatos pode ajudar a elaboração de melhores protocolos para a aclimatização de plântulas micropropagadas (Figura 11).

Nas avaliações da superfície adaxial das folhas de *C. labiata* foram observados e contados os estômatos abertos (Figura 11C) e fechados (Figura 11D), além de estômatos alterados (Figura 11E), observados somente nos tratamentos com aplicação de PBZ. A presença de estômatos apenas na face abaxial parece ser regra geral entre os vários sub grupamentos da família Orchidaceae, tendo sido observados por Ayensu e Williams (1972) em espécies de Oncidiinae; por Pridgeon (1982) em espécies de Pleurothallidinae; por Khasim e Mohana-Rao (1990), em espécies de Epidendroideae; por Stern (1997) para espécies de Orchidinae; por Holtzmeier et al. (1998) em espécies dos gêneros *Maxillaria*, *Trigonidium* e *Mormolyca* e por Oliveira e Sajo (1999) em nove espécies de orquídeas de hábito epifítico pertencentes a grupamentos diversos. Entretanto, Stern et al. (1993) observaram folhas anfiestomáticas em espécies de *Neuwiedia* e *Apostasia*, consideradas primitivas dentro da família.

Figura 11 – Visão geral em MEV da superfície adaxial das folhas de *C. labiata*. (A) Controle; (B) Representativo aos tratamentos com uso de PBZ; (C) Padrão de estômatos abertos; (D) Padrão de estômatos fechados; (E) Padrão de estômatos alterados. Barras: A, C e D = 20µm; B = 100µm e E = 10µm

De acordo com a análise de variância (Tabela 9), houve diferença estatística ($P < 0,01$) para todas as variáveis analisadas, sendo os resultados dos valores médios para estômatos abertos (EA), estômatos fechados (EF), estômatos alterados (EAL) e estômatos totais (ET) em folhas de *C. labiata* apresentados na Tabela 10.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para estômatos abertos (EA), estômatos fechados (EF), estômatos alterados (EAL) e estômatos totais (ET) em folhas de *C. labiata* em relação aos tratamentos testados

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios			
		EA	EF ⁽¹⁾	EAL	ET
		(estômato.mm ⁻²)	(estômato.mm ⁻²)	(estômato.mm ⁻²)	(estômato.mm ⁻²)
Tratamento	3	5.541,43**	15,91**	2.714,23**	2.954,47**
Resíduo	40	240,90	2,08	69,02	501,22
Média	-	73,59	18,81	17,77	110,18
CV _{exp.} (%)	-	21,09	67,72	46,74	20,31

** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $\log(n+0,5)$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro. n = dado amostrado

Tabela 10 - Valores médios para estômatos abertos (EA), estômatos fechados (EF), estômatos alterados (EAL) e estômatos totais (ET) em folhas de *C. labiata* em relação aos tratamentos avaliados

Trat	EA (estômato.mm ⁻²)	EF (estômato.mm ⁻²)	EAL (estômato.mm ⁻²)	ET (estômato.mm ⁻²)
T1	94,40±10,53 A	31,20±14,21 A	0,00±0,00 C	125,60±20,75 A
T2	56,33±17,43 B	17,33±17,42 AB	14,33±8,77 B	88,00±26,85 B
T3	53,63±15,92 B	23,63±10,19 A	38,72±9,12 A	116,00±14,20 A
T4	93,45±16,61 A	4,36±5,50 B	16,72±10,40 B	114,54±24,93 A

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± desvio padrão. T1 = MS (controle); T2 = MS+1,0mg L⁻¹ PBZ por 40 dias; T3 = MS+10,0mg L⁻¹ PBZ por 4 dias; T4 = MS+100,0mg L⁻¹ PBZ por 4 horas

Considerando o número de estômatos totais (ET), nenhum tratamento promoveu o aumento do índice de estômatos por área em relação ao controle. Entretanto, observou-se que ao se utilizar 1,0 mg.L⁻¹ de PBZ por 40 dias (T1) ocorreu redução de ET resultado não observado nos demais tratamentos. Estes resultados diferem dos observados por Auras (1997), que em seu trabalho com girassol sob efeitos de PBZ, as folhas não se expandiram até o tamanho original e a área foliar foi reduzida, apresentando maiores índices estomáticos adaxiais e abaxiais, devido ao aumento no

número de estômatos por unidade de área. O autor também relata que a giberelina desempenha algum papel no crescimento das células guarda, uma vez que o comprimento dessas nas superfícies abaxial e adaxial foi reduzido com a aplicação do PBZ. Gopi et al. (2008) também encontraram um maior número de estômatos após a aplicação de diferentes doses de triazóis, e atribuíram o fato à mudança no equilíbrio hormonal, principalmente da citocinina, que por sua vez altera a divisão celular.

Entretanto, Saibo et al. (2003) atribuem à giberelina um papel crucial na formação de estômatos no hipocótilo de *Arabidopsis.thaliana*, e em seu estudo a aplicação deste hormônio, combinado com auxina ou etileno, aumentou significativamente o número de estômatos na epiderme da região analisada. Seguindo esta linha de raciocínio, pode-se supor que o número de estômatos diminuiu no tratamento T2 em função do tempo de exposição ao PBZ, que é inibidor da síntese de giberelinas. Ainda é possível inferir que a influência do PBZ nos estômatos, mesmo quando em baixas concentrações, é mais efetiva na diminuição da formação de estômatos frente à aplicação a longo tempo do que à exposição a altas concentrações.

Na avaliação do número de estômatos abertos (Tabela 10) foi observado que o PBZ, nas condições estipuladas para T2 e T3 proporcionou redução no número de estômatos abertos (64 e 46% respectivamente), sendo que a alta concentração de PBZ em menor tempo de exposição (T4) não promoveu alteração no número de estômatos abertos com relação ao controle (81 e 75%, respectivamente). Entretanto, ao se avaliar o número de estômatos fechados, os menores valores foram encontrados em T4, totalizando apenas 3,8% do total de estômatos. Nishiyama et al. (2011) afirmam que a aplicação de citocininas exógenas pode aumentar a abertura dos estômatos e a transpiração de muitas plantas.

No entanto, Blackman e Davies (1983) trabalhando com *Zea mays* e *Commelina* sp, observaram que a utilização de citocininas sozinhas não promoveu a abertura dos estômatos, mas quando aplicadas em conjunto com zeatina e cinetina, ambas citocininas, resultaram no aumento progressivo da abertura estomática do milho, proporcionalmente ao aumento das concentrações. Já para *Commelina* sp, as altas concentrações das citocininas sozinhas restringiram a abertura estomática.

Jewer e Incoll (1981) também verificaram que, em *Kalanchoe daigremontiana*, uma planta CAM como a maioria das orquídeas, a aplicação de cinetina e zeatina promoveu a abertura dos estômatos. Contudo, no presente experimento a aplicação de

PBZ, que acredita-se estimular a produção de citocininas, resultou na diminuição do número de estômatos abertos, com exceção para T4, que apresentou número de estômatos abertos igual ao controle, e ainda para o T4, ocorreu a diminuição da quantidade e porcentagem de estômatos fechados. Desta forma, podemos inferir que a abertura dos estômatos não foi influenciada pela alteração na produção de citocininas, a não ser pelo tratamento T4, que pode ter estimulado a produção deste hormônio, apresentando um maior número de estômatos abertos.

Outro fitormônio envolvido na abertura dos estômatos é o ácido abscísico (ABA) (POSPÍŠILOVÁ, BAŤKOVÁ, 2004), que também é influenciado pela aplicação de triazóis como o PBZ (FLETCHER et al. 2000). A aplicação do triazol uniconazol em *A.thaliana* reduziu o catabolismo de ABA, aumentando os níveis endógenos deste fitormônio na planta (SAITO et al. 2006). O aumento da quantidade de ABA, ou a aplicação deste fitormônio na planta influencia o fechamento dos estômatos, contribuindo para a diminuição do estresse hídrico causado em plantas micropropagadas na transferência para o ambiente *ex vitro*. A redução do número de estômatos abertos é interessante, pois um dos maiores problemas apresentados por plantas micropropagadas levadas ao ambiente *ex vitro* é a alta taxa de evaporação que estas sofrem, pois o cultivo *in vitro* acarreta aumento no número de estômatos presentes nas folhas, além de estômatos com a funcionalidade prejudicada, em função do ambiente com alta umidade (COSTA et al., 2009).

Um interessante efeito da aplicação de PBZ foi o aparecimento de estômatos alterados, caracterizados pela ausência de ostíolo e pela não diferenciação das células guardas, não encontrados no tratamento controle. Este resultado pode ter sido causado por uma deformação do estômato decorrente da presença de PBZ, ou pelo atraso em seu desenvolvimento, bem como o da planta tratada, por esse regulador. Auras (1997) relata que a giberelina desempenha algum papel no crescimento das células guarda, uma vez que o comprimento dessas foi reduzido com a aplicação do PBZ. Fosket (1994) afirma que a formação de células guarda ocorre somente no final do desenvolvimento foliar e que está relacionada com o número de divisões celulares que ocorreram na protoderme, tecido meristemático primário que origina a epiderme.

Segundo Tichá (1982), há um mecanismo regulador da produção de estômatos que parece ter como referência o tamanho foliar final e/ou o tempo necessário para atingi-lo. Os estômatos alterados aparentam apresentar apenas uma célula guarda e

não duas, o que indicaria a não ocorrência da divisão celular final durante a diferenciação das células guarda, muito provavelmente por inibição causada pela presença do PBZ, independente da dose e do tempo de exposição. Na formação de um estômato, há inicialmente a divisão assimétrica de uma célula protodérmica, originando a célula mãe e a célula irmã. Esta célula mãe então se divide dando origem às duas células guarda. Aparentemente a aplicação de PBZ manteve esta célula mãe não dividida, dando origem a um “estômato imaturo”. A menor dose em maior tempo de exposição (T2) e a maior dose em menor tempo de exposição (T4) apresentaram resultados significativamente inferiores a dose intermediária (T3), provavelmente por maior efeito do PBZ nesse tratamento. Andrade et al. (2006), em estudos com “pulse”, observou que entre os vários tratamentos testados, as doses e tempos de exposição intermediários foram mais efetivos nos efeitos sob os explantes.

Giberelinas atuam na divisão celular e a aplicação de PBZ pode ter atrasado a formação dos estômatos. Williams (1975) encontrou em folhas de *Ludisia discolor* estômatos em diferentes fases de formação, dentre eles estômatos em que a célula mãe ainda não havia se dividido. A aparência destes estômatos “imatuross” é bem similar aos estômatos alterados encontrados neste trabalho.

5 CONCLUSÕES

- O paclobutrazol não promoveu alterações na parte aérea e na taxa de brotação das microplântulas até os 40 dias de cultivo, sendo que as alterações e o aumento na taxa de brotação somente podem ser verificadas a partir dos 80 dias de cultivo.
- O meio de cultura MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ PBZ por um período de 40 dias apresentou maior desenvolvimento e vigor do sistema radicular para as espécies *C. labiata* e *C. eldorado*.
- As espécies estudadas apresentaram respostas semelhantes, permitindo utilizar apenas a *C. labiata* para a avaliação de “pulse”.
- O paclobutrazol causou alterações morfológicas nos estômatos das microplântulas, contudo, não promoveu aumento no número de estômatos por área foliar.
- Os testes de “pulse” reduziram a parte aérea das microplântulas, representando uma alternativa inviável para a micropropagação de *C. labiata*.
- O paclobutrazol promoveu aumento na espessura das raízes, sem alterar os tecidos radiculares, evidenciando respostas adaptativas a aclimatização das microplantas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S.; FLETCHER, R.A.; MURR D.P. Alteration of ethylene synthesis in cucumber seedlings by triadimefon. **Canadian Journal of Botany**, Montreal, v. 67, p. 278-280. 1989.
- ACHARD, P.; CHENG, H.; De GRAUWE, L.; DECAT, J.; SCHOUTTETEN, H.; MORITZ, T.; Van der STRAETEN, D.; PENG, J.R., HARBERD, N.P. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. **Science**, Washington, v. 311, p. 91–94. 2006.
- ACHARD, P.; VRIEZEN, W.H.; Van der STRAETEN, D.; HARBERD, N.P. Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 15, p. 2816– 2825. 2003.
- ALBANY, N.R.; VILCHEZ, J.A.; GARCIA, L.; JIMÉNEZ, E. Comparative study of parameters of Grand Nain banana (Musa AAA) after *in vitro* multiplication with growth retardants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.83, p.357- 361, 2005.
- ALVES DE BRITO, C.J.F. ;ALQUINI, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol methacrylate. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 39, p. 949-951, 1996.
- ANTONY, J.M.; SENARATNA, T.; DIXON,; SIVASITHAMPARAM, K. Somatic embryogenesis for mass propagation of Ericaceae a case study with *Leucopogon verticillatus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 76, p. 137-146, 2004.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley, 1992. 682p.
- ASARE-BOAMAH, N.K., HOFSTRA, G., FLETCHER, R.A. ; DUMBROFF, E.B. Triadimefon protect bean plants from water stress through its effect on abscisic acid. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 27, p. 383-390. 1986.
- ATAHYDE, M.L.F.; LAMAS, F.M. Aplicação de cloreto de mepiquat no algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 369-375, 1999.
- AURAS, N.E. **Efeitos do paclobutrazol sobre morfologia e anatomia foliar, crescimento de parte aérea, distribuição de biomassa e trocas gasosas em girassol**. 1997. 88p. Tese(Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa , 1997.

AYENSU, E.S.; WILLIAMS, N.H. Leaf anatomy of *Palumbina* and *Odontoglossum* subgenus *Osmoglossum*. **American Orchid. Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 8, n. 41, p. 687-696, 1972.

BAI, S.; CHANEY, W. Gibberellin synthesis inhibitors affect electron transport in plant mitochondria. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 35, p. 257-262, 2001.

BANON, S.; OCHOA, J.; FERNÁNDEZ, J.A.; FRANCO, J.A. Paclobutrazol as aids for *Phillyrea angustifolia* nursery production. **HortScience**, Alexandria, v.36, p. 449-500, 2001.

BARRETT, J.E. *Chrysanthemum* height control by ancymidol, PP333, and EL-500 dependent on medium composition. **HortScience**, Alexandria, v.17, p. 896-897, 1982.

BENNETT, I.J.; McDAVID, D.A.; McCOMB, J.A. The influence of amonium nitrate, pH and índole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptos globulos*. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 3, p. 355-360, 2003.

BEROVA, M.; ZLATEV, Z.; STOEVA, N. Effect of Paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v.28, p.75-84, 2002.

BLACKMAN, P.G.; DAVIES, W.J. The Effects of Cytokinins and ABA on Stomatal Behaviour of Maize and Commelina. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 34, n.12, p. 1619-1626. 1983.

BONA, C.; BOEGER, M. R.; SANTOS, G. de O. **Guia ilustrado de anatomia vegetal**. Ribeirão Preto, Holos, 2004. 80p.

BRAGA, P.I.S. **Aspectos Biológicos das Orchidaceae de uma Campina da Amazônia Central**. 1982. 345 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia ; Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 1982.

BRAINERDE, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. Stomatal functioning of in vitro and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO₂. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 33, p.338-392, 1982.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lei no 10.683, de 28 de maio de 2003. Instrução Normativa no6, de 23 de setembro de 2008. Disponível em: http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislacao_federal/INSTRUCAO_NORMATIVA/INSTRUCAO_NORMATIVA_06_DE_23_DE_SETEMBRO_DE_2008.pdf. Acesso em: nov. 2009.

BUDIMIR, S.; STOJICIC, D. Cytokinin-mediated axillary shoot formation in *Pinus heldreichii*. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 48, n. 3, p. 477-479, 2004.

BUTCHER, W.P.; INGRAN, D.S. Organs and embryos. In: _____ Plant Tissue Culture. [s. l.]: Edwad Publishing 1976. p. 3-15.

CADAVID, I.C.; SALAZAR, S. **Micropropagación de *Cattleya quadricolor***. Medellin : Universidad Eafit, 2008. p.122-129. (Cuadernos de Investigación).

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

CANTO, A.M.M.E.; SOUZA, F.V.D.; COSTA, M.A.C.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; CABRAL, J.R.S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p.717-720, 2004.

CARVALHO, V.S. **Morfogênese *in vitro* em orquídeas do grupo *Cattleya***. 2002. 164p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, 2002.

CHANEY, W.R. Paclobutrazol: more than just a growth retardant. In: PRO-HORT CONFERENCE, Peoria, Illinois. 2004. 5p.

CHEN, Y.F.; RANDLETT, M.D.; FINDELL, J.L.; SCHALLER, G.E. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, V. 277, p.19861–19866. 2002.

CHIZHOVA SI, PAVLOVA VV, PRUSAKOVA LD. Absciscic acid content and growth of spring barley plants treated with triazoles. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscou, v.52, p. 108-114, 2005.

COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M.; SANTOS, A.M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 742-748. 2009.

CUI, H.; BENFEY, P.N. Cortex proliferation: Simple phenotype, complex regulatory mechanisms. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 4, n. 6, p. 551-553. 2009.

DAQUINTA, M.; ESPINOSA, P.; ESCALONA, M. Bromeliads micropropagation in temporary immersion system. In: INTERNACIONAL WORKSHOP ON PLANT BIOTECHNOLOGY, 1999, Ciego de Avila, Cuba, **Anais...** Ciego de Avila, 1999. p. 19-23,

DAS, M.C., KUMARIA, S.; TANDON, P. Protocorm Regeneration, Multiple Shoot Induction and *ex vitro* Establishment of *Cymbidium devonianum* Paxt. . **Asian Journal of Plant Sciences**, Faisalabad, v. 6, p. 349-353, 2007.

DAS, D.K.; PRAKASH, N.S.; BHALLA-SARIN, N. Multiple shoot induction and plant regeneration in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, p. 691-695, 1999.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, p. 335-345, 1981.

DEORA, N.S.; SHEKHAWAT, N.S. Micropropagation of *Capparis decidua* (Forsk.) Edgew-a tree of arid horticulture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 278-281, 1995.

DIXON, R.A. Isolations and maintenance of callus and cell suspensions cultures. In: DIXON R. R. (Ed.). **Plant Cell Culture: A Practical Approach**. Washington DC: IRL Press, 1985. p.1-20.

DRAKE, P.M.W.; JOHN, A.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Cytokinin pulse-mediated shoot organogenesis from cotyledons of Sitka Spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] and high frequency in vitro rooting of shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.50, p.147-151, 1997.

DRESSLER, R.L. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge: Harvard University, 1981. 332p.

DYCUS, A.M.; KNUDSON, L. The role of the velame of aerial roots orchids. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 119, p. 78-87, 1957.

EARLY, J.D., JR., MARTIN, G.C. Sensitivity of peach seedling vegetative growth to paclobutrazol. **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, p. 23-27, 1988.

ELAIDY, A.A.; SALAMA, M.I.; EL-SAMMAK, A.; ABOU EL-KHASHAB, A.M. Salt-tolerant of *Baladi guava* seedlings as affected by culture and ethrel. **Journal Agricultural Research**, Tanta, v. 18, p. 373-381, 1992.

EI-KHASHAB, AM; EI-SAMMAK, AF; ELAIDY, AA; SALAMA, MI Paclobutrazol reduces some negative effects of salt stress in peach. **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v. 122, p. 43-46, 1997.

EMBRAPA.Núcleo Tecnológico para Informática. SOC – Software Científico. 1990. 258 p.

ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZALEZ, B.; DAQUINTA, M.; BORROTO, C.; GONZALEZ, J.L.; DESJARDINS, Y. Pineapple micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, p. 743-748, 1999.

EYMAR, E.; ALEGRE, J.; TORIBIO, M.; VELA-LÓPEZ, D. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. **Plant Cell , Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, p. 57-65, 2000.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press, 1974. 600 p.

FARIAS, L.A. ;RIBEIRO, R. Pôster Apresenta orquídeas na Mata Atlântica. **Revista O Mundo das Orquídeas**, Marília, n. 13, p. 43-45, 2000.

FAY, M.F.; CHASE, M.W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to 21st century. **Annals of Botany**, London, v. 104, p. 359-364, 2009.

FEUSER, S.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, p.6-10, 2001.

FLETCHER, R.A., HOFSTRA, G. Triazoles as potential plant protectants. In: BERG, K.; PLEMPER, M. (Ed). **Sterol Biosynthesis Inhibitors: Pharmaceutical and Agrochemical Aspects**. Cambridge: Ellis Harwood , 1988. p. 321–331.

FLETCHER, R.A.; GILL, A.; DAVI, T.D.; SANKHLA, N. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**, New York, v. 24, p. 55-138. 2000.

FLYGH, G.; GRÖNROOS, R.; ARNOLD, S.von. Induction, rooting and growth of adventitious shoots of *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Forest Research**, Clemson, v. 23, p. 1907-1916, 1993.

FOSKET, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic Press, 1994. 580p.

FU, X.; HARBERD, N.P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. **Nature**, London, v.421, p. 740–743, 2003.

GALVANESE, M.S., TAVARES, A.R.; AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; CHU, E.P., STANCATO, G.C.; HARDER, I.C.F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n.311, p. 63-67, 2007.

GAMBORG, O. Plant cell cultures: nutrition and media. In: Vasil I.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, 1984. v. 1 p. 18-26.

GELL, J.A.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Desenvolvimento inicial de plântulas de *Cattleya eldorado* Lindl. (Orchidaceae) em diferentes condições de cultivo. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 54, 2003. **Anais...** Belém, Pará. 2003. CD-ROM

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture: the Technology**. England: Exegetics, 1993. 501 p.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant Propagation by Tissue Culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Great Britain: British Library, 1984. 709 p.

GIATTI, L.; LIMA, G.P.P. Ação do BAP na regeneração in vitro de *Blc. Owen Holmes Ponkan* x *Brassavola digbiana* nº 2 / BAP (6-benzylaminopurine) in the regeneration in vitro of *Blc Owen Holmes Ponkan* x *Brassavola digbiana* nº 2. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavaras, v. 31, n.5, p 1279-1285, 2007.

GLIOZERIS, S.; TAMOSIUNAS, A.; STUOPYTE, L. Effect of some growth regulators on chlorophyll fluorescence in *Viola x wittrockiana* 'Wesel Ice'. **Biologija**, Moscow, v. 53, n.2, p. 24-27, 2007.

GOPI, R.; JALEEL, C.A.; PANNEERSELVAM, R. Leaf anatomical responses of *Amorphophallus campanulatus* to triazoles fungicides. **EurAsian Journal of BioSciences**, Konak, v. 2, p. 46-52, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, 1990. p.99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. p. 99-169.

GROSSMANN, K.; HÄUSER C.H.; SAUERBREY E.; FRITSCH H.; SCHMIDT O.; JUNG, J. Plant growth retardants as inhibitors of ethylene production. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.134, p. 538-543, 1989.

GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture, I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, Edinburgh, v.17, p.1-7, 1977.

GUBLER, F.; CHANDLER, P.; WHITE, R.; LLEWELLYN, D.; JACOBSEN, J. GA signaling in barley aleurone cells: Control of SLN1 and GAMYB expression. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.129, n.1, p.191-200. 2002.

HABERMANN, G.; ALVAREZ, R. C. F.; MODESTO, J. C.; FORTES, A. M. T.; RODRIGUES, J.D.; ONO, E. O. Rooting of healthy and CVC-affected 'Valência' sweet orange stem cuttings, through the use of plant regulators. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.49, p. 29-36, 2006

HAZARIKA, B.N.; PARTHASARATHY, V.A. ; NAGARAJU, V. Action of paclobutrazol in acclimatization of micropropagated Citrus plantlets. **Indian Journal of Agricultural Research**, Haryana, v. 36, p. 57–60, 2002.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue cultured plants. **Current Science**, Bangalore, v. 85, p. 1705–1712, 2003.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 105–120. 2006.

HOLST, K.; SCHMÜLLING, T.; WERNER, T. Enhanced cytokinin degradation in leaf primordia of transgenic Arabidopsis plants reduces leaf size and shoot organ primordial formation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, p. 1328-1334, 2011.

HOLTZMEIER, M.A.; STERN, W.L.; JUDD, W.S. Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of *Maxillaria* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 127, p. 43-82, 1998.

INADA, S.; SHIMMEN, T. regulation of elongation growth by gibberellin in root segments of *Lemna minor*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 932–939, 2000.

JEWER, P.C.; INCOLL, L.D. Promotion of stomatal opening in detached epidermis of *Kalanchoe daigremontiana* Hametet Perr. By natural and synthetic cytokinins. **Planta**, Berlim, v.153, p. 317-318, 1981.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p.137-138, 1965.

KHASIM, S.M.; MOHANA-RAO, P.R. Anatomy in relation to taxonomy in some members of Epidendroideae (Orchidaceae). **Phytomorphology**, Delhi, v. 40, n. 3 . p. 243- 250, 1990.

KHUNACHAK, A.;CHIN, C.K.; LE, T.; GIANFAGNA, T. Promotion of asparagus shoot and root growth by growth retardants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.11,n.2, p. 97-110. 1987.

KISHOR, A.; SRIVASTAV, M.; DUBEY, A.K.; SINGH, A.K.;SAIRAM, R.K.;PANDEY, R.N.;DAHUJA, A.; SHARMA, R.R. Paclobutrazol minimizes salt stress effects in mango (*Mangifera Indica* L.), **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.84, p. 459–465, 2009.

KISHOREKUMAR, A.; JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; SRIDHARAN, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on the foliage characteristics of Chinese potato (*Solenostemon rotundifolius* Poir., J.K. Morton). **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 50, n.3/4, p. 127-129, 2006.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, n.14, p.214-217, 1946.

KÖLLER W Isomers of sterol synthesis inhibitors: fungicidal effects and plant growth regulator activities. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 18, p.129-147, 1987.

KOVAC, J. Micropropagation of *Actinidia kolomikta*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 35, p. 301-303, 1993.

KOZAK, D. The effect of growth retardants applied *in vitro* on the acclimatization and growth of *Tibouchina urvilleana* Cogn. *in vitro*. **Acta Scientiarum Polonorum**, Szczecin, v.5, p. 65–70, 2006.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

KRAUS, T.E.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol protects wheat seedlings from heat and paraquat injury: is detoxification of active oxygen involved? **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.35, p. 45-52, 1994.

KUCHARSKA, D.; ORLIKOWSKA, T. The influence of paclobutrazol in the rooting medium on the quality of *Chrysanthemum* vitroplants. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Poland, v. 16, p. 417-424, 2008.

LACERDA, L.D. Amazon mercury emissions. **Nature**, London, n. 374, p. 20–21, 1995.

LAMAS, F.M. Estudo comparativo entre cloreto de mepiquat e cloreto de chlormequat aplicados no algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.265-272, 2001.

LATHA, P.G., Micropropagation and *in vitro* flower induction in *Habenaria crinifera* Lindl. **Journal of the Orchid Society of India**, Chandigarh, v. 13, p. 47-53, 1999.

LINGHT, M.E.; GARDNER, M.J.; JÄGER A.K; STADEN, van. Dual regulation of seed germination by smoke solutions. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 37, p. 135-141, 2002.

LORENZO, J.C.; BLANCO, M.A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane

micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.65, p. 1-8, 2001.

LORENZO, J.C.; GONZALEZ, B.L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.54, p. 197–200, 1998.

LEE, Y.-I.; CHEN, M.C.; HUANG, C.Y. Effect of medium composition on asymbiotic seed germination of five *Phalaenopsis* species. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.78, p. 225-230, 2010.

MALAURE, R.S.; BARCLAY, G.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. The production of novel plants from florets of *Crhysanthemum morifolium* using tissue culture. 1. Shoot regeneration from ray florets and somaclonal variation exhibited by regenerated plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 139, n. 1, p. 8-13, 1991.

MARIN, J.A.; GELLA, R.; HERRERO, M. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. **Annals of Botany**, London, v.62, p.663-670, 1988.

MARSHALL, J.G.; SCARRAT, J.B.; DUMBROFF, E.B. Induction of drought resistance by abscisic acid and paclobutrazol in jack pine. **Tree Physiology**, Oxford, v. 8, p. 415-421, 1991.

MARSHALL, J.G.; RUTLEDGE, R.G.; BLUMWALD, E. ; DUMBROFF, E.B. Reduction in turgid water volume in jack pine, white spruce and black spruce in response to drought and paclobutrazol. **Tree Physiology**, Oxford, v. 20, p. 701-707.2000.

MARTIN, K.P. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsea malabarica* (Reichb. F.) J.D. Hook., an endangered orchid. **In vitro Cell and Developmental Biology-Plant**, Totowa, v. 39, p. 322-326, 2003.

MATHUR, G.; NADGAUDA, R. *In vitro* plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* A. B. Jacks. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, p.74-80, 1999.

MAUSETH, J.D. **Plant anatomy**. Califórnia: The Benjamin Cummings Publishing, 1988.

MAYER, J.L.S.; RIBAS, L.L.F.; BONA, C.; QUOIRIN, M.: Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasileira, cidade**, v. 22, n. 2, p. 323-332, 2008.

MEJSTRÍK, V. The anatomy of roots and mycorrhizae of the orchid *Dendrobium cunninghamii* Lindl. **Biology Plant**, Praga, v. 12, n. 2, p. 105-109, 1970.

MENEZES, L.C. **Cattleya labiata Lindley**. Orquídeas brasileiras. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1987. 112 p.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of Ornamental Bromeliads (Bromeliaceae), **Biotechnology in Agriculture and Forestry, cidade**, v. 40, p. 43-57, 1997.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* - an endangered endemic brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News**, São Paulo, v.1, n.6, p.70-72, 1993.

MEREDITH Jr., W.R.; WELL, R. Potential for increasing cotton yields through enhanced partitioning to reproductive structures. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 3, p. 636-639, 1989.

MERKLE, S.A.; BAILEY, R.L.; PAULEY, B.A.; NEU, K.A.; KIM, M.K.; RUGH, C.L.; MONTELLO, P.M. Somatic embryogenesis from tissues of mature sweetgum trees. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 27, p. 959-964, 1997.

MIN, X.J.; BARTHOLOMEW, D.P. Effect of plant growth regulators on ethylene production, 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity, and initiation of inflorescence development of pineapple. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.15, n.3, p.121-128, 1996.

MORAIS, L.M.; DIAS, L.C.; FARIA, R.T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1397-1400, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEPOMUCENO, C.F.; RIOS, A.P.S.; QUEIROZ, S.R.O.D.; PELACANI, C.R.; SANTANA, J.R.F. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (griseb) altschul. **Revista Árvore**, cidade, v. 31, n.5, p. 967-975, 2007.

NISHIYAMA, R.; WATANABE, Y.; FUJITA, Y.; LE, D.T.; KOJIMA, M.; WERNER, T.; VANKOVA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T.; SAKAKIBARA, H.; SCHMÜLLING, T.; TRAN, L.S.P. Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 2169-2183, 2011.

NIZAM, K.; TE-CHATO, S. Optimizing of root induction in oil palm plantlets for acclimatization by some potent plant growth regulators (PGRs). **Journal of Agricultural Technology**, Songkla, v.5, n.2, p. 371- 383, 2009.

OLIVEIRA, C.V.; SAJO, M.G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 365-374, 1999.

OZMEN, A.D.; OZDEMIR, F.; TURKAN, I. Effects of paclobutrazol on response of two barley cultivars to salt stress. **Biology Plant**. Stuttgart, v.46, p. 263–268, 2003.

PANAIA, M.; SENARATNA, T.; BUNN, E.; DIXON, K. W.; SIVASITHAMPARAM, K. Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, p. 23–29, 2000.

PIERIK, R.L.M. Produccion de plantas libres de enfermedades In: PIERIK, R.L.M. (Ed.) **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Pronsa,. 1990. p.169-180.

PINDEL, A.; MICZYNSKIK, C. Regeneration of *Cymbidium* orchids from leaf and root explant. **Folia Horticulturae**, New York, v.8, n. 2, p. 95-105, 1996.

PINKER, I.M. Chopper-light for shoot cultures. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 520, p. 195-202, 2002.

POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P.. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, p. 117-124, 2005.

POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. **Biologia Plantarum**, Praga, v.42, p.481-497, 1999.

POSPÍŠILOVÁ, J.; BAŤKOVÁ, P. Effects of pre-treatments with abscisic acid and/or benzyladenine on gas exchange of French bean, sugar beet, and maize leaves during water stress and after rehydration. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 48, n. 3, p. 395-399. 2004.

PRIDGEON, A.M. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, p. 921-938, 1982.

PUROHIT, S.D.; SINGHVI, A. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 76, p. 219-229, 1998.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.51, p.501-531, 2000.

RECH FILHO, A.; LISCHKA, R.W.; DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Micropropagação de *Vriesea reitzii* em biorreator de imersão temporária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003a, Lavras. **Anais...** Lavras, 2003a. p. 212.

RECH FILHO, A.; LISCHKA, R.W.; DAL VESCO, L.L.; MÜLLER, C.V.; ALVES, G.M., CUNHA, L.; GUERRA, M.P. Efeitos do paclobutrazol na morfogênese in vitro de *Vriesea gigantea*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p. 154, 2003b.

REDDY, K.R.; BOONE, M.R.; REDDY, A.R.; HODGES, H.F.; TURNER, S.B.; MCKINION, J.M. Developing and validating a model for plant growth regulator. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 6, p. 1100-1105, 1995.

RICHARDSON, P.J.; WEBSTER, A.D.; QUINLAN, J.D. The effect of paclobutrazol sprays with or without the addition of surfactants on the shoot growth, yield and fruit quality of the apple cultivars Cox and Suntan. **Journal of Horticultural Science**, Reading, v. 61, p. 439-446, 1986.

RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; SCHMULLING, T. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **Plant Cell**, Rockville, v.18, p.40-54, 2006.

RITCHIE, G.A.; SHORT, K.C.; DAVEY, M.R. In vitro acclimatization of chrysanthemum and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, n.245, p.1557-1563, 1991.

ROBERTS, A.V.; WALKER, S.; HORAN, I.; SMITH, E.F.; MOTTLEY, J. The effect of growth retardants, humidity and lighting at Stage III on Stage IV of micropropagation in chrysanthemum and rose. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.319, p.153-158, 1992.

SADHU, B.P.; GUPTA, K. Triazole: a plant growth regulator and a fungicide. **Geobios**, Lyon, v. 24, p.181-192, 1997.

SAEED, W.T. Pomegranate cultivars as affected by paclobutrazol, salt stress and change in fingerprints. **Bulletin- Faculty of Agriculture University of Cairo**, Cairo, v. 56, p. 581-616, 2005.

SAIBO, N.J.M.; VRIEZEN, W.H.; BEEMSTER, G.T.S.; STRAITEN, D. van der. Growth and stomata development of Arabidopsis hypocotyls are controlled by gibberellins and

modulated by ethylene and auxins. **The Plant Journal**, London, v.33, p. 989-1000, 2003.

SAITO, S.; OKAMOTO, M.; SHINODA, S.; KUSHIRO, T.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; HIRAI, N.; TODOROKI, Y.; SAKATA, K.; NAMBARA, E.; MIZUTANI, M. A plant growth retardant, uniconazole, is a potent inhibitor of ABA catabolism in Arabidopsis.

Bioscience Biotechnology & Biochemistry, Tokyo, v.70, n. 7, p. 1731-1739, 2006.

SAUERBREY, E.; GROSSMANN, K.; JUNG, J. Ethylene production by sunflower cell suspensions. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 87, p. 510-513, 1988.

SHEKHAWAT, N.S.; RATHORE, T.S.; SINGH, R.P.; DEORA, N.S.; RAO, S.R. Factors affecting in vitro clonal propagation of *Prosopis cineraria*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, p. 273-280, 1993.

SHUSHAN, S. Development anatomy of an orchid Cattleya X Trimos. In: WHITHNER, C.L. (Ed). **The Orchids: a scientific survey**. New York: Ronald Press,. 1959. p. 45-72.

SILVA, M.F.F.; SILVA, J.B.F. **Orquídeas nativas da Amazônia Brasileira II**.

Manaus:Universidade Federal Rural da Amazônia ; Belém.:Museu Paraense Emílio Goeldi, 526 p, 2004..

SIVANESAN, I.; SON, M.S.; LIM, C.S.; JEONG, B.R. Effect of soaking of seeds in potassium silicate and uniconazole on germination and seedling growth of tomato cultivars, Seogeon and Seokwang. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 35, p. 6743-6749, 2011.

SMITH, E.F.; ROBERTS, A.V.; MOTTLEY, J. The preparation in vitro of chrysanthemum for transplantation to soil. 2. Improved resistance to desiccation conferred by paclobutrazol. **Plant Cell Tissue, Organ and Culture**, Dordrecht, v. 21, p. 133–140, 1990.

SMITH, E.F.; GRIBAUDO, I.; ROBERTS, A.V. ;MOTTLEY, J. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n.2, p. 111 -113, 1992.

SOBHANA, A.; RAJEEVAN, P.K. 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/s Narosa Publishers, New Delhi, 2002. p. 134-138.

SOUZA, D.S.; SIQUEIRA, D.L.; CECON, P.R.; SANTOS, D. Micropropagação das bananeiras 'Prata-Anã' e 'FHIA 01' a partir de explantes de plantas tratadas com paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 561-570. 2010.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M; CASTRO, E. M. de. Germinação de Embriões e Multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, edição especial, p. 1532-153, 2003.

SRIVASTAVA, K.; TIWARI, K.N.; SINGH, R.; SINGH, B.D.; JAISWAL, H.K. Shoot regeneration from immature cotyledons of *Cicer arietinum*. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 44, n. 3, p. 333-337, 2001.

STERN, W.L.; CHEADLE, V.I.; THORSCH, J. Apostasiads, systematic anatomy, and the origins of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.111, p. 411-455, 1993.

STERN, W.L. Vegetative anatomy of subtribe Orchidinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 124, n. 2, p.121-136,1997.

STERN, W.L.; JUDD, W.S. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 136, p. 153-178, 2001.

SURIYAN, C.; OUK, P.; CHALERMPOL, K. An effective in-vitro acclimatization using uniconazole treatments and *ex-vitro* adaptation of Phalaenopsis orchid. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.121, p.468–473, 2009.

TADEO, F.R.; GÓMEZ-CADENAS, A.; BEN-CHEIKH, W.; PRIMO-MILLO, E.; TALÓN, M. Gibberellin-ethylene interaction controls radial expansion in citrus roots. **Planta**, Berlim, v. 202, n. 3, p. 370-378, p. 134-138.1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer, 2009. 705 p.

TANIMOTO, E. Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 24, n. 4, p. 249-265, 2005.

TE-CHATO, S.; NUJEEN, P.; MUANGSORN, S. Paclobutrazol enhance budbreak and flowering of Friederick's Dendrobium orchid in vitro. **Journal of Agricultural Technology**, Songkla, v. 5, n. 1, p. 157-165, 2009.

TEFERA, W.; WANNAKRAIROJ, S. Synergistic effects of some plant growth regulators on in vitro shoot proliferation of korarima [*Aframomum corrorima* (Braun) Jansen]. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, p. 1894-1901, 2006.

THAKUR, R.; SOOD, A.; NAGAR, P.K.; PANDEY, S.; SOBTI, R.C.; AHUJA, P.S. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.25, p.382-391, 2006.

THORPE, T.A.; PATEL, K.R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants – laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. . v. 1, p. 49- 60.

TICHA, I.; RADOCHOVÁ, B.; KADLECEK, P. Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Praga, v.42, n.3, p. 469-474, 1999.

TICHA, I. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves - Stomata density and sizes. **Photosynthetica**, Praga, v.16, p. 375-471, 1982.

TODIC, S.; TESIC, D.; BESLIC, Z. The effect of certain exogenous growth regulators on quality of grafted grapevine rootlings. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.45, p.121–126, 2005.

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

TORRES, J.; MOGOLLÓN, N. Efecto del PBZ sobre la brotación y el desarrollo in vitro de la epidermis foliar de *Cattleya mossiae* Parker ex Hooker previo a la aclimatación. **Bioagro**, Barquisimeto, n. 14, p. 25-28, 2002.

TOSCANO-DE-BRITO, A.L.V.; CRIBB, P. **Orquídeas da Chapada Diamantina**. São Paulo: Ed. Nova Fronteira, 2005. 400p.

UBEDA-TOMÁS, S.; FEDERICI, F.; CASIMIRO, I.; BEEMSTER, G.T.S.; BHALERAO, R.; SWARUP, R.; DOERNER, P.; HASELOFF, J.; BENNETT, M.J. Gibberellin signaling in the endodermis controls *arabidopsis* root meristem size. **Current Biology**, London, v. 19, p. 1194–1199, 2009.

VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, Cambridge, v. 110, p. 605-613, 1949.

VIKRANT, R.A. Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4 – D pulse treatment of mature embryos of *Paspalum scrobiculatum*. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 46, n. 2, p. 297-300, 2003.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of in vitro preconditioning with carbohydrates during the rooting of micro cuttings on in vitro establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.38, n. 3/4, p. 261-267, 1989.

WATSON, G.W. Soil-applied paclobutrazol affects root growth, shoot growth and water potential of American elm seedlings. **Journal of Environmental Horticulture**, Washington, v.19, p.199–122, 2001.

WEISS, D.; ORI, N. Mechanisms of cross-talk between gibberellin and other hormones. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.144, p.1240–1246, 2007.

WHITE, P.R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, Cambridge , v. 2, p. 231-244, 1951.

WILLIAMS, N.H. Stomatal development in *Ludisia discolor* (Orchidaceae): mesoperigenous subsidiary cells in the monocotyledons. **Taxon**, v. 24, n. 2/3, p. 281-288. 1975.

YANG, L.; GAO, S.; ZOU, Z.; CHEN, G. Primary Studies on Polyploid Induction of *Cymbidium* hybrid In Vitro. **Northern Horticulture**, Pequim, v. 6, p.6, 2009.

YAXLEY, J.R.; ROSS, J.J.; SHERRIFF, L.J.; REID, J.B. Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.125, p. 627-633, 2001.

YIM, K.O.; KWON, Y.W.; BAYER, D.E. Growth responses and allocation of assimilates of rice seedlings by paclobutrazol and gibberellin treatment. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 16, p. 35–41, 1997.

ZAERR, J.B.; MAPES, M.O. Action of growth regulators. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. 2nd ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p. 231-255.

ZHU, L.H.; VAN-DE-PEPPEL, A.; LI, X.Y. Welander, M. Changes of leaf water potential and endogenous cytokinins in young apple trees treated with or without paclobutrazol under drought conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p.133–141, 2004.

ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation of fruit plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.120, p.217-222,1981.