

# **CONTROLE DA ABSCISÃO FOLIAR E MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM CULTURAS DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul<sup>1</sup>**

Cristina Ferreira Nepomuceno<sup>2</sup>, Ana Paula de Souza Rios<sup>3</sup>, Sandra Regina de Oliveira Domingos Queiroz<sup>4</sup>, Claudinéia Regina Pelacani<sup>4</sup> e José Raniere Ferreira de Santana<sup>4</sup>

**RESUMO** – O trabalho teve por objetivos controlar a abscisão foliar de plântulas de angico utilizando  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CoCl}_2$  e avaliar o efeito do paclobutrazol sobre o comportamento *in vitro* das plântulas. As sementes foram desinfestadas e inoculadas em placas de Petri contendo papel germtest, previamente esterilizado e umedecido com água estéril. As placas ficaram no escuro por dois dias até que ocorresse a germinação das sementes e, em seguida, foram transferidas para tubo de ensaio contendo meio WPM. Todo esse material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . No primeiro experimento, o meio de cultura foi suplementado com dois tipos de inibidores de etileno ( $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CoCl}_2$ ) em diferentes concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0; e 40,0  $\mu\text{M}$ ). No segundo, o meio foi suplementado com diferentes concentrações (1,7; 3,4; 6,8; e 13,6  $\mu\text{M}$ ) de paclobutrazol. Verificou-se que houve aumento no número de folhas e redução na abscisão foliar com a utilização de 10 e 20  $\mu\text{M}$  (respectivamente), independentemente do inibidor de etileno utilizado. Tanto o  $\text{AgNO}_3$  quanto o  $\text{CoCl}_2$  contribuíram com acréscimos no número de gemas e no número de brotações. O aumento na concentração de paclobutrazol reduziu o crescimento das plântulas, obtendo-se menores médias das seguintes variáveis: comprimento da parte aérea, número de folhas, número de folhas senescentes e matéria seca da parte aérea na maior concentração (13,6  $\mu\text{M}$ ) de paclobutrazol. Esse inibidor de crescimento teve efeito também no sistema radicular, reduzindo o comprimento da raiz e o número de raízes secundárias, no entanto promoveu o engrossamento das raízes.

Palavras-chave: Angico, paclobutrazol e  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CoCl}_2$ .

## ***CONTROL OF LEAF ABSCISSION AND IN VITRO MORPHOGENESIS IN CULTURES OF *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* Altschul***

**ABSTRACT** – This work aimed to control leaf abscission of seedlings of angico using  $\text{AgNO}_3$  and  $\text{CoCl}_2$  and evaluate the effect of the paclobutrazol on the *in vitro* behavior of seedlings. The seeds were disinfected and inoculated in Petri plates containing germtest paper, previously sterilized and imbibed in sterile water. The plates were kept in the dark for two days, until seed germination. Seeds were transferred to test tubes containing WPM medium. In the first experiment, the culture medium was supplemented with different concentrations of (0.0; 5.0; 10.0; 20.0; 40.0  $\mu\text{M}$ ) and types ( $\text{AgNO}_3$  and  $\text{CoCl}_2$ ) of ethylene inhibitors. In the second experiment, the medium was supplemented with different concentrations (1.7; 3.4; 6.8; 13.6  $\mu\text{M}$ ) of paclobutrazol. There

<sup>1</sup> Recebido em 10.10.2006 e aceito para publicação em 30.01.2007.

<sup>2</sup> Bolsista DTI/M-CNPq. Rua General Costa e Silva, 40, Sobradinho, 44018-240 Feira de Santana-BA. E-mail: <nepomucenocf@yahoo.com.br>.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana - BA. E-mail: <riosbioap@yahoo.com.br>.

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Biológicas da UEFS. E-mail: <sanqueiroz@ig.com.br>; <pelacani@uefs.br>; <raniere@uefs.br>.

was increase in the number of leaves and reduction in foliar abscission with 10 and 20  $\mu\text{M}$  respectively, independent of the used ethylene inhibitor. Both the  $\text{AgNO}_3$  and the  $\text{CoCl}_2$  helped to increase the number of buds and shoots. The increase in the concentration of paclobutrazol reduced seedling growth, with lower means for the variables – length of aerial part, number of leaves, number of senescent leaves and dry matter of the aerial part in the highest concentration (13.6  $\mu\text{M}$ ) of paclobutrazol. This growth inhibitor had also effects on the root system, reducing root length and number of secondary roots, however promoting root thickening.

*Keywords:* Angico, paclobutrazol and  $\text{AgNO}_3$  and  $\text{CoCl}_2$ .

## 1. INTRODUÇÃO

*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul, pertencente à subfamília Mimosoideae (Leguminosae), é uma espécie arbórea que ocorre em vários biomas, entre eles o da caatinga, conhecida popularmente como angico. Esta espécie apresenta um mecanismo fisiológico de adaptação, em que ocorre abscisão foliar durante o período de seca, fenômeno conhecido como caducifólia e comum nas plantas da caatinga. Algumas espécies lenhosas quando cultivadas *in vitro* apresentam esse processo em resposta ao ambiente a que é submetido; como consequência da abscisão foliar, o crescimento *in vitro* é reduzido, e o explante torna-se frágil, impossibilitando a continuação do processo de micropropagação (LEMOS e BLAKE, 1994). O ambiente fechado, no qual as plântulas ou explantes são submetidos, proporciona, de modo geral, o acúmulo de etileno, regulador de crescimento e responsável pela abscisão de folhas, frutos e flores. Esse regulador, mesmo em pequenas concentrações, pode ser fisiologicamente ativo e desencadear vários processos, dentre estes a abscisão foliar (KERBAUY, 2004).

Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de amenizar ou inibir a ação do etileno, seja bloqueando a sua biossíntese, seja bloqueando a ação desse regulador, através de inibidores do etileno. Geralmente, são utilizadas substâncias químicas como o aminoetóxi-vinil-glicina (AVG), ácido aminoacético (AOA), que atuam bloqueando a conversão do S-Adenosil-metionina (Adomet) em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), atuando como inibidores de enzimas que utilizam o co-fator piridoxal fosfato. Além desses inibidores da biossíntese de etileno, tem-se o íon cobalto, que atua bloqueando a conversão do ACC em etileno, a qual é realizada pela ACC oxidase, e os inibidores da ação como o íon prata (nitrato de prata e tiossulfato de prata), dióxido de carbono e transciclooctano, que compete pelo receptor

de etileno e é um forte inibidor. Outro composto é o 1-aminociclopropano (MCP), que age ligando-se ao receptor de etileno de forma irreversível (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Além da abscisão foliar, as plântulas de *A. colubrina* cultivadas *in vitro* apresentam entrenós bastante alongados e, conseqüentemente, poucas gemas axilares, o que resulta em baixa produção de explante na fase de multiplicação (NEPOMUCENO, 2006). O alongamento de entrenós é característica marcante da ação de giberelina, e esse quadro pode ser revertido com o uso de compostos com ação antagonista do ácido giberélico. O paclobutrazol está entre os compostos com tal a ação, bloqueando reações de oxidação na passagem de caureno para ácido caurenóico na biossíntese de substâncias giberélicas (SALISBURY e ROSS, 1992; TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os inibidores do crescimento vegetal são combinações sintéticas e têm sido aplicados em culturas para reduzir o crescimento longitudinal de brotos, sem diminuir a produtividade da planta. A maioria dos inibidores de crescimento age inibindo a biossíntese da giberelina, hormônio responsável, principalmente, pelo alongamento do broto (RADEMACHER, 2000).

Segundo Lorenzo et al. (1998) e Thakur et al. (2006), o paclobutrazol, além de reduzir o alongamento dos brotos, promove aumento nas taxas de multiplicação no cultivo *in vitro*. Ziv (1995) ainda relatou que há também redução na área foliar e aumento na resistência ao estresse em várias espécies de plantas micropropagadas, como crisântemo, rosa e videira. De acordo com Roberts et al. (1992), os inibidores de crescimento, a exemplo do ancimidol, flurprimidol e paclobutrazol, podem ser utilizados para reduzir a hiperidricidade de plantas micropropagadas, o que, segundo Smith et al. (1990a), resulta em melhoria na taxa de sobrevivência depois do transplantio. Ilczuk

et al. (2005), ao utilizarem o retardante de crescimento flurprimidol, em culturas de *Hippeastrum x chmielii* verificaram a redução no alongamento das folhas e incrementos no sistema radicular.

Embora o uso de retardantes de crescimento em plantas tenha se tornado uma opção para controlar, sobretudo, o porte das plantas, pouco se sabe a respeito dos possíveis efeitos do paclobutrazol nos processos fisiológicos das plantas cultivadas *in vitro*.

Os objetivos deste trabalho foram: controlar a abscisão foliar em culturas de angico utilizando nitrato de prata e cloreto de cobalto e avaliar o comportamento *in vitro* das plântulas ao serem submetidas a meio de cultura contendo o inibidor de crescimento, paclobutrazol.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local de realização do experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), localizado no Município de Feira de Santana, região do semi-árido da Bahia.

### 2.2. Material vegetal, desinfestação e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de *A. colubrina*, coletadas na Fazenda Floresta, localizada no Município de Tanquinho, Ba. As sementes ficaram armazenadas no Banco de Sementes do Horto Florestal da UEFS, mantidas em saco de pano, por um período de uma semana, sob temperatura ambiente.

Inicialmente, as sementes de *A. colubrina* foram lavadas em água corrente. Em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas após imersão em álcool 70% por 1 min, seguido de solução de hipoclorito de sódio – NaOCl (água sanitária comercial - 2,5% de cloro ativo) com duas gotas de detergente neutro por 15 min e lavadas quatro vezes com água destilada estéril. Em seguida foram inoculadas 10 sementes por placa de Petri contendo papel germtest, previamente esterilizados, umedecidos com água destilada estéril, e, então, as placas foram vedadas com filme de PVC. O conjunto de placas de Petri ficou no escuro por dois dias, em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Após 48 h de semeadura, as sementes com protrusão da radícula foram transferidas para tubos de ensaio contendo 20 mL de meio sólido WPM (Wood Plant Medium) (LLOYD e McCOWN, 1980), suplementado

com 3% de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar (Reagen®) e acrescido de 1 mL.L<sup>-1</sup> de fungicida (Derosal® 500 sc). O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  (utilizando-se KOH ou HCl 0,1 N), antes da autoclavagem à temperatura de 121 °C por 15 min. Todo o processo de transferência das sementes com protrusão de radícula foi realizado em câmara de fluxo laminar.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 16 h, com umidade relativa de 50% e radiação fotossintética ativa de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### 2.3. Controle da abscisão foliar *in vitro* em culturas de *A. colubrina*

No primeiro ensaio, o meio de cultura foi suplementado com cloreto de cobalto -  $\text{CoCl}_2$  (0,0; 5,0; 10,0; 20,0; e 40,0  $\mu\text{M}$ ); no segundo ensaio, adicionou-se ao meio nitrato de prata -  $\text{AgNO}_3$  (0,0; 5,0; 10,0; 20,0; e 40,0  $\mu\text{M}$ ). Após a inoculação das sementes com radícula, os tubos foram fechados com filme de PVC. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 5 (tipos de inibidores do etileno x concentrações dos inibidores), com 10 repetições, e cada repetição constou de seis tubos.

Aos 30 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: comprimento da parte aérea (mm), em que para a realização da medida se utilizou régua graduada em mm; e contagem do número de folhas originadas, número de pinas, folhas perdidas por abscisão foliar, número de brotações e números de gemas.

### 2.4. Efeito do inibidor de crescimento paclobutrazol (PBZ) na morfogênese de *A. colubrina*

Foram adicionadas ao meio de cultura cinco concentrações de paclobutrazol (1,7; 3,4; 6,8; e 13,6  $\mu\text{M}$ ). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, composto por 10 repetições, e cada repetição constou de cinco tubos.

Aos 45 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: comprimento da parte aérea e da raiz (mm) através de medição com régua graduada em mm; número de folhas, número de folhas senescentes e número de raízes secundárias, as quais foram realizadas através de contagem. Para matéria seca da parte aérea e das raízes (mg), inicialmente separou-se a parte aérea da raiz, sendo ambas acondicionadas em sacos de papel e mantidas na estufa com ventilação forçada, com temperatura mantida em 60 °C, até que atingissem o peso constante.

## 2.5. Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Tukey (fator qualitativo) e por regressão (fator quantitativo). Os dados foram analisados usando-se o programa SISVAR, v 4.3, desenvolvido pela UFLA (FERREIRA, 2003).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

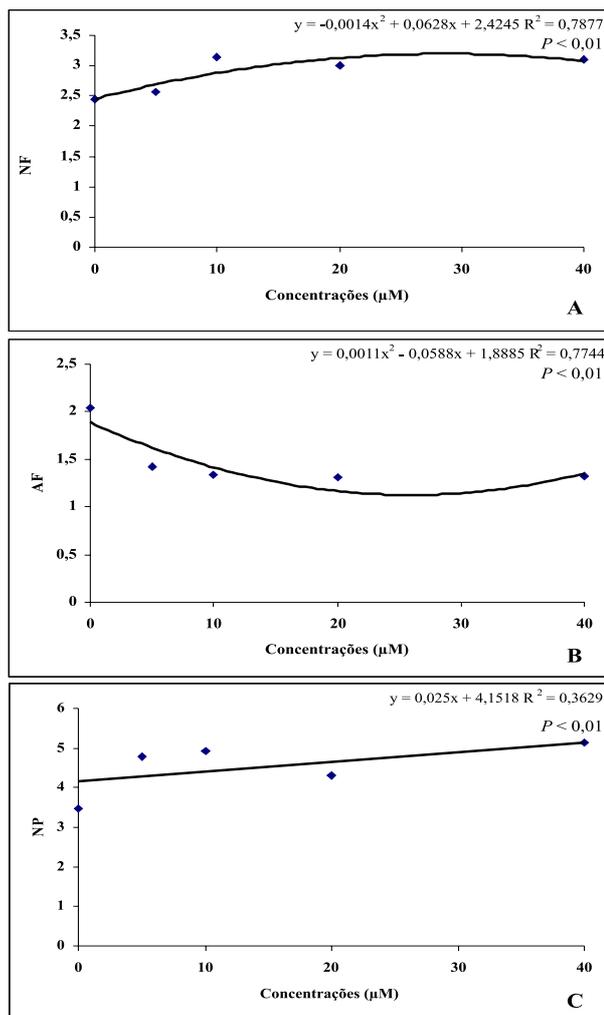
### 3.1. Controle da abscisão foliar *in vitro* em culturas de *A. colubrina*

Para o número de folhas, a curva de regressão indicou um comportamento quadrático, atingindo o maior valor (3,13 folhas por plântula), quando foi adicionado ao meio de cultura a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  ou  $\text{AgNO}_3$  (Figura 1A), observando-se um aumento em 29% no número de folhas, em comparação com o controle. Em relação à abscisão foliar, o menor valor obtido foi de 1,3 folha por plântula, quando o meio de cultura era enriquecido com os inibidores na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . Essa condição representou a maior porcentagem (36%) na redução da abscisão foliar das plântulas de angico, em comparação ao controle (Figura 1B). Isso pode ser causado pela interferência dos íons cobalto e prata, em que o cloreto de cobalto age inibindo a biossíntese de etileno na última etapa da rota, bloqueando a conversão do ACC em etileno, realizada pela ACC oxidase, enquanto o íon prata age inibindo a ação do etileno, em que a prata é muito específica, pois a inibição que esse íon causa não pode ser induzida por nenhum outro íon metálico (TAIZ e ZEIGER, 2004). Embora esses inibidores de etileno tenham se reduzido, inicialmente, à abscisão foliar, esses mesmos compostos mostraram-se pouco eficientes no controle desse fenômeno ao longo do experimento.

O acúmulo de etileno tem efeito adverso no desenvolvimento das plantas, afetando a diferenciação, desenvolvimento, morfologia e crescimento das plantas, diminuindo a expansão foliar e o comprimento dos brotos, inibindo a regeneração de novos brotos e causando necrose apical (ERIG e SCHUCH, 2005), além de promover abscisão foliar nos cultivos *in vitro*.

Com relação ao número de pinas, a curva de regressão indicou comportamento linear, atingindo o maior valor (5,13 pinas por plântula) quando se utilizou a maior concentração do inibidor de etileno (40  $\mu\text{M}$ ),

enquanto no meio de cultura, sem adição dos inibidores, apresentou-se com apenas 3,5 pinas por plântula (Figura 1C). Entretanto, com essa concentração observou-se o aumento da abscisão foliar, o que torna nulo o ganho no número de pinas, uma vez que a utilização desse material como fonte de explante poderá impossibilitar a continuação do processo de micropropagação.



**Figura 1** – Médias do número de folhas (NF) (A), abscisão foliar (AF) (B) e número de pinas (NP) (C) de plântulas de *A. colubrina* submetidas a diferentes concentrações de inibidores de etileno ( $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CoCl}_2$ ) em meio WPM. Feira de Santana, 2006.

**Figure 1** – Means of number of leaves (NL) (A), leaf abscission (LA) (B) and number of pinnas (NP) (C) of *A. colubrina* seedlings subject to different concentrations of ethylene inhibitors in WPM medium. Feira de Santana, 2006.

Quanto ao número de gemas, a concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de nitrato de prata foi a que promoveu o maior estímulo para a produção de gemas por plântula (Quadro 1). O maior número de brotações foi obtido também quando se utilizaram 5  $\mu\text{M}$  de nitrato de prata (2,08 brotações por plântula), revelando diferença estatisticamente significativa com relação ao cloreto de cobalto (1,59 brotação por plântula). Quando se adicionou a concentração de 10  $\mu\text{M}$  dos inibidores, foi observado também diferença estatisticamente significativa para o estímulo do número de brotações entre o cloreto de cobalto (1,86 brotação por explante) e o nitrato de prata (1,56 brotação por plântula) (Quadro 2). Esses resultados discordam daqueles encontrados por Pereira-Neto (2001), que ao utilizar concentrações inferiores a 12,5  $\mu\text{M}$  de cloreto de cobalto, não estimulou a formação de brotações ou a taxa de multiplicação das brotações, indicando que o íon cobalto foi ineficaz para inibir a produção de etileno em cultura de *Hancornia speciosa* e, conseqüentemente, não promoveu a estimulação de brotações. Segundo esse autor, a baixa mobilidade do íon cobalto em tecidos vegetais pode interferir no transporte, a partir do meio de cultura, para os sítios de produção de etileno.

De acordo com Reis et al. (2003), os inibidores tanto da ação quanto da biossíntese de etileno estimulam o desenvolvimento das brotações, aumentam o número de brotos por explante e a área foliar em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, em comparação com o meio de cultura sem a adição dos inibidores. No cultivo *in vitro* de *Cucumis sativus* foi observado, por Mohiuddim et al. (1997), que concentrações de 10 a 50  $\mu\text{M}$  de nitrato de prata estimulam a indução de brotações, além de aumentar o número de brotos por explante, com a ressalva de que a concentração de 30  $\mu\text{M}$  produziu a maior porcentagem delas.

Os resultados apresentados indicam a hipersensibilidade dos tecidos de *A. colubrina* para o etileno, em que este induz a abscisão foliar, o que poderá limitar as etapas seguintes do processo de micropropagação para essa espécie. Em contrapartida, os inibidores de etileno testados mostraram-se benéficos para a morfogênese dessa espécie, possibilitando o aumento no número de gemas e no número de brotações. A utilização desses inibidores, em especial o nitrato de prata que promoveu maior número de gemas e de brotações, poderá ser usado como o primeiro passo para a etapa de multiplicação no processo de micropropagação dessa espécie. Segundo Sisler e Yang (1984), o íon prata interfere no complexo receptor de etileno, numa ligação essencial do receptor,

resultando na inativação biológica do complexo e, ou, na perda da capacidade do receptor para se ligar ao etileno.

De modo geral, o uso de nitrato de prata (5,0  $\mu\text{M}$ ) foi eficiente para a produção de elevado número de gemas (11,25) em cultura de *A. colubrina* sem a adição de fitoreguladores, enquanto em cultura de *Acácia mearnsii* Borges Júnior et al. (2004), com o uso do fitoregulador BAP (6-benzilaminopurina) (8,87  $\mu\text{M}$ ), obtiveram apenas 3,5 gemas por explante. O nitrato de prata também promoveu aumento no número de brotações sem a necessidade de fitoreguladores. Em cultivos *in vitro* de *Aspidosperma polyneuron*, Ribas et al. (2005) encontraram resultados semelhantes ao de angico quando utilizaram os fitoreguladores ZEA (zeatina) ou BAP, quando obtiveram os melhores resultados para o número de brotações (entre duas e três brotações por explante).

**Quadro 1** – Número de gemas de *A. colubrina* em função dos inibidores de etileno. Feira de Santana, 2006

**Table 1** – Number of buds of *A. colubrina* as a function of ethylene inhibitors. Feira de Santana, 2006

Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	Inibidores de etileno	
	Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )	Cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ )
0,0	3,30 a <sup>z</sup> C <sup>y</sup>	3,30 aC
5,0	11,25 aA	7,57 bAB
10,0	6,22 bBC	8,70 aA
20,0	6,00 aBC	5,55 aBC
40,0	8,5 aAB	9,3 aA

<sup>z</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada linha, para cada inibidor de etileno, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>y</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada coluna, para cada concentração dos inibidores de etileno, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Quadro 2** – Número de brotações de *A. colubrina* em função dos inibidores de etileno. Feira de Santana, 2006

**Table 2** – Number of shoots of *A. colubrina* as a function of ethylene inhibitors. Feira de Santana, 2006

Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	Inibidores de etileno	
	Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )	Cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ )
0,0	1,41 a <sup>z</sup> B <sup>y</sup>	1,41 aB
5,0	2,08 aA	1,59 bAB
10,0	1,56 bB	1,86 aA
20,0	1,53 aB	1,59 aAB
40,0	1,65 aB	1,79 aAB

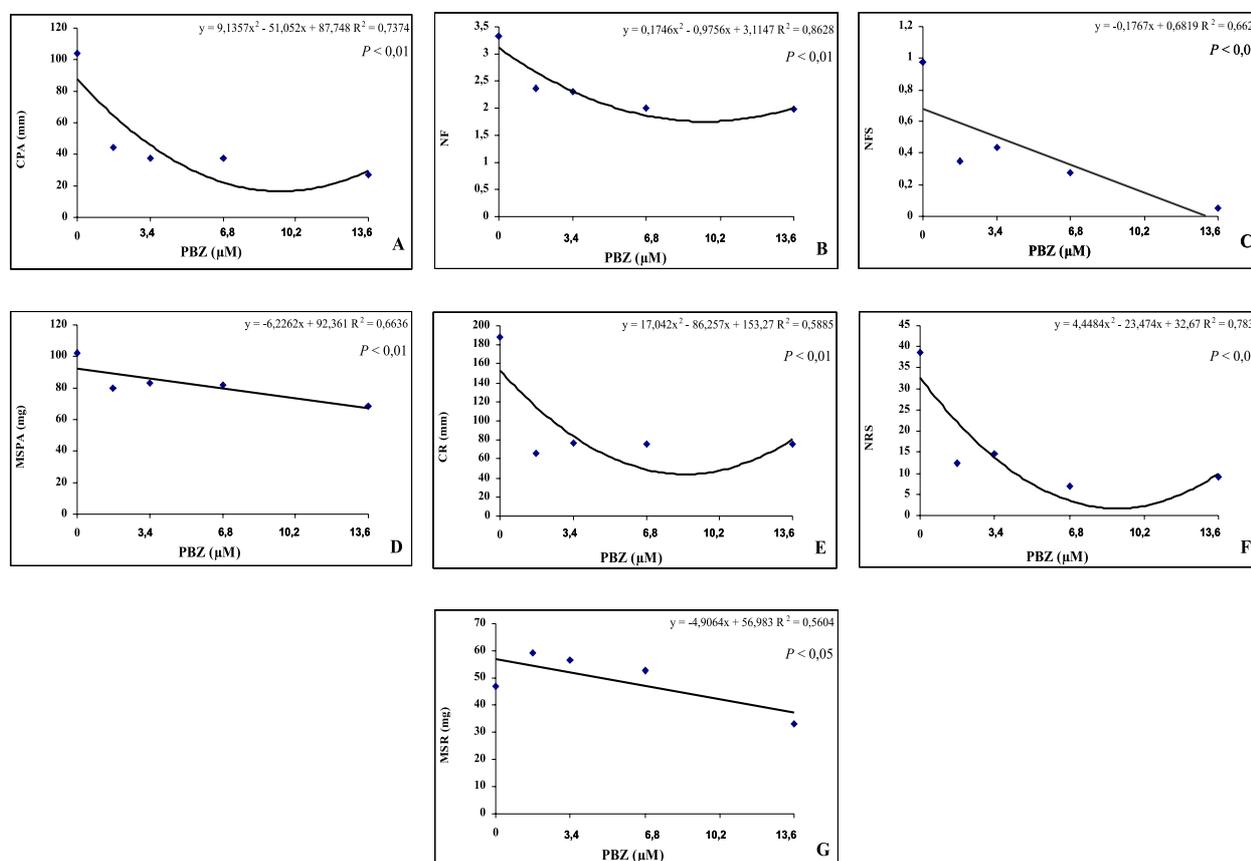
<sup>z</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada linha, para cada inibidor de etileno, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>y</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna, para cada concentração dos inibidores de etileno, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 3.2. Efeito do inibidor de crescimento paclobutrazol (PBZ) na morfogênese de *A. colubrina*

Observou-se que as plântulas apresentaram menor crescimento com o aumento das concentrações de paclobutrazol. A análise de regressão indicou um comportamento quadrático das concentrações de paclobutrazol com relação às variáveis comprimento da parte aérea e número de folhas. O menor comprimento da parte aérea foi obtido quando se utilizou a maior concentração de paclobutrazol (13,6  $\mu\text{M}$ ), observando redução de 290% em relação ao meio de cultura sem a adição de paclobutrazol (Figura 2AB). Resultados semelhantes foram encontrados por Ritchie et al. (1991)

em culturas de *Chrysanthemum moriflorum* e *Beta vulgaris*, em que esses autores verificaram redução de 230% no comprimento quando foi utilizada a concentração de 10,2  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol. De acordo com Taiz e Zeiger (2004), o paclobutrazol age inibindo a biossíntese da giberelina, hormônio promotor do crescimento, que tem ação na extensibilidade da parede celular, permeabilidade da membrana, atividade enzimática e mobilização de açúcares, além do alongamento celular. O paclobutrazol bloqueia reações de oxidação na passagem do *ent*-caureno para o ácido *ent*-caurenóico, agindo antes da formação do GA<sub>12</sub> – aldeído, que é a primeira giberelina da rota e precursora de todas as outras (TAIZ e ZEIGER, 2004).



**Figura 2** – Média de comprimento da parte aérea (CPA) (A), número de folhas (NF) (B), número de folhas senescentes (NFS) (C), matéria seca da parte aérea (MSPA) (D), comprimento de raiz (CR) (E), número de raízes secundárias (NRS) (F) e matéria seca de raiz (MSR) (G) de plântulas de *A. colubrina* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol em meio WPM. Feira de Santana, 2006.

**Figure 2** – Means of length of aerial part (CPA) (A), number of leaves (NL) (B), number of senescent leaves (NLS) (C), dry matter of the aerial part (DMAP) (D), root length (RL) (E), number of secondary roots (NSR) (F) and dry matter of root (DMR) (G) of *A. colubrina* seedlings subject to the different concentrations of paclobutrazol in WPM medium. Feira de Santana, 2006.

A inibição da síntese de giberelina pode, portanto, acarretar menor alongamento do entrenó em plantas (KERBAUY, 2004). Observou-se que plântulas de *A. colubrina* apresentam rápido crescimento *in vitro*, promovido pelo alongamento dos entrenós em função da giberelina endógena, a que promove o crescimento da plântula, sem que haja aumento no número de entrenós (NEPOMUCENO, 2006).

Com relação ao número de folhas senescentes, observou-se modelo matemático linear decrescente nas concentrações de paclobutrazol utilizadas (Figura 2C). O maior número de folhas senescentes ocorreu na ausência do paclobutrazol, e o menor número foi encontrado com a maior (13,6  $\mu\text{M}$ ) concentração desse composto. Segundo Rademacher (2000), os compostos que atuam inibindo o crescimento vegetal induzem aumento no conteúdo de citocininas, e os níveis de etileno são diminuídos, tendo como consequência um retardo na senescência. Esse autor ainda relatou que retardantes de crescimento, como o paclobutrazol, podem influenciar a redução do etileno, bloqueando a conversão do ácido aminociclopropanocarboxílico por meio da ACC oxidase.

Comportamento semelhante ao do número de folhas pode ser observado na matéria seca da parte aérea (Figura 1D). Pôde-se verificar redução na matéria seca da parte aérea quando foi utilizada a maior concentração de paclobutrazol (13,6  $\mu\text{M}$ ) em 32,9%, em comparação com o controle. Resultados semelhantes foram verificados em cultura de *Chrysanthemum morifolium*, em que, utilizando concentrações mais altas (10,2  $\mu\text{M}$ ) de paclobutrazol, a matéria seca da parte aérea foi reduzida em 49% (RITCHIE et al., 1991).

O sistema radicular também sofreu influência do paclobutrazol, havendo redução no comprimento da raiz, número de raízes secundárias e matéria seca da raiz. O maior valor do comprimento da raiz foi observado no meio sem a adição do paclobutrazol e o menor, com 1,7  $\mu\text{M}$  do mesmo composto, mostrando uma diferença de 185% em relação ao meio sem adição do paclobutrazol (Figura 2E). Observou-se comportamento quadrático das variáveis comprimento da raiz e número de raízes secundárias nas concentrações de paclobutrazol utilizadas, em que houve diferença altamente significativa na redução do número de raízes secundárias na presença de 6,8  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol, em comparação com o meio

sem esse composto (Figura 2F). Esses resultados corroboram respostas encontradas por Konstas e Kintzios (2003) em cultura de *Cucumis sativus*, quando utilizaram outro retardante de crescimento, flurprimidol, o qual age inibindo a biossíntese da giberelina, de forma semelhante ao paclobutrazol.

A equação matemática que melhor se ajustou para a variável matéria seca da raiz foi a linear. O maior valor da matéria seca da raiz foi obtido na presença de 1,7  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol. Entretanto, quando se utilizou a concentração mais alta (13,6  $\mu\text{M}$ ), observou-se redução da matéria seca da raiz (Figura 2G). Esses resultados indicam que o paclobutrazol em baixas concentrações contribui para a incorporação de carbono, uma vez que na ausência deste retardante de crescimento as raízes indicaram menor incorporação de matéria seca. Resultados semelhantes foram encontrados por Konstas e Kintzios (2003) utilizando o flurprimidol na espécie *Cucumis sativus*. Contudo, nos meios contendo paclobutrazol se observou engrossamento das raízes. Essa característica também foi verificada em outras espécies quando sob a ação de retardantes de crescimento, como em *Chrysanthemum morifolium* e *Vitis vinifera* (SMITH et al., 1990b; ROBERTS et al., 1992; SMITH et al., 1992) e em *Lilium longiflorum* (THAKUR et al., 2006). Esse aspecto de engrossamento das raízes pode ser benéfico na etapa de aclimatização, pois raízes mais vigorosas tendem a facilitar maior pegamento das mudas. As raízes possuem um padrão de crescimento que é determinado ainda no estágio embrionário, e o padrão axial e o padrão radial, apenas após a germinação, tornam-se ativos e iniciam a formação dos órgãos e dos tecidos. Como a giberelina é um hormônio responsável pelo alongamento das células, proporcionando, então, o crescimento do órgão, com o uso do paclobutrazol inibindo a biossíntese de giberelina, embora ocorra a divisão celular as novas células não se alongam e, como consequência, tem-se o crescimento reduzido, sendo provável que as raízes tenham aumentado de diâmetro devido à ocorrência de divisões celulares radiais.

Outras pesquisas são necessárias para avaliar a ação do paclobutrazol em um período maior de tempo, pois esse retardante de crescimento degrada lentamente e apresenta, de acordo com Silva et al. (2003), meia-vida de 95 dias.

#### 4. CONCLUSÕES

Os inibidores de etileno ( $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CoCl}_2$ ) mostraram-se pouco eficientes no controle da abscisão foliar, embora com a menor concentração ( $5,0 \mu\text{M}$ ) de nitrato de prata se obtiveram incrementos significativos tanto no número de gemas quanto de brotações, mostrando-se eficiente para o processo de micropropagação.

A concentração de  $1,7 \mu\text{M}$  de paclobutrazol mostrou-se eficiente na redução do crescimento e no número de folhas senescentes e proporcionou aumento de matéria seca da raiz nas plântulas de *A. colubrina*, além de promover o engrossamento das raízes.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BORGES JÚNIOR, N.; SORBOSA, R. C.; MARTINS-CODER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acácia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, v.28, n.4, p.493-498, 2004.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.961-965, 2005.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar** – Versão 4.3. Lavras: DEX/UFLA–MG, 2003.
- ILCZUK, A. et al. *In vitro* propagation of *Hippeastrum x chmielli* Cham. – influence of flurprimidol and culture in solid or liquid medium and temporary immersion systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.83, p.339-346, 2005.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.
- KONSTAS, J.; KINTZIOS, S. Developing a scale-up system for the micropropagation of cucumber (*Cucumis sativus* L.): The effect of growth retardants, liquid culture and vessel size. **Plant Cell Reports**, v.21, p.538-548, 2003.
- LE MOS, E. E. P.; BLAKE, J. Leaf abscission in micropropagated sugar apple (*Annona squamosa* L.). In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994. p.232-237.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* ssp. **HortScience**, v.15, p.415, 1980.
- LORENZO, J. C. et al. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, p.197-200, 1998.
- MOHIUDDIM, A. K. M. et al. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.75-78, 1997.
- NEPOMUCENO, C. F. **Crescimento *in vitro* e controle morfofisiológico em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**. 2006. - f Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.
- PEREIRA-NETO, A. B. Effect of inhibitors of ethylene biosynthesis and signal transduction pathway on the multiplication of *in vitro*-grown *Hancornia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, p.1-7, 2001.
- RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.501-531, 2000.
- REIS, L. B. et al. Axillary Bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cell Development Biology – Plant**, v.39, n.6, p.618-622, 2003.
- RIBAS, L. L. F. et al. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenil. **Revista Árvore**, v.29, n.4, p.517-524, 2005.
- 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**, v.42, n.245, p.1557-1563, 1991.

ROBERTS, A. V. et al. The effect of growth retardants, humidity and lighting at Stage III on Stage IV of micropropagation in chrysanthemum and rose. **Acta Horticulturae**, v.319, p.153-158, 1992.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth, 1992.682p.

SISLER, E. C.; YANG, S. F. Ethylene the gaseous plant hormone. **Bioscience**, v.34, n.4, p.234-238, 1984.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Degradação do paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1223-1227, 2003.

SMITH, E. F.; ROBERTS, A. V.; MOTTLEY, J.. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. 3. Improved resistance to desiccation conferred by reduced humidity. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, n.2, p.141-145, 1990a.

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 and Organ Culture**, v.21, n.2, p.133-140, 1990b.

SMITH, E. F. et al. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. **HortScience**, v.27, p.111-113, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

THAKUR, R. et al.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**, v.25, p.382-391, 2006.

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE, K. J.; LILA, T.; SMITH, M. A. (Eds.) **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer, 1995.p.493-516.