

CRISTINA FERREIRA NEPOMUCENO

**CRESCIMENTO *IN VITRO* E CONTROLE
MORFOFISIOLÓGICO EM PLÂNTULAS DE *Anadenanthera*
colubrina (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**

FEIRA DE SANTANA – BAHIA
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**CRECIMENTO *IN VITRO* E CONTROLE
MORFOFISIOLÓGICO EM PLÂNTULAS DE *Anadenanthera*
colubrina (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**

CRISTINA FERREIRA NEPOMUCENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana como parte dos requisitos para a obtenção do título de *Mestre em Botânica*.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RANIERE FERREIRA DE SANTANA (UEFS)

FEIRA DE SANTANA – BA

2006

Ficha Catalográfica – Universidade Estadual de Feira de Santana

Nepomuceno, Cristina Ferreira. Crescimento *in vitro* e controle morfofisiológico em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.)

Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul. 2006, 70p.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana

Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, 2006.

Inclui Bibliografia

1. *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. 2. Angico. 3. Fisiologia Vegetal. 4. Aeração *in vitro*. 5. Morfogênese. 6. Cultura de tecidos. I. José Raniere Ferreira de Santana. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Prof. Dr. José Raniera Ferreira de Santana
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2006

Aos meus queridos pais, Francisco e
Gildete, meus irmãos e sobrinhos,
pelo apoio, incentivo, compreensão e
paciência, com amor

DEDICO

É preciso ser alegre,
assim como é preciso navegar
e viver...

É preciso inflar os sorrisos
que amúdam dentro da gente.
Mas é preciso que seja de verdade,
ou seja, é preciso que a alegria
não seja uma farsa, uma compulsão,
mas que seja uma construção
indissolúvel.

É preciso entender a alegria,
considerá-la seriamente
como parte da transformação do mundo
e de nós, enquanto mundos complexos,
habitados por tantas possibilidades
de sentimentos.

É preciso favorecer a expressão da alegria
para que ela própria, prisioneira,
sinta-se capaz de emergir e corar nossos olhos.

É preciso abrir os braços e erguer a cabeça
e pôr-se vulnerável às influências da alegria,
sem o medo de perder a si mesmo,
ao perder a crença no sofrimento.

Cláudio Lessa da Fonseca

AGRADECIMENTOS

À Deus que tem me acompanhado fielmente durante cada dia de minha vida e que conhece a fundo os meus pensamentos e nunca me abandona.

Aos meus pais, Francisco e Gildete pelo eterno incentivo, por estarem sempre dispostos a me ajudar no que for preciso e pelo exemplo de vida.

Aos meus irmãos Carlos, Josélia, Francisco, Domingos, Jocélia, Genilde e Alexandre por todo amor, por saber que estaremos sempre juntos dividindo nossas alegrias e tristezas e por ter a certeza que poderei dizer sempre que vocês são o meu porto seguro.

Ao Prof. Dr. José Raniere pelo profissionalismo, pelos ensinamentos acadêmicos, conselhos, exigências e cobranças dos deveres cumpridos e incentivos na vida profissional, e sobretudo, pela amizade.

A Universidade Estadual de Feira de Santana e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica pela realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

As Prof^a Sandra e Claudinéia pela correção do manuscrito.

A Prof^a Claudinéia pela atenção, incentivo e interesse demonstrado a esse trabalho de pesquisa.

Aos estagiários de Iniciação Científica, Carlos Felipe, Luana e Karla, por toda ajuda dispensada.

A Ana Paula e a Janilza pela ajuda na execução dos trabalhos, e por nossos almoços super descontraídos.

Aos funcionários do Horto Florestal em especial D. Zezé, por estar sempre nos alegrando e claro sempre aparecendo com um chazinho nos momentos certos.

As amigas Ana Paula e Sandra Regina, por estarem sempre dispostas a ajudar, a ouvir as minhas reclamações e pelos conselhos.

As amigas Thyla, Edjane e Cristiane pela amizade e companheirismo.

A Ana Carolina pela disposição em me ajudar nas coletas.

Aos colegas do Horto Moema, Alone, Ana Carolina, Carol, Mirna, Sheila e José Roberto.

A Dany e Kátia pela troca de experiências.

Aos amigos que não estiveram fisicamente próximos, mas presentes em cada lembrança.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	10
Respostas morfofisiológicas <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan var. <i>cebil</i> Altschul	
Resumo	11
Abstract	12
Introdução	13
Material e Métodos	15
Resultados e Discussão	17
Conclusões	30
Referências Bibliográficas	31
CAPÍTULO 2	35
Controle da abscisão foliar e morfogênese <i>in vitro</i> em culturas de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan var. <i>cebil</i> Altschul	
Resumo	36
Abstract	37
Introdução	38
Material e Métodos	39
Resultados e Discussão	42
Conclusão	55
Referências Bibliográficas	56
CONCLUSÕES GERAIS	59
RESUMO GERAL	60
ABSTRACT	62

Introdução Geral

1. Introdução Geral

Anandenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul, é uma espécie de grande ocorrência no semi-árido nordestino, conhecida popularmente como angico, possui grande importância econômica, ecológica e social no bioma caatinga. Pertence à família Leguminosae – Mimosoideae e encontra-se distribuída desde a região Nordeste do Brasil até Bolívia, Argentina, Paraguai e Peru (Altschul, 1964).

A espécie em estudo possui porte arbóreo pouco ramificado, de até 20m de altura, a sua casca pardo-avermelhada, é grossa (2-5 cm), muito rugosa quando adulta, apresentando acúleos na fase jovem e na fase adulta os ramos são lisos. As folhas são bipinadas, alternadas, com 15-20 jugas (pinas) e cada uma apresentando de 20 a 80 pares de folíolos, estes são rígidos e possuem de 4-6 mm de comprimento. O pecíolo possui glândula vermelha basal e elipsóide. As flores são de cor branca, dispostas em inflorescências. Seus frutos são legumes, achatados, grandes (com até 25 cm de comprimento), contendo de 5–10 sementes, lisas e escuras (Barbosa, 1980; Lorenzi & Matos, 2002).

O angico é uma árvore fornecedora de boa madeira para a construção civil, para lenha e carvão, além de sua casca ser muito rica em taninos e usada na indústria de curtume, é também empregada na medicina popular em muitas regiões do Brasil. É considerada amarga, adstringente, depurativa, hemostática, sendo utilizada contra leucorréia e gonorréia. O decocto e o xarope da casca do caule são empregados contra tosse, bronquite e coqueluche. O ferimento do caule libera uma goma-resina usada no fabrico de goma de mascar e no tratamento de problemas respiratórios (Lorenzi & Matos, 2002). Pode ainda ser utilizada para arborização de parques e praças e para o plantio em florestas mistas destinadas à recomposição de áreas degradadas (Lorenzi, 2002).

A grande ocorrência e os diversos usos atribuídos ao angico propiciaram uma exploração intensa da sua casca, folha, madeira e flores para os mais diversos usos inerentes as suas propriedades. Esta espécie se encontra no grupo das espécies importantes para o enriquecimento do semi-árido/caatinga e é devidamente considerada no manejo para fins silviculturais. Mas devido à utilização indiscriminada, a sobrevivência desta espécie tem sido colocada em risco, estando na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (Brasil, 1995).

Diante do grande potencial econômico, social e ambiental de *A. colubrina* var. *cebil*, faz-se necessário desenvolver metodologias para uma eficiente multiplicação, conservação e

manutenção desta espécie. Embora, como acontece com a maioria das plantas nativas, a propagação desta espécie ocorra normalmente através de sementes, esta via de propagação apresenta algumas desvantagens, como a falta de uniformidade, segregação de caracteres e um longo tempo para a produção das mudas.

Sendo assim, é necessário o estudo da propagação vegetativa através da micropropagação, que é uma técnica amplamente difundida e apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais.

Segundo Cabral *et al.* (2003) a micropropagação constitui uma forma de manter sempre disponível explante sadio e livre de contaminação para a aplicação de técnicas de regeneração por cultura de tecidos e transformação genética, além de ser altamente conveniente para a manutenção de coleções de plantas de genótipos diferentes e livres de patógenos, redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie, reprodução da planta mãe, geralmente com fidelidade genética durante a multiplicação.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998) vários fatores influenciam o sucesso da micropropagação, desde o genótipo e a atividade fisiológica da planta matriz, a manipulação até o transplante da planta produzida. Esta manipulação envolve o manejo da planta matriz, as características do explante, as condições ambientais, além do microambiente dentro dos frascos de cultura. O microambiente, que parece ser bastante homogêneo tem se mostrado como responsável pela variabilidade no comportamento das culturas, que pode comprometer todo o sistema de micropropagação.

Um dos fatores que determinam o microambiente da cultura são as tampas dos recipientes, as quais devem permitir a troca gasosa com o ambiente externo, evitando que ocorra deficiência de O₂ e acúmulo de gases como CO₂ e etileno (Islam *et al.*, 2005). De acordo com Jackson (2003), o crescimento e o desenvolvimento são afetados pelas trocas gasosas em culturas de tecidos vegetais.

Informações sobre o acúmulo de compostos gasosos em culturas *in vitro*, tem tido como foco o etileno, que possui papel importante no crescimento e desenvolvimento *in vitro* (Biddington, 1992).

De acordo com Kozai *et al.* (1992) as principais características do ambiente gasoso *in vitro* nos sistemas convencionais de cultura de tecidos são a alta umidade relativa, acúmulo de etileno e outras substâncias tóxicas, que ocorrem principalmente devido a restrições das trocas de ar entre o recipiente de cultura e o ambiente externo. Estas condições podem causar inibição da fotossíntese, estômatos anormais, dificultando a micropropagação e a aclimatização, proporcionando perdas elevadas de plantas na transferência para as condições

ex vitro (Pospíšilová *et al.*, 1999). Contudo, é reconhecido que uma melhora na performance das plantas é alcançada quando o ambiente *in vitro* é o mais próximo daquele em que as plantas crescem *in vivo*.

Na tentativa de eliminar ou reduzir a produção/ação do etileno é que se tem utilizado alternativas para o fechamento dos recipientes (tampa plástica sem PVC e tampão de algodão), que permitem a liberação do etileno.

Os frascos devem ser bem fechados para evitar o ressecamento, que poderá ocorrer devido à evaporação excessiva de água a partir do meio, além de proteger também contra a contaminação por agentes externos. Entretanto, as tampas devem permitir a troca gasosa com o ambiente externo, evitando que ocorra deficiência de O₂ e acúmulo de gases como CO₂ e etileno (Islam *et al.*, 2005). O tipo de fechamento dos frascos afeta a composição gasosa, podendo interferir no crescimento, alongamento e desenvolvimento dos explantes vegetais.

Uma outra alternativa para amenizar ou eliminar a ação do etileno, é o uso de substâncias químicas (inibidores do etileno) que atuam inibindo a biossíntese [aminoetóxi-vinil-glicina (AVG), ácido aminoacético (AOA) e o íon cobalto] ou a ação [íons prata, dióxido de carbono, *trans*ciclooctano e 1-aminociclopropano (MCP)] do etileno (Taiz & Zaiger, 2004).

É bem conhecido que o etileno induz a abscisão de folhas, frutos e flores em muitas espécies. A abscisão foliar tem se apresentado como um dos maiores problemas para a micropropagação de plantas lenhosas.

Além da abscisão foliar, as plântulas de angico cultivadas *in vitro*, apresentam entrenós bastante alongados e conseqüentemente, poucas gemas axilares, o que resulta em baixa produção de explante para a fase de multiplicação. O alongamento de entrenós é característica marcante da ação de giberelina e este quadro pode ser revertido com o uso de inibidores de crescimento.

Os inibidores de crescimento vegetais são combinações sintéticas, e tem sido aplicado em culturas para reduzir o crescimento longitudinal de brotos, sem diminuir a produtividade da planta. Dentre os inibidores da biossíntese da giberelina vem sendo utilizado nos cultivos *in vitro*, o paclobutrazol (PBZ), que atua sobre o retardamento do crescimento (Taiz & Zaiger, 2004).

Segundo Lorenzo *et al.* (1998) o paclobutrazol além de reduzir o alongamento dos brotos promove também aumento nas taxas de multiplicação no cultivo *in vitro*. Ziv (1995), ainda relata que há também redução da área foliar e aumento da resistência ao estresse em várias espécies de plantas micropropagadas, como crisântemo, rosa e videira.

O cultivo *in vitro* é também fortemente dependente da fonte de carbono, uma vez que, células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento.

Diante disso, é necessária a adição de carboidratos no meio de cultura, pois nos vegetais, estes desempenham várias funções essenciais, servindo como substrato para a respiração e como esqueletos de carbono para a formação de macromoléculas (Calamar *et al.*, 2002). A sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada devido à rapidez de sua absorção, estando presente em meios de cultura em concentrações que variam de 20 a 40 g.L⁻¹. O nível de sacarose é um fator muito importante no sucesso do desenvolvimento de muitas espécies (Ferreira *et al.*, 2002)

Um outro fator que tem sido largamente utilizado na cultura *in vitro* é o carvão ativado, o qual tem desempenhado papel importante na morfogênese das plantas. Em cultivos de *Pfaffia glomerata*, Nicoloso *et al.* (2001) verificaram que o uso de carvão ativado favoreceu o desenvolvimento das plântulas, embora a adição de carvão ativado ao meio de cultura nem sempre tem se mostrado vantajosa para todas as espécies vegetais.

De acordo com Mohamed-Yasseen (2001) o efeito estimulatório do carvão ativado sobre a morfogênese pode ser devido à absorção irreversível dos compostos inibitórios e metabólitos tóxicos (como os fenóis), escurecimento e aeração do meio de cultura e liberação de substâncias presentes naturalmente no carvão ativado. Além disso, este autor observou que o carvão ativado adsorve muitos reguladores de crescimento usados no meio de cultura.

Em cultura de *Garcinia mangostana*, apesar da presença do carvão ativado ter reduzido a proliferação de brotações, cerca de 75% das plantas produziram raízes no meio de enraizamento, apresentando um número alto de raízes, de 6 a 7 raízes por explante (Normah *et al.*, 1995).

A micropropagação de espécies lenhosas tem apresentado vários fatores que dificultam a sua propagação *in vitro*, tais como: contaminação, oxidação do meio de cultura, baixa taxa de enraizamento (Jordan, 1988) e multiplicação dos brotos, acúmulo de etileno causando a abscisão foliar (Rasai *et al.*, 1994; Zobayed *et al.*, 2002), alongamento excessivo dos entrenós, o que reduz o número de explantes para a fase de multiplicação. Com o intuito de superar esses problemas, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias que se adequem às particularidades de cada espécie.

Os objetivos do trabalho foram: a) estudar as respostas morfofisiológicas das plântulas de angico submetidas a várias condições de cultivo; b) controlar a abscisão foliar em

culturas de angico; c) avaliar o comportamento *in vitro* das plântulas ao serem submetidas em meio de cultura contendo o inibidor de crescimento, paclobutrazol, visando a micropropagação e a conservação da espécie.

2. Referências Bibliográficas

Altschul, S. von R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**. Massachusetts, n. CXCI: 1-65, 1964.

Barbosa, D. C. A. **Estudos ecofisiológicos em *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan. Aspectos da germinação e crescimento**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 146p. 1980.

Biddington, NL. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**. v. 11, p. 173-187, 1992.

Brasil. Congresso. Senado. Resolução nº 1.009, de 06 de dezembro de 1994. Diário Oficial de 04 de janeiro de 1995.

Cabral, G. B.; Pires, M. V. V.; Lacerda, A. L.; Carneiro, V. T. de C. Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria sp.* 2003. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/download.html>.

Calamar, A.; Klerk, G-J. Effect of sucrose adventitious root regeneration in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 70, p. 207-212, 2002.

Ferreira, M. das G. R.; Cárdenas, F. E. N.; Carvalho, C. H. S. de; Carneiro, A. A. e Damião-Filho, C. F. Respostas de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 24, p. 246-248, 2002.

Grattapaglia, D. & Machado, M. A. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. & Buso, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v. 1, 509p., 1998.

Islam, Md. T.; Dembele, D. P. & Keller, E. R. J. Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 81, p. 123-130, 2005.

Jackson, M. B. Aeration stress in plant tissue cultures. **Bulgarian Journal Plant Physiology**. Special Issue: 96-109, 2003.

Jordan, M. Multiple shoot formation and rhizogenesis from cherimola (*Annona cherimola* L.) hypocotyls and petiole explants. **Gartenbauwissenschaft**. v. 56, p. 224-227, 1988.

Kozai, T.; Fujiwara, K.; Hayashi, M.; Aitchen-Christie, J. The *in vitro* environmental and its control in micropropagation. In: Kurata, K.; Kozai, T. (Ed.). **Transplant production systems**. Dordrecht: Kluwer, p. 247-282, 1992.

Lorenzi, H. & Matos, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum, São Paulo, 512p., 2002.

Lorenzi, H. **Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. V. 1, 4ª ed., Nova Odessa, Instituto Plantarum, São Paulo, 368p., 2002.

Lorenzo, J. C.; González, 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**. v. 54, p. 197-200, 1998.

Mohamed-Yasseen, T. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. **In Vitro Cell Development Biology – Plant**. v. 37, p. 204-205, 2001.

Nicoloso, F. T.; Erig, A. C.; Martins, C. F.; Russowski, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Perdensen]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 3, p. 11-18, 2001.

Normah, M. N.; Nor-Azza, A. B.; Aliudin, R. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 43, p. 291-294, 1995.

Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadleček, P.; Haisel, D.; Plzánková, S. Acclimatization of micropropagated to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**. V. 42, p. 481-497, 1999.

Rasai, S.; Kantharajah, AS. & Dodd, WA. The effect of growth regulators, sucrose of explants and irradiance on *in vitro* regeneration of atemoya. **Australian Journal Botany**. v. 42, p. 333-340, 1994.

Taiz, L.; Zaiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.

Ziv, M. *In vitro* acclimatization. **In: Aitken-Christie, Kozai, J., Lila, T., Smith, MA. (eds.) Automation and environmental control in plant tissue culture**. Kluwer. Dordrecht, pp. 493-516, 1995.

Zobayed, S. M. A.; Armstrong, J. & Armstrong, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 69, p. 155-165, 2002.

Capítulo 1

**Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de
Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. *cebil* Altschul**

1. Resumo

O presente trabalho teve como objetivo promover o estabelecimento *in vitro* da espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* Altschul, avaliando a influência do tipo de fechamento dos tubos de ensaio, do carvão ativado e da sacarose no crescimento *in vitro* destas plântulas. As sementes permaneceram por 45 minutos em água corrente e em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas com imersão em álcool a 70% por 1 minuto, em seguida foi utilizado solução de hipoclorito de sódio - NaOCl (2,5%) com 2 gotas de detergente neutro (Ypê®) por 15 minutos e lavadas 4 vezes em água estéril. As sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo papel germtest, previamente esterilizados, umedecidos com água estéril. As placas ficaram no escuro por dois dias e em câmara de fluxo laminar, as plântulas foram transferidas para o tubo de ensaio contendo meio WPM (Lloyd & McCown, 1980). Foram avaliados três tipos de fechamento dos tubos de ensaio: filme de PVC, tampa plástica (sem filme de PVC) e tampão de algodão. Para avaliar a influência do carvão ativado e da sacarose, foram utilizados as seguintes concentrações de carvão ativado (0; 1 g.L⁻¹) e de sacarose (0; 10; 20; 30 g.L⁻¹). Ao final de 30 dias observaram-se efeitos altamente significativos dos tipos de fechamento sobre todas as variáveis analisadas: comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de pinas (NP), matéria seca da parte aérea (MSPA), abscisão foliar (AF), comprimento da raiz (CR), matéria seca da raiz (MSR) e número de raízes secundárias (NRS). Os maiores valores para CPA (112,01 mm) e CR (177,93 mm), MSPA (106,47 mg) e NRS (44,6) foram obtidos quando os tubos foram fechados com algodão. A abscisão foliar foi reduzida em 7,3 vezes quando se utilizou tampão de algodão em relação ao PVC. Observaram-se efeitos significativos da sacarose para todas variáveis analisadas, exceto para a variável AF. Os maiores valores para CPA (102,5 mm), NF (3,1), CR (194,7 mm) e NRS (47,88) foram obtidos na presença de 10 g.L⁻¹ de sacarose. E para as variáveis NP (23,5), MSPA (59,1 mg) quando se utilizou 20 g.L⁻¹ de sacarose e para MSR (33,37 mg) com 30 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura. O carvão ativado apresentou efeito significativo apenas para a variável NRS, e o maior valor (45,79) para esta variável foi na presença do carvão ativado (1 g.L⁻¹). O uso de tampa plástica ou tampão de algodão proporcionou incrementos significativos no crescimento das plântulas e no controle da abscisão foliar.

2. Abstract

This work aimed to promote in vitro establishment of the species *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* Altschul, evaluating the influence of the type of test tube cover, the activated charcoal and the sucrose in the in vitro growth of these seedlings. The seeds were kept for 45 minutes in running water and were disinfested in laminar flow chamber using alcohol at 70% for one minute. Then, a sodium hypochlorite solution was used - NaOCl (2,5%) with two detergent (Ypê ®) drops and washed in sterile water during four times. Afterwards, they were inoculated in Petri plates containing germtest paper, previously sterilized, imbibed with sterile water. The plates kept in the dark for two days, and then the seedlings (in laminar flow chamber) were transferred to the test tube containing WPM medium (Lloyd & McCown, 1980). Three types of test tube closings were evaluated - PVC film, plastic lid (without PVC film) and cotton lid. To evaluate the influence of the activated charcoal and sucrose, the following concentrations of activated charcoal (0; 1 g.L⁻¹) and sucrose (0; 10; 20; 30 g.L⁻¹) were used. After 30 days, highly significant effects were observed of the types of closure on all the variables analysed - aerial part length (APL), number of leaves (NL), number of pinnas (NP), dry matter of aerial part (DMAP), leaf abscission (LA), root length (RL), root dry matter (RDM) and number of secondary roots (NSR). The greatest values for the length of the aerial part (112,01 mm) and root (177,93 mm), dry matter of aerial part (106,47 mg) and number of secondary roots (44,6) were obtained when the tubes were closed with cotton. Leaf abscission was reduced in 7,3 times when cotton lid was used instead of PVC. Significant effects were observed of sucrose for all analysed variables, except for the leaf abscission variable. The greatest values for APL (102,5 mm), NP (3,1), RL (194,7 mm) and NRS (47,88) were obtained in the presence of 10 g.L⁻¹ of sucrose. And for the variables NP (23,5), DMAP (59,1 mg) when 20 g.L⁻¹ of sucrose was used, and for RDM (33,37 mg) with 30 g.L⁻¹ sucrose in culture medium. The activated charcoal showed significant effects only for the variable SRN and the greatest value (45,79) for this variable was in the presence of activated charcoal (1 g.L⁻¹). The use of plastic lid or cotton lid helped the seedlings growth significantly and contributed to control the leaf abscission.

3. Introdução

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul, pertence à família Leguminosae – Mimosoideae, possui porte arbóreo e é conhecida como angico. A propagação desta espécie, normalmente acontece através de sementes (Lorenzi & Matos, 2002), a taxa de germinação geralmente é alta (mais de 80%), principalmente se as sementes forem jovens (Lorenzi, 2002). No entanto, a multiplicação via semente, que é o processo mais empregado, tem como desvantagem contribuir para uma grande falta de uniformidade, segregação de caracteres, além do longo tempo para produção (Gonzalez *et al.*, 1994).

Alternativamente, a cultura de tecidos pode ser uma importante ferramenta para uma rápida e eficiente propagação de espécies, dentre elas o angico. A micropropagação vem sendo utilizada para a produção em larga escala comercial, com grandes vantagens, devido à obtenção de mudas uniformes e sadias em curto espaço de tempo. Contudo, a aplicação em larga escala da propagação *in vitro* ainda é limitada, para a maioria das espécies lenhosas com interesse econômico, apresentando sérios problemas, como a contaminação, oxidação do meio de cultura, baixa taxa de enraizamento (Jordan, 1988) e multiplicação dos brotos, acúmulo de etileno causando a abscisão foliar (Rasai *et al.*, 1994; Zobayed *et al.*, 2002).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998) vários fatores influenciam o sucesso da micropropagação, desde o genótipo e a atividade fisiológica da planta matriz, a manipulação até o transplântio da planta produzida. Esta manipulação envolve o manejo da planta matriz, as características do explante, as condições ambientais, além do microambiente dentro dos frascos de cultura. O microambiente, que parece ser bastante homogêneo tem se mostrado como responsável pela variabilidade no comportamento das culturas, que pode comprometer todo o sistema de micropropagação.

Um dos fatores que determinam o microambiente da cultura são as tampas dos recipientes. Os frascos devem ser bem fechados para evitar o ressecamento, que poderá ocorrer devido à evaporação excessiva de água a partir do meio, além de proteger também contra a contaminação por agentes externos. Entretanto, as tampas devem permitir a troca gasosa com o ambiente externo, evitando que ocorra deficiência de O₂ e acúmulo de gases como CO₂ e etileno (Islam *et al.*, 2005). O tipo de fechamento dos frascos afeta a composição gasosa, podendo interferir no crescimento, alongamento e desenvolvimento dos explantes vegetais (Jackson, 2003).

De acordo com Kim (2001), o crescimento e a fotossíntese de plântulas *in vitro* aumentaram quando ocorreram trocas gasosas entre o meio interno e externo a cultura. Em

culturas de *Annona*, Zobayed *et al.* (2002) e Santana (2003) relataram incrementos no crescimento com o aumento eficiente da ventilação dos tubos.

Informações sobre o acúmulo de compostos gasosos em culturas *in vitro*, tem tido como foco o etileno, o qual possui papel importante no crescimento e desenvolvimento *in vitro* (Biddington, 1992). É bem conhecido que o etileno induz a abscisão de folhas, frutos e flores em muitas espécies. A abscisão foliar tem se apresentado como um dos maiores problemas para a micropropagação. Em cultivos com *Annona*, Zobayed *et al.* (2002) relataram que as taxas de abscisão são relativamente altas quando estas são cultivadas em recipientes com restrição de trocas gasosas.

A utilização do fechamento convencional (filme de PVC) em cultivo *in vitro*, restringe as trocas gasosas e favorece a alta umidade dentro dos vasos, o que pode levar a desordens morfológicas e fisiológicas como a hiperidricidade, estômatos mal formados e com mau funcionamento (Kozai *et al.*, 1986). Contudo, o crescimento das plântulas em resposta as trocas gasosas na cultura de tecidos depende da espécie, do tipo de recipiente e também do meio de cultura.

O cultivo *in vitro* é também fortemente dependente da fonte de carbono, uma vez que as células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento. Diante disso, é necessária a adição de carboidratos no meio de cultura, pois estes fornecem energia metabólica e esqueletos de carbono para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (Caldas *et al.*, 1998). Segundo Santana (2003), entre as fontes de carbono, a sacarose é a mais utilizada em plantas cultivadas *in vitro* e é considerada a melhor fonte para o crescimento e diferenciação. De acordo com Ferreira *et al.* (2002), a sacarose é mais utilizada devido à rapidez de sua absorção. Os níveis de sacarose no substrato da cultura *in vitro* influenciam vários processos metabólicos nas culturas, apresentando efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos (Skrebsky *et al.*, 2004).

Um outro fator que pode ser benéfico às culturas *in vitro* é a adição do carvão ativado. Fisicamente ele simula a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor. Quimicamente, o carvão ativado tem efeito diluidor, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio, fixando citocininas residuais trazidas nos tecidos das plantas e absorvendo compostos tóxicos inibidores do enraizamento (Grattapaglia &

Machado, 1998) e tem sido relatado como uma condição indispensável na indução de processos de morfogênese em muitas espécies (Fridborg *et al.*, 1978).

O presente trabalho teve como objetivo estudar as respostas morfofisiológicas das plântulas de angico submetidas a várias condições de cultivo.

4. Material e Métodos

4.1 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.

4.2 Material vegetal, desinfestação e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, que estavam armazenadas no Banco de Sementes do Horto Florestal - UEFS, sob temperatura ambiente, onde encontravam-se mantidas em saco de pano. Os frutos maduros da espécie em estudo foram coletados na Fazenda Floresta, localizada no município de Tanquinho, Ba, nos meses de setembro/outubro de 2004.

Inicialmente as sementes de angico foram lavadas em água corrente. Em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas com imersão em álcool a 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio - NaOCl [água sanitária comercial (Qboa ®) - 2,5% de cloro ativo] com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 15 minutos e lavadas 4 vezes com água estéril. Em seguida foram inoculadas 10 sementes por placa de Petri contendo papel germtest, previamente esterilizados, umedecidos com água estéril e então vedadas com filme de PVC. O conjunto de placas de Petri ficou no escuro por dois dias, em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após 48 horas de semeadura, quando as sementes já haviam emitido a radícula (com aproximadamente 3 cm de comprimento), as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio, contendo 20 mL de meio sólido WPM (Lloyd & McCown, 1980), suplementado com

sacarose e solidificado com 0,7% de agar (Reagentes ®) e acrescido de 1 mL.L⁻¹ de fungicida (Derosal ® 500 sc). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se KOH ou HCl 0,1N), antes da autoclavagem à temperatura de 121° C por 15 minutos. Todo o processo de transferência das plântulas foi realizado em câmara de fluxo laminar.

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

4.3 Influência do tipo de fechamento dos tubos de ensaio

Neste experimento, as plântulas foram inoculadas em meio contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, e utilizou-se três tipos de fechamento dos tubos de ensaio: filme de PVC (selamento tradicional), tampa plástica sem PVC e tampão de algodão (selamentos alternativos).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por três tratamentos (fechamento dos tubos com filme de PVC, tampa plástica e tampão de algodão), com dez repetições, e cada repetição constou de quatro tubos.

4.4 Influência do carvão ativado e da sacarose

As plântulas foram transferidas para o tubo de ensaio contendo meio WPM, suplementado com diferentes concentrações de carvão ativado (0; 1 g.L⁻¹) e de sacarose (0; 10; 20; 30 g.L⁻¹). Nesse ensaio o tipo de fechamento utilizado foi o tampão de algodão, baseados nos resultados do experimento anterior.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com fatorial 2 x 4 (sendo que 2 representa as concentrações de carvão ativado e 4 as concentrações de sacarose), com dez repetições e quatro tubos por unidade experimental.

4.5 Variáveis analisadas

Aos trinta dias após inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: comprimento da parte aérea e da raiz (mm), sendo que para a realização da medida utilizou-se régua graduada em mm; número de folhas, número de pinas, abscisão foliar 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 e estes foram acondicionados em sacos de papel e mantidos na estufa com ventilação forçada, com temperatura mantida em 60° C, até que atingissem o peso constante.

4.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Tukey e através de Regressão, para os fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR, v 4.3, desenvolvido pela UFLA (Ferreira, 2003).

5. Resultados e Discussão

5.1 Influência do tipo de fechamento dos tubos de ensaio

Observou-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para os tipos de fechamento sobre todas as variáveis analisadas (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de pinas (NP), abscisão foliar (AF), matéria seca parte aérea (MSPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes secundárias (NRS) e matéria seca da raiz (MSR) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas à diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio após 30 dias de inoculação *in vitro*. Feira de Santana, 2006.

FV	GL	Quadrados Médios									
		CPA	NF ^z	NP	AF ^z	MSPA ^z	CR	NRS	MSR		
Fechamento	2	4817,52 ^{**}	0,6456 ^{**}	1075,33 ^{**}	1,908 ^{**}	24,2204 ^{**}	9800,56 ^{**}	2111,25 ^{**}	1158,23 ^{**}		
Resíduo	27	121,919	0,0671	0,450402	0,0377	2,039	880,3	49,12	53,66		
CV (%)		11,39	12,92	29,03	12,39	20,12	19,23	23,33	22,11		

^{**}Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

^z Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

As maiores médias para o número de folhas e número de pinas foram encontradas quando os tubos foram vedados com tampa plástica (sem filme de PVC), equivalendo a 2,25 folhas/plântula (Figura 1A) e a 2,8 vezes mais pinas/plântula do que aquelas mantidas em tubos com filme de PVC (Figura 1B). Estes resultados estão de acordo com Zobayed *et al.* (2000) que verificaram em culturas de segmentos nodais de *Eucalyptus camaldulensis* que o número de folhas foi superior (1,4 vezes) as culturas que estavam em recipientes com restrição de trocas gasosas.

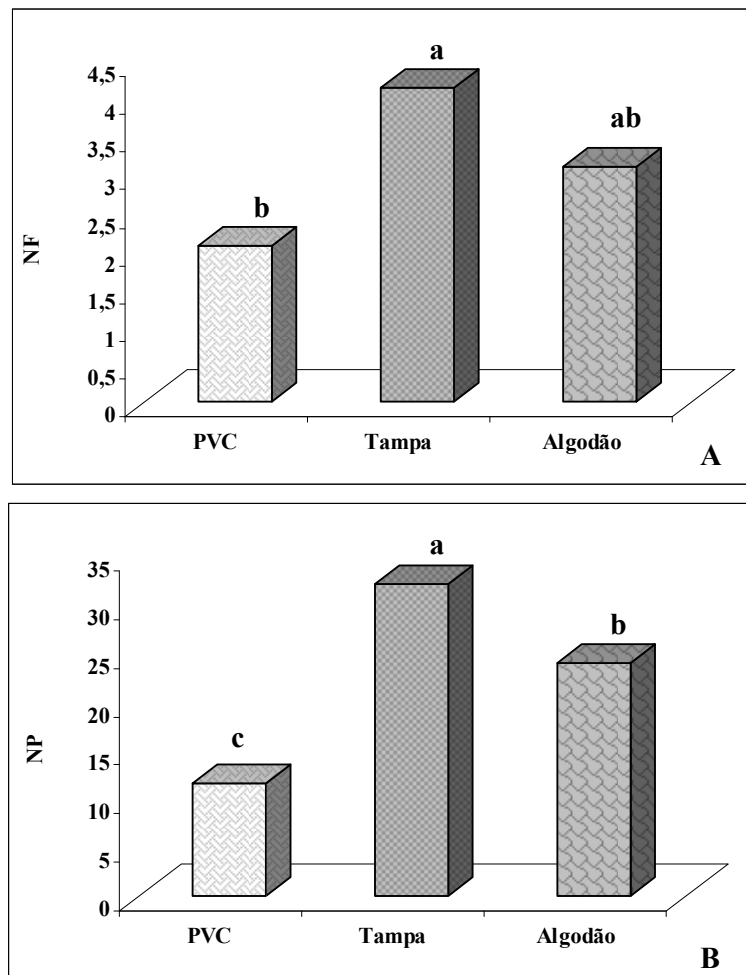


Figura 1: Médias do número de folhas (NF) (A) e número de pinas (NP) (B) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas à diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio em meio WPM. Médias seguidas pela mesma letra para cada tratamento (PVC, tampa plástica e tampão de algodão) não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2006.

O fechamento dos tubos com tampão de algodão mostrou-se bastante eficiente na redução da abscisão foliar, e quando comparados ao selamento com PVC, o decréscimo foi de 7,3 vezes (Figura 2A). Resultados semelhantes foram encontrados por Zobayed *et al.* (2002) em culturas de *Annona squamosa* e *A. muricata* quando verificaram decréscimo na abscisão foliar através do aumento eficiente da ventilação, demonstrando que a ventilação forçada foi completamente preventiva para a abscisão foliar quando comparada aos vasos herméticos. Em culturas de *A. glabra*, com o uso de tampão de algodão reduziu-se a abscisão foliar em 12 vezes, quando comparado ao selamento tradicional, sem o uso de químicos ou ventilação forçada (Santana, 2003).

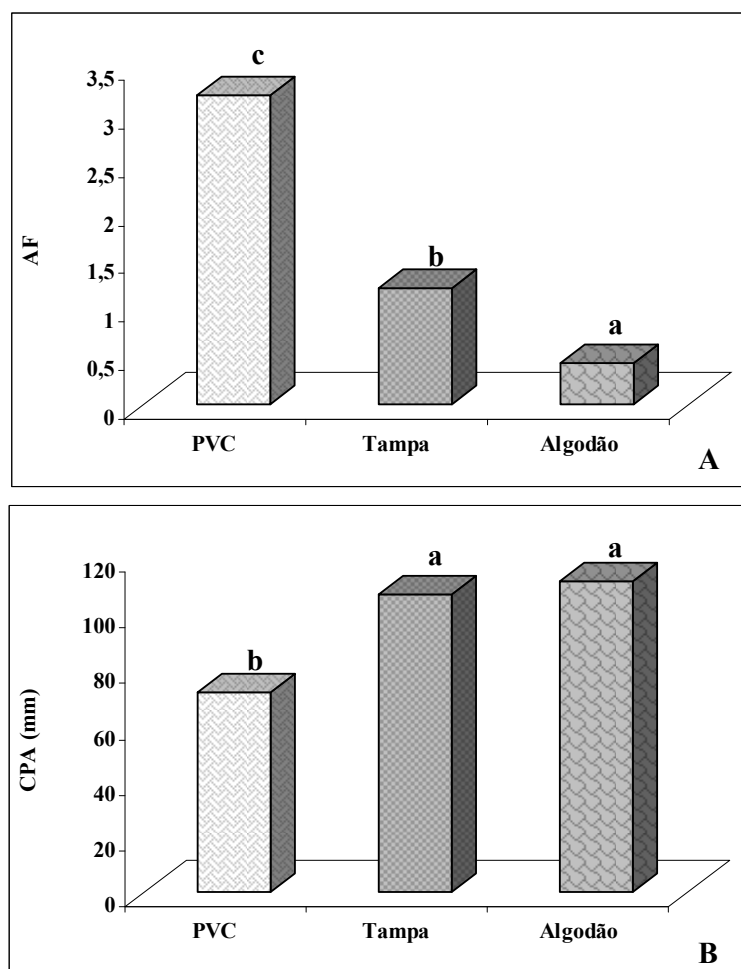


Figura 2: Médias da abscisão foliar (AF) (A) e comprimento da parte aérea (CPA) (B) de plântulas *A. colubrina* var. *cebil* submetidas à diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio em meio WPM. Médias seguidas pela mesma letra para cada tratamento (PVC, tampa plástica e tampão de algodão) não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2006.

A abscisão dos folíolos iniciou na segunda semana de cultivo nos tubos que estavam selados com filme de PVC, subsequente a abscisão dos folíolos, aconteceu à abscisão total das folhas, possivelmente devido à restrição nas trocas gasosas entre o ambiente interno e o externo da cultura, o que provavelmente, levou ao acúmulo de gases tóxicos no interior dos tubos.

A queda das folhas é um forte indicativo da presença de etileno, que segundo Grattapaglia & Machado (1998) o acúmulo deste regulador de crescimento pode interferir na morfogênese das culturas, acelerando a senescência das mesmas. Em cultivos de *Annona* realizados por Zobayed *et al.* (2002), a alta taxa de abscisão foliar nos tubos selados, sem ventilação ou com pouca ventilação, pode ser atribuída ao acúmulo de etileno e quando ventilados houve a redução em 100% da abscisão foliar nessas culturas. Uma vedação total dos frascos, além de causar o acúmulo de gases liberados pela cultura, leva à saturação de vapor de água que diminui o fluxo transpiratório nas culturas, podendo causar deficiências minerais de elementos como o cálcio, ocasionando necrose dos ápices (Grattapaglia & Machado, 1998).

Plântulas cultivadas em tubos fechados com algodão apresentaram incremento de 56% no comprimento da parte aérea quando comparadas a aquelas cultivadas em tubos com fechamento tradicional (PVC) (Figura 2B). As folhas apresentaram-se maiores e mais expandidas (dados não mostrados) quando vedadas com tampão de algodão em relação ao filme de PVC. Essa observação corrobora os resultados obtidos para outras culturas *in vitro* como *Solanum tuberosum* (Kubota & Kozai, 1992), *Rehmannia glutinosa* (Cui *et al.*, 2000), *Malus* 'Jork 9' (Li *et al.*, 2001). Entretanto, as respostas de crescimento para taxas de ventilação são diferentes de acordo com as espécies e meio de cultura como também a densidade de fluxo fotossintético, a umidade relativa e a concentração de sacarose do meio (Walker *et al.*, 1988; Kozai, 1991).

Cultivos em recipientes com fechamento que possibilite trocas gasosas reduzem o acúmulo de gases e aumenta o fluxo transpiratório, o que aumenta a probabilidade das plantas sobreviverem durante a fase de aclimatização uma vez que nessas condições as mesmas apresentam melhor controle da transpiração.

Observaram-se incrementos significativos na matéria seca da parte aérea (20%) e das raízes (97%) quando se utilizou o fechamento alternativo (Figura 3A, B). Estes resultados estão de acordo com Zobayed *et al.* (2000) em cultivos de *Eucalyptus camaldulensis*, que encontraram maior massa seca da parte aérea e das raízes quando os tubos foram aerados (com ventilação forçada), o que é um caráter desejável levando a uma melhor qualidade no

transplântio. O aumento nas trocas gasosas provavelmente afetou a concentração de CO₂ e etileno e a umidade relativa no interior dos tubos. A promoção do crescimento das plântulas observadas possivelmente pode estar associada a alguns destes fatores.

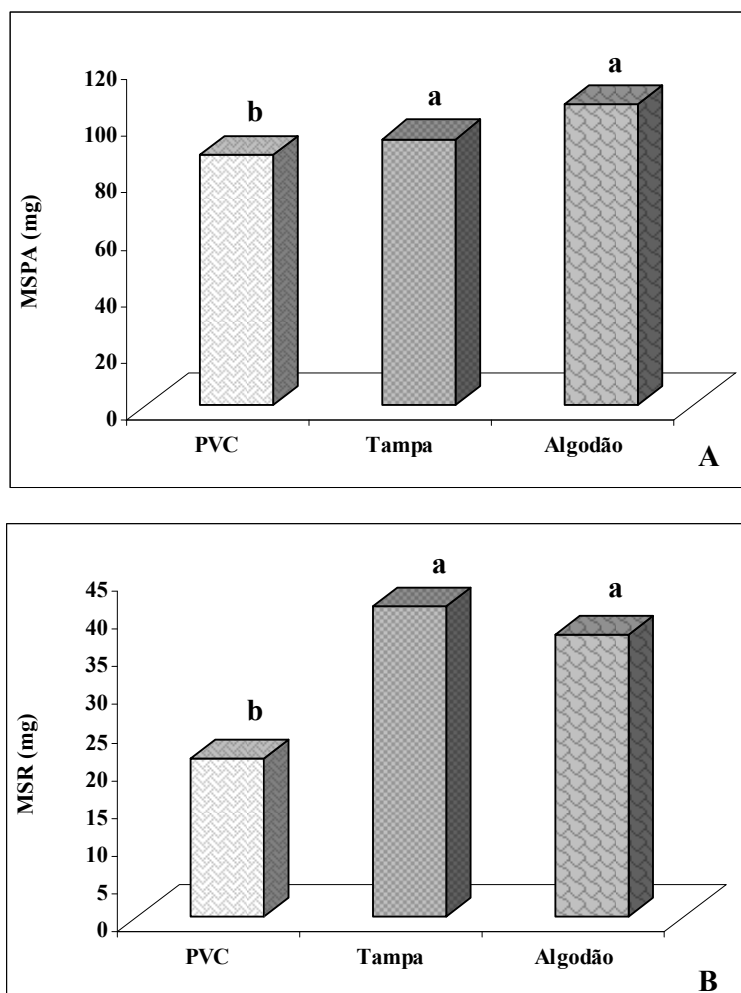


Figura 3: Médias da matéria seca da parte aérea (MSPA) (A) e matéria seca da raiz (MSR) (B) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas à diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio em meio WPM. Médias seguidas pela mesma letra para cada tratamento (PVC, tampa plástica e tampão de algodão) não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2006.

O sistema radicular formado nos tubos fechados com algodão apresentou diferenças significativas no comprimento da raiz e no número de raízes secundárias, observando-se

incrementos de 50% e 190%, respectivamente, (Figura 4A, B), corroborando Lucchesini & Mensuali-Sodi (2004) que verificaram maior promoção no enraizamento de brotações de *Phillyrea* quando se melhorou a aeração dos tubos, ocorrendo o mesmo para as culturas de oliva (Lucchesini & Vitagliano, 2002). Logo, o aumento no número de raízes secundárias realça o desenvolvimento da autotrofia, promovendo indiretamente o crescimento e a qualidade da raiz. Entretanto, os dados diferem de Souza *et al.* (1999) que não observaram diferença significativa entre os tipos de fechamento quanto ao número de raízes e obtiveram

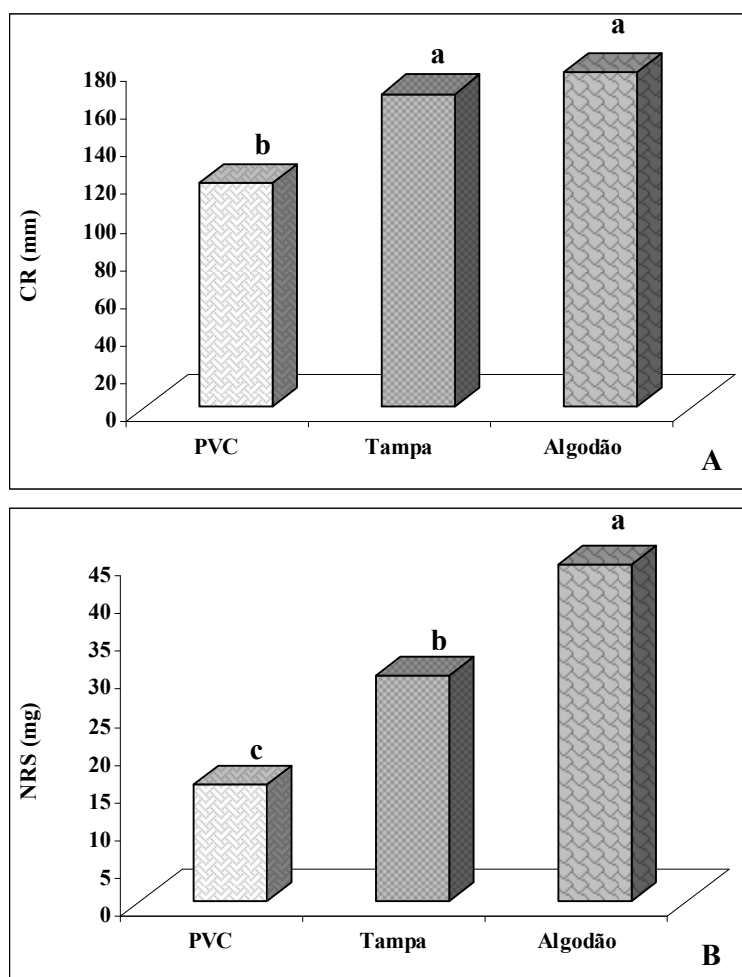


Figura 4: Médias do comprimento da raiz (CR) (A) e número de raízes secundárias (NRS) (B) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas à diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio em meio WPM. Médias seguidas pela mesma letra para cada tratamento (PVC, tampa plástica e tampão de algodão) não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2006.

comprimento médio das raízes produzidas no cultivo com tampas de metal e plásticas superior às raízes produzidas com o PVC em culturas de *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L., uma espécie olerícola.

Lucchesini & Mensuali-Sodi (2004) relataram que as brotações de *Phillyrea*, que foram enraizadas em vasos aerados desenvolveram maior biomassa e um aparelho extensivo de raiz quando mantidas em condições para a transferência *ex vitro*.

Embora o tampão de algodão, permita uma maior evaporação e redução do volume inicial do meio de cultura em aproximadamente 50%, isso não foi prejudicial ao desenvolvimento da raiz de angico, não causando toxidez às raízes para o seu desenvolvimento, durante o período de 30 dias. O mesmo não foi verificado por Souza *et al.* (1999), em que o desenvolvimento das raízes de *Brassica oleracea* foi prejudicado pela maior concentração de sais devido à evaporação de água do meio de cultura.

As plântulas de angico crescidas em tubos com o fechamento PVC apresentaram lenticelas no caule, provavelmente pela necessidade de aumentar a superfície de absorção para o oxigênio.

Considerando as variáveis avaliadas, as plântulas de angico crescidas em ambiente aerado (com tampa plástica ou tampão de algodão) tiveram crescimento mais vigoroso que aquelas cultivadas em ambiente fechado (PVC).

5.2 Influência do carvão ativado e da sacarose

O carvão ativado mostrou-se altamente significativo apenas para o número de raízes secundárias ($p < 0,01$). A interação carvão ativado x sacarose não foi significativa para as variáveis avaliadas ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2: Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de pinas (NP), abscisão foliar (AF), matéria seca parte aérea (MSPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes secundárias (NRS) e matéria seca da raiz (MSR) de plântula de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas à diferentes concentrações de carvão ativado e sacarose em meio WPM após 30 dias de inoculação *in vitro* Feira de Santana, 2006.

FV	GL	Quadrados							Médios		
		CPA	NF	NP	AF ^z	MSPA	CR	NRS ^z	MSR ^z		
Carvão ativado (C)	1	366,67 ^{ns}	0,0605 ^{ns}	8,211 ^{ns}	0,00593 ^{ns}	305,8 ^{ns}	0,31 ^{ns}	8,659 ^{**}	2,868 ^{ns}		
Sacarose (S)	3	1451,78 ^{**}	2,0817 ^{**}	183,535 ^{**}	0,00877 ^{ns}	883,6 ^{**}	14098,91 ^{**}	3,307 [*]	13,730 ^{**}		
C * S	3	34,26 ^{ns}	0,4167 ^{ns}	11,440 ^{ns}	0,01798 ^{ns}	10,5 ^{ns}	748,77 ^{ns}	0,201 ^{ns}	0,329 ^{ns}		
Resíduo	72	105,56	0,2730	18,012	0,01240	96,9	1440,19	0,974	0,842		
CV (%)		10,55	17,91	20,00	10,93	18,22	22,61	15,35	19,29		

^{**}Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

^{*} Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

^z Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

A sacarose e carvão ativado não apresentaram efeito significativo para a variável abscisão foliar (Tabela 2).

A análise de variância mostrou efeito altamente significativo da sacarose ($p < 0,01$), para comprimento da parte aérea, número de folhas, número de pinas, matéria seca da parte aérea, comprimento e matéria seca da raiz (Tabela 2).

Observou-se incremento no número de raízes secundárias em presença de carvão ativado (Tabela 3), enquanto a matéria seca e o comprimento da raiz não foram influenciados pela presença do carvão ativado. Segundo Nicoloso *et al.* (2001) a adição de carvão ativado ao meio de cultivo nem sempre tem se mostrado vantajosa. Em culturas de *Pfaffia glomerata*, estes autores relataram que a presença do carvão ativado (0,1 a 0,3%) teve respostas negativas em relação à matéria seca da parte aérea quanto para o desenvolvimento do sistema radicular, e sugeriram que a presença do carvão ativado adsorve consideravelmente os elementos químicos presentes no meio, diminuindo a disponibilidade dos mesmos. Em cultura de pereira a concentração de 1% de carvão ativado adicionado ao meio de cultura, não favoreceu o enraizamento o que foi associado à capacidade que o carvão ativado tem de reter substâncias (Erig *et al.*, 2004).

Tabela 3: Valores médios para número de raízes secundárias em plântulas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, em função de diferentes concentrações de carvão ativado. Feira de Santana, 2006.

Carvão Ativado (g.L ⁻¹)	Número de raízes secundárias
0,0	37,15 b
1,0	45,79 a

A análise de regressão mostrou tendência quadrática das concentrações de sacarose ($p < 0,01$) para as variáveis número de folhas, número de pinas, comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea (Figura 5).

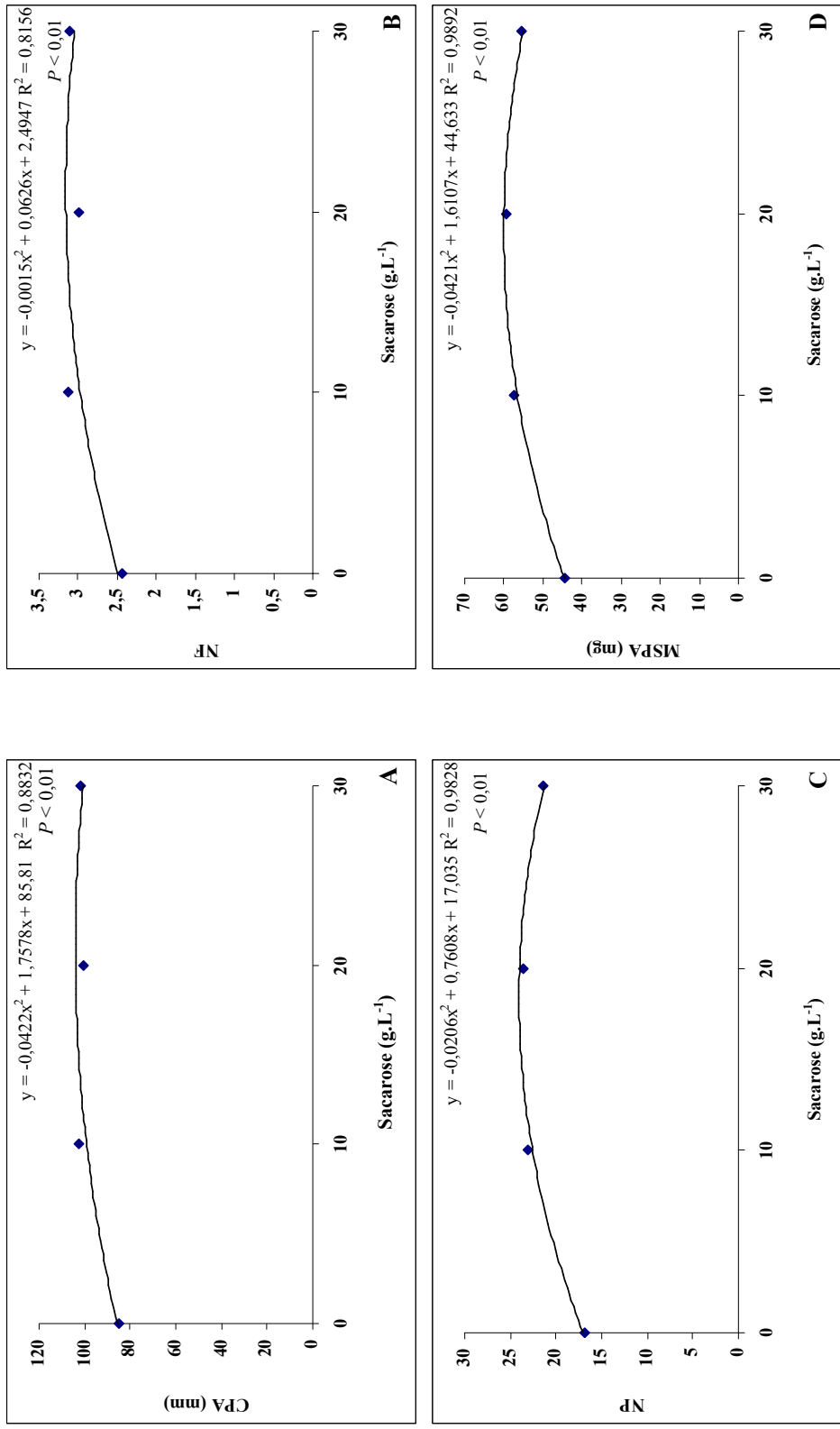


Figura 5. Valores médios para comprimento da parte aérea (CPA) (A), número de folhas (NF) (B), número de pinas (NP) (C) e matéria seca da parte aérea (MSPA) (D) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas a diferentes concentrações de sacarose em meio WPM. Feira de Santana, 2006.

As médias para comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento da raiz e número de raízes secundárias foram melhores quando se utilizou 10 g.L⁻¹ de sacarose, que apresentaram 102,5 mm; 3,1 por plântula; 194,7 mm e 6,8 por plântula, respectivamente (Figura 5A, B e Figura 6A, B). É provável que essas plântulas tenham sido favorecidas por esta concentração de sacarose, não necessitando de concentrações maiores para o crescimento porque devem ter utilizado as reservas que se encontram armazenadas nos cotilédones.

A maior média para número de pinas e matéria seca da parte aérea ocorreu quando se utilizou 20 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 5C, D). Esses resultados são interessantes, uma vez que indica que houve incorporação de carboidrato, aumentando assim, a energia disponível para as plântulas, além da melhor qualidade das mesmas, possibilitando a utilização deste material vegetal como fonte de explante para a etapa de multiplicação *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos em cultivos de *Pfaffia glomerata* por Skrebsky *et al.* (2004) quando utilizou concentrações mais altas de sacarose (67,2 g.L⁻¹). Faria *et al.* (2004) também verificou que concentrações mais altas de sacarose influenciaram no crescimento e no acúmulo de biomassa das plântulas de *Dendrobium* cultivadas *in vitro*.

Quanto à matéria seca da raiz, observou-se uma tendência linear crescente com as concentrações de sacarose ($p < 0,01$) que variaram de 3,89 mg, com a concentração zero, para 5,81 mg, na concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 6C). Esses resultados estão de acordo com obtidos por Skrebsky *et al.* (2004) no cultivo de *Pfaffia glomerata* em que a resposta para essa variável também se mostrou linear positiva. George (1996) verificou que o aumento da concentração de sacarose, de modo geral, estimula o crescimento e a formação de raízes de algumas espécies. Já em outros trabalhos, na fase de enraizamento, a redução da concentração de sacarose no meio de cultura vem sendo citada como benéfico na melhoria da qualidade do sistema radicular, bem como na sobrevivência das plântulas transplantadas.

Não houve modelo matemático que se ajustassem as concentrações de sacarose para as variáveis número de raízes secundárias e comprimento da raiz (Figura 6A, B).

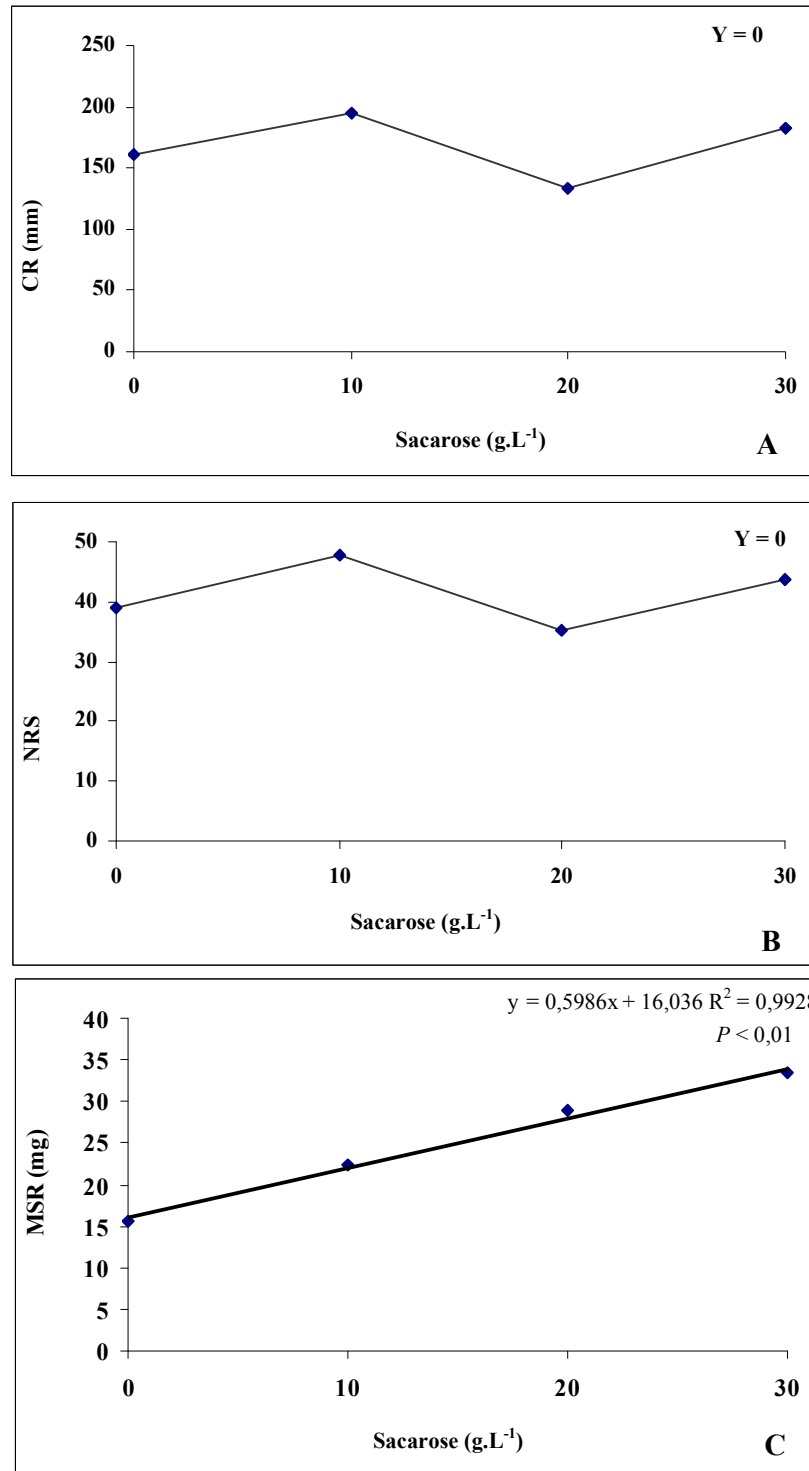


Figura 6: Valores médios para comprimento da raiz (A), número de raízes secundárias (B) e matéria seca das raízes (C) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas à diferentes concentrações de sacarose em meio WPM. Feira de Santana, 2006.

6. Conclusões

O tipo de fechamento dos tubos influenciou significativamente no crescimento das plântulas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*.

O uso de tampa plástica ou tampão de algodão proporcionou incrementos significativos no crescimento das plântulas e no controle da abscisão foliar.

A concentração de 10 g.L⁻¹ de sacarose foi mais eficiente para comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento da raiz e número de raízes secundárias. Enquanto que para número de pinas e matéria seca da parte aérea foi a 20 g.L⁻¹ de sacarose. E para matéria seca da raiz a melhor concentração foi 30 g.L⁻¹ de sacarose.

O carvão ativado foi eficiente apenas para a variável número de raízes secundárias.

7. Referências Bibliográficas

Cui, YC.; Hahn, EJ.; Kozai, T. & Paek, KY. Number of air exchangers, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 62, p. 219-226, 2000.

Caldas, L. S.; Haridasan, P.; Ferreira, M. E. Meios nutritivos. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, A. J. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v. 1, p. 87-132, 864p., 1998.

Faria, R. T. de; Rodrigues, F. N.; Oliveira, L. do V. R.; Muller, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 22, p. 780-783, 2004.

Erig, A. C.; Schuch, M. W e Braga, E. J. B. *In vitro* rooting of pear tree (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**. v.34, p. 275-277, 2004.

Ferreira, D. F. **Sisvar – Versão 4.3**. DEX/UFLA – Lavras, MG, 2003.

Ferreira, M. das G. R.; Cárdenas, F. E. N; Carvalho, C. H. S. de; Carneiro, A. A.; Damião Filho, C. F. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, SP, v. 24, p. 246-248, abril 2002.

Fridborg, G.; Pederson, M.; Landstrom, L. E.; Eriksson, T. The effects of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites, inhibition of morphogenesis. **Physiologia Plantarum**. Copenhagem, v. 43, p. 104-106, 1978.

George, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics. 1361p., 1996.

Gonzalez, M.G. N.; Pípolo, V. C.; Malaguido, A. B. Influência da consistência física do meio no enraizamento de estacas de aceroleira (*Malpighia emarginata*). In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, **Resumos**. Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. 80,1994.

Grattapaglia, D.; Machado, M. A. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. & Buso, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v. 1, 864p., 1998.

Islam, Md. T.; Dembele, D. P. & Keller, E. R. J. Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 81, p. 123-130, 2005.

Jackson, M. B. Aeration stress in plant tissue cultures. **Bulgarian Journal Plant Physiology**. Special Issue: 96-109, 2003.

Jordan, M. Multiple shoot formation and rhizogenesis from cherimola (*Annona cherimola* L.) hypocotyls and petiole explants. **Gartenbauwissenschaft**. v. 56, p. 224-227, 1988.

Kim, SJ. **Effects of environmental conditions on growth and quality of chrysanthemum plantlets in bioreactor culture**. MS Dissertation. Chungbuk National University, Cheongju, Korea, 2001.

Kozai, T.; Fujiwara, K.; Watanabe, I. Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (2) Effect of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels closed with stoppers. **J. Agr. Met.** v. 42, p. 119-127, 1986.

Kozai, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cell Development Biology - Plant**. v. 27, p. 47-51, 1991

Kubota, C. & Kozai, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**. v. 27, p. 1312-1314, 1992.

Li, RY.; Murthy, HN.; Kim, SK.; Paek, KY. CO₂ enrichment and photosynthetic photon flux affect the growth of *in vitro*-cultured apple plantlets. **Journal Plant Biology**. v. 44, p. 87-91, 2001.

Lloyd, G. & McCown, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* ssp. **HortScience**. Alexandria, v.15, p.415, 1980. (Abst. 321)

Lorenzi, H. & Matos, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum, São Paulo, 512p., 2002.

Lorenzi, H. **Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. V. 1, 4ª ed., Nova Odessa, Instituto Plantarum, São Paulo, 368p., 2002.

Lucchesini, M & Mensuali-Sodi, A. Influence of medium composition and vessel ventilation on *in vitro* of *Phillyrea latifolia* L. **Scientia Horticulturae**. v. 100, p. 117-125, 2004.

Lucchesini, M. & Vitagliano, C. In vitro micro-environments to improve growth of olive plantlets during the rooting phase. In: Vitagliano, C. & Martelli, G. P. (Eds.), Proceedings of the Fourth IS on Olive Growing. **Acta Horticulturae**. p. 865-898, 2002.

Nicoloso, F. T.; Erig, A. C.; Martins, C. F.; Russowski, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 3, p. 11-18, 2001.

Rasai, S.; Kantharajah, AS. & Dodd, WA. The effect of growth regulators, sucrose of explants and irradiance on *in vitro* regeneration of atemoya. **Australian Journal of Botany**. v. 42, p. 333-340, 1994.

Santana, J. R. F. de. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de Annonaceae**. 2003. 237p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Scragg, A. H. Secondary products from cultured cells and organs: II. Large scale culture. In: Dixon, R. A.; Gonzáles, R. A. **Plant Cell Culture: a practical approach**. 2ª ed. Oxford University Press, 1994.

Souza, C. M. de; Pinto, J. E. B. P.; Rodrigues, B. M.; Morais, A. R. de; Arrigoni-Blank, M. de F. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 23, p. 830-835, out./dez., 1999.

Skrebsky, E. C; Nicoloso, F. T; Ferrão, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**. v. 34, p. 1471-1477, 2004.

Walker, PN.; Heuser, CW. & Heinemann, PH. Micropropagation: studies of gaseous environments. **Acta Horticulturae**. v. 230, p. 145-152, 1988.

Zobayed, S. M. A.; Zobayed, F. A.; Kubota, C. & Kozai, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**. v. 85, p. 587-592, 2000.

Zobayed, S. M. A.; Armstrong, J. & Armstrong, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 69, p. 155-165, 2002.

Capítulo 2

**Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de
Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. *cebil* Altschul**

1. Resumo

O trabalho teve por objetivos controlar a abscisão foliar em culturas de angico e avaliar o comportamento *in vitro* das plântulas, ao serem submetidas em meio de cultura contendo o inibidor de crescimento, paclobutrazol. As sementes permaneceram por 45 minutos em água corrente e em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas com imersão em álcool a 70% por 1 minuto, em seguida foi utilizado solução de hipoclorito de sódio - NaOCl (2,5%) com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 15 minutos e lavadas 4 vezes em água estéril. As sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo papel germtest, previamente esterilizados e umedecidos com água estéril. As placas ficaram no escuro por dois dias e em câmara de fluxo laminar, as plântulas foram transferidas para o tubo de ensaio contendo meio WPM (Lloyd & McCown, 1980). No primeiro experimento, as plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* foram inoculadas em meio WPM suplementado com dois tipos de inibidores de etileno (nitrato de prata – AgNO₃ e cloreto de cobalto – CoCl₂) em diferentes concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 µM). No segundo, as plântulas *A. colubrina* var. *cebil* foram inoculadas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg.L⁻¹) de paclobutrazol. Após a inoculação, os tubos contendo as plântulas foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas, com radiação fotossintética ativa de 30 µmol.m⁻².s⁻¹. Com os resultados observados, verificou-se que houve aumento no número de folhas e redução da abscisão foliar com a utilização de 10 e 20 µM (respectivamente) independente do inibidor de etileno utilizado. Tanto o nitrato de prata quanto o cloreto de cobalto contribuíram com acréscimos no número de brotações e no número de gemas. O aumento na concentração de paclobutrazol reduziu o crescimento das plântulas, obtendo-se menores médias para as variáveis: comprimento da parte aérea, número de folhas, número de folhas senescentes e matéria seca da parte aérea na maior concentração (4,0 mg.L⁻¹) de paclobutrazol. Este inibidor de crescimento teve efeito também no sistema radicular, reduzindo o comprimento da raiz, número de raízes secundárias e promoveu o engrossamento das raízes.

2. Abstract

This work aimed to control foliar abscission in angico growth and evaluate the *in vitro* behaviour of seedlings as they were submitted to a medium containing a growth inhibitor, paclobutrazol. The seeds were kept for 45 minutes in running water and were desinfested (in laminar flow chamber) using alcohol at 70% for one minute. Then, a sodium hypochlorite solution - NaOCl (2,5%) was used with 2 detergent (Ypê ®) drops for 15 minutes and washed four times in sterile water. Afterwards, they were inoculated in Petri plates containing germtest paper, previously sterilized and imbibed in sterile water. The plates kept in the dark for two days, and then the seedlings (in laminar flow chamber) were transferred to the test tube containing WPM medium (Lloyd & McCown, 1980). In the first experiment, the seedlings of *A. colubrina* var *cebil* were inoculated in WPM medium supplemented with different concentrations of (0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 μM) and types (platinum nitrate - AgNO_3 and cobalt chloride - CoCl_2) of ethylene inhibitors. In the second one, the seedlings *A. colubrina* var. *cebil* were inoculated in WPM medium supplemented with different concentrations (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg.L^{-1}) of paclobutrazol. After being inoculated, the tubes containing the seedlings were kept in a growth room with $25\pm 2^\circ\text{C}$ temperature, for a light period of two hours, under active photosynthetic radiation of $30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The results showed that the number of leaves increased and the foliar abscission reduced with the use of 10 and 20 μM (respectively) independent of the ethylene inhibitor used. Both the platinum nitrate and the cobalt chloride helped to increase the number of buddings and shoots. The increasing in concentration of paclobutrazol reduced the growth of seedlings, so that lesser media were obtained for the variable - aerial part length, number of leaves, number of leaves senescence and dry matter of the aerial part in the greatest concentration (4,0 mg.L^{-1}) of paclobutrazol. This growth inhibitor had also effects on the radicular system, reducing root length, number of secondary roots and promoted root thickening.

3. Introdução

O angico é uma árvore resistente à seca, por apresentar um mecanismo fisiológico de adaptação, onde ocorre abscisão das folhas durante a estação sazonal mais seca. No cultivo *in vitro* algumas espécies lenhosas apresentam este fenômeno em resposta ao ambiente o qual lhe é submetido, e como consequência da abscisão foliar, o crescimento *in vitro* é reduzido e o explante torna-se fraco, impossibilitando a continuação do processo de micropropagação (Lemos & Blake, 1994). O ambiente fechado no qual as plântulas ou explantes são submetidos proporciona o acúmulo de etileno, regulador de crescimento responsável pela abscisão de folhas, frutos e flores. Este regulador em pequenas concentrações pode ser fisiologicamente ativo e desencadear todo o fenômeno de abscisão.

Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de amenizar ou eliminar a ação do etileno, seja bloqueando a sua biossíntese ou a ação deste 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 cofator 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 os íons prata (nitrato de prata e tiosulfato de prata), dióxido de carbono, *trans*ciclooctano, este compete pelo receptor de etileno e sendo então um forte inibidor. Um outro composto é o 1-aminociclopropano (MCP) que age ligando-se ao receptor de etileno de forma irreversível (Taiz & Zaiger, 2004).

Além da abscisão foliar, as plântulas de angico cultivadas *in vitro*, apresentam entrenós bastante alongados e, conseqüentemente, poucas gemas axilares, o que resulta em baixa produção de explante para a fase de multiplicação. O alongamento de entrenós é característica marcante da ação de giberelina e este quadro pode ser revertido com o uso de antagonista do ácido giberélico.

Os inibidores de crescimento vegetais são combinações sintéticas, e tem sido aplicado 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). Dentre os inibidores da biossíntese da giberelina tem-se o paclobutrazol (PBZ) ou β -

[4-(clorofenil)metil-1H-1,2,4-triazol-1-etanol], que é um derivado do triazol e a utilização deste retarda o crescimento das culturas. O paclobutrazol tem sido utilizado na conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi (Canto *et al.*, 2004).

Segundo Lorenzo *et al.* (1998) o paclobutrazol além de reduzir o alongamento dos brotos promove também aumento nas taxas de multiplicação no cultivo *in vitro*. Ziv (1995) ainda relata que há também redução da área foliar e aumento da 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, como por exemplo, o ancimidol, flurprimidol, paclobutrazol podem ser utilizados para reduzir a hiperidricidade de plantas micropropagadas, o que resulta em melhora na taxa de sobrevivência depois do transplântio (Smith *et al.*, 1990b).

Embora o uso de retardantes de crescimento em plantas tem-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 anigo utilizando nitrato de prata e cloreto de cobalto; avaliar o comportamento *in vitro* das plântulas ao serem submetidas em meio de cultura contendo o inibidor de crescimento, paclobutrazol.

4. Material e Métodos

4.1 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.

4.2 Material vegetal, desinfestação e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, as quais estavam armazenadas no Banco de Sementes do Horto Florestal - UEFS, sob temperatura ambiente, onde encontravam-se mantidas em saco de pano. Os frutos maduros da espécie em estudo foram coletados na Fazenda Floresta, localizada no município de Tanquinho, BA, nos meses de setembro/outubro de 2004.

Inicialmente as sementes de angico foram lavadas em água corrente. Em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas com imersão em álcool a 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio - NaOCl [água sanitária comercial (Qboa ®) - 2,5% de cloro ativo] com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 15 minutos e lavadas 4 vezes com água estéril. Em seguida foram inoculadas 10 sementes por placa de Petri contendo papel germtest, previamente esterilizados, umedecidos com água estéril e então vedadas com filme de PVC. O conjunto de placas de Petri ficou no escuro por dois dias, em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após 48 horas de semeadura, quando as sementes já haviam emitido a radícula (com aproximadamente 3 cm de comprimento), as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio, contendo 20 mL de meio sólido WPM (Lloyd & McCown, 1980), suplementado com 3% de sacarose e solidificado com 0,7% de agar (marca Reagentes) e acrescido de 1 mL.L^{-1} de fungicida (Derosal ® 500 sc). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se KOH ou HCl 0,1N), antes da autoclavagem à temperatura de 121°C por 15 minutos. Todo o processo de transferência das plântulas foi realizado em câmara de fluxo laminar.

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

4.3 Controle da abscisão foliar *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Foram adicionados ao meio de cultura o cloreto de cobalto (CoCl_2), um inibidor da biossíntese do etileno, e o nitrato de prata (AgNO_3), inibidor da ação do etileno. Utilizou-se as seguintes concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 μM). Os tubos foram fechados com filme de PVC. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2×5

(sendo que 2 representa os tipos de inibidores do etileno e 5 as concentrações dos inibidores), com dez repetições e cada repetição constou de seis tubos.

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

4.4 Efeito do inibidor de crescimento paclobutrazol (PBZ) na morfogênese de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Foram adicionadas ao meio de cultura cinco concentrações de paclobutrazol (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg.L⁻¹). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, composto por dez repetições, e cada repetição constou de cinco tubos.

Aos quarenta e cinco dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: comprimento da parte aérea e da raiz (mm), para a realização da medida utilizou-se 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 e estes foram acondicionados em sacos de papel e mantidos na estufa com ventilação forçada, com temperatura mantida em 60° C, até que atingissem o peso constante.

4.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante as análises de variância e regressão. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR, v 4.3, desenvolvido pela UFLA (Ferreira, 2003).

5. Resultados e Discussão

5.1 Controle da abscisão foliar *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Observou-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) das concentrações dos inibidores de etileno (CoCl_2 e AgNO_3) sobre todas as variáveis analisadas, exceto para o comprimento da parte aérea. Obteve-se também efeito significativo ($p < 0,01$) da interação “inibidores x concentrações” para as variáveis número de brotações e número de gemas (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de pinas (NP), abscisão foliar (AF), número de brotações (NB) e número de gemas (NG) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas à diferentes inibidores de etileno após 30 dias da inoculação *in vitro*. Feira de Santana, 2006.

FV	GL	Quadrados Médios					
		CPA	NF ^Z	NP ^Z	AF ^Z	NB ^Z	NG
Inibidores de etileno (I)	1	621,65 ^{ns}	0,189 ^{ns}	0,008 ^{ns}	0,025 ^{ns}	0,0005 ^{ns}	0,71 ^{ns}
Concentrações (C)	4	1455,49 ^{ns}	1,215**	8,635**	1,975**	0,5360**	124,14**
I * C	4	350,85 ^{ns}	0,308 ^{ns}	1,342 ^{ns}	0,023 ^{ns}	0,4480**	25,47**
Resíduo	90	760,90	0,138	0,978	0,070	0,1070	6,31
CV (%)		34,60	17,84	21,84	17,76	19,87	36,03

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

^ZDados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

A análise de regressão mostra efeito quadrático das concentrações dos inibidores de etileno para as variáveis número de folhas e abscisão foliar. As maiores médias para o número de folhas (3,13 folhas/plântula) foram encontradas quando se utilizou 10 μM independente do tipo de inibidor de etileno utilizado, observando-se um aumento em 29% no número de folhas quando comparado com o controle (Figura 1A). Houve redução da abscisão foliar com a adição dos inibidores de etileno, embora a maior porcentagem (36%) foi encontrada com a concentração de 20 μM independente do tipo de inibidor utilizado quando se comparou com o controle (Figura 1B). Tanto o cloreto de cobalto quanto o nitrato de prata mostraram-se eficientes na redução da abscisão foliar. Isto 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 e enquanto que o íon prata age inibindo a ação do etileno, onde a prata é muito específica, pois a inibição que este íon causa, não pode ser induzida por nenhum outro íon metálico (Taiz & Zeiger, 2004).

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

Pôde-se observar que a partir da concentração de 40 μM independente do inibidor, a abscisão foliar volta a aumentar (Figura 1B). De acordo com Santos *et al.* (1997), isto ocorre devido à ascensão dos níveis de etileno em resposta para várias espécies. Como o íon prata é um metal pesado e pode ser fitotóxico, é possível que tenha desencadeado estresse químico e como resposta teve-se a produção de etileno (Chi *et al.*, 1991).

Para a variável comprimento da parte aérea não houve diferença significativa entre os tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados por Reis *et al.* (2003) onde o alongamento das brotações não diferiu significativamente. Estes resultados indicam que tais compostos reduzem, mas não eliminam a produção e/ou ação do etileno, já que este afeta o crescimento *in vitro* de algumas espécies, dentre elas o angico.

Observou-se o modelo matemático linear para a variável número de pinas, sendo que o maior número de pinas foi encontrado com a maior concentração do inibidor de etileno (40 μM), correspondendo a 5,13 pinas/plântula, enquanto que, no meio de cultura sem adição dos inibidores apresentou-se com apenas 3,5 pinas/plântula (Figura 1C).

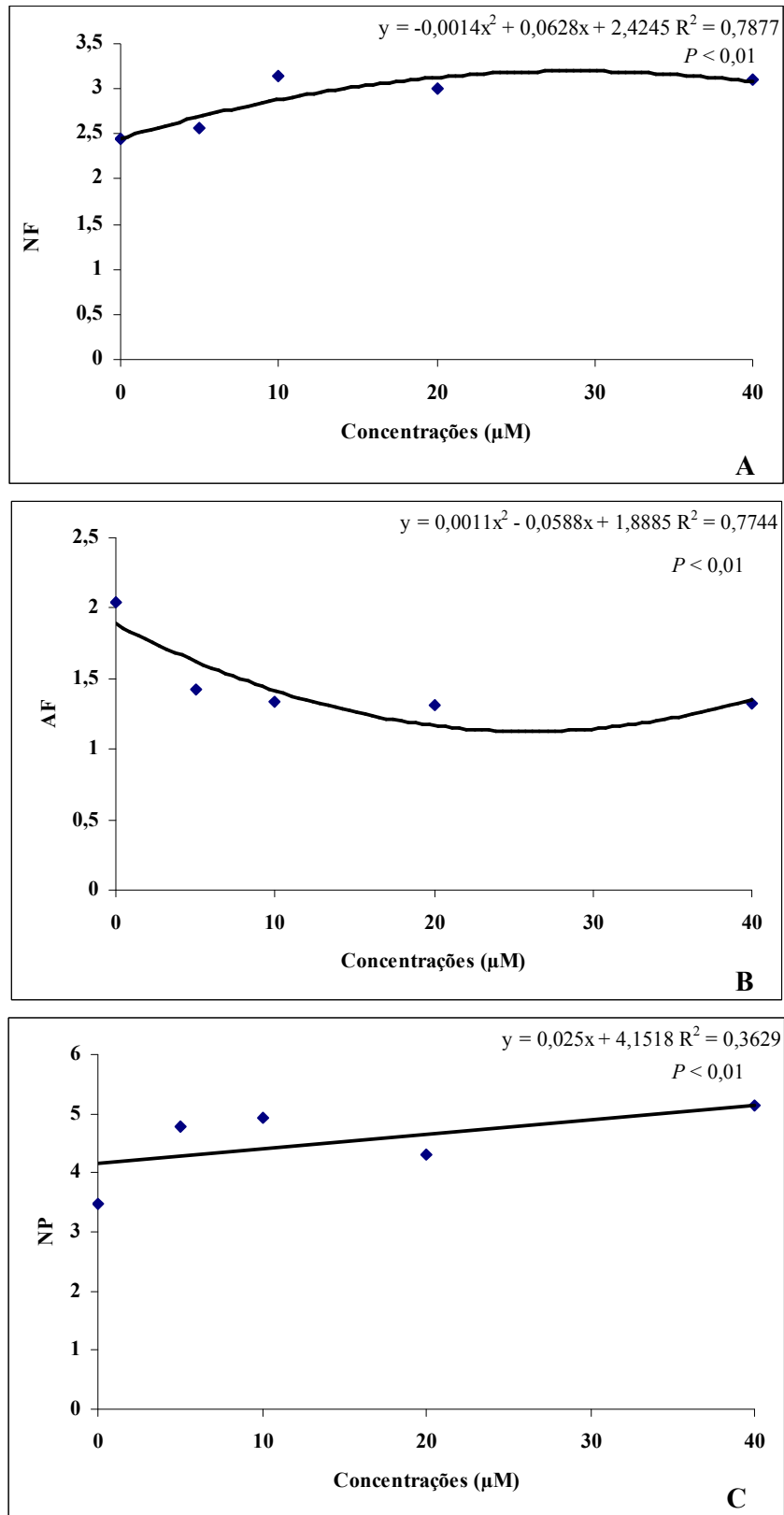


Figura 1: Médias do número de folhas (NF) (A), abscisão foliar (AF) (B) e número de pinas (NP) (C) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas a diferentes concentrações de inibidores de etileno (AgNO_3 e CoCl_2) em meio WPM. Feira de Santana, 2006.

Observou-se efeito significativo da interação “inibidores e concentração” para a variável número de brotações, onde se obteve maior número de brotações quando utilizou 5,0 μM tanto para nitrato de prata (2,08 brotações por explante) quanto para cloreto de cobalto (1,59 brotações por explante). Quando se utilizou a concentração de 10 μM dos inibidores observou-se também diferença significativa, entre o cloreto de cobalto (1,86 brotações por explante) e o nitrato de prata (1,56 brotações por explante) (Tabela 2). Segundo Reis *et al.* (2003) os inibidores tanto da ação quanto da biossíntese do etileno estimularam o desenvolvimento das brotações e aumentaram o número de brotos por explante, além de aumentar a área foliar de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* quando comparados ao meio de cultura sem a adição dos inibidores. No cultivo *in vitro* de *Cucumis sativus* foi observado por Mohiuddim *et al.* (1997) que em concentrações de 10 a 50 μM de nitrato de prata estimulou a indução de brotações, além de aumentar o número de brotos por explante, sendo que a concentração de 30 μM produziu a maior porcentagem de brotações.

Tabela 2: Número de brotações de *A. colubrina* var. *cebil* em função dos inibidores de etileno. Feira de Santana, 2006.

Concentrações (μM)	Inibidores de etileno	
	Nitrato de prata (AgNO_3)	Cloreto de cobalto (CoCl_2)
0,0	1,41 a ^y	1,41 a
5,0	2,08 a	1,59 b
10,0	1,56 b	1,86 a
20,0	1,53 a	1,59 a
40,0	1,65 a	1,79 a

^y Médias seguidas pela mesma letra, em cada linha, para cada inibidor de etileno, não diferem entre si pelo teste de Tukey. $P < 0,05$.

Observou-se também, efeito significativo da interação “inibidores e concentração” para a variável número de gemas. O maior número médio (11,25 gemas/explante) foi obtido quando se utilizou de 5,0 μM de nitrato de prata (Tabela 3).

Tabela 3: Número de gemas de *A. colubrina* var. *cebil* em função dos inibidores de etileno. Feira de Santana, 2006.

Concentrações (μM)	Inibidores de etileno	
	Nitrato de prata (AgNO_3)	Cloreto de cobalto (CoCl_2)
0,0	3,30 a ^y	3,30 a
5,0	11,25 a	7,57 b
10,0	6,22 b	8,70 a
20,0	6,00 a	5,55 a
40,0	8,50 a	9,30 a

^y Médias seguidas pela mesma letra, em cada linha, para cada inibidor de etileno, não diferem entre si pelo teste de Tukey. $P < 0,05$.

Os resultados indicam a hipersensibilidade dos tecidos de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* para o etileno, onde este induz a abscisão foliar, o que poderá limitar as etapas seguintes do processo de micropropagação para esta espécie. Em contrapartida os inibidores de etileno sejam da ação ou da biossíntese mostraram-se benéficos para a morfogênese dessa espécie, possibilitando o aumento no número de brotações e no número de gemas. A utilização desses inibidores em especial o nitrato de prata o qual promoveu maior número de brotações e de gemas poderá ser usado como o primeiro passo para a etapa de multiplicação no processo de micropropagação desta espécie.

Sisler & Yang (1984) propuseram que o íon prata interfere com o complexo receptor de etileno uma ligação essencial do receptor, resultando ou na inativação biológica do complexo ou no receptor que perde a capacidade para ligar-se ao etileno.

Os resultados encontrados discordam daqueles encontrados por Pereira-Neto (2001) que ao utilizar concentrações inferiores a 12,5 μM de cloreto de cobalto não estimulou a formação de brotações ou a taxa de multiplicação das brotações, sugerindo que o íon cobalto é ineficaz para inibir a produção de etileno em cultura de *Hancornia speciosa*, e

consequentemente não promoveu a estimulação de brotações. Segundo este autor a baixa mobilidade do íon cobalto em tecidos vegetais pode interferir com o transporte a partir do meio de cultura para os sítios de produção de etileno.

5.2 Efeito do inibidor de crescimento paclobutrazol (PBZ) na morfogênese de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Observou-se efeitos altamente significativos ($p < 0,01$) das concentrações de paclobutrazol sobre as variáveis comprimento da parte aérea, número de folhas, número de folhas senescentes, matéria seca da parte aérea, comprimento da raiz, número de raízes secundárias e efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre a variável matéria seca da raiz (Tabela 4).

Observou-se que as plântulas apresentaram menor crescimento com o aumento das concentrações de paclobutrazol.

A análise de regressão mostra um comportamento quadrático das concentrações de paclobutrazol para as 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 ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), observando uma redução de 290% em relação ao meio de cultura sem a adição de paclobutrazol (Figura 3 A,B). Resultados semelhantes foram encontrados por Ritchie *et al.* (1991) em culturas de crisântemo e beterraba, onde os autores verificaram uma redução de 230% no comprimento quando foi utilizado a concentração de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de paclobutrazol.

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, mobilização de açúcares, além do alongamento celular (Taiz & Zaiger, 2004).

O angico apresenta rápido crescimento *in vitro*, promovido pelo alongamento dos entrenós em função da giberelina endógena, a qual promove o crescimento da plântula, sem que haja aumento no número de entrenós. O paclobutrazol bloqueia reações de oxidação na passagem do *ent*-caureno para o ácido *ent*-caurenóico, agindo antes da formação do GA₁₂ – aldeído, que é a primeira giberelina da rota e precursora de todas as outras (Taiz & Zaiger, 2004).

Tabela 4: Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de folhas senescentes (NFS), matéria seca parte aérea (MSPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes secundárias (NRS) e matéria seca da raiz (MSR) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas à diferentes concentrações de paclotrazol (PBZ) após 30 dias de inoculação *in vitro*. Feira de Santana, 2006.

FV	GL	Quadrados							Médios		
		CPA	NF	NFS ^z	MSPA	CR	NRS	MSR			
PBZ	4	9621,06**	3,002**	0,165**	1460,48**	26358,08**	1633,8**	1073,98*			
Resíduo	45	81,03	0,331	0,036	120,03	740,78	25,0	325,43			
CV (%)		18,00	24,05	16,16	13,2	28,26	30,57	36,35			

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

^z Dados transformados: em $(x + 1)^{0,5}$.

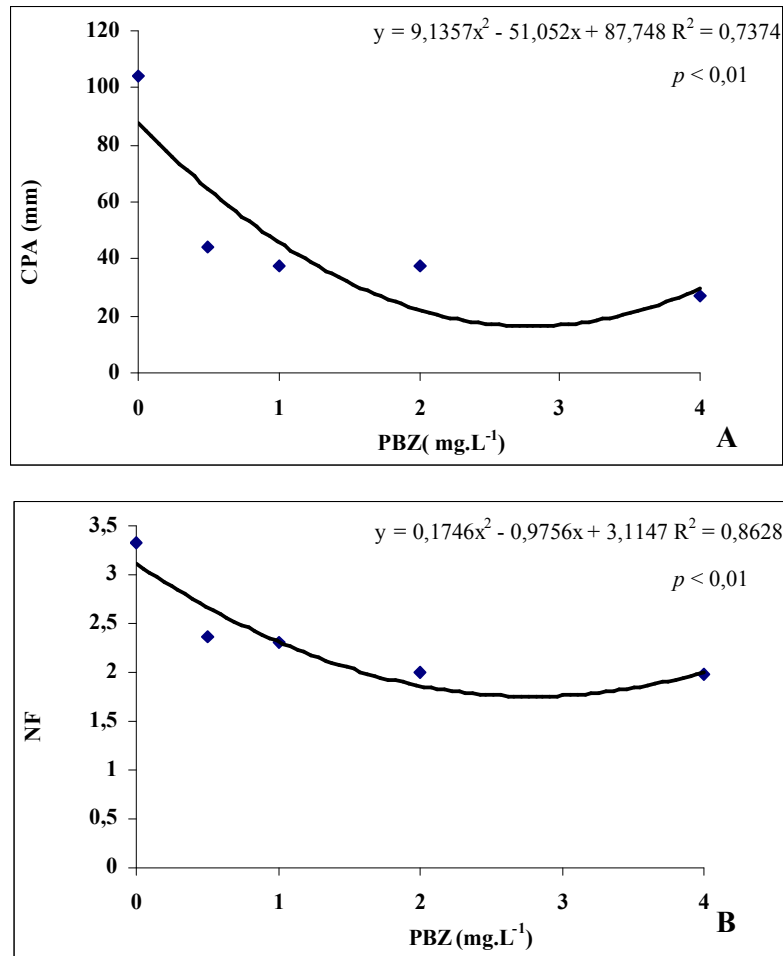


Figura 3: Médias do comprimento da parte aérea (CPA) (A) e número de folhas (NF) (B) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol em meio WPM. Feira de Santana, 2006.

O inibidor de crescimento utilizado também reduziu significativamente ($p < 0,01$) as variáveis número de folhas senescentes e matéria seca da parte aérea. Observou-se modelo matemático linear decrescente para essas duas variáveis (Figura 4 A,B). O maior número de folhas senescentes ocorreu na ausência do paclobutrazol e o menor número foi encontrado com a maior (4,0 mg.L⁻¹) concentração deste composto. Resultados semelhantes foram verificados por Ritchie *et al.* (1991) em cultura de crisântemo, em que utilizando concentrações mais alta 3,0 mg.L⁻¹ de paclobutrazol, à matéria seca da parte aérea foi reduzida em 49%. Segundo Rademacher (2000) os compostos que atuam inibindo o crescimento vegetal, induzem o aumento do conteúdo de citocininas, e os níveis de etileno são

diminuídos, tendo como consequência retardo na senescência. Este autor ainda relata que retardantes de crescimento como o paclobutrazol pode influenciar na redução do etileno bloqueando o ácido aminociclopropanocarboxílico (ACC oxidase).

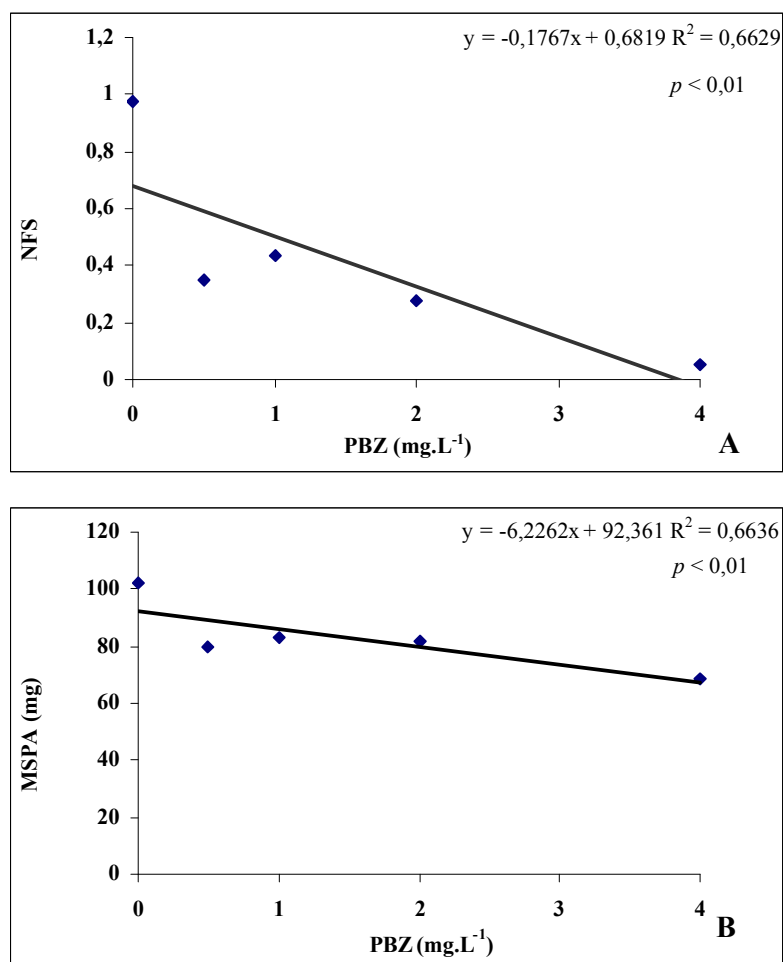


Figura 4: Médias do número de folhas senescentes (NFS) (A) e matéria seca da parte aérea (MSPA) (B) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol em meio WPM. Feira de Santana, 2006.

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 para comprimento da raiz foi obtido no meio sem a adição do paclobutrazol e o menor foi obtido com 0,5 mg.L⁻¹ de paclobutrazol, com uma diferença de 185% em relação ao meio sem adição

do paclobutrazol (Figura 5A). Observou-se comportamento quadrático para as variáveis comprimento da raiz e número de raízes secundárias, sendo que houve uma diferença de 451% na redução do número de raízes secundárias na presença de 2,0 mg.L⁻¹ de paclobutrazol quando comparado ao meio sem este composto (Figura 5B). Estes resultados corroboram aquelas respostas encontradas por Konstas & Kintzios (2003) em cultura de *Cucumis sativus*, quando utilizou um outro retardante de crescimento, flurprimidol, o qual age inibindo a biossíntese da giberelina, no mesmo local da rota de biossíntese desse hormônio em que o paclobutrazol atua, encontrou decréscimo no número de raízes.

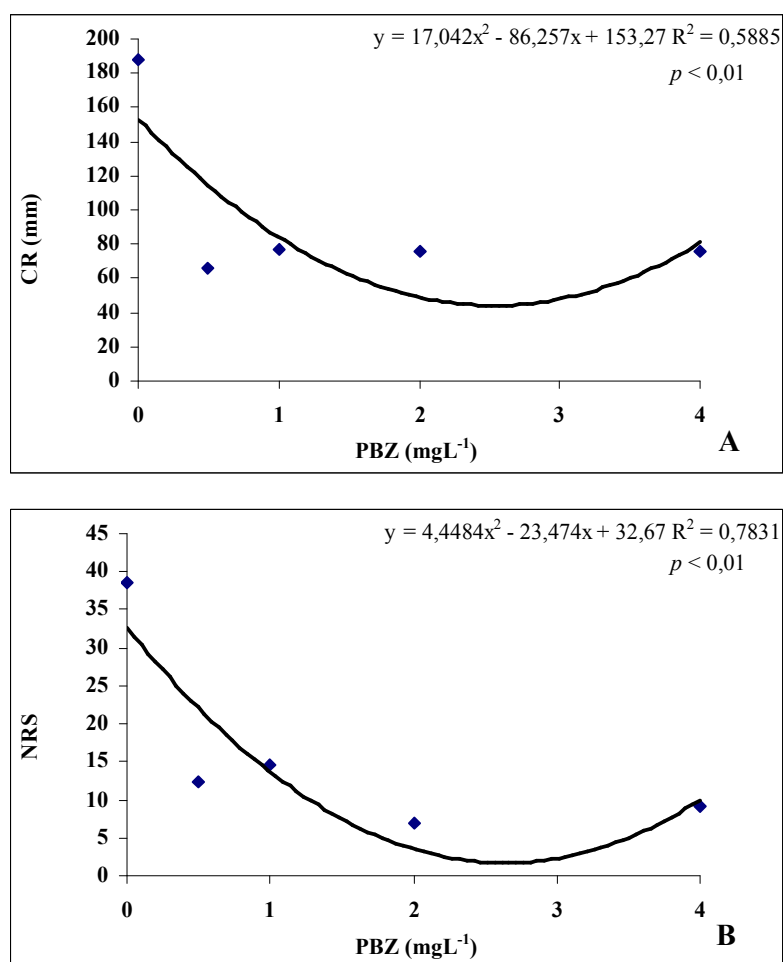


Figura 5: Médias do comprimento da raiz (CR) (A) e número de raízes secundárias (NRS) (B) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol em meio WPM. Feira de Santana, 2006.

A equação matemática que melhor se ajustou para a variável matéria seca da raiz foi a linear. O maior valor para matéria seca foi obtido na presença de 0,5 mg.L⁻¹, entretanto

quando se utilizou a concentração mais alta (4,0 mg.L⁻¹) foi observado uma redução da matéria seca (Figura 6A). Estes resultados mostram que o paclobutrazol em baixas concentrações contribui para a incorporação de carbono, uma vez que na ausência deste retardante de crescimento apresentou menor valor para matéria seca. Konstas & Kintzios (2003) utilizando o flurprimidol também verificou acúmulo de carboidratos em cultivo de *Cucumis sativus*.

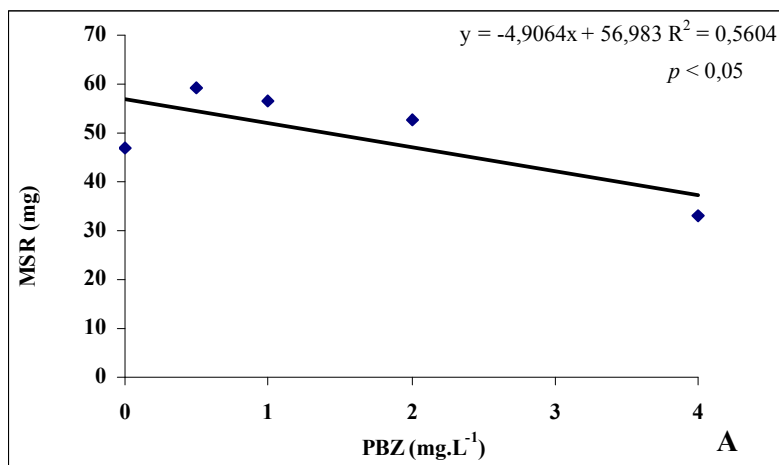


Figura 6: Médias da matéria seca da raiz (MSR) (A) de plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol em meio WPM. Feira de Santana, 2006.

Contudo, nos meios contendo paclobutrazol, observou-se engrossamento das raízes (Figura 7). Smith *et al.* (1990a) em cultivo *in vitro* de crisântemo e videira (Smith *et al.*, 1992) também observaram aumento no diâmetro das raízes e Roberts (1992) afirma que as raízes em presença de retardantes de crescimento podem engrossar. Este aspecto de engrossamento das raízes pode ser benéfico na etapa de aclimatização, pois raízes mais vigorosas tendem a facilitar um maior pegamento das mudas. As raízes possuem um padrão de crescimento que é determinado ainda no estágio embrionário, 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 pela divisão celular e alongamento das células, proporcionando então o crescimento do órgão, e com o uso do paclobutrazol inibindo a biossíntese de giberelina, embora ocorra à divisão celular as novas células não

alongam e como consequência tem-se o crescimento reduzido, sendo assim é provável que as raízes tenham aumentado de diâmetro devido a ocorrência de divisões celulares radiais.

O enraizamento foi também promovido pelo paclobutrazol em *Plectranthus australis* e *Phaseolus vulgaris* crescidos *in vivo* (Davis *et al.*, 1985) e por outros retardantes de crescimento, ancimidol, em *Asparagus officinalis* L. cultivados *in vitro* (Chin, 1982).



Figura 7: Aspectos morfológicos externos das raízes em plântulas de *A. colubrina* var. *cebil* cultivadas em meio de cultura contendo paclobutrazol (A - 0,0; B - 0,5; C - 1,0; D - 2,0; E - 4,0 mg.L⁻¹ de paclobutrazol). Feira de Santana, 2006.

As avaliações foram feitas com 45 dias, seria necessário um período maior para verificar o comportamento dessas plântulas em relação ao paclobutrazol, pois este degrada lentamente e apresenta meia vida de 95 dias (Silva *et al.*, 2003). Então, é provável que as plântulas permanecessem com o entrenó diminuído e talvez aumentasse o número de gemas, pois segundo Rademacher (2000) há aumento das citocininas quando se utiliza este tipo de retardante de crescimento.

6. Conclusões

A concentração de 20 μM independente do tipo de inibidor utilizado promoveu redução da abscisão foliar e a concentração de 10 μM promoveu aumento no número de folhas.

O nitrato de prata (5,0 μM) promoveu aumento no número de brotações e no número de gemas mostrando-se eficiente para o desenvolvimento das plântulas.

A concentração de 0,5 mg.L^{-1} de paclobutrazol se mostrou suficiente na redução do crescimento e de folhas senescentes das plântulas de angico.

O sistema radicular também sofreu influência do paclobutrazol, onde o menor comprimento da raiz foi verificado com a concentração 0,5 mg.L^{-1} de paclobutrazol, havendo uma redução do número de raízes secundárias quando se utilizou 2,0 mg.L^{-1} .

A concentração de 0,5 mg.L^{-1} de paclobutrazol proporcionou aumento da matéria seca da raiz, contribuindo para a incorporação de carbono.

As raízes engrossaram indicando um aspecto positivo para a utilização deste composto, na etapa que antecede a aclimatização.

7. Referências Bibliográficas

Canto, A. M. M. E.; Souza, F. V. D.; Costa, M. A. C.; Souza, A. da S.; Ledo, C. A. da S.; Cabral, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, p. 717-720, 2004.

Chin, C. K. Promotion of shoot formation in asparagus *in vitro* by ancymidol. **HortScience**. v. 17, p. 590-591, 1982.

Chi, G. L.; Pua, E. C.; Goh, C. J. Role of ethylene on shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. **Plant Physiology**. v. 96, p. 178-183, 1991.

Davis, T. D.; Sankhla, N.; Walser, R. H. ; Upadhyaya, B. Promotion of adventitious formation on cuttings by paclobutrazol. **HortScience**. v. 20, p. 883-884, 1985.

Erig, A. C.; WulffSchuch, M. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**. v. 35, p. 961-965, 2005.

Ferreira, D. F. **Sisvar – Versão 4.3**. DEX/UFLA – Lavras, MG, 2003.

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.

Lemos, 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**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 237-32, 1994.

Lloyd, G. & McCown, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* ssp. **HortScience**. Alexandria, v.15, p.415, 1980. (Abst. 321)

Lorenzo, J. C.; González, 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**. v. 54, p. 197-200, 1998.

Mohiuddim, A. K. M.; Chowdhury, M. K. U.; Abdullan, Z. C.; Napis, S. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 51: 75-78, 1997.

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: 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.; Paiva Neto, V. b.; Toledo-Picoli, E. A.; Costa, M. G. C.; Rego, M. M.; Carvalho, C. R.; Finger, F. L.; Otoni, W. C. Axillary Bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cell Development Biology – Plant**. v. 39, p. 618-622, 2003.

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, p. 1557-1563, 1991.

Roberts, AV., Walker, S., Horan, I., Smith, EF., Mottley, J. 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.

Santos, K. G. B.; Mundstock, E.; Bodanese-Zanettini, M. H. Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. **Plant Cell Reports**. v. 16, p. 859-864, 1997.

Sisler, E. C.; Yang, S. F. Ethylene the gaseous plant hormone. **Bioscience**. v. 34, p. 234-238, 1984.

Silva, C. M. M. de S; Fay, E. F.; Vieira, R. F. Degradação do paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 38, p. 1223-1227, 2003.

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, p. 133-140, 1990a

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**. 1990b

Smith, E. F.; Gribaudo, I.; Roberts, A. V., Mottley, J. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. **HortScience**. v. 27, p. 111-113, 1992.

Taiz, L.; Zaiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.

Ziv, M. *In vitro* acclimatization. In: Aitken-Christie, Kozai, J., Lila, T., Smith, MA. (eds.) **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Kluwer. Dordrecht, pp. 493-516, 1995.

Conclusões Gerais

O tipo de fechamento dos tubos de ensaio influenciou no crescimento das plântulas, sendo que o tampão de algodão proporcionou melhores resultados do que quando se utilizou o fechamento com filme de PVC.

O carvão ativado promoveu incrementos no sistema radicular, proporcionando maior formação de raízes secundárias.

As concentrações de sacarose também influenciaram o crescimento das plântulas, onde a concentração de 10 g.L^{-1} foi mais eficiente para comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento da raiz e número de raízes secundárias. Enquanto que para número de pinas e matéria seca da parte aérea foi a 20 g.L^{-1} de sacarose. E para matéria seca da raiz a melhor concentração foi 30 g.L^{-1} de sacarose.

Os inibidores de etileno reduziram a abscisão foliar, porém o fechamento dos tubos de ensaio com tampão de algodão proporcionou melhores resultados. O nitrato de prata ($5,0 \mu\text{M}$) promoveu aumento no número de brotações e no número de gemas mostrando-se eficiente para o desenvolvimento das plântulas.

O paclobutrazol influenciou na morfogênese das plântulas de angico, além de promover a redução dos entrenós, reduziu também o número de nós e promoveu o engrossamento das raízes.

Resumo geral

A cultura de tecidos oferece grande potencial para o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas com importância econômica, ecológica e social. A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul é uma planta do semi-árido nordestino, muito utilizada no curtimento de couro, devido a grande produção de tanino, é também utilizada para produção de lenha, carvão, como ornamental e na medicina popular. Este trabalho teve como objetivos estudar as respostas morfofisiológicas das plântulas de angico, controlar a abscisão foliar e avaliar o comportamento *in vitro* das plântulas verificando o efeito do uso de 1) tipos de fechamento dos tubos de ensaio, 2) diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado, 4) diferentes concentrações e tipos de inibidores de etileno e, 5) diferentes concentrações do inibidor de crescimento, paclobutrazol, visando a micropropagação e a conservação da espécie. As sementes permaneceram por 45 minutos em água corrente e em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas com imersão em álcool a 70% por 1 minuto, em seguida foi utilizado solução de hipoclorito de sódio - NaOCl (2,5%) com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 15 minutos e lavadas 4 vezes em água estéril. As sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo papel germtest, previamente esterilizados e umedecidos com água estéril. As placas ficaram no escuro por dois dias e em câmara de fluxo laminar, as plântulas, foram transferidas para o tubo de ensaio contendo meio WPM. Com os resultados obtidos verificou-se que o fechamento dos tubos de ensaio com tampão de algodão proporcionou incrementos para as variáveis analisadas: comprimento da parte aérea e raiz, matéria seca da parte aérea e número de raízes secundárias, além de reduzir a abscisão foliar em 7,3 vezes quando comparado fechamento com PVC. Ao avaliar as diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, observou-se que na presença de 10 g.L⁻¹ de sacarose obtiveram-se os maiores valores para comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento da raiz e número de raízes secundárias. Já para as variáveis, número de pinas e matéria seca da parte aérea, quando se utilizou 20 g.L⁻¹ de sacarose e para matéria seca da raiz com a adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose. O carvão ativado apresentou efeito significativo apenas para a variável número de raízes secundárias sendo que o maior valor para esta variável foi na concentração de 1g.L⁻¹. Nos experimentos em que foram utilizados inibidores de etileno (nitrato de prata e cloreto de cobalto) observou-se aumento no número de folhas e redução da abscisão foliar com a utilização de 10 e 20 µM (respectivamente) independente do inibidor de etileno utilizado. Tanto o nitrato de prata quanto o cloreto de cobalto contribuíram com

acréscimos no número de brotações e no número de gemas. O aumento na concentração de paclobutrazol reduziu o crescimento das plântulas, obtendo-se menores médias para as variáveis: comprimento da parte aérea, número de folhas, número de folhas senescentes e matéria seca da parte aérea na maior concentração ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$) de paclobutrazol. Este inibidor de crescimento teve efeito também no sistema radicular, reduzindo o comprimento da raiz, número de raízes secundárias e promoveu o engrossamento das raízes.

Abstract

The tissue culture is a great potential for in vitro establishment of native species of economical, social and ecological importance. The species *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var *cebil* (Griseb.) Althschul is from the Northeast of the semi arid area, it is widely used for leatherhardening, due to its great tannin production, it also generates wood and charcoal, for decoration and alternative medicine. This research aims to study the morphophysiological answers of the angico seedlings, foliar abscission control and evaluate the in vitro behaviour of seedlings to verify the effects of the use of 1) types of test tube closure, 2) different concentrations of sucrose and activated charcoal, 3) different concentrations and types of ethylene inhibitors, e 4) different concentrations of growth inhibitor, paclobutrazol, for the species micropropagation and conservation of species. The seeds remained in running water for 45 minutes and were washed 4 times in sterile water immersed in alcohol at 70% a minutes. Then, a sodium hypochlorite solution - NaOCl (2,5%) was used with 2 detergent (Ypê ®) drops for 15 minutes. Afterwards, they were inoculated in Petri plates containing germtest paper, previously sterilized and imbedded with sterile water. The plates stayed in the dark for two days and then the seedlings, in laminar flow chambers, were transferred to the test tube containing WPM medium. The results showed that the closing of the test tubes with cotton lid incremented the analysed variables - aerial part length and root, dry matter of aerial part and number of secondary roots, foliar abscission besides reduction in 7,3 times when the cotton lid was used in comparison to PVC. Respecting the sucrose concentrations and activated charcoal, the greatest values were obtained for the length of the aerial part, number of leaves, length of the root and number of secondary roots in the presence of 10 g.L⁻¹ sucrose. And for the variables number of pinnae, dry matter of aerial part when 20 g.L⁻¹ sucrose was used and for the dry matter of the root with 30 g.L⁻¹ sucrose in culture medium. The activated charcoal showed significant effect only for the variable of secondary root number. In those experiments where ethylene inhibitors were used (platinum nitrate and cobalt chloride), an increase in the number of leaves and foliar abscission reduction were observed using of 10 and 20 µM respectively independent of the ethylene inhibitor used. Both the platinum nitrate and the cobalt chloride helped to increase the number of buddings and shoots. The increase in the concentration of paclobutrazol reduced seedlings length, so that lesser media were obtained for the variables - aerial part length, number of leaves, number of leaves senescence and dry matter of aerial part in the greater concentration

(4,0 μM) of paclobutrazol. This growth inhibitor also had an effect over the radicular system, reducing root length, number of secondary roots, and promoted the root thickening.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)