



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



TECLA DOS SANTOS SILVA

**MORFOGÊNESE E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Caesalpinia
pyramidalis* Tul.**

Feira de Santana, BA
2012

TECLA DOS SANTOS SILVA

**MORFOGÊNESE E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Caesalpinia
pyramidalis* Tul.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

Feira de Santana, BA
2012

BANCA EXAMINADORA

Dra. Vanessa Cristina Stein
(Universidade Federal de Góias)

Dra. Franciane Tavares Braga
(Universidade do Estado da Bahia)

Dr. José Ranieri Ferreira de Santana
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientador e Presidente da Banca

Ao Deus criador, essência da vida, Alfa, Ômega, pois ele é a Luz, o Amor, a Verdade, o Princípio e o Fim.

Aos meus pais José Dionísio e Edineuza, que são meu porto seguro e responsáveis pela pessoa que me tornei, pelo meu caráter. Sempre me deram força e embasamento para todas as decisões da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais uma conquista e etapa concluída nessa longa jornada que é a vida. Obrigada Senhor! Sei que estás presente sempre em minha vida!

À minha família "meu porto seguro", meus pais por todo amor, carinho dedicação, incentivo, apoio e renúncia. Meus queridos e amados irmãos Eudes e Neto (meus amigos e companheiros em todas as horas) pelo amor, força e conselhos.

Ao meu namorado "Dinho". Obrigada meu anjo por todo amor, carinho, apoio, incentivo, por sempre acreditar em mim e pela compreensão em todos os momentos. Muito obrigada amor!

Ao professor Dr. José Raniere, pela orientação, ensinamentos, conselhos e oportunidade desde a Iniciação Científica. Muito Obrigada!

Em especial, à minha "mãe científica", co-orientadora Cristina Nepomuceno, a quem devo muito, que desde a Iniciação Científica, vem contribuindo na minha formação profissional, me ensinando a buscar sempre ser o melhor que eu pudesse ser. Obrigada Cris!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (PPGBiotec), pela oportunidade e suporte para a realização deste trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa.

À Unidade experimental Horto Florestal, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pela infra-estrutura e suporte para a realização dos experimentos.

Aos meus queridos amigos e companheiros de laboratório, muito especiais para mim, Bruno Alvim (Bú) e Priscila Tavares (Pri) pela ajuda em todas as etapas da realização deste trabalho. Foi um prazer conviver com vocês todos os dias desde a graduação até hoje! Nossos almoços, conversas e discussões (inclusive estatísticas) serão inesquecíveis. Não esquecendo Danilo Marcelo (Dan) Fernando Carneiro (Bra), Fábio Garcia e em especial a Mara Márcia pelo incentivo, palavras amigas, apoio e convivência. Obrigada, foi um imenso prazer conviver com vocês.

À aluna de Iniciação Científica Bárbara Paula, pela ajuda e disposição com execução dos experimentos. Muito obrigada!

À Ingrid Gutiérrez, pela ajuda e disposição com a estatística, além dos momentos de descontração compartilhados. Obrigada!

À minha querida madrinha Laura (tia Dinha), Roque, Tia Ciélia e meu Vô Manoel, pela ajuda imprescindível com a coleta do material vegetal.

A todos os familiares que participaram direta e indiretamente tanto na realização desta pesquisa como na minha formação moral. Meus avôs, tios, primos, todos que acreditaram em mim.

Às minhas amigas de toda uma vida Priscilla Souza e Karla Santos, pelo apoio, paciência e compreensão. Muito obrigada!

À Alone Lima, por suas palavras de incentivo e presteza no LCTV, sempre disposta a nos proporcionar as melhores condições para trabalhar.

Aos professores Lenaldo Muniz, Daniela Garcia e Sandra Queiroz, pelo incentivo.

À todos os funcionários e estudantes do Horto Florestal, em especial a Janilza paixão, Cíntia, Márcio, Seu Romualdo, Dona Suede, Maria Nascimento, e lógico não podia esquecer de " Dona Zezé" (seus chazinhos serão inesquecíveis). Foi muito bom conviver com todos vocês.

E, enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta na minha formação acadêmica e na realização desta dissertação. Muito Obrigada!

"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes"

Isaac Newton

“O mundo vai girando cada vez mais veloz , a gente espera do mundo, o mundo espera de nós, um pouco mais de paciência...”

Lenini

RESUMO

A catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) é uma espécie endêmica da Caatinga, que possui potencial madeireiro, forrageiro e medicinal. A cultura de tecidos vegetais tem-se mostrado eficaz na multiplicação e conservação de espécies lenhosas com potenciais explorados. Dessa forma, este trabalho objetivou estudar os efeitos dos tipos e concentrações de reguladores de crescimento vegetal sobre a multiplicação *in vitro* de *C. pyramidalis* e desenvolver um protocolo de conservação *in vitro* para a mesma. Para a multiplicação realizou-se três experimentos, onde foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento vegetal (BAP, KIN, TDZ e ANA) sobre diferentes explantes (hipocótilo, segmento cotiledonar, cotilédone, epicótilo e segmento nodal). Para a conservação *in vitro*, realizaram-se dois experimentos: no primeiro testou-se o efeito de diferentes concentrações de sacarose (87,64; 131,46; 175,28 e 219,10mM) combinados com concentrações (0,0 e 87,64mM) de sorbitol ou manitol, e no segundo, avaliou-se o uso de diferentes concentrações (0,0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 μ M) do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ). O meio de cultura usado para todos os experimentos foi o WPM. A maior taxa de regeneração, número de brotos, número de folhas, comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea foram obtidas com o segmento nodal inoculado em meio isento de regulador de crescimento vegetal. O uso do sorbitol e do manitol não se mostraram eficientes na conservação *in vitro* da catingueira, sendo indicada para este propósito, a utilização da concentração de 219,10mM de sacarose e de 6 μ M de PBZ por até 240 dias.

Palavras-chave: Agente osmótico. Retardante de crescimento. Reguladores de crescimento vegetal.

ABSTRACT

The catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) is an endemic species of the Caatinga, which has the potential timber, fodder and medicinal. The plant tissue culture has proved effective in multiplication and conservation of woody species with potential explored. Thus, this study investigated the effects of the types and concentrations of plant growth regulators on *in vitro* multiplication of *C. pyramidalis* and develop a protocol for *in vitro* conservation of the same. For multiplication was carried out three experiments in which we assessed the effects of different concentrations of plant growth regulators (BAP, KIN, TDZ or NAA) on different explants (hypocotyls, cotyledon segments, cotyledons, and epicotyl nodal segments). For the conservation *in vitro* experiments there were two: firstly tested the effect of different concentrations of sucrose (87.64, 131.46, 175.28 and 219.10mM) supplemented with different concentrations (0.0 and 87.64mM) of sorbitol or mannitol, and second, to evaluate the use of different concentrations (0.0, 1.5, 3.0, 4.5 and 6.0 μ M) the growth retardant paclobutrazol (PBZ). The culture medium used for all experiments was the WPM. The highest rate of regeneration, shoot number, leaf number, shoot length and dry weight of shoots were obtained from the nodal segments were inoculated into plant growth regulator free medium. The use of mannitol and sorbitol were not efficient for *in vitro* conservation catingueira, being suitable for this purpose, use of concentration of 219.10mM sucrose and 6 μ M PBZ until 240 days.

Keywords: osmotic agent. Growth retardant. Plant growth regulators.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 1 Morfogênese <i>in vitro</i> <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1.1 INTRODUÇÃO	28
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	30
1.2.1 Local de realização dos experimentos	30
1.2.2 Material vegetal	30
1.2.3 Meio de cultura e inoculação	31
1.2.4 Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia pyramidalis</i>	31
1.2.5 Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas indução de brotações em diferentes tipos de explantes de <i>C. pyramidalis</i>	31
1.2.6 Efeito da interação da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações em segmentos nodais de <i>C. pyramidalis</i>	32
1.2.7 Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas na indução de brotações em segmentos nodais de <i>C. pyramidalis</i>	32
1.2.8 Condições experimentais	33
1.2.9 Análise estatística	33
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
1.3.1 Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas indução de brotações em diferentes tipos de explantes de <i>C. pyramidalis</i>	34
1.3.2 Efeito da interação da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações em segmentos nodais de <i>C. pyramidalis</i>	38
1.3.3 Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas na indução de brotações em segmentos nodais de <i>C. pyramidalis</i>	45
CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO 2- Conservação <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.	58
RESUMO	59
ABSTRACT	60
2.1 INTRODUÇÃO	61

2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	63
2.2.1	Local de realização dos experimentos	63
2.2.2	Meio de cultura e inoculação	63
2.2.3	Material vegetal	63
2.2.4	Efeito dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol na conservação <i>in vitro</i> de <i>C. pyramidalis</i>	64
2.2.5	Efeito de diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ) na conservação <i>in vitro</i> de <i>C. pyramidalis</i>	65
2.2.6	Condições experimentais	65
2.2.7	Análise estatística	65
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
2.3.1	Efeito dos agentes osmóticos sacarose, manitol e sorbitol na conservação <i>in vitro</i> de <i>C. pyramidalis</i>	66
2.3.2	Efeito do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ) na conservação <i>in vitro</i> de <i>C. pyramidalis</i>	77
	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	83
	CONCLUSÃO GERAL	88

INTRODUÇÃO GERAL

O Nordeste brasileiro possui a maior parte de seu território ocupado por uma vegetação xerófila, de fisionomia e florística variada, denominada “Caatinga” (DRUMOND et al., 2000). A Caatinga é um mosaico de arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas que cobre a maior parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte nordeste de Minas Gerais, no vale do Jequitinhonha (LEAL et al., 2005) (Figura 1). Exclusivamente brasileiro, esse Bioma ocupa cerca de 11% do país (844.453 Km²), sendo o principal da região nordeste e constituído por uma variedade de espécies vegetais, sendo muitas dessas endêmicas (MMA, 2011).

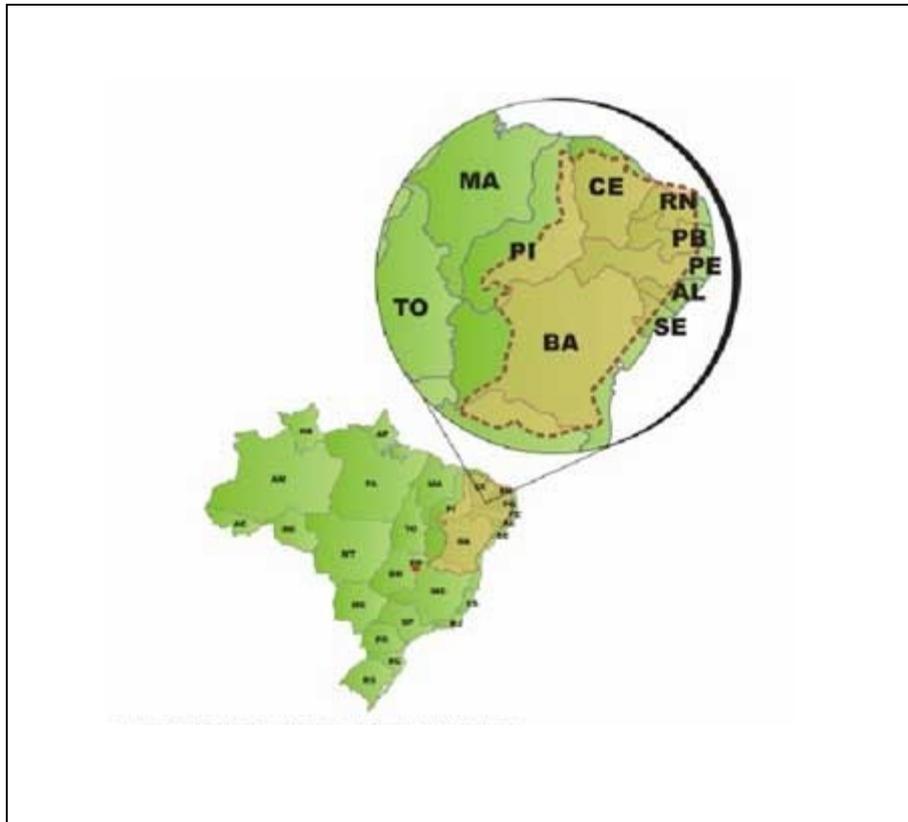


Figura1: Localização da Região Semi-árida no Brasil. Fonte: <http://nossossemiario.blogspot.com.br/p/sertao-semi-arido-o-sertao-semi-arido.html>.

O termo “Caatinga” é de origem Tupi e significa “mata branca”, referindo-se ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (PRADO, 2003). Normalmente, a Caatinga é descrita na literatura como pobre e de pouca importância biológica, no entanto,

possui um considerável número de espécies endêmicas, e que devem ser consideradas como um patrimônio biológico de valor incalculável, que não são encontradas em nenhum outro lugar do mundo além do Nordeste Brasileiro. Apesar dessas particularidades, a Caatinga não recebe o destaque merecido, sendo sempre colocada em segundo plano quando se discutem políticas públicas para o estudo e a conservação da biodiversidade do país (NEA, 2011; KILL, 2011).

A Caatinga constitui-se na expressão sintética dos elementos físicos e climáticos, uma vegetação singular, cujos elementos florísticos expressam uma morfologia, anatomia e mecanismos fisiológicos convenientes para resistir ao ambiente xérico, ou seja, condição de sobrevivência ligada a um ambiente seco, com deficiência hídrica, cuja água disponível às plantas procede unicamente durante o curto período da estação chuvosa, já que seus solos apresentam baixa capacidade de acumular água (NETO, 2009).

Em termos madeireiros e forrageiros, a Caatinga mostra-se bastante rica e diversificada, sendo ainda que entre as diversas espécies, várias são notoriamente consideradas como medicinais de uso popular, sendo comercializadas as folhas, cascas e raízes, em calçadas e ruas das principais cidades, bem como mercados e feiras livres (DRMUMOND et al., 2000). O estudo e a conservação da diversidade biológica da Caatinga é um dos maiores desafios da ciência brasileira, pois apesar de ser a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional, pouca atenção tem sido dada à conservação da variada e marcante paisagem da Caatinga, e a contribuição da sua biota à biodiversidade extremamente alta do Brasil, tem sido subestimada (SILVA et al., 2004).

Dentre as famílias mais comuns desse Bioma, tem-se a Leguminosae, cuja importância econômica é bastante diversificada, sendo utilizada desde a alimentação humana e animal até na produção de corantes, óleos, perfumes, inseticidas, além de apresentar uso medicinal, agrônômico e madeireiro (FERREIRA et al., 2004). Dentre as espécies que constituem essa família, tem-se *Caesalpinia pyramidalis* Tul., objeto de estudo do presente trabalho.

C. pyramidalis pertence à subfamília Caesalpinaceae, sendo uma das espécies vegetais mais representativas e bem distribuídas na Caatinga, ocorrendo nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, conhecida popularmente como catingueira, catinga-de-porco, catingueira-das-folhas-largas, mussitaiba, pau-de-porco e pau-de-rato (MAIA, 2004).

É uma árvore de porte médio, sem espinhos, com 4-6m de altura, podendo atingir 12m, apresentando copa aberta e irregular com ramos verdes e abundantes lenticelas

esbranquiçadas. A casca das árvores adultas da catingueira é de cor cinza-claro, às vezes levemente castanho, largando a camada superficial em lâminas um pouco alongadas, de bordo irregular, dando à casca um aspecto liso com coloração de “camuflagem”, com manchas de cor amarela, verde e branco. Suas folhas são bipinadas, com 5-11 folíolos alternos ou opostos, sésseis, obtusos, oblongos, coriáceos, bordo inteiro, levemente ondulado, 1-3cm nas folhas de ramos adultos e com menos de 1cm em folhas de rebrotas. As folhas novas têm coloração rosada, mas logo depois se tornam verdes apresentando um cheiro desagradável, típico. As flores são amarelas, dispostas em racimos curtos e o fruto é uma vagem achatada, pontada, de 8-11cm de comprimento e 2cm de largura, de cor castanho claro, composto por 5-7 sementes, as quais, através da deiscência violenta da vagem, são arremessadas a longas distâncias (MAIA, 2004) (Figura 2).

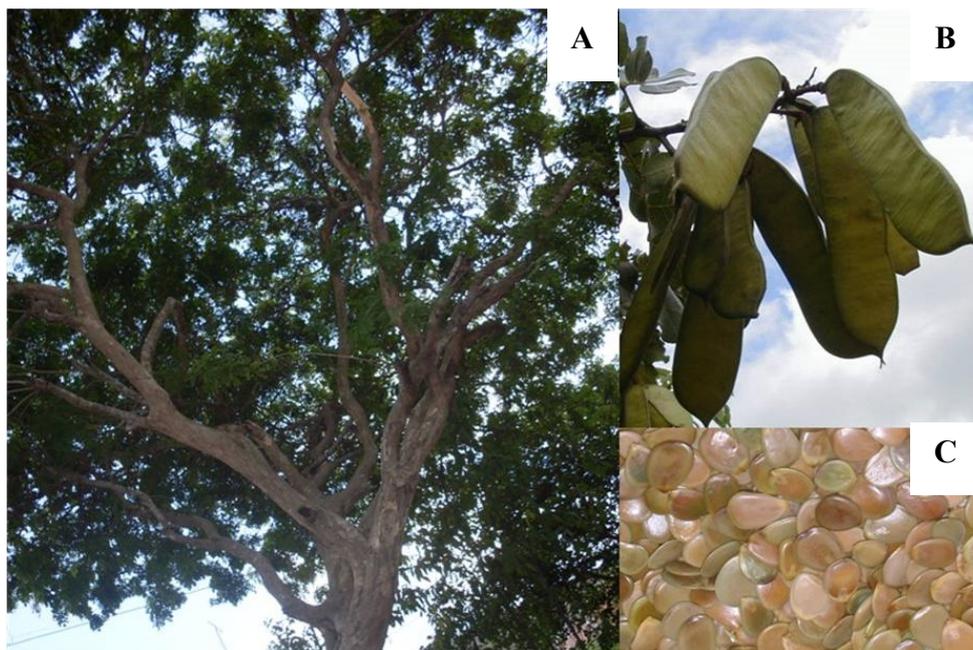


Figura 2: Caracterização botânica da *Caesapinia pyramidalis* Tul. A- Exemplar adulto (arbóreo) na estação chuvosa; B- frutos (vagens) imaturos; C- sementes. Fonte: Autora, adaptado de <http://www.cnip.org.br/bdpm/fotosdb/1019613156.JPG>.

Quanto à fenologia da espécie, observa-se que durante a estação seca, a catingueira adota um comportamento de caducifolia, no entanto, 30 dias após o início das chuvas elas alcançam vegetação plena. A floração ocorre na época da transição entre a seca e a chuvosa e na época chuvosa propriamente dita, culmina a frutificação. Subordinada a melhores suprimentos d’água em solo mais profundo, a catingueira tem caule retilíneo (30-35cm de circunferência), que permite o aproveitamento de sua madeira para diversos fins. O tronco oco

serve de abrigo para abelhas silvestres sem ferrão e outros insetos, para pequenos animais e pássaros. Pode ser manejada através da poda para produzir forragem durante a época seca, na qual normalmente está sem folhas, sendo que estas, quando submetidas, pelo homem, a processo de fenação, oferecem uma massa forrageira volumosa e bastante nutritiva (MAIA, 2004).

A catingueira apresenta grande potencial econômico devido à sua rusticidade e ao seu aproveitamento madeireiro, sendo bastante utilizada também na medicina popular. Suas flores, folhas e cascas são usadas no tratamento de hepatites, anemias, infecções catarrais e nas diarreias. A madeira branco-amarelada com cerne escuro possui grande quantidade de celulose e lignina, podendo ser utilizado para carvão, álcool combustível e coque metalúrgico (MAIA, 2004; SILVA et al., 2009).

A utilização medicinal da catingueira está associada aos compostos produzidos pela mesma, pois de acordo com Bahia et al. (2005), a espécie em estudo possui uma variedade de biflavonóides, flavonóides, triterpenos e fenilpropanóides, sendo que a presença de biflavonóides na família Leguminosae é relativamente rara e, na subfamília Caesalpinaceae, nunca havia sido relatada anteriormente. Segundo Lima et al. (2006), a catingueira possui ação antibacteriana, cujo extrato etanólico tem sido usado contra linhagens resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A grande ocorrência e os diversos usos atribuídos a catingueira propiciaram uma exploração intensa e indiscriminada da sua casca, folha, flores e madeira. Fato este, que faz surgir atualmente a necessidade de estratégias para sua multiplicação, conservação e manejo sustentável (TEIXEIRA et al., 2007). Embora sua propagação ocorra normalmente através de sementes, esta via de propagação sexuada apresenta algumas desvantagens, tais como a falta de uniformidade, segregação de caracteres e um longo tempo para a produção das mudas (GONZALEZ et al., 1994). Ressaltando ainda que, a produção de sementes se dá apenas por um curto período anual e a irregularidade aliada a má distribuição pluviométrica na região semiárida de um ano para outro, pode comprometer a obtenção dessas sementes de tal forma, que a maioria dos frutos apresentam sementes mal formadas ou inviáveis para a germinação (MATALLO JUNIOR, 2000; OLIVEIRA et al., 2011).

Dentro desse contexto, surge a cultura de tecidos vegetais, cujas técnicas baseiam-se na capacidade da célula vegetal regenerar um indivíduo completo, o que é denominado de totipotencialidade celular. As técnicas que envolvem a cultura de tecidos são uma das mais importantes contribuições para a propagação de plantas, possibilitando a multiplicação clonal de indivíduos superiores com rápido crescimento (GEORGE, 2008). As atividades inerentes à

cultura de tecidos são realizadas em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controladas, visando entre outros fatores, a otimização das respostas aos estímulos térmicos e fotoperíodo aplicados ao material *in vitro* (TORRES et al., 1998).

Dentre as aplicações do cultivo *in vitro*, tem-se a clonagem, seguida pela cultura de células, tecidos e órgãos para fins práticos, como a obtenção de plantas haplóides a partir de cultura de anteras, produção de metabólitos secundários em bioreatores, geração de variantes somaclonais, microenxertia, tecnologia dos protoplastos, conservação de germoplasma *in vitro*, entre outras (CARVALHO; VIDAL, 2003).

A tecnologia da cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas, constituem uma das áreas de maior sucesso, como parte do complexo da Biotecnologia e vem sendo ampliada dia-a-dia. Essa tecnologia conquistou destacada posição na produção comercial e industrial de plantas, no melhoramento genético, no manejo, no intercâmbio e conservação de germoplasma e em outras aplicações, como as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários (CARVALHO; VIDAL, 2003).

Dentre as técnicas da cultura de tecidos vegetais temos a micropropagação e a conservação *in vitro*, que serão as técnicas abordadas no presente estudo. A micropropagação ou propagação *in vitro* é uma técnica que vem sendo bastante explorada na propagação massal de várias espécies vegetais, inclusive lenhosas, se mostrando um método viável para a produção de mudas em escala comercial e com alta fidelidade genética, o que é de importância singular para a conservação de espécies nativas e recuperação de áreas degradadas (MERKLE; NAIRN, 2005). A micropropagação pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática (PASQUAL et al., 1997). A organogênese conceitua-se como a formação de estruturas a partir de tecidos e/ou células, podendo ainda ocorrer por duas formas: via direta, através da regeneração de plantas sem passar pela fase de calo, apresentando alta fidelidade genética; e, por via indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação é um método viável na produção de mudas em larga escala de espécies lenhosas. No entanto, um dos maiores problemas no estabelecimento *in vitro* dessas espécies, está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e ainda oxidações provocadas por compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). De forma que os fatores determinantes para o sucesso da propagação *in vitro* são a origem do explante e o meio nutritivo onde são cultivados, para o qual, diversas formulações têm sido empregadas na cultura *in vitro*, onde diferem entre si, basicamente em relação à concentração de sais, sendo que, para cada tipo de explante, espécie e cultivar, o

meio de cultura mais adequado e eficiente deve ser determinado experimentalmente (REZENDE et al., 2008).

A utilização de reguladores de crescimento vegetal adicionados ao meio de cultura tem a função de suprir prováveis deficiências de fitormônios nos explantes oriundos da planta matriz, com o objetivo de induzir os processos de desdiferenciação e rediferenciação celular, culminando na formação de tecidos e órgãos. Sendo que, a espécie e o tipo de explante respondem de forma diferente à ação dos diversos tipos e concentrações de reguladores de crescimento vegetal utilizados no cultivo *in vitro*. Destacando-se como os principais e mais utilizados, as citocininas e as auxinas, onde o balanço entre as concentrações dos mesmos são fatores determinantes para o desenvolvimento da planta *in vitro* (PIZA et al., 2001; TERMIGNONI, 2005).

As citocininas são indispensáveis durante a fase de multiplicação, pois controlam a divisão celular e estão ligadas com a diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares (KERBAUY, 2008). Seu transporte ocorre pelo xilema, no sentido acrópeto, em direção ao ápice (FREITAS, 2009). As citocininas mais usadas em cultura de tecidos vegetais são: a cinetina (KIN), 6-benzilaminopurina (BAP), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e thidiazuron (TDZ) (GUERRA; NODARI, 2006). O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As auxinas são os únicos reguladores de crescimento transportados polarmente, ou seja, seu transporte ocorre unidirecionalmente do ápice para a base da planta. Essa característica é essencial para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, agindo como um fator determinante nos movimentos trópicos, na divisão das células e na dominância apical (KERBAUY, 2008).

A utilização mais freqüente das auxinas é verificada na indução do desenvolvimento de nós, formação de calo e desenvolvimento de raízes adventícias (CARVALHO; VIDAL, 2003). Do grupo das auxinas, as mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido μ -naftalenoacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético), 4-CPA (ácido 4-clorofenoxiacético) e picloran. Seu balanço com as citocininas em alto/baixo favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. Concentrações iguais promovem a produção de calos (GUERRA; NODARI, 2006).

Outra técnica de grande importância na cultura de tecidos vegetais é a conservação de plantas *in vitro*, que se baseia no cultivo das coleções em laboratório (GEORGE, 2008), de

forma que a manutenção dos recursos fitogenéticos ocorre quando são realizadas alterações nas condições de cultivo a fim de desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento das células e dos tecidos (ROCA et al., 1991). A utilização de métodos de conservação *in vitro* é importante tanto por motivos econômicos quanto práticos, caracterizando-se como um componente adicional importante no tratamento de recursos genéticos, inclusive de espécies ameaçadas de extinção (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

O crescimento lento das culturas tem sido utilizado com sucesso e consiste em reduzir drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade, pela indução de estresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardantes de crescimento ou diminuição das concentrações dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (WITHERS; WILLIAMS, 1998). Os agentes osmóticos, tais como manitol, sorbitol e sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993).

Os retardantes de crescimento vegetal são compostos sintéticos que reduzem o alongamento do caule, sem mudar os padrões de desenvolvimento ou causar fitotoxicidade. Esse processo ocorre com a redução do alongamento das células e da taxa de divisão celular (SELEGUINI, 2007). Dentre esses retardantes de crescimento, tem-se o paclobutrazol (PBZ), um triazol que inibe a biossíntese das giberelinas, diminuindo dessa forma, o desenvolvimento das plantas (SILVA, 2008), pois, segundo Taiz; Zeiger (2004), as giberelinas aumentam o alongamento e a divisão celular, o que é evidenciado pelo aumento no comprimento e número de células em resposta à aplicação desse hormônio. O PBZ pode também alterar os níveis de ácido abscísico (ABA), etileno, citocininas e auxinas (FLETCHER et al., 2000; DAVIS; CURRY, 1991).

A conservação *in vitro* possibilita a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre das intempéries e riscos que existem no campo, além de reduzir os custos, garantir a manutenção da fidelidade genética, facilitar a disponibilidade de material para o melhoramento genético e o intercâmbio de germoplasma (FARIA et al., 2006). Sendo ainda que, a estocagem de plantas *in vitro* permite um fluxo contínuo de produção em todas as épocas do ano, e possibilita a produção de plantas a partir de órgãos já desenvolvidos, o que em geral, não é conseguido em condições naturais de campo (BERTONI et al., 2006).

O cultivo *in vitro* de espécies vegetais possibilita a recuperação de plantas com potenciais muito explorados, e dessa forma suscetíveis ao risco de extinção. Uma vez que, a utilização da catingueira, principalmente para a exploração de sua madeira, requer a extração

da árvore, a qual necessita, muitas vezes de muito tempo para se desenvolver, o que pode levar à extinção.

Dessa forma, este trabalho objetivou estudar os efeitos dos tipos e concentrações de reguladores de crescimento vegetal sobre multiplicação *in vitro* de *C. pyramidalis* e desenvolver um protocolo de conservação *in vitro* para a mesma, visto que se faz necessário estudar formas de propagação e conservação da catingueira, como estratégia para o seu cultivo e exploração sustentável, além da conservação dos recursos genéticos, dando suporte e embasamento para trabalhos e projetos biotecnológicos futuros com a espécie em estudo.

REFERÊNCIAS

BAHIA, M. V. et al. Biflavonoids and other Phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 6B, p. 1402-1405. 2005.

BERTONI, B.W. et al. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.

CARVALHO, F. M. J; VIDAL, S. M. *Noções básicas de cultura de tecidos*. Documentos 116. Embrapa. Out., 2003. Disponível em:

<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/273469/1/DOC116.PDF>>. Acesso em: 03 nov. 2011.

DAVIS, T.; CURRY. E. Chemical regulation of vegetative growth. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v. 10, n. 2, p.151-158. 1991.

DRUMOND, M. A. et al. *Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do Bioma Caatinga: Estratégias para o Uso Sustentável da Biodiversidade da Caatinga*, Petrolina, 2000. 23p. Disponível em:

<<http://www.semiarido.org.br/UserFiles/file/Estrategias%20para%20uso%20sustentavel%20da%20caatinga.pdf>>. Acesso em: 4 ago. 2011.

DUMET, D. et al. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *Cryo-Letters*, London, n. 14, p. 243-250. 1993.

FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* *Passiflora giberti* N. E. Brown. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal – SP, v. 28, n. 2, p. 267-270. 2006.

FERREIRA, G. C.; HOPKINS, M. J. G.; SECCO, R. R. Contribuição ao conhecimento morfológico das espécies de leguminosae comercializadas no estado do Pará, como “angelim” *Acta Amazonica*. v. 34, n. 2, p 219-232. 2004.

FLETCHER, R. A. et al. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural reviews*, New York, v. 24, p. 55-138. 2000.

FREITAS, H. B. *Desenvolvimento e hormônios vegetais*. Salvador: EDUFBA. Dez. 2009. p. 25-30.

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. v. 1 The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 01–28

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, 1998. p. 183-260.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. *Apostila de biotecnologia*. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41 p. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

GONZALEZ, M. G. N.; PÍPOLO, V. C.; MALAQUIDO, A. B. Influência da consistência física do meio no enraizamento de estacas de aceroleira (*Malpighia emarginata*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. *Anais*. Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1994. p. 80.

KERBAUY, G. B. *Fisiologia vegetal*. Ed. Guanabara Koogan, 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2008. 431p.

KIILL, L. H. P. *Caatinga: patrimônio brasileiro ameaçado*. <Agronline.com.br.> o site da agropecuária. Disponível em:
<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/899060/1/Kiill2011.pdf>> Acesso em: 05 nov. 2011.

LEAL, I. R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *Megadiversidade*. v.1, n. 1, Jul. 2005.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 105, p. 137–147. 2006.

MAIA, G. N. *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. Ed. Leitura & Arte, São Paulo, 2004. 413 p.

MATALLO JÚNIOR, H.A desertificação no Brasil. In: OLIVEIRA, T.S. et al. (Ed.). *Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido*. Fortaleza: UFC, 2000. p. 89-113.

MERKLE, S. A.; NAIRN, C. J. Hardwood tree biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Wallingford, UK, v. 41, p. 602-619, set./out. 2005.

MMA. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. *Caatinga*. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=203>>. Acesso em: 05 nov. 2011.

NEA. Núcleo de Educação Ambiental. *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Disponível em:
<<http://www.nucleo.ufal.br/nea/index.php/contemainmenu-48/20-sugestao-de-leitura/172-biodiversidade-da-caatinga-reas-e-as-prioritas-para-a-conserva>>. Acesso em: 05 nov. de 2011.

NETO, A. G. S. *Avaliação da área foliar de cinco espécies florestais ocorrentes no semi árido Paraibano*. 2009. 37f. Monografia (graduação em engenharia florestal). Universidade Federal de Campina Grande. Patos- PB.

OLIVEIRA, L. M. O. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 33, n. 2 p. 289 – 298. 2011.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. *Cultura de tecidos vegetais: Tecnologia e aplicações: introdução: fundamentos básicos*. Lavras: UFLA/FAEP, 1997. p. 7-45.

PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Reguladores vegetais na micropropagação de abacaxizeiro. *Revista Ceres*. Viçosa, v. 48, n. 280, p. 681-690. 2001.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Ed. Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 2003. p. 3-73.

REZENDE, J. C. et al. Influência do meio de cultura e concentração de Agar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. *Scientia Agraria*. Curitiba. v. 9, n. 1, p. 21-26. 2008.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1991. p. 697-712.

SELEGUINI, A. *Uso de paclobutrazol na produção de mudas, no crescimento, produção e qualidade de frutos de tomateiro em ambiente protegido*. 2007. 101f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira. 2007. Disponível em: <http://www.ppga.feis.unesp.br/teses2007/alexander2007_dr.pdf>. Acesso em: 29 de out. 2011.

SILVA, J. M. C., TABARELLI, M., FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (orgs.). *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2004.

SILVA, K. S. *Uso de Paclobutrazol em tomateiro cultivado em dois ambientes*. 2008. 79f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira. Disponível em: <<http://www.ppga.feis.unesp.br/teses2008/katiane2008.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2011.

SILVA, L. B. et al. Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabacea), espécie endêmica da caatinga do Nordeste do Brasil. *Acta Botânica Brasileira*. São Paulo. v. 23, n. 2, p. 436-445, abr./jun. 2009.

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

TEIXEIRA, N. C. et al. Efeito do estresse hídrico sobre a viabilidade e o vigor de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* TUL. (Leguminosae-caesalpinoideae). In CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL. *Anais*. Caxambu – MG: SEB 1-3. 2007. p. 1-3.

TERMIGNONI, R. R. *Cultura de tecidos vegetais*. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005. 182 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v.1, 1998. 509 p.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, C. A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa, CNPH, v.1, 1998. p. 297-329.

CÁPITULO I

Morfogênese in vitro Caesalpinia pyramidalis Tul.

RESUMO

Caesalpinia pyramidalis Tul. é uma espécie endêmica da Caatinga, conhecida popularmente como catingueira, que possui larga utilização pelas populações locais, principalmente por suas propriedades madeireiras, medicinais e forrageiras. O presente trabalho objetivou estudar os efeitos dos tipos e concentrações de reguladores de crescimento vegetal sobre multiplicação *in vitro* de *C. pyramidalis*. Realizaram-se três experimentos, nos quais foram avaliados os efeitos de diferentes reguladores de crescimento vegetal (BAP, KIN, TDZ e ANA) sobre diferentes explantes (hipocótilo, segmento cotiledonar, cotilédone, epicótilo e segmento nodal). No primeiro experimento, explantes (hipocótilo, nó cotiledonar, cotilédone e epicótilo) foram inoculados em meio suplementados com diferentes concentrações (0,0; 1,0; 2,0; e 4,0 μ M) e tipos de citocininas (BAP e KIN). No segundo experimento, segmentos nodais foram inoculados em meio contendo combinações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 μ M) e ANA (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 μ M). No terceiro experimento, segmentos nodais foram inoculados em meio contendo diferentes tipos (KIN, BAP e TDZ) e concentrações (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 16 μ M) de citocininas. Em todos os experimentos foi utilizado o meio de cultura WPM suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 7,0 g.L⁻¹ de ágar. Após 45 dias registrou-se a maior taxa de regeneração, número de brotos, número de folhas, comprimento da parte aérea e matéria fresca e seca da parte aérea quando se utilizou o segmento nodal inoculado em meio de cultura isento de regulador de crescimento.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Organogênese. Reguladores de crescimento vegetal.

ABSTRACT

Caesalpinia pyramidalis Tul. is an endemic species of the Caatinga, known popularly as catingueira, which has wide use by local people, mainly for its timber properties, medicinal and fodder. The present study investigated the effects of the types and concentrations of plant growth regulators on *in vitro* multiplication of *C. pyramidalis*. There were three experiments in which were evaluated the effects of different plant growth regulators (BAP, KIN, TDZ or NAA) on different explants (hypocotyls, cotyledon segments, cotyledons, or epicotyl nodal segments). In the first experiment, a explants (hypocotyl, cotyledonary node, cotyledons or epicotyl) were inoculated in a medium supplemented with different concentrations (0.0, 1.0, 2.0, or 4.0 μ M) and types of cytokinins (BAP or KIN). In the second experiment, nodal segments were inoculated in medium containing combinations of BAP (0.0, 1.0, 2.0, 4.0 or 8.0 μ M) and NAA (0.0, 1.0, 2.0, 4.0 or 8.0 μ M). In the third experiment, nodal segments were inoculated in medium containing different types (KIN, BAP or TDZ) and concentrations (0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 or 16 μ M) of cytokinins. In all experiments were used WPM supplemented with 87.64mM sucrose and solidified with 7.0gL⁻¹ agar. After 45 days was observed a higher rate of regeneration, shoot number, leaf number, shoot length and fresh and dry shoot when were used the nodal segment inoculated into culture medium plant growth regulator free.

Keywords: *In vitro* culture. Organogenesis. Plant growth regulators

1.1 INTRODUÇÃO

O Nordeste Brasileiro apresenta a maior parte do seu território ocupado por uma vegetação xerófila, de fisionomia e florística variada, denominada “Caatinga”, um Bioma constituído especialmente de espécies lenhosas, geralmente, caducifólias, perdendo suas folhas no início da estação seca (DRUMOND et al., 2000). Uma das famílias muito comum desse Bioma é a Leguminosae, que engloba a maior parte das plantas lenhosas, em relação ao número de gênero e espécies. Segundo Ferreira et al. (2004), esta família possui importância econômica bastante diversificada sendo utilizada desde a alimentação humana e animal até na produção de corantes, óleos, perfumes, inseticidas, além de apresentar uso medicinal, agrônômico e madeireiro.

Dentre as espécies que constituem a família Leguminosae, tem-se *Caesalpinia pyramidalis* Tul., uma árvore de porte médio, endêmica do sertão nordestino, conhecida popularmente como “catingueira, catinga-de-porco ou pau-de-rato”. A catingueira é bastante utilizada na medicina popular para o tratamento de febres, doenças estomacais, hepatite, anemia, infecções catarrais, nas diarreias e como diuréticos. A utilização medicinal pela população está associada aos compostos produzidos pela catingueira, pois de acordo com Bahia et al. (2005), a espécie em estudo possui uma variedade de biflavonóides, flavonóides, triterpenos e fenilpropanóides, sendo que a presença de biflavonóides na família Leguminosae é relativamente rara e, na subfamília Caesalpinaceae, nunca havia sido relatada anteriormente. De acordo com Lima et al. (2006), a catingueira possui ação antibacteriana, cujo extrato etanólico tem sido usado contra linhagens resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Além de propriedades medicinais, a catingueira possui ainda potencial madeireiro e forrageiro para caprinos, ovinos e bovinos (DRUMOND et al., 2000). Seu lenho e galhos, devido à grande quantidade de lignina e celulose, podem ser ainda utilizados para produção de álcool combustível, coque metalúrgico, sendo que a cinza da madeira possui elevado teor de potássio, que é utilizado na fabricação de sabão (MAIA, 2004).

Em ambiente natural a propagação da catingueira é feita através de sementes, no entanto, esta via de propagação sexuada apresenta algumas desvantagens, tais como a falta de uniformidade, segregação de caracteres e um longo tempo para a produção das mudas (GONZALEZ et al., 1994). Ressaltando que, a produção de sementes se dá apenas por um curto período anual e a irregularidade aliada a má distribuição pluviométrica na região semiárida de um ano para outro, pode comprometer a obtenção dessas sementes, de tal forma

que a maioria dos frutos apresenta sementes mal formadas ou inviáveis para a germinação (MATALLO JUNIOR, 2000; OLIVEIRA et al., 2011). Sendo ainda que, o abuso de seus recursos, principalmente a exploração de sua madeira, cuja utilização requer a extração da árvore, a qual necessita de tempo para se desenvolver, pode impedir sua reprodução natural, ocasionando problemas com a propagação, o que pode direcioná-las ao risco de extinção. Dessa forma, surge a necessidade do desenvolvimento de estratégias para sua multiplicação, conservação e manejo sustentável.

A utilização de recursos biotecnológicos, como técnicas de cultura de tecidos vegetais, tem auxiliado na propagação clonal de genótipos de várias espécies lenhosas. Dentre essas técnicas tem-se a micropropagação, que é amplamente utilizada para a multiplicação de plantas *in vitro*, representando um método viável de propagação, além de possibilitar a produção de um grande número de mudas em curto espaço de tempo e com alta sanidade (SOUZA et al., 2008).

O estabelecimento *in vitro* de explantes corresponde à primeira etapa de um sistema de micropropagação. No entanto, para o início dos trabalhos, dois fatores são importantes e devem ser considerados: o tipo de explante a ser utilizado e a assepsia (SOUZA et al., 2011). O tipo de explante deve ser escolhido de acordo com a sua capacidade para se adequar às condições *in vitro*, sendo recomendados os que contenham maior proporção de tecido meristemático por apresentarem maior capacidade de expressar a totipotência (KIELSE et al., 2009). A idade desses explantes é um fator de grande relevância, uma vez que, para espécies lenhosas, são indicados materiais mais jovens, pois uma série de alterações na capacidade morfogenética, inerentes da própria diferenciação e envelhecimento celular dos tecidos, pode ocorrer com a passagem do estado juvenil para o adulto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Tem-se ainda como outro fator de grande relevância, os meios de cultura utilizados na micropropagação, componentes essenciais para o crescimento dos tecidos, controlando também, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Para a obtenção dos processos objetivados *in vitro*, são utilizados reguladores de crescimento vegetal, como citocininas e auxinas, de forma que, para o eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*, é necessário um adequado balanço entre esses reguladores de crescimento (AMÉRICO et al., 2003). Auxinas e citocininas, endógenas e exógenas, são exigidas em proporções adequadas de acordo com cada espécie, para a formação de brotos e raízes adventícias (SILVEIRA et al., 2001). As citocininas são indispensáveis durante a fase de multiplicação, pois controlam a divisão celular e estão ligadas com a diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas

caulinares (KERBAUY, 2008). Dentre as citocininas, está o 6-benzilaminopurina (BAP), que tem sido o mais indicado para promover a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), sendo considerada eficiente na multiplicação de diversas espécies lenhosas. Outra citocinina bastante utilizada é a cinetina (KIN), seguida da feniluréia thidiazuron (TDZ), um composto sintético com atividade citocínica. Segundo Curti (2011), o TDZ surgiu como um regulador altamente eficaz em culturas de tecidos de um conjunto diversificado de espécies, que se estende desde gramíneas e herbáceas até espécies lenhosas.

Já as auxinas estão associadas ao enraizamento, controlam o crescimento celular, estando envolvidas também no controle da divisão celular (KERBAUY, 2008). As auxinas mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido μ -naftalenoacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético), 4-CPA (ácido 4-clorofenoxiacético) e picloran. Seu balanço com as citocininas em alto/baixo favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea, concentrações iguais promovem a produção de calos (GUERRA; NODARI, 2006).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou estudar os efeitos dos tipos e concentrações de reguladores de crescimento vegetal sobre a multiplicação *in vitro* de *C. pyramidalis*, como uma estratégia alternativa para a exploração sustentável desse importante recurso genético, visto a falta de relatos da propagação *in vitro* da espécie em estudo.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

1.2.2 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de *C. pyramidalis* coletadas no Município de Retirolândia-BA e armazenadas em geladeira sob temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ no LCTV.

1.2.3 Meio de cultura e inoculação

O meio de cultura utilizado em todos os ensaios foi o WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 7gL^{-1} de ágar (Himedia®). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1N, antes da autoclavagem. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (25x150mm) vedados com tampa plástica e esterilizados por autoclavagem durante 15 min à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm.

As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica e os recipientes fechados com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC).

1.2.4 Estabelecimento *in vitro* de *C. pyramidalis*

As sementes foram lavadas com água e detergente neutro, permanecendo em água corrente por 30 minutos, em seguida foram imersas em solução do fungicida derosal® 2mL.L^{-1} (10min). Logo após foram desinfestadas em álcool a 70% (1min), e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) com duas gotas de detergente neutro por 15 minutos. Em seguida, foram submetidas a lavagem por três vezes em água destilada estéril e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura.

1.2.5 Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocinina na indução de brotações em diferentes tipos de explantes de *C. pyramidalis*

Explantes (hipocótilo, cotilédone, nó cotiledonar e epicótilo), oriundos de plântulas germinadas *in vitro* com 20 dias de idade, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura suplementado com diferentes concentrações (0,0; 1,0; 2,0 e $4,0\mu\text{M}$) de 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN).

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 4 x 4 (tipos de citocininas x concentrações de citocininas x tipos de explantes), totalizando 32 tratamentos, com 6 repetições e cada uma constando de 5 unidades experimentais (tubos de ensaio). Após 45 dias da inoculação, avaliou-se a porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos, número de brotos e folhas, o comprimento da parte aérea e a matéria seca da parte aérea.

1.2.6 Efeito da interação da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações em segmentos nodais de *C. pyramidalis*

Segmentos nodais, oriundos de plantas germinadas *in vitro* com 40 dias de idade, foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 μ M) e ANA (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 μ M). O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado composto por arranjo fatorial 5 x 5 (concentrações de BAP x concentrações de ANA) totalizando 25 tratamentos constituído por 10 repetições com quatro unidades experimentais (tubos de ensaio) cada.

Após 45 dias da inoculação foram avaliados: a porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos, o número de brotos e folhas, o comprimento da parte aérea, a matéria seca da parte aérea e a porcentagem de formação de calos na base dos explantes.

1.2.7 Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas na indução de brotações em segmentos nodais de *C. pyramidalis*

Segmentos nodais, oriundos de plantas germinadas *in vitro* com 40 dias de idade, foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura, suplementado com diferentes concentrações e tipos de citocininas, constituindo os tratamentos dispostos na tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos utilizados na multiplicação *in vitro* de *C. pyramidalis* com diferentes concentrações e tipos de citocininas. Feira de Santana, BA. 2012.

Tratamentos	Concentração das citocininas (μ M)		
	BAP	KIN	TDZ
T1	0,0	0,0	0,0
T 2	2,0	0,0	0,0
T 3	4,0	0,0	0,0
T 4	8,0	0,0	0,0
T 5	16,0	0,0	0,0
T 6	0,0	2,0	0,0
T 7	0,0	4,0	0,0
T 8	0,0	8,0	0,0
T 9	0,0	16,0	0,0
T 10	0,0	0,0	1,0
T 11	0,0	0,0	2,0
T 12	0,0	0,0	4,0
T13	0,0	0,0	6,0

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado totalizando 13 tratamentos constituídos por 10 repetições com quatro unidades experimentais cada. Após 45 dias da inoculação foram avaliados: a porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos, o número de brotos e folhas, o comprimento da parte aérea e a matéria seca da parte aérea.

1.2.8 Condições experimentais

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, com radiação fotossintética ativa de $60\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obtidas a partir de lâmpadas brancas fluorescentes, sendo que, logo após a inoculação, os tratamentos permaneceram no escuro por 5 dias afim de reduzir as oxidações dos explantes.

1.2.9 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente, mediante a análise de variância, sendo que os mesmos foram transformados pela função $(x + 1)^{0.5}$, exceto os dados de porcentagem, os quais foram submetidos à transformação em arco-seco $\sqrt{\frac{x}{100}}$. Quando o valor de “F” foi significativo, as médias dos tratamentos qualitativos foram submetidas à comparação de médias por meio do teste de Tukey e as médias de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fase de estabelecimento *in vitro* de *C. pyramidalis* foi influenciada por contaminações fúngicas e bacterianas nas sementes utilizadas, sendo que, alguns lotes apresentaram 90% de contaminação enquanto que outros lotes de 10 a 30% (dados não mostrados). A época de coleta, provavelmente, influenciou a taxa de contaminação das sementes, visto que as mesmas coletadas em períodos de maior precipitação pluviométrica apresentaram maior taxa de contaminação. Altos índices de contaminações fúngicas e bacterianas também foram relatados em outras espécies lenhosas, como *Olea europaea* (92,95%) e em *Quercus rubrum* (46%) (DONINI et al., 2008; VIEITEZ et al., 2009).

1.3.1 Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocinina na indução de brotações em diferentes tipos de explantes de *C. pyramidalis*

Em *C. pyramidalis* não foi observado o desencadeamento de respostas morfogênicas nos explantes cotilédone, hipocótilo e epicótilo em nenhum dos tratamentos testados, de forma que os dados estatísticos analisados foram apenas para as brotações oriundas do segmento contendo o nó cotiledonar (Figura 1).

De acordo com a análise de variância, a interação “tipo de citocinina x concentração de citocinina”, apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para as variáveis porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos, número de folhas e efeito significativo ($p < 0,05$) para a número de brotos. A fonte de variação “concentração de citocinina” isolada apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para o comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea (Tabela 2).

Tabela 2: Resumo da análise de variância para explantes responsivos (ER), número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 45 dias obtidos a partir do segmento com nó cotiledonar de *C. pyramidalis* submetidas a diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN). Feira de Santana, BA. 2012.

FV	GL	Quadrados médios				
		ER ^X	NB ^Y	NF ^Y	CPA ^Y	MSPA ^Y
Tipo de Citocinina (TC)	1	0,02 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,19 ^{ns}
Concentração (C)	3	0,07 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,04 ^{ns}	4,32**	1,17**
TC x C	3	0,12**	0,04*	0,14**	1,8 ^{ns}	3,65 ^{ns}
Resíduo	40	0,03	0,01	0,02	0,65	3,35
CV(%)		43,26	7,67	10,90	34,11	30,17

** 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. ^X Dados transformados em arco-seno \sqrt{x} ; ^Y Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

O comportamento constatado para a espécie em estudo é semelhante ao que foi observado por Gutiérrez et al. (2011) em estudos com *Bauhinia cheilantha*, cujo os mesmo explantes (cotilédone, hipocótilo e epicótilo) também não apresentaram respostas morfogênicas diante dos tratamentos experimentados. Possivelmente, as células desses explantes possuem baixa competência para responder aos reguladores testados, comprometendo a determinação das mesmas. A falha de competência de um tecido pode ser reflexo da falta de receptores para a classe hormonal que irá induzir o processo organogênético (SOUSA et al., 2007).

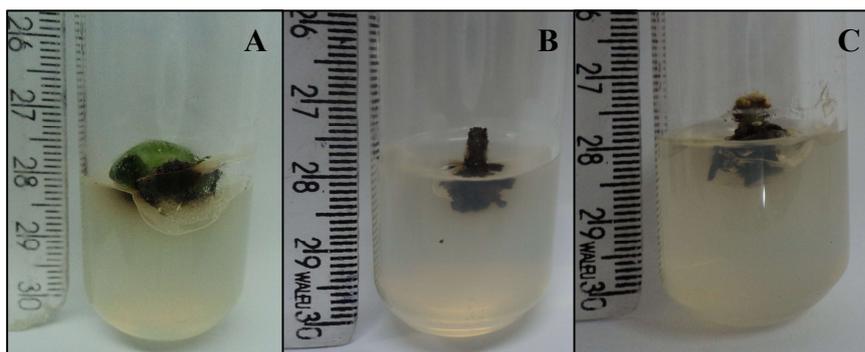


Figura 1: Aspecto dos explantes cotilédone (A), epicótilo (B) e hipocótilo (C) aos 45 dias de inoculados em meio de cultura WPM acrescido de $4\mu\text{M}$ de BAP. Feira de Santana, BA. 2012.

A maior taxa de explantes responsivos (60%) foi obtida com a utilização do nó cotiledonar na presença de $2\mu\text{M}$ da citocinina KIN (Tabela 3). Esse resultado difere do encontrado para angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*), no qual foi observada 98,8% de regeneração, quando utilizado segmento cotiledonar na presença de BAP, independente da concentração testada (KIELSE et al., 2009). O BAP é um fitorregulador natural que tem se mostrado eficaz na multiplicação de diversas espécies lenhosas (ARAGÃO et al., 2011), no entanto, não apresentou eficácia nas concentrações testadas para a regeneração de brotos em catingueira a partir do segmento cotiledonar, visto que a utilização da cinetina mostrou-se significativamente superior para a regeneração *in vitro* da catingueira.

Diferente do BAP, a cinetina é um regulador de crescimento vegetal que não está presente naturalmente nas plantas (CASTRO, 2011), sua aplicação em cultura de tecidos foi utilizada com êxito para a multiplicação de várias espécies lenhosas, a exemplo de *Tabernaemontana fuchsiaefolia*, *Stryphnodendron adstringens* e figueira cv. “Roxo de Valinhos” (OLIVEIRA et al., 2003; NICIOLI et al., 2008; FERREIRA; PASQUAL, 2008).

Ao analisar a variável número de brotos, observou-se a maior média (0,93) quando o meio de cultura foi suplementado com $2\mu\text{M}$ de KIN (Tabela 3). Esses resultados discordam daqueles reportados por Gutiérrez et al. (2011), em culturas de *Bauhinia cheilantha*, que observaram maior número de brotos (1,33 brotos/explante) com o mesmo explante, na presença de $6,6\mu\text{M}$ de BAP, sendo ainda que os mesmos autores constataram que os valores encontrados com a utilização da citocinina KIN foram significativamente inferiores. Balaraju et al. (2008) também observaram aumento no número de brotos de *Vitex agnus-castus* com a utilização de BAP em comparação com KIN.

Tabela 3: Explantes responsivos, número de brotos e número de folhas obtidos a partir do nó cotiledonar de *C. pyramidalis* aos 45 dias de inoculação em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 μ M) e tipos de citocininas (BAP e KIN). Feira de Santana, BA. 2012.

Concentração (μ M)	Tipo de citocinina	
	BAP	KIN
	Explantes responsivos (%)	
0,0	35,55aA	35,55aB
1,0	43,33aA	27,50aB
2,0	33,33bA	60,00aA
4,0	29,72aA	33,33aB
	Número de brotos	
0,0	0,64aA	0,64aAB
1,0	0,56aA	0,48aB
2,0	0,43bA	0,93aA
4,0	0,56aA	0,46aB
	Número de folhas	
0,0	0,80aA	0,80aAB
1,0	1,06aA	0,65aB
2,0	0,43bA	1,43aA
4,0	0,56aA	0,53aB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na mesma coluna para cada variável, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para a variável número de folhas, constatou-se que a maior média (1,43) também foi registrada com a utilização de 2 μ M de KIN (Tabela 3), corroborando Kielse et al. (2009), que obtiveram o maior número de folhas (2,90) em *Parapiptadenia rigida* com a utilização segmento cotiledonar inoculado em meio contendo 1,44 μ M de KIN. O incremento no número de folhas na etapa de multiplicação é bastante favorável, pois na inserção entre o caule e a folha existe a produção de gema, a qual poderá dar origem a um novo broto e conseqüentemente aumentar a produção de novas mudas (COSTA et al., 2010). No entanto para a catingueira foi verificado baixo número de folhas, discordando assim de Costa et al. (2010) em culturas de *Erythrina velutina*, que constataram um aumento significativo no número de folhas (10,12) com o mesmo explante na presença de 4,44 μ M de BAP combinado com 1,34 μ M de ANA.

As concentrações de citocininas mostraram tendência linear decrescente ($p < 0,01$) para a variável comprimento da parte aérea, sendo que a maior média observada (9,21mm), foi registrada na ausência das citocininas (Figura 2). Esse resultado corrobora Kang et al. (2009) em culturas *Populus trichocarpa*, cujo maior comprimento das brotações (22mm) foi obtido em meio de cultura isento de reguladores de crescimento vegetal.

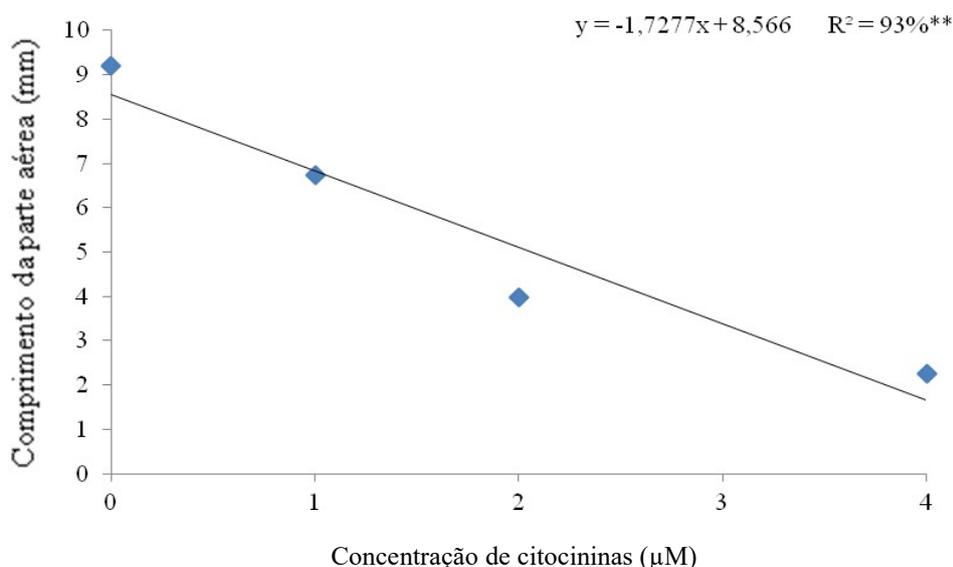


Figura 2: Comprimento da parte aérea de brotos obtidos a partir do segmento contendo o nó cotiledonar de *C. pyramidalis*, aos 45 dias da inoculação com diferentes concentrações das citocininas benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN). Feira de Santana, BA. 2012.

Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que as citocininas controlam a divisão celular, estando intimamente ligadas à diferenciação das células e, sobretudo na formação de gemas caulinares (KERBAUY, 2008), atuando também na quebra da dominância apical, o que conseqüentemente leva a uma redução no tamanho das plantas. Dessa forma, à medida que se reduz as concentrações das citocininas, há um aumento no comprimento da parte aérea. O comprimento médio dos brotos observados para *C. pyramidalis* foram superiores aos 4,3mm obtidos por Kielse et al. (2009) em *P. rigida*, independente da concentração ou tipo de regulador testado, ou ainda aos 3,9mm registrados por Souza et al. (2008) em culturas de *Eugenia uniflora*.

Observou-se comportamento linear decrescente ($p < 0,01$) das concentrações das citocininas BAP e KIN, para a variável matéria seca da parte aérea. Na ausência dos

reguladores de crescimento vegetal, os brotos apresentaram maiores valores médios para matéria seca (3,04mg) da parte aérea, tendendo a um declínio em concentrações crescentes dos reguladores (Figura 3). Gutiérrez et al. (2011) também obtiveram a maior média para matéria seca (5,37 mg) de *B. cheilanta* na ausência de reguladores de crescimento.

A redução no peso seco da parte aérea de *C. pyramidalis* à medida que se adicionaram citocininas ao meio de cultura pode ser associado à redução do tamanho desses brotos provocados pelo mesmo fator, visto que os brotos oriundos dos tratamentos contendo citocininas se mostraram bem menores (Figura 2), quando comparados aos brotos do tratamento isento das mesmas, refletindo de forma direta no peso dessas brotações.

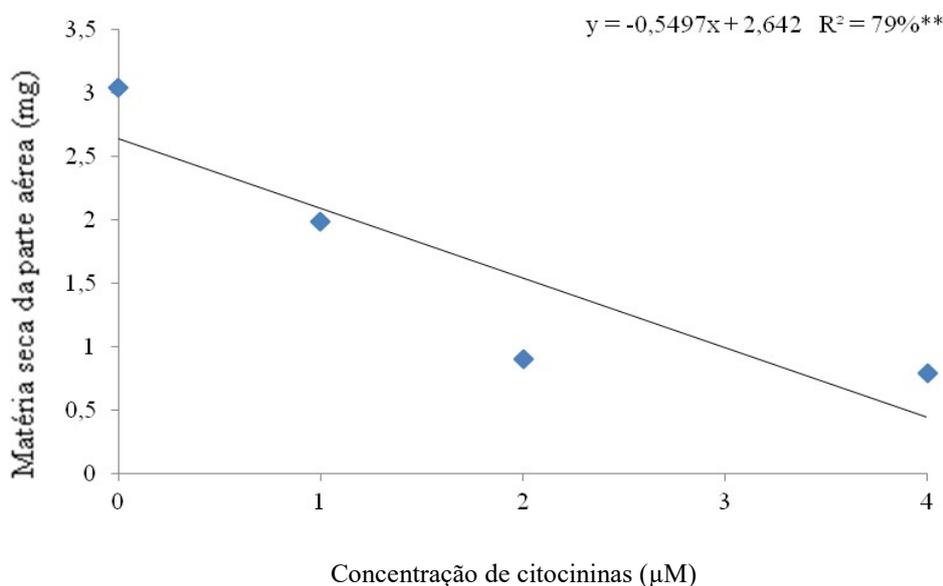


Figura 3: Matéria seca da parte aérea de brotos obtidos a partir do segmento cotiledonar de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações das citocininas benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN). Feira de Santana, BA. 2012.

1.3.2 Efeito da interação da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações em segmentos nodais de *C. pyramidalis*

De acordo com a tabela de análise de variância, observou-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) da interação “BAP x ANA” para a porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos, número de brotos, comprimento da parte aérea e matéria

seca da parte aérea, sendo significativo ($p < 0,05$) para a porcentagem de formação de calo na base dos explantes (Tabela 4).

Tabela 4: Resumo da análise de variância para explantes responsivos (ER), número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e porcentagem de formação de calo na base dos explantes (CBE) de brotos oriundos do segmentos nodal de plantas de *Caesalpinia pyramidalis* submetidas a diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP) e ácido nafatalenoácetico (ANA). Feira de Santana, BA. 2012.

FV	GL	Quadrados médios					
		ER ^X	NB ^Y	NF ^Y	CPA ^Y	MSPA ^Y	CBE ^X
BAP (B)	4	1,15 **	0,187 **	0,36 **	5,94**	0,71**	0,12 **
ANA (A)	4	0,70 **	0,097 **	0,18**	2,65**	0,99**	0,006 ^{ns}
B X A	16	0,30 **	0,042 **	0,11**	2,11**	0,59**	0,04 *
Resíduo	150	0,03	0,006	0,01	0,29	0,09	0,02
CV(%)		44,19	6,38	9,88	27,90	20,77	138,87

** 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. ^X Dados transformados em arco-seno $\sqrt{x/100}$; ^Y Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$

A análise de regressão indicou modelo quadrático descendente ($p < 0,01$) das concentrações de BAP para a variável porcentagem de explantes responsivos, na ausência e na presença de $2\mu\text{M}$ de ANA. Quando o meio de cultura foi suplementado com $8\mu\text{M}$ de ANA, apresentou comportamento linear crescente ($p < 0,01$) (Figura 4). No entanto a maior taxa de explantes responsivos (91,43%) foi obtida em meio de cultura sem reguladores de crescimento vegetal (Figura 4). Esses resultados são superiores aos encontrados por Borchetia et al. (2009) em *Camellia sinensis*, no qual obtiveram a maior porcentagem de explantes responsivos a partir de segmento nodal (32,8%) em meio de cultura WPM suplementado com $13,32\mu\text{M}$ de BAP. No entanto, para *C. pyramidalis* foi constatado um declínio significativo na taxa de regeneração dos brotos à medida que se aumentou a concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura.

De acordo com Furtado et al. (2007) a resposta morfogênica é fortemente influenciada pelo genótipo, dessa forma é fundamental que seja realizada adaptação dos protocolos em cada espécie, visto que as concentrações dos reguladores vegetais utilizadas desfavoreceram de forma significativa a taxa de regeneração da catingueira.

Ao analisar a variável número de brotos, obteve-se um modelo linear decrescente ($p < 0,01$) das concentrações de ANA quando o meio de cultura estava isento de BAP e quadrático descendente ($p < 0,01$) na presença de 2 e $8\mu\text{M}$ de BAP (Figura 5).

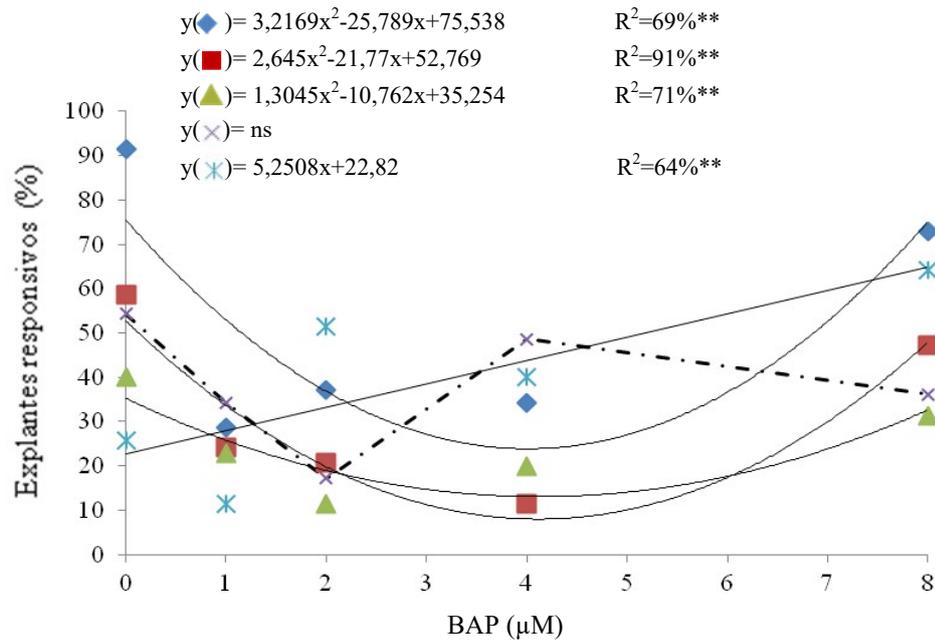


Figura 4: Porcentagem de explantes responsivos obtidos a partir de segmento nodal de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações de BAP e ANA (◆ 0,0 µM ANA; ■ 1,0 µM ANA; ▲ 2,0 µM ANA; × 4,0 e * 8,0µM ANA) (**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo ao nível de 5% pelo teste F). Feira de Santana, BA. 2012.

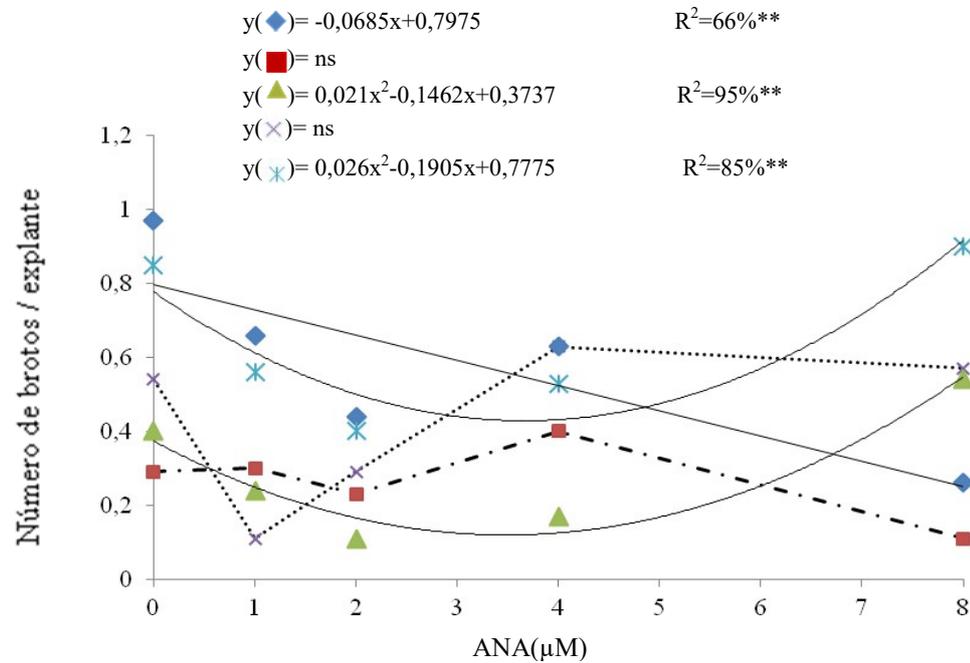


Figura 5: Número de brotos obtidos a partir de segmento nodal de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP (◆ 0,0 µM BAP; ■ 1,0 µM BAP; ▲ 2,0 µM BAP; × 4,0 e * 8,0µM BAP) (**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo ao nível de 5% pelo teste F). Feira de Santana, BA. 2012.

O maior número de brotos observado (0,97 brotos/explante) foi obtido na ausência dos reguladores de crescimento vegetal (Figura 5), corroborando Flôres et al. (2011) em culturas de *Luehea divaricata*, na qual também constataram que a ausência de regulador de crescimento no meio de cultura proporcionou a obtenção do maior número de brotações por explante (1,6). No entanto, Aragão et al. (2011) não registraram a formação de brotos em culturas de *Caesalpinia echinata* no meio de cultura isento de regulador.

A indução de brotos em explantes pode ser realizada por meio da aplicação de citocininas exógenas, promovendo o crescimento inicial das gemas axilares pela quebra da dominância apical (TAIZ; ZEIGER, 2004), porém para que brotos sejam formados, é necessário que no balanço entre auxinas e citocininas, as concentrações de citocininas sejam maiores (GUERRA; NODARI, 2006). No entanto, a formação de brotos, mesmo nos explantes inoculados em meio livre de fitorregulador, indicou que não houve a necessidade de uma fonte exógena de citocinina para estimular a formação de brotações em segmentos nodais de *C. pyramidalis*. Provavelmente, as concentrações testadas da citocinina BAP promoveram um desbalanço hormonal com as concentrações endógenas de auxinas nos explantes, visto que os mesmos foram oriundos de plantas germinadas *in vitro*, aos quais espera-se apresentar elevada quantidade de auxinas endógenas.

A adição de reguladores de crescimento vegetal em meios de cultura e o balanço adequado entre as concentrações já presentes internamente nos explantes, são importantes para o desencadeamento de respostas organogênicas, como observados para espécies lenhosas como *Erythrina velutina* (COSTA et al., 2010) e *Searsia dentata* (PRAKASH; STADEN, 2008). Os resultados obtidos para catingueira corroboram aqueles observados em outras espécies lenhosas como *Schizolobium amazonicum* (CORDEIRO et al., 2004) e *Cabralea canjerana* (ROCHA et al., 2007), em que também foram constatados baixa taxa de multiplicação.

A formação de calo na base dos explantes mostrou ser diretamente proporcional à adição de BAP no meio de cultura. Verificou-se comportamento linear crescente das concentrações dessa citocinina na ausência ($p < 0,01$) e na presença de $8\mu\text{M}$ ($p < 0,05$) de ANA no meio de cultura (Figura 6). A maior taxa (29%) de formação de calo foi observada na presença de $8\mu\text{M}$ de BAP, como houve tendência linear para esta variável, concentrações maiores provavelmente, deverão aumentar a taxa de formação de calo (Figura 6). Resultados semelhantes foram observados por Aragão et al. (2011) em trabalhos de multiplicação com *C. echinata*, no qual constataram que a maior concentração de BAP testada ($4,5\mu\text{M}$) foi responsável pela formação do maior percentual de calos (29,67%).

O comportamento observado, induzindo à formação de calos na catingueira, deve ter ocorrido provavelmente, por desbalanceamento nos níveis de fitormônios contidos nos explantes. De acordo com Santos (1998), elevadas concentrações de citocininas parecem reagir com a quantidade de auxina endógena do explante, o que leva à formação de calo provocando inibição no surgimento dos brotos. Sendo ainda que, para sistemas de micropropagação clonal, a formação de calos é indesejável uma vez que a constituição cromossômica deste material é, em geral, instável, podendo originar variantes genéticas, por meio de um processo chamado variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

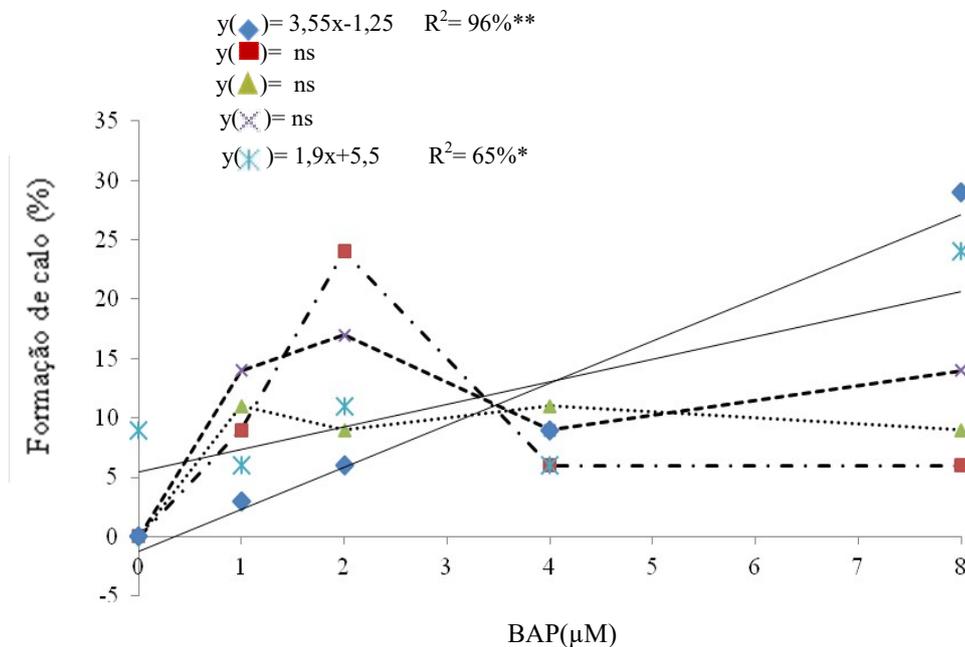


Figura 6: Porcentagem de formação de calo na base de brotos obtidos a partir de segmento nodal de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações de BAP e ANA (◆ 0,0 µM ANA; ■ 1,0 µM ANA; ▲ 2,0 µM ANA; ✕ 4,0 e * 8,0 µM ANA) (**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; *significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ^{ns} não significativo ao nível de 5% pelo teste F). Feira de Santana, BA. 2012.

Para número de folhas, as concentrações de BAP apresentaram tendência quadrática descendente ($p < 0,01$) na ausência e nas concentrações 1 e 2 µM de ANA. O maior número de folhas (1,63) foi obtido na ausência dos reguladores de crescimento (Figura 7). As concentrações mais elevadas geraram menores números de folhas por explante de catingueira, indicando efeito inibitório do fitoregulador. Comportamento similar foi obtido por Flôres et al. (2011), em culturas de *L. divaricata*, que também constataram efeito quadrático para esta

variável, no qual o maior número de folhas foi registrado na ausência de reguladores de crescimento. No entanto, Costa et al. (2010), observaram um efeito linear crescente para número de folhas de *E. velutina*, alcançando uma média de 9,4 folhas no meio de cultura suplementado com 17,76 μ M de BAP combinado com 1,34 μ M de ANA.

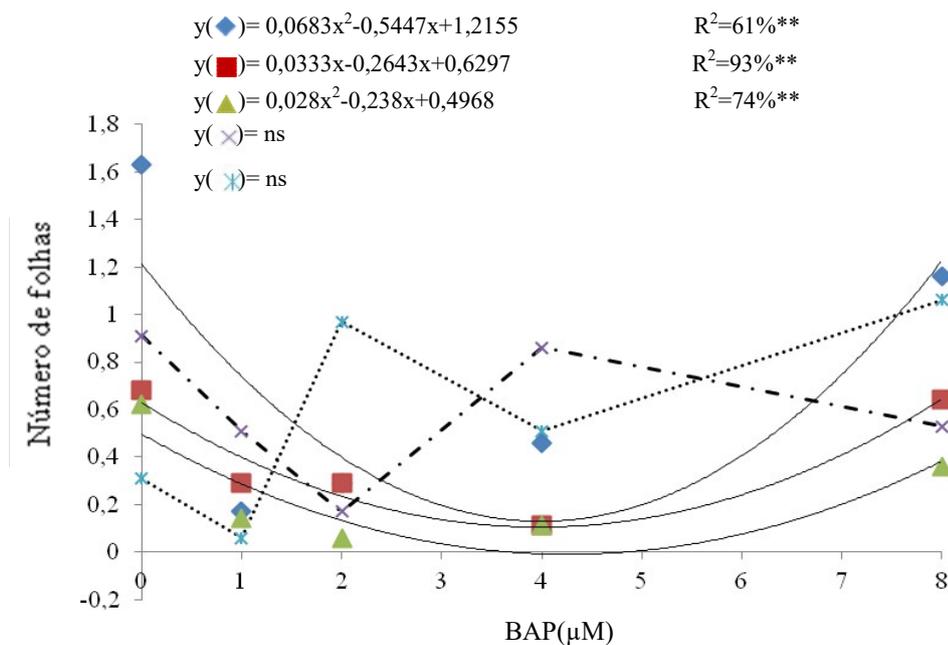


Figura 7: Número de folhas obtidas a partir de segmento nodal de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações de BAP e ANA (\diamond 0,0 μ M ANA; \blacksquare 1,0 μ M ANA; \blacktriangle 2,0 μ M ANA; \times 4,0 μ M ANA e \ast 8,0 μ M ANA) (**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo ao nível de 5% pelo teste F). Feira de Santana, BA. 2012.

Para o comprimento da parte aérea foi observada uma redução na altura média, dentro de cada concentração de ANA à medida que se aumentaram as concentrações de BAP, sendo constatado efeito quadrático ($p < 0,01$) na ausência e na utilização de 2 μ M de BAP e efeito linear decrescente ($p < 0,05$) na presença de 1 μ M de BAP (Figura 8A).

O maior comprimento dos brotos (17,90mm) foi observado quando não foi utilizado reguladores de crescimento no meio de cultura (Figura 8A), corroborando Kang et al. (2009) que também registraram o maior comprimento dos brotos (22mm) de *Populus trichocarpa*, em meio isento de reguladores de crescimento vegetal. É de fato constatado por vários autores que o aumento da concentração de citocininas no meio pode provocar a redução do comprimento dos brotos (PURKAYASTHA et al., 2008; NICIOLI et al., 2008; COSTA et al., 2010), visto sua atuação na quebra da dominância apical provocadas pelas auxinas endógenas

dos explantes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), brotos ideais para o enraizamento *in vitro* devem possuir altura igual ou superior a 10mm, concordando assim com a média de 17,90mm encontrados para *C. pyramidalis* no presente estudo.

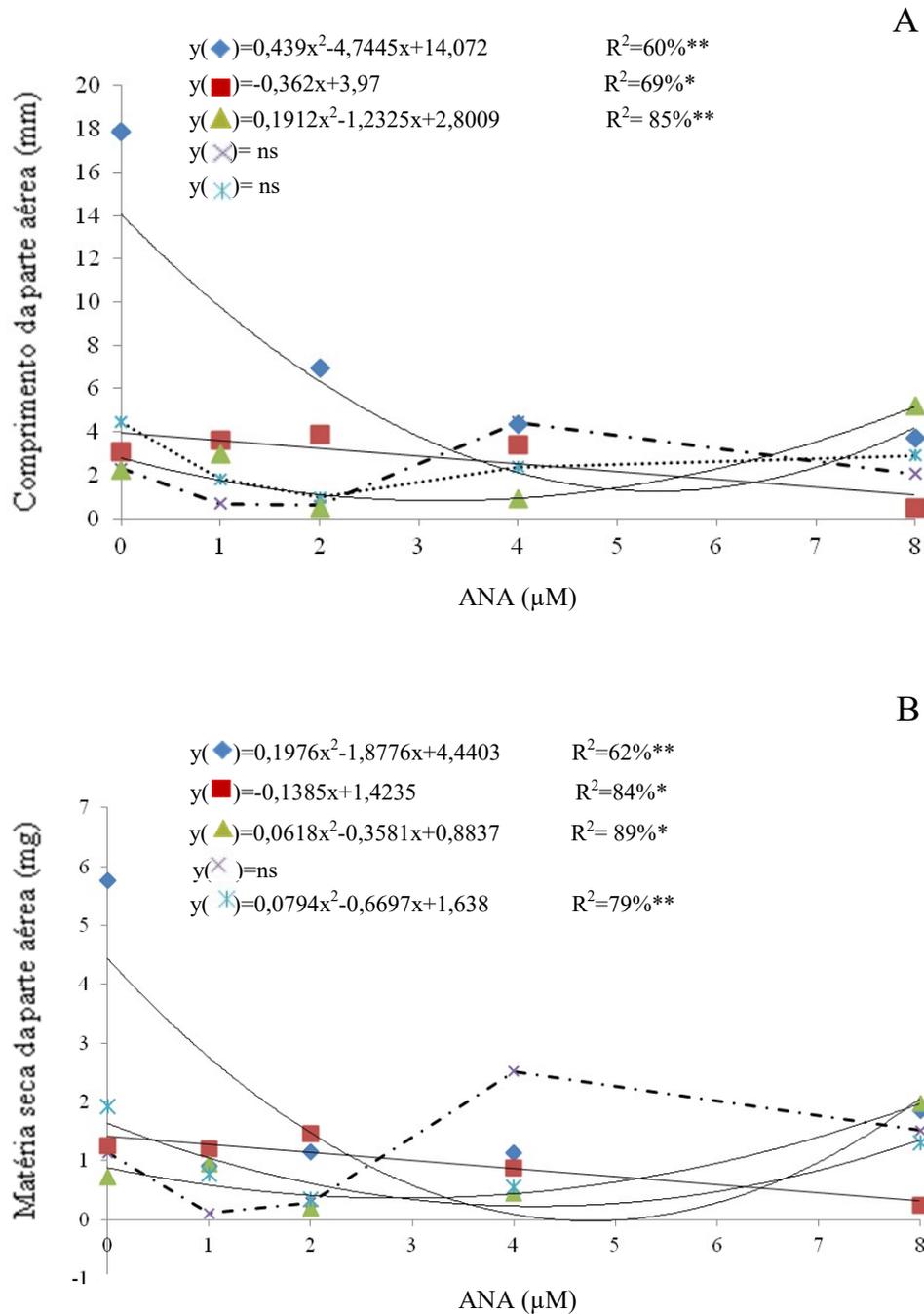


Figura 8: Comprimento da parte aérea (A) e matéria seca da parte aérea (B) obtidas a partir de segmento nodal de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP (\blacklozenge 0,0 μM BAP; \blacksquare 1,0 μM BAP; \blacktriangle 2,0 μM BAP; \times 4,0 μM e \ast 8,0 μM BAP) (**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; *significativo ao nível de 5% pelo teste F; ^{ns} não significativo ao nível de 5% pelo teste F). Feira de Santana, BA. 2012.

Em relação à matéria seca da parte aérea, observou-se tendência quadrática descendente das concentrações de ANA, na ausência ($p < 0,01$) e na presença de 2 e $8\mu\text{M}$ ($p < 0,05$) de BAP, e linear decrescente ($p < 0,05$) na utilização de $1\mu\text{M}$ de BAP (Figura 8B), sendo que foi constatado uma redução no peso da parte aérea à medida que aumentou-se as concentrações dos reguladores de crescimento, de forma que o maior valor obtido ($5,77\text{mg}$) foi registrado quando não foi adicionado reguladores de crescimento no meio de cultura (Figura 8B).

A adição de fitorreguladores em meios nutritivos tem o objetivo principal de suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz (FURTADO et al., 2007), no entanto, para a catingueira essa adição se mostrou inibitória para o desenvolvimento das brotações *in vitro*, refletindo num decréscimo na matéria seca da parte aérea. Comportamento este que pode ser atribuído à característica que os fitorreguladores possuem de inibir, promover ou modificar as diferentes respostas fisiológicas, mesmo em baixas concentrações, através da quais controlam o crescimento e desenvolvimento da planta (VIEIRA et al., 2010).

1.3.3 Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas na indução de brotações em segmentos nodais de *C. pyramidalis*

De acordo com a análise de variância, observou-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) dos tratamentos testados para todas as variáveis analisadas (Tabela 5).

Tabela 5: Resumo da análise de variância para explantes responsivos (ER), número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria fresca da parte aérea (MFPA) e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 45 dias obtidos a partir do segmento nodal de *C. pyramidalis* submetidas a diferentes concentrações e tipos de citocininas. Feira de Santana, BA. 2012.

FV	GL	Quadrados médios				
		ER ^x	NB ^y	NF ^y	CPA ^y	MSPA ^y
Tratamento	12	0,78 **	0,09 **	0,18 **	5,12 **	1,15 **
Resíduo	78	0,02	0,003	0,009	0,17	0,08
CV(%)		49,15	5,04	8,32	25,21	21,40

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. ^x Dados transformados em arco-seno \sqrt{x} ; ^y Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

Ao analisar a porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos, observou-se uma redução na taxa de regeneração de brotos à medida que se aumentaram as concentrações das citocininas no meio de cultura (Figura 9). A maior taxa (91,4%) observada

para essa variável foi alcançada na ausência dos reguladores de crescimento vegetal. Sendo que na utilização de concentrações maiores da citocinina TDZ (4 μ M-T12 e 6 μ M-T13) atingiu-se o menor percentual de regeneração (0,0%) (Figura 9).

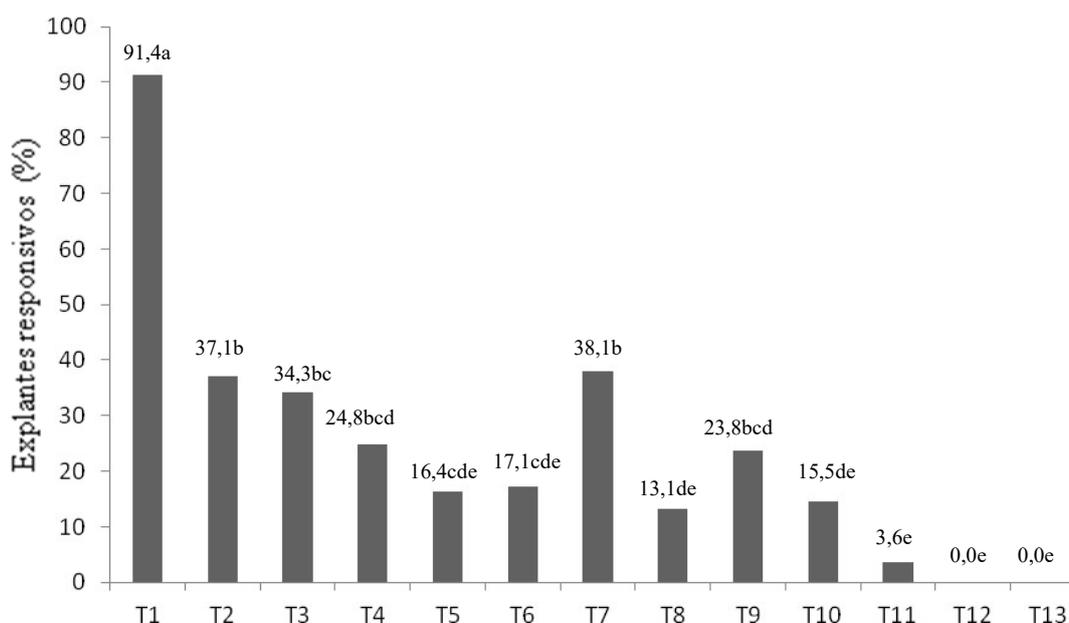


Figura 9: Porcentagem de explantes responsivos obtidos a partir de segmento nodal de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações e tipos de citocininas. T1 \rightarrow 0,0 μ M de citocinina; T2 \rightarrow 2 μ M de BAP; T3 \rightarrow 4 μ M de BAP; T4 \rightarrow 8 μ M de BAP; T5 \rightarrow 16 μ M de BAP; T6 \rightarrow 2 μ M de KIN; T7 \rightarrow 4 μ M de KIN; T8 \rightarrow 8 μ M de KIN; T9 \rightarrow 16 μ M de KIN; T10 \rightarrow 1 μ M de TDZ; T11 \rightarrow 2 μ M de TDZ; T12 \rightarrow 4 μ M de TDZ e T13 \rightarrow 6 μ M de TDZ. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste F. Feira de Santana, BA. 2012.

Comportamento similar ao observado para porcentagem de explantes responsivos foi obtido também para o número de brotações, cuja maior média (0,97 brotos/explante) foi registrada na ausência das citocininas, sendo que na presença das maiores concentrações de TDZ, também não foram averiguadas a formação de brotações (Figura 10).

Diferente do que foi observado para a catingueira, espécies lenhosas como *Rauvolfia tetraphylla* e *Leucaena leucocephala* apresentaram um alto número de brotos (9,2 e 6,98, respectivamente) com a utilização de TDZ adicionado ao meio de cultura (FAISAL et al., 2005; SHAIK et al., 2009).

O thidiazuron é um potente regulador de crescimento que faz parte do grupo das fenilurétrias, não possuindo o anel purina das citocininas como benzilaminopurina, cinetina e zeatina, sendo utilizado para induzir brotações em várias espécies lenhosas (MOK et al.,

1987; LU, 1993). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo não confirmam a eficiência do TDZ na indução de brotações nos explantes *C. pyramidalis* nas concentrações testadas. Sugere-se, portanto, a utilização de outras concentrações TDZ, inclusive concentrações bem menores que as testadas, de modo a estabelecer-se um balanço hormonal ideal para a proliferação de brotos em catingueira, pois de acordo com Graça et al. (2001), o TDZ por ser mais potente que outras citocininas, as concentrações requeridas são menores que das demais, para se obter resultados similares de multiplicação. No entanto deve-se levar em consideração ainda, que o TDZ é uma citocinina de elevado custo se comparado com o BAP ou a KIN, e que pode ainda apresentar problemas na morfogênese de brotações de lenhosas, como foi verificado em culturas de *Bauhinia cheilantha*, cujas brotações apresentaram-se hiperídricas (GUTIÉRREZ et al., 2011) e em brotos de *Eucalyptus dunnii*, onde foram verificados plantas com aspecto pouco desenvolvidas e atrofiadas, além da formação de calo (GRAÇA et al., 2001).

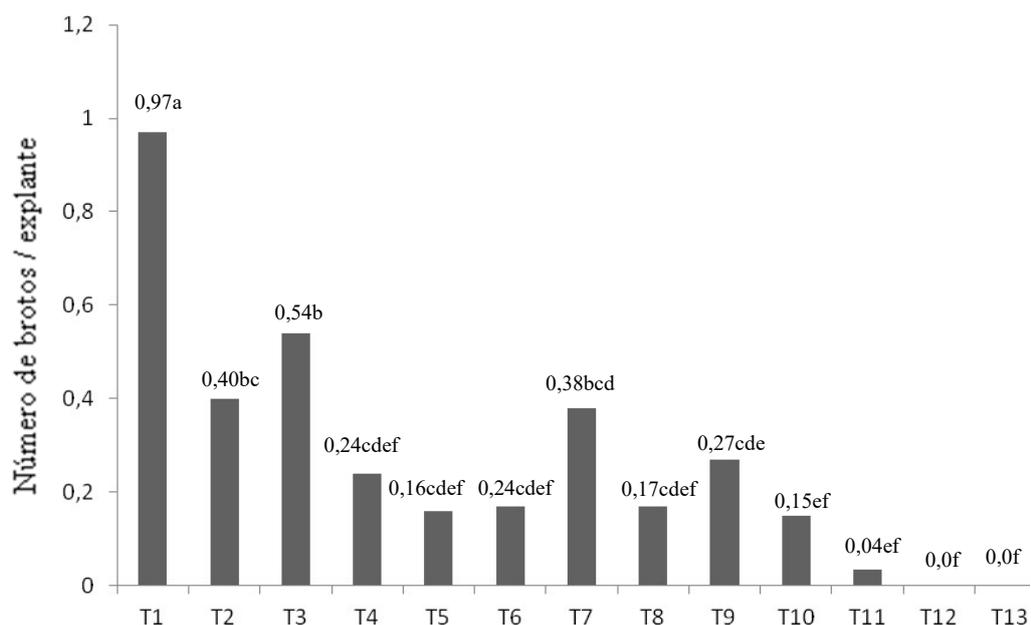


Figura 10: Número de brotos obtidos a partir de segmento nodal de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações e tipos de citocininas. T1 → 0,0 μM de citocinina; T2 → 2 μM de BAP; T3 → 4 μM de BAP; T4 → 8 μM de BAP; T5 → 16 μM de BAP; T6 → 2 μM de KIN; T7 → 4 μM de KIN; T8 → 8 μM de KIN; T9 → 16 μM de KIN; T10 → 1 μM de TDZ; T11 → 2 μM de TDZ; T12 → 4 μM de TDZ e T13 → 6 μM de TDZ. Médias Médias seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste F. Feira de Santana, 2012.

Ao avaliar os tratamentos contendo a citocinina BAP ou KIN também se registrou uma queda significativa no número de brotos à medida que se aumentaram as concentrações

dessas citocininas, sendo que, ao comparar-se o meio de cultura suplementado com BAP e KIN, as maiores médias para número de brotos foram observadas com o segmento nodal em meio incrementado com BAP ao invés de KIN (Figura 10). O efeito benéfico do BAP na multiplicação de brotações relaciona-se com a influência deste regulador de crescimento na divisão celular e na liberação das gemas axilares inibidas pela dominância apical, sendo ainda esta citocinina muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies lenhosas (CORDEIRO et al., 2004). No entanto, para a catingueira a presença de BAP no meio de cultura, nas concentrações testadas, não se mostrou eficiente para a proliferação de brotos, sendo registrado um declínio significativo para taxa de multiplicação dos explantes à medida que se adicionou esta citocinina no meio de cultura.

Diferente do que foi observado para a catingueira, concentrações maiores de BAP tem sido usadas para a proliferação de brotos em algumas espécies lenhosas com resultados satisfatórios, como foi registrado para *Balanites aegyptiaca* (ANIS et al., 2010) e *Searsia dentata* (PRAKASK; VAN STADEN, 2008), cujas concentrações superiores ou iguais a 10 μ M, apresentaram resultado satisfatório para multiplicação *in vitro*. Por outro lado, o uso de concentrações menores de BAP também tem sido indicado para espécies lenhosas, como *Caesalpinia echinata* (ARAGÃO et al., 2011), *Melia azedarach* (HUSAIN e ANIS, 2009), *Maclura tinctoria* (GOMES et al., 2010) e *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO et al., 2008).

De com Schuch e Erig (2005), as concentrações de citocininas para a multiplicação *in vitro*, estão entre a faixa de 0,44 e 22,2 μ M. Desse modo, esses resultados indicam que é necessário testar outras citocininas, ou até mesmo outras concentrações das mesmas a fim de estabelecer um balanço hormonal interno, com intuito de aumentar o número de brotos formados.

Ao avaliar-se o número médio de folhas, as concentrações das citocininas utilizadas não se mostraram eficientes, sendo que a maior média registrada (1,63) foi obtida em meio isento das mesmas (Figura 11A). O mesmo comportamento foi constatado para o comprimento e matéria seca da parte aérea, cujas maiores médias (17,9mm e 5,77mg) também foram registradas na ausência de reguladores de crescimento (Figura 11B e 12).

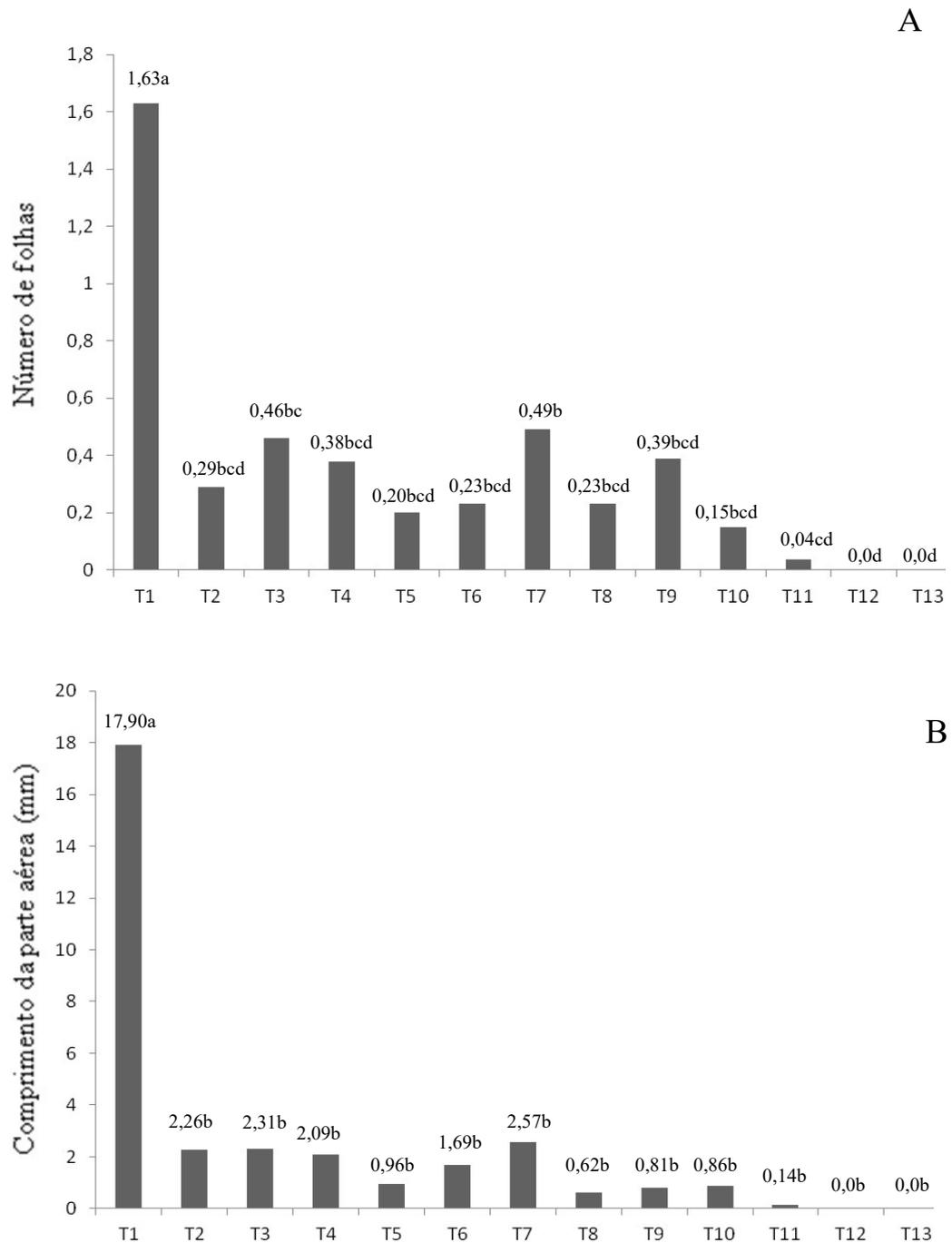


Figura 11: Número de folhas (A) e comprimento da parte aérea (B) obtidos a partir de segmento nodal de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações e tipos de citocininas. T1 → 0,0 μM de citocinina; T2 → 2 μM de BAP; T3 → 4 μM de BAP; T4 → 8 μM de BAP; T5 → 16 μM de BAP; T6 → 2 μM de KIN; T7 → 4 μM de KIN; T8 → 8 μM de KIN; T9 → 16 μM de KIN; T10 → 1 μM de TDZ; T11 → 2 μM de TDZ; T12 → 4 μM de TDZ e T13 → 6 μM de TDZ. Médias Médias seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste F. Feira de Santana, BA 2012.

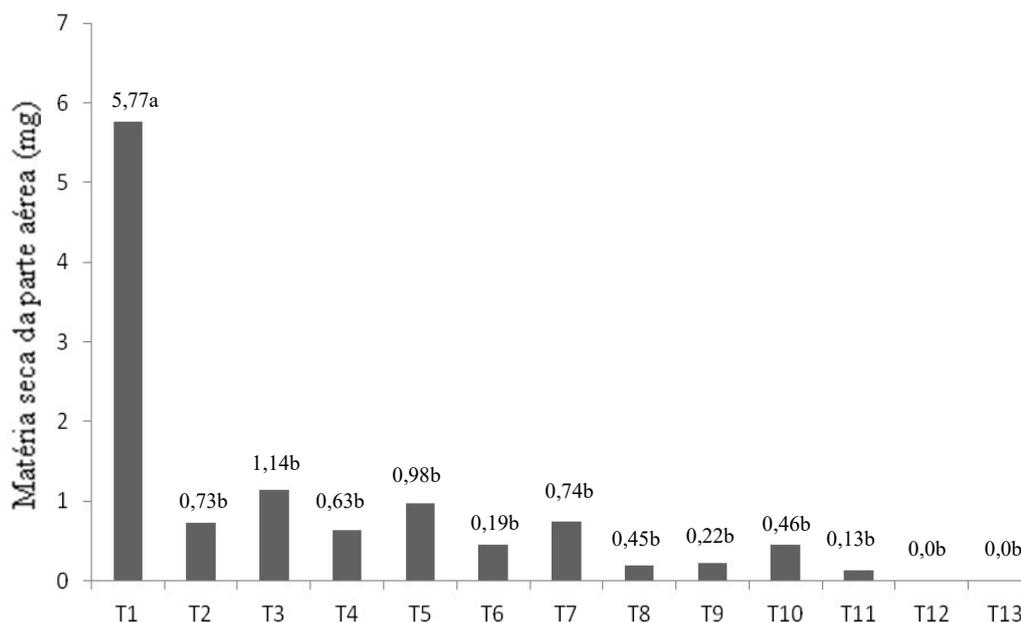


Figura 12: Matéria seca da parte aérea obtidos a partir de segmento nodal de *C. pyramidalis*, aos 45 dias com diferentes concentrações e tipos de citocininas. T1 → 0,0 μ M de citocinina; T2 → 2 μ M de BAP; T3 → 4 μ M de BAP; T4 → 8 μ M de BAP; T5 → 16 μ M de BAP; T6 → 2 μ M de KIN; T7 → 4 μ M de KIN; T8 → 8 μ M de KIN; T9 → 16 μ M de KIN; T10 → 1 μ M de TDZ; T11 → 2 μ M de TDZ; T12 → 4 μ M de TDZ e T13 → 6 μ M de TDZ. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste F. Feira de Santana, BA, 2012.

A baixa taxa de multiplicação *in vitro* encontrada para *C. pyramidalis* corrobora os resultados observados em várias espécies lenhosas como *Luehea divaricata* (1,6 brotos/explantes) (FLÔRES et al., 2011), *Cabralea canjerana* (1,66 brotos/explante) (ROCHA et al., 2007) e *Schizolobium amazonicum* (2,14 brotos/explante) (CORDEIRO et al., 2004).

Pode-se observar a formação de calo na base ou na parte caulinar dos explantes com a adição de concentrações maiores de citocininas (dados não mostrados). A presença de calo na base dos explantes com a utilização de citocininas também foram observadas em culturas de outras espécies lenhosas como *Erythrina velutina*, *Hancornia speciosa* e *Caesalpinia echinata* (COSTA, 2009; SOARES et al., 2007; ARAGÃO et al., 2011).

Para que ocorra a formação de brotos é necessário que no balanço “auxinas x citocininas”, as concentrações de citocininas se sobressaiam; para ocorrer a calogênese a condição é haver um equilíbrio no balanço hormonal (GUERRA; NODARI, 2006), visto que o balanço entre as quantidades de citocininas exógenas e auxinas endógenas variam conforme

o tecido utilizado como explante (BRUNETTA et al., 2006). Dessa forma os resultados encontrados para a catingueira se explicam provavelmente pelo desbalanço hormonal que se estabeleceu, produzindo calo.

CONCLUSÃO

O segmento nodal apresentou-se como o melhor explante na ausência de reguladores de crescimento vegetal, sendo que a presença dos mesmos no meio de cultura, nas concentrações testadas, inibiu a formação de brotos em segmentos nodais, uma vez que apenas o explante segmento cotiledonar demonstrou competência organogênica na presença de 2 μ M de cinetina.

Com a realização desse estudo não foi observada uma taxa de multiplicação satisfatória para catingueira. Dessa forma, sugere-se a realização de novos estudos a fim de se obter um maior número de brotos por explante.

REFERÊNCIAS

AMÉRICO, W. J.; COUTO, M.; QUEZADA, A. C. Multiplicação *in vitro* do Porta- enxerto de almeixeira Julior. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 9, n. 2, p. 121-124, abr/jun. 2003.

ANIS, M.; VARSHNEY, A.; SIDDIQUE, I. In vitro clonal propagation of *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. *Agroforestry Systems*, v. 78, p. 151-158. 2010.

ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. A. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de Pau-brasil. *Cerne*, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, jul./set. 2011.

BAHIA, M. V. et al. Outros Biflavonóides de *Caesalpinia pyramidalis*. In: 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. *Anais*: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. 2005. Disponível em <<http://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T1389-2.pdf>> Acesso em 08 de setembro de 2011.

BALARAJU, K. et al. Micropropagation of *Vitex agnus-castus*, (Verbenaceae)—a valuable medicinal plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant*, Wallingford, UK, v. 44, n. 5, p. 436-441. 2008.

BORCHETIA, S. et al. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.). *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 120, p. 544–550, maio. 2009.

BRUNETTA, J. M. F. C. et al. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n. 71, p. 19-24, ago. 2006.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPACNPH, 1998. v.1. p. 183-260.

CASTRO, P. R. C. *Hormônios Vegetais*. Depto. de Ciências Biológicas/ESALQ-USP. Disponível em <<http://pt.scribd.com/doc/3319812/Hormonios-Vegetais>>. Acesso em 10 de novembro de 2011.

CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). *Cerne*. v. 10, n.1, p. 118-124, jan/jun. 2004.

COSTA, G. M. *Propagação in vitro de Erythrina velutina*. 2009. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA.

COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. *Ciência Rural*, Santa Maria. v. 40, n. 5, p. 1090-1096, maio. 2010.

CURTI, A. R. *Contribuições para a micropropagação de Peltophorum dubium (SPRENGEL) Taubert*. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de

Santa Maria- Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal. Santa Maria, RS.
Disponível em:

<http://www.vsdani.com/ppgef/tesesdissertacoes/8c569aline_ritter_curti_disserta__o_de_mestrado.pdf> Acesso em 20 de novembro de 2011.

DONINI, L. P. et al. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. Arbequina para início da micropropagação. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1769-1772, set. 2008.

DRUMOND, M. A. et al. *Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do Bioma Caatinga: Estratégias para o Uso Sustentável da Biodiversidade da Caatinga*, Petrolina, 2000. 23p
<<http://www.semiarido.org.br/UserFiles/file/Estrategias%20para%20uso%20sustentavel%20da%20caatinga.pdf>> Acesso em: 4 de agosto de 2011.

FAISAL, M.; AHMAD, N.; ANIS, M. Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, v. 80, p. 187-190, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M. Otimização de protocolo para micropropagação da figueira “Roxo de Valinhos” *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1149-1153, jul. 2008.

FERREIRA, G. C.; HOPKINS, M. J. G.; SECCO, R. S. Contribuição ao conhecimento morfológico das espécies de leguminosae comercializadas no estado do Pará, como “angelim”. *Acta Amazônica* v. 34, n. 2, p. 219- 232. 2004.

FLÔRES, A. V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart & Zucc. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, jan./mar, 2011.

FURTADO, C. M. et al. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hipogaea*), utilizando diferentes citocininas. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. v. 7, n. 1, p. 51- 58, 2007.

GOMES, G. A. C. et al. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered Woody species. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v. 34, n. 1, p. 25-30, jan./fev. 2010.

GONZALEZ, M. G. N.; PÍPOLO, V. C.; MALAQUIDO, A. B. Influência da consistência física do meio no enraizamento de estacas de aceroleira (*Malpighia emarginata*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. *Anais*. Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1994. p. 80.

GRAÇA, M. E. C. et al. Efeito das citocininas benzilaminopurina e thidiazuron, na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. *Boletim de Pesquisa Florestal*. n. 43, p. 107-112. 2001.

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, 1998, p. 183-260.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. *Apostila de biotecnologia*. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41 p. disponível em <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em 15 de agosto de 2011.

GUTIÉRREZ, I. E. M. de et al. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41 n. 2, p. 260-265, fev. 2011.

HUSAIN, M. K.; ANIS, M. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). *Acta Physiologiae Plantarum*. v. 31, n. 4, p. 765-772. 2009.

KANG, B. et al. Micropropagation of *Populus trichocarpa* ‘Nisqually-1’: the genotype deriving the *Populus* reference genome. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 251-257, dez. 2009.

KERBAUY, G. B. *Fisiologia vegetal*. Ed. Guanabara Koogan, 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2008. 431p.

KIELSE, P. et al. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1098-1104, jul. 2009.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*. v. 60, v. 4, 197-214. 1981.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 105, p. 137-147. 2006.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendronn* ssp. *HortScience*, Alexandria, v.15, n. 3, p.416-420, Jun. 1980.

LU, C. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, v.29, p.92-96, 1993.

MAIA, G. N. *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. Ed. Leitura & Arte, São Paulo, 2004. 413 p.

MATALLO JÚNIOR, H.A desertificação no Brasil. In: OLIVEIRA, T.S. et al. (Ed.). *Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido*. Fortaleza: UFC, 2000. p.89-113.

MOK, M. C. et al. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*. v. 22, n. 6, p. 1194-1197. 1987.

NASCIMENTO, A. C. et al. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): Efeitos do BAP e AIB. *Revista Verde*, Mossoró – RN – Brasil, v. 3, n. 2, p. 20-26 de abr./jun. 2008.

NICIOLI, P. M. et al. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 685-689, maio/jun. 2008.

OLIVEIRA, A. J. B. et al. In vitro multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). *Revista Árvore*, v. 27, n. 4, p. 421-425. 2003.

OLIVEIRA, L. M. O. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 33, n. 2 p. 289 – 298. 2011.

PRAKASH, S.; STADEN, J. V. Micropropagation of *Searsia dentata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 44, n. 4, p. 338–341. 2008.

PURKAYASTHA, J. et al. Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: a valuable medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 44, n. 5, p. 442-447. 2008.

ROCHA, S. C. et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. *Revista Árvore*. v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

SANTOS, M. R. A. *Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em Smilax japecanga Grisebach*. 1998. 81f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. *Propagação de plantas frutíferas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

SHAIK, N. M. et al. Improved method of *in vitro* regeneration in *Leucaena leucocephala* – a leguminous pulpwood tree species. *Physiology and Molecular Biology of Plant*. v. 15, n. 4, p. 311-318, out. 2009.

SILVEIRA, C. A. P.; CITADIN, I.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* do Porta – enxerto de macieira M-7 (*Malus sp.*) sob diferentes tipos e concentrações de auxinas. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.7 n. 2, p. 107-109, maio/ago. 2001.

SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

SOUSA, C. et al. Germinação e Indução de Brotações *in vitro* Utilizando Diferentes Reguladores Vegetais em Mangabeira (*Hancornia speciosa*) *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 276-278, jul. 2007.

SOUZA, A. V. et al. Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Grised. *Ciência agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 1, p. 92-98, jan./fev. 2011.

SOUZA, J. A. et al. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.7, p. 2046-2048, out. 2008.

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

VIEIRA, E. L. et al. *Manual de Fisiologia Vegetal*. São Luis: EDFMA. 2010. 230p. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=enZO_IITcvMC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em 8 de fev. de 2012.

VIEITEZ, A. M. et al. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 135–145, 2009.

CAPÍTULO 2

Conservação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* Tul.

RESUMO

Caesalpinia pyramidalis Tul. é uma árvore endêmica da Caatinga, conhecida popularmente como catingueira, sendo bastante utilizada na medicina popular no tratamento de hepatite, anemia, infecções catarrais e diarreias. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da redução do potencial osmótico do meio de cultura e a utilização do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ) na conservação *in vitro* de *C. pyramidalis*. No primeiro experimento, plântulas com sete dias foram inoculadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de sacarose (87,64; 131,46; 175,28 e 219,10mM) combinadas com concentrações (0,0 e 87,64mM) de sorbitol ou manitol. No segundo experimento, plântulas com sete dias foram inoculadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações (0,0, 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 μ M) de PBZ. Em todos os experimentos foi utilizado o meio de cultura WPM, acrescido por 87,64mM de sacarose (exceto para os tratamentos contendo concentrações superiores de sacarose) e solidificado com 7g.L⁻¹ de ágar. A porcentagem de sobrevivência das plantas foi avaliada bimestralmente e ao final de 240 dias foram analisados: número de folhas verdes e foliólulos senescentes, comprimento da parte aérea e da maior raiz, o número de raízes, matéria fresca e matéria seca da parte aérea e matéria fresca e seca das raízes. A utilização dos agentes osmóticos sorbitol e manitol não se mostraram eficientes na conservação *in vitro* de catingueira, sendo indicada para esse propósito as concentrações de 219,10mM de sacarose e 6,0 μ M de PBZ por até 240 dias sem subcultivos.

Palavras-chave: Agente osmótico. Retardante de crescimento. Crescimento mínimo.

ABSTRACT

Caesalpinia pyramidalis Tul. is a tree endemic to the Caatinga, known popularly as catingueira, being widely used in folk medicine to treat hepatitis, anemia, catarrhal infections and diarrhea. This study aimed to evaluate the effect of reducing the osmotic potential of the culture medium and the use of growth retardant paclobutrazol (PBZ) on *in vitro* conservation of *C. pyramidalis*. In the first experiment, seedlings were inoculated with seven days in culture medium supplemented with different concentrations of sucrose (87.64, 131.46, 175.28 or 219.10 mM) combined with concentrations (0.0 or 87.64 mM) sorbitol or mannitol. In the second experiment, seedlings with seven days, were inoculated in culture medium containing different concentrations (0.0; 1.5; 3.0; 4.5 or 6.0 μ M) of PBZ. In all experiments was used WPM plus a 87.64 mM sucrose (except for the treatments containing higher concentrations of sucrose) and solidified with agar 7g.L⁻¹. The percentage of plant survival was evaluated every two months and the end of 240 days were analyzed: number of green leaves and senescent leaves, shoot length and the largest root, root number, fresh and dry matter of aerial part and fresh and dried roots. The use of osmotic agents sorbitol and mannitol were not effective in *in vitro* conservation catingueira and was recommended for this purpose the concentration of 219.10mM sucrose and 6.0 μ M of PBZ for up to 240 days without subculture.

Keywords: osmotic agent. Growth retardant. Minimum growth.

2.1 INTRODUÇÃO

Caesalpinia pyramidalis Tul pertence à família Leguminosae e subfamília Caesalpinaceae, sendo conhecida popularmente como catingueira, pau-de-rato, catingueira-das-folhas-largas, mussitaíba e pau-de-porco (MAIA, 2004). É uma árvore de porte médio endêmica do semiárido nordestino e de ampla dispersão (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia) no bioma Caatinga (SAMPAIO, 2002; MAIA, 2004; BAHIA et al., 2005).

A catingueira é uma planta que vegeta em lugares pedregosos, sendo um exemplo de espécie de usos múltiplos, visto que possui potencial madeireiro, forrageiro e ecológico, além de ser bastante utilizada na medicina popular (SALVAT et al., 2004). As infusões feitas com suas flores, folhas e cascas são usadas no tratamento de febres, hepatite, anemia, infecções catarrais, diarréias, doenças estomacais e como diuréticos. A espécie é também usada como lenha, carvão, estacas, mourões, na construção de casas de taipa e pode ser utilizada para produção de álcool combustível e coque metalúrgico. A cinza de sua madeira possui elevado teor de potássio e é usada para fabricação de sabão (MAIA, 2004).

C. pyramidalis possui uma variedade de biflavonóides, flavonóides, triterpenos e fenilpropanóides, sendo que a presença de biflavonóides na família Leguminosae é relativamente rara e, na subfamília Caesalpinaceae nunca havia sido relatada anteriormente (BAHIA et al., 2005). De acordo com Lima et al. (2006), a catingueira possui ação antibacteriana, cujo extrato etanólico tem sido usado contra linhagens resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A grande pressão no consumo tanto de suas folhas, flores, cascas e principalmente da madeira, que provoca a retirada de toda a planta, ameaça a estabilidade populacional da catingueira. Fato este, que faz surgir atualmente a necessidade de estratégias para sua multiplicação, conservação e manejo sustentável (TEIXEIRA et al., 2007). Dentro desse contexto, a cultura de tecidos vegetais surge como uma alternativa para minimizar os impactos causados pela exploração sem controle das espécies, que pode direcioná-las para a extinção.

A cultura de tecidos envolve um grupo heterogêneo de técnicas que abrange métodos de propagação e conservação de germoplasma. A manutenção de coleções *in vitro* tem sido considerada como um método alternativo à conservação de germoplasma (SANTOS et al., 2011) que garante a manutenção da biodiversidade, visto que possibilitam a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre das intempéries e riscos que

existem no campo, reduz os custos, garante a manutenção da fidelidade genética, além de facilitar a disponibilidade de material para o melhoramento genético (FARIA et al., 2006). Uma vez que, a estocagem de plantas *in vitro* permite um fluxo contínuo de produção em todas as épocas do ano, e possibilita a produção de plantas a partir de órgãos já desenvolvidos o que, em geral, não é conseguido em condições naturais de campo (BERTONI et al., 2006).

Assim, as técnicas de conservação *in vitro* constituem-se em métodos valiosos para a conservação de recursos genéticos vegetais (HARDING et al., 1997), principalmente de espécies com potencial econômico muito explorado. A conservação de germoplasma *in vitro* pode ser feita a partir de mudanças no ambiente de cultivo visando desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos (WITHERS; WILLIAMS, 1998) de forma a aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, ou estendê-los indefinidamente, reduzindo-se assim a mão-de-obra e o espaço necessário para a sua conservação, além de proporcionar acesso imediato a todo o germoplasma da coleção (GUERRA; POMPELLI, 2011).

O crescimento lento das culturas tem sido utilizado com sucesso e consiste em reduzir drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade, pela indução de estresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardantes de crescimento ou diminuindo a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (WITHERS; WILLIAMS, 1998). Os agentes osmóticos, tais como manitol, sorbitol, sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993).

Os retardantes de crescimento vegetal são compostos sintéticos que reduzem o alongamento do caule, sem mudar os padrões de desenvolvimento ou causar fitotoxicidade. Esse processo ocorre com a redução do alongamento das células e com a redução da taxa de divisão celular (SELEGUINI, 2007). Dentre esses retardantes de crescimento, tem-se o paclobutrazol (PBZ), um triazol que inibe a biossíntese das giberelinas diminuindo o desenvolvimento das plantas (SILVA, 2008), pois segundo Taiz e Zeiger (2004) as giberelinas aumentam o alongamento e a divisão celular, o que é evidenciado pelo aumento no comprimento e número de células em resposta à aplicação desse hormônio. O PBZ pode também alterar os níveis de ácido abscísico (ABA), etileno, citocininas e auxinas (FLETCHER et al., 2000; DAVIS; CURRY, 1991).

Sendo assim, o cultivo *in vitro* de espécies vegetais possibilita a recuperação de plantas com potenciais muito explorados, e dessa forma, suscetíveis ao risco de extinção.

Considerando que a utilização da catingueira, principalmente para a exploração de sua madeira, requer a extração da árvore, a qual necessita, muitas vezes de muito tempo para se desenvolver, o que pode levar esta espécie a extinção.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de agentes osmóticos e do retardante de crescimento paclobutrazol na conservação *in vitro* de *C. pyramidalis*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

2.2.2 Meio de cultura e inoculação

O meio de cultura utilizado em todos os ensaios foi o WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), suplementado com 87,64mM de sacarose (exceto quando indicado para os tratamentos contendo concentrações superiores de sacarose) e solidificado com 7g.L⁻¹ de ágar (Himedia®). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N, antes da autoclavagem. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (25x150 mm) vedados com tampa plástica e esterilizados por autoclavagem durante 15 min à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm.

As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica e os recipientes fechados com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC).

2.2.3 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de *C. pyramidalis* coletadas na região de Retirolândia-BA, armazenadas em geladeira sob temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ no LCTV.

2.2.4 Efeito dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol na conservação *in vitro* de *C. pyramidalis*

Plântulas com sete dias de idade oriundas da germinação de sementes em meio de cultura, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio suplementados com diferentes potenciais osmóticos ($\Psi_o = -0,2170; -0,3255; -0,4340; -0,651; -0,434; -0,5425$ e $-0,868$ MPa) obtidos através da utilização dos agentes osmóticos sacarose (Sac), sorbitol (Sorb) e manitol (Man). Sendo que diferentes concentrações de sacarose (87,64; 131,46; 175,28 e 219,10mM) foram combinadas com concentrações de sorbitol (0,0 e 87,64mM) ou manitol (0,0 e 87,64mM), constituindo os tratamentos dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos utilizados na conservação *in vitro* de *C. pyramidalis* com diferentes potenciais osmóticos obtidos a partir de distintas concentrações dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol ou manitol. Feira de Santana, BA. 2012.

Tratamentos	Concentração dos agentes osmóticos (mM)			Potencial osmótico – Ψ_o (MPa)
	Sacarose	Sorbitol	Manitol	
AG 1	87,64	0,0	0,0	-0,2170
AG 2	131,46	0,0	0,0	-0,3255
AG 3	175,28	0,0	0,0	-0,4340
AG 4	219,10	0,0	0,0	-0,6510
AG 5	87,64	87,64	0,0	-0,4340
AG 6	131,46	87,64	0,0	-0,5425
AG 7	175,28	87,64	0,0	-0,6510
AG 8	219,10	87,64	0,0	-0,8680
AG 9	87,64	0,0	87,64	-0,4340
AG 10	131,46	0,0	87,64	-0,5425
AG 11	175,28	0,0	87,64	-0,6510
AG 12	219,10	0,0	87,64	-0,8680

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez repetições e oito tubos por repetição. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada bimestralmente, constituindo o fatorial “tempo de cultivo x concentração do agente osmótico” e ao final de 240 dias foram analisadas: o número de folhas verdes, comprimento da parte aérea, número

de foliólulos senescentes, comprimento da maior raiz, a matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes.

2.2.5 Efeito de diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ) na conservação *in vitro* de *C. pyramidalis*

Plântulas com sete dias de idade, oriundas da germinação de sementes em meio de cultura, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio suplementados com diferentes concentrações (0,0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 μ M) de PBZ.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições, cada uma constituída por 10 parcelas experimentais (tubos).

A porcentagem de sobrevivência foi avaliada bimestralmente constituindo o fatorial “tempo de cultivo x concentração de PBZ” e ao final de 240 dias, avaliou-se: o número de folhas verdes, comprimento da parte aérea, número de foliólulos senescentes, comprimento da maior raiz, a matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes.

2.2.6 Condições experimentais

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ obtidas através de lâmpadas branca fluorescentes.

2.2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente, mediante a análise de variância, sendo que os dados de porcentagem foram submetidos à transformação em arco-seco $\sqrt{\frac{y}{100}}$. Quando o valor de “F” foi significativo, as médias dos tratamentos qualitativos foram submetidas à comparação de médias por meio do teste de Tukey e as médias de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Efeito dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol na conservação *in vitro* de *C. pyramidalis*

De acordo com a análise de variância, a interação “tempo de cultivo x concentração dos agentes osmóticos” apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para a porcentagem de sobrevivência das plantas de *C. pyramidalis* (Tabela 2).

Tabela 2: Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência bimestral em função de diferentes concentrações dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol durante 240 dias de *C. pyramidalis*. Feira de Santana, BA. 2012.

FV	GL	Quadrados médios
Tratamento(T)	11	0,89**
Tempo(t)	3	16,49**
Txt	33	0,18**
Residuo	240	0,02
CV(%)		13,75

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Dados transformados em arco-seno $\sqrt{\frac{y}{10}}$.

Ao analisar as demais variáveis, observou-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) dos tratamentos para comprimento da parte aérea, matéria fresca e seca da parte aérea, matéria fresca e seca das raízes e comprimento da maior raiz; e efeito significativo ($p < 0,05$) para as variáveis número de folhas verdes e número de foliólulos senescentes (Tabela 3).

Tabela 3: Resumo da análise de variância para número de folhas verdes (NFV), comprimento da parte aérea (CPA) e número de foliólulos senescentes aos 240 dias de plantas de *C. pyramidalis* submetidas a diferentes concentrações dos agentes osmóticos sacarose, manitol e sorbitol. Feira de Santana, BA. 2012.

FV	GL	Quadrados médios							
		NFV	CPA	NFS	MFPA	MFR	MSPA	MSR	CR
Tratamento	11	3,46*	2755,7**	570,6*	63643,3**	115609,7**	6652,5**	6235,2**	3027,9**
Resíduo	60	1,47	353,4	243,5	7196,8	29196,1	1005,2	1662,9	968,3
CV(%)		57,27	23,0	51,8	24,5	51,9	23,3	50,3	39,9

*,**significativo ao nível de 5% de probabilidade; altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste F, respectivamente.

Para a porcentagem de sobrevivência, foi constatada uma tendência linear decrescente ao longo do tempo para todos os tratamentos testados, exceto para AG2 (131,46mM Sac) e

AG5 (87,64mM Sac + 87,64mM Sorb), nos quais foi obtido comportamento quadrático ($p < 0,01$) (Figura 1). Após 240 dias a maior taxa de sobrevivência (77,78%) foi observada no tratamento AG3 (175,28mM Sac), seguido do tratamento AG4 (219,10mM Sac), no qual foi verificado 72,78% de plantas vivas (Figura 1). Esses resultados são inferiores aos observados por Ledo et al. (2007), em trabalhos de conservação *in vitro* de *Cocos nucifera* usando agentes osmóticos, onde foi registrado 100% de sobrevivência ao final de 365 dias, em meio contendo 116,85 e 175,28mM de sacarose.

Os menores valores médios (14,39; 17,26; 24,6 e 25,56%) para porcentagem de sobrevivência foram obtidos em meio contendo sorbitol ou manitol. O que representou uma redução significativa quando comparado com os meios suplementados apenas com sacarose (Figura 1), demonstrando dessa forma que a adição dos agentes osmóticos sorbitol e manitol no meio de cultura nas concentrações testadas influenciaram de forma direta no declínio da taxa de sobrevivência da espécie em estudo. O tratamento AG5 possui o mesmo potencial osmótico (-0,4340MPa) do tratamento AG3, assim como os tratamentos AG7 (175,28mM Sac + 87,64mM) e AG11 (175,28mM Sac + 87,64mM Man), possuem o mesmo potencial osmótico do tratamento AG4 (-0,6510 MPa), comprovando dessa forma, que o tipo de agente osmótico influenciou diretamente na taxa de sobrevivência das plantas de catingueira.

Efeitos fitotóxicos dos agentes osmóticos sorbitol e manitol também foram relatados por Lemos et al. (2002) e Sá et al. (2011) em culturas de *Saccharum officinarum*, e *Hancornia speciosa*, respectivamente. Fortes e Pereira (2001) observaram um decréscimo significativo na sobrevivência de plantas de *Solanum tuberosum* na presença de manitol, obtendo somente 37,36% de plantas vivas ao final de 270 dias de cultivo, tendo uma redução de 103,43% se comparado aos 76% de sobrevivência obtida na utilização apenas da sacarose. Comportamento similar foi relatado por Silva e Scherwinski-Pereira (2011) que também observaram redução na taxa de sobrevivência de plantas de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* na presença de manitol. Já Santos et al. (2011) registraram efeito nocivo da maior concentração testada de sorbitol (219,65mM) em plantas de *Hancornia speciosa*.

Os açúcares sorbitol e manitol pertencem ao grupo dos açúcares álcool que geralmente não são metabolizados pelas plantas, sendo empregados para a redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (GEORGE, 2008). Contudo, dependendo da concentração ou espécie em estudo, os mesmos podem ter efeito fitotóxico, como foi observado para a *C. pyramidalis*.

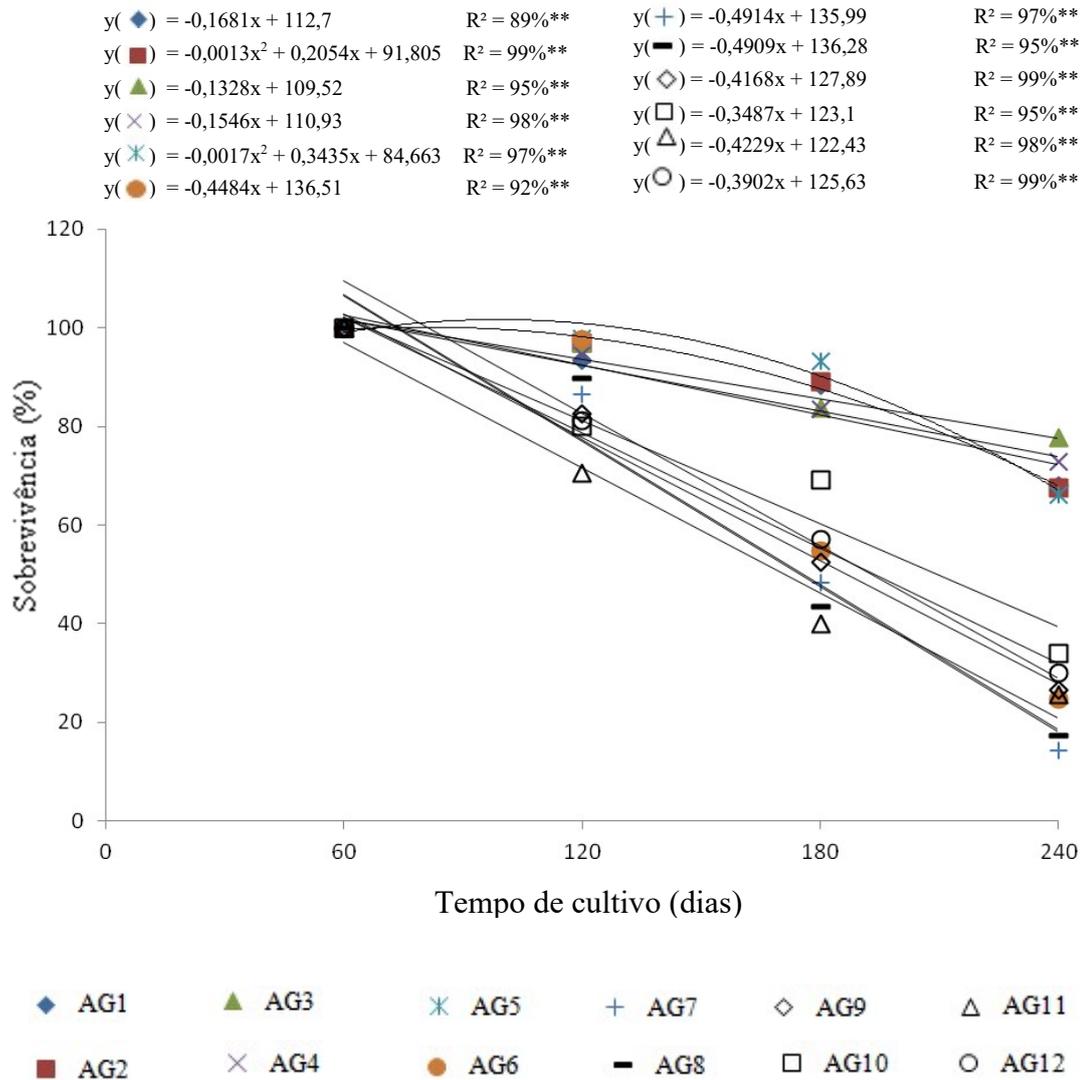


Figura1: Porcentagem de sobrevivência de plantas de *C. pyramidalis* ao longo do tempo, submetidas a diferentes concentrações dos agentes osmóticos sacarose (Sac), sorbitol (Sorb) e manitol (Man). AG1→ 87,64mM Sac; AG2→ 131,46mM Sac; AG3→175,28mM Sac; AG4→219,10mM Sac; AG5→ 87,64mM Sac+ 87,64mM Sorb; AG6→ 131,46mMSac+87,64mM Sorb; AG7→ 175,28mM Sac + 87,64mM Sorb; AG8→ 219,10mM Sac + 87,64mM Sorb; AG9→87,64mM Sac + 87,64mM Man; AG10→ 131,46mMSac+87,64mM Man; AG11→ 175,28mM Sac + 87,64mM Man; AG12→ 219,10mM Sac + 87,64mM Man. Feira de Santana, BA. 2012.

Diferente do que foi observado para catingueira, Ledo et al. (2007) registraram uma queda de 151,26% na taxa de sobrevivência de *C. nucifera* ao final de 365 dias na presença da maior concentração (233,70mM) de sacarose testada, em relação às concentrações menores. Segundo os mesmo autores, o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura provavelmente promoveu um efeito depressivo no metabolismo das plântulas, o que possivelmente levou a uma redução da sobrevivência. A sacarose é o carboidrato mais

utilizados nos meios nutritivos, suportando as mais altas taxas de crescimento na maioria das culturas (PASQUAL et al., 2002), no entanto em altas concentrações pode reduzir o crescimento das plantas através da redução da disponibilidade de água no meio de cultura, o que pode representar um característica positiva para trabalhos de conservação *in vitro* a depender da espécie em estudo.

Em relação à variável número de folhas verdes, foi averiguado que nos tratamentos suplementados com a combinação de sacarose com sorbitol ou manitol, houve uma redução significativa no número médio de folhas verdes por planta (Figura 3A), sendo influenciada diretamente pelo aumento na concentração total de carboidratos no meio, visto que, as menores médias (0,58; 1,25 e 1,67) foram observadas nas maiores concentrações dos agentes osmóticos combinados, exceto para o tratamento AG10 (131,46mM Sac+87,64mM Man), que juntamente com o AG2 (131,46mM Sac) apresentaram as maiores médias (3,10) (Figura 3A). Esses resultados corroboram Faria et al. (2006), que também registraram o menor número de folhas em *Passiflora giberti* em altas concentrações de carboidratos combinados.

Foi observado um decréscimo no comprimento da parte aérea em resposta ao aumento da concentração dos agentes osmóticos, onde os maiores valores (119,9 e 110,8mm) foram encontrados nos tratamentos contendo 87,64mM de sacarose (AG1) e 87,64mM de sacarose combinado com 87,64mM de manitol (AG9), respectivamente; ao passo que os menores valores (53,7; 58,9 e 54,5mm) foram verificados nos tratamentos AG7 (175,28mM Sac + 87,64mM Sorb), AG10 (131,46mM Sac + 87,64mM Man) e AG12 (219,10mM Sac + 87,64mM Man), respectivamente (Figura 3B). A adição de manitol ou sorbitol em combinação com a sacarose mostrou-se eficiente na redução do crescimento de plantas de catingueira, concordando com os resultados obtidos para *Cocos nucifera* e *Hancornia speciosa* (LÉDO et al., 2007; SÁ et al., 2011).

No entanto, apesar da redução nos valores médios observados para o comprimento de plantas de *C. pyramidalis*, uma variável de suma importância em trabalhos de conservação *in vitro*, a utilização do manitol e sorbitol nas concentrações testadas combinadas com as concentrações mais altas de sacarose, não se mostraram eficazes nesse propósito, visto que aos 240 dias, foi constatado aspecto sem vigor, e plantas mal desenvolvidas sem crescimento regular da parte aérea (Figura 2).

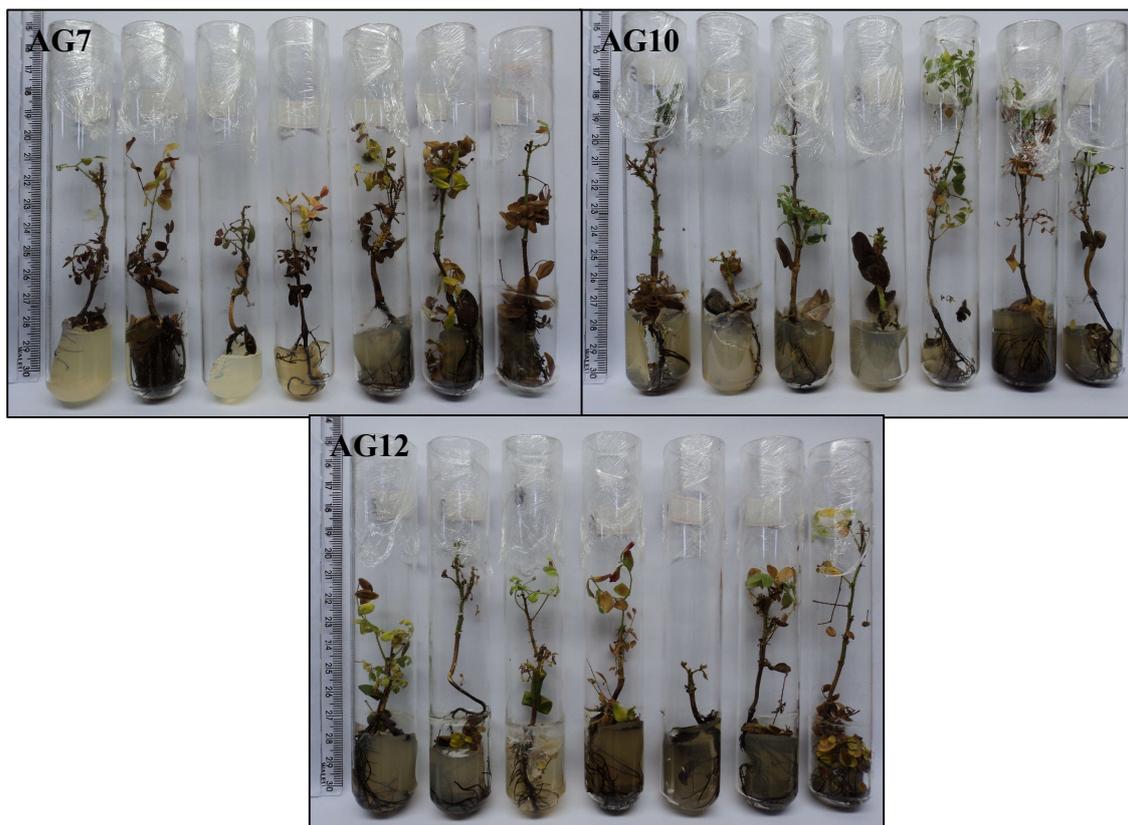


Figura 2: Aspecto das plantas vivas de *C. pyramidalis* Tul. aos 240 dias submetidas a diferentes concentrações do agente osmótico sacarose (Sac), sorbitol (Sorb) e manitol (Man). AG7→ 175,28mM Sac + 87,64mM Sorb; AG10→ 131,46mMSac + 87,64mM Man; AG12→ 219,10mM Sac + 87,64mM Man. Feira de Santana, BA. 2012.

Para número de foliólulos senescentes, observou-se também, a influência da concentração total de carboidratos no meio de cultura, visto que o maior número (47,0) de foliólulos senescentes foi registrado no tratamento AG9 (87,64mM Sac + 87,64mM Man) seguido do tratamento AG1 (87,64mM sac), cuja média foi de 43,5 (Figura 3). Já as menores médias (15,9 e 15,2) foram verificadas nos tratamento AG4 (219,10mM Sac) e AG12 (219,10mM sac + 87,64mM Man), respectivamente (Figura 4). Entretanto, as plantas oriundas do tratamento AG12 não apresentaram aspecto desenvolvido, com grande parte das plantas atrofiadas, não sendo interessante para o cultivo *in vitro* (Figura 2). Sá et al. (2011) observaram a redução da abscisão foliar com a utilização de altas concentrações de manitol em culturas de *Hancornia speciosa*, embora tenha sido evidenciado seu efeito deletério ao explante. Diferente do que foi observado para a catingueira no presente estudo, Santos et al. (2011) em trabalhos de conservação com *H. speciosa* observaram que a presença de sacarose no meio de cultura foi um fator que elevou a abscisão foliar. De acordo com os mesmos autores, possivelmente a disponibilização de uma fonte de carbono no meio de cultura

aumentou o metabolismo e desenvolvimento *in vitro*, já que esta é um carboidrato prontamente disponível, o que conseqüentemente aumentou o acúmulo no microambiente do etileno.

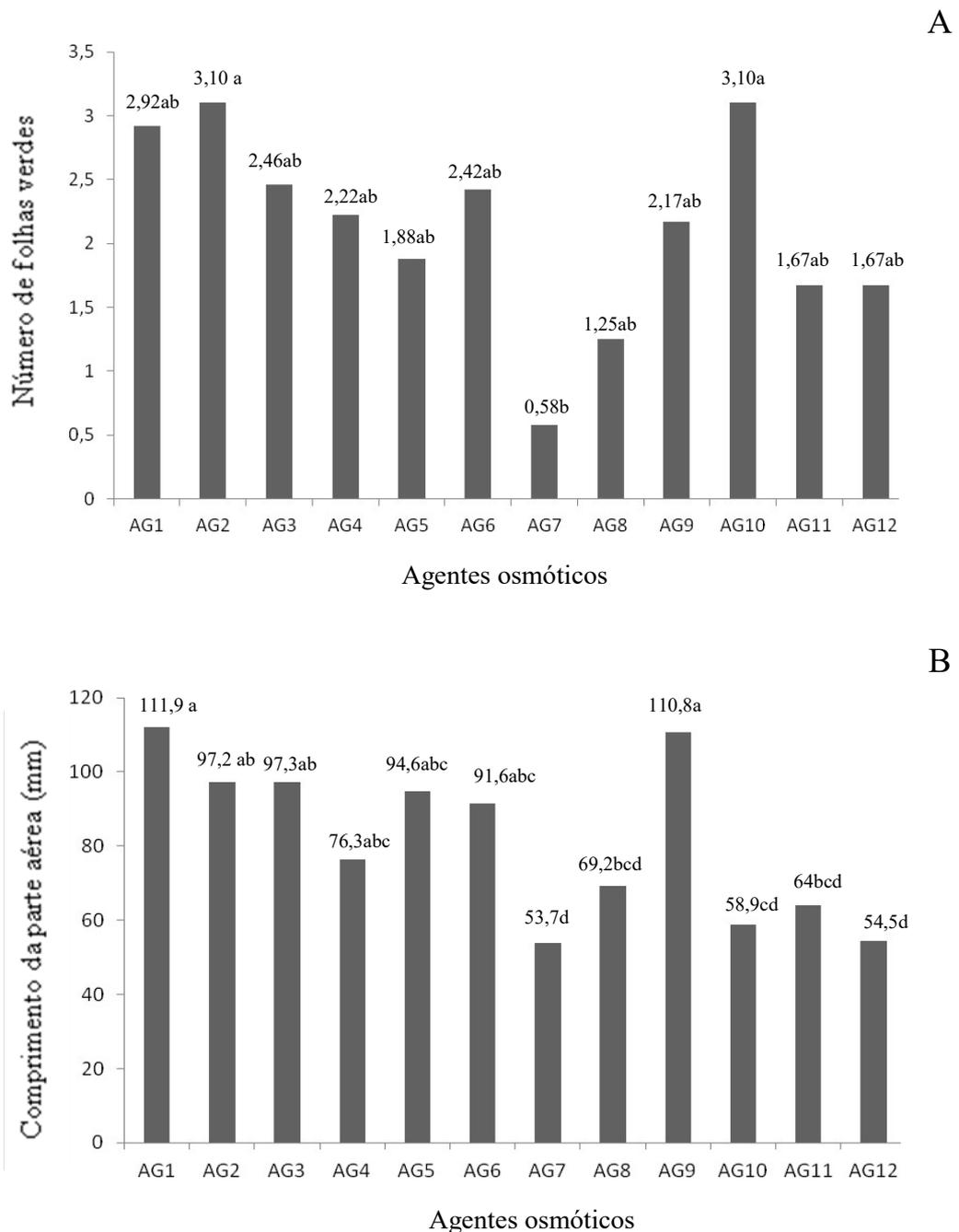


Figura 3: Número de folhas verdes (A) e comprimento da parte aérea (B) de plantas de *C. pyramidalis*, aos 240 dias, submetidas a diferentes concentrações do agente osmóticos sacarose (Sac), sorbitol (Sorb) e manitol (Man). AG1→ 87,64mM Sac; AG2→ 131,46mM Sac; AG3→175,28mM Sac; AG4→219,10mM Sac; AG5→ 87,64mM Sac+ 87,64mM Sorb; AG6→ 131,46mMSac+87,64mM Sorb; AG7→ 175,28mM Sac + 87,64mM Sorb;AG8→ 219,10mM Sac + 87,64mM Sorb; AG9→87,64mM Sac + 87,64mM Man; AG10→ 131,46mMSac+87,64mM Man; AG11→ 175,28mM Sac + 87,64mM Man; AG12→ 219,10mM Sac + 87,64mM Man. Feira de Santana, BA. 2012.

O etileno é um hormônio gasoso, cujo aumento está associado à perda de clorofilas e ao desaparecimento gradual da cor, que são aspectos característicos da senescência de folhas (ALVARENGA et al., 2012) culminando no processo de abscisão foliar, visto que o etileno enfraquece as células a tal ponto, que o peso da folha é suficiente para romper sua ligação com o caule, assim a folha se destaca e cai (DANTAS, 2012). Segundo Canto et al. (2009), a condição de senescência é indesejável *in vitro*, principalmente quando se objetiva a conservação de germoplasma, porque envolve a realização de um novo subcultivo, para que a planta possa recuperar seu vigor e não tenha sua capacidade de regeneração comprometida.

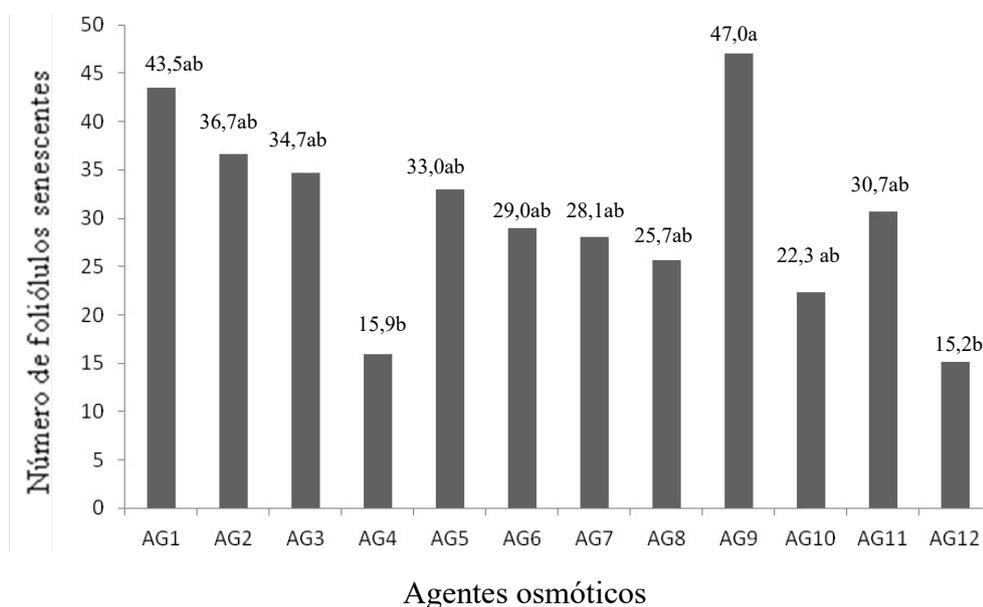


Figura 4: Número de foliólulos senescentes de plantas de *C. pyramidalis*, aos 240 dias, submetidas a diferentes concentrações do agente osmóticos sacarose (Sac), sorbitol (Sorb) e manitol (Man). AG1 → 87,64mM Sac; AG2 → 131,46mM Sac; AG3 → 175,28mM Sac; AG4 → 219,10mM Sac; AG5 → 87,64mM Sac + 87,64mM Sorb; AG6 → 131,46mM Sac + 87,64mM Sorb; AG7 → 175,28mM Sac + 87,64mM Sorb; AG8 → 219,10mM Sac + 87,64mM Sorb; AG9 → 87,64mM Sac + 87,64mM Man; AG10 → 131,46mM Sac + 87,64mM Man; AG11 → 175,28mM Sac + 87,64mM Man; AG12 → 219,10mM Sac + 87,64mM Man. Feira de Santana, BA. 2012.

Ao analisar a variável comprimento da maior raiz, também foi constatada uma redução nos valores médios da mesma, com o aumento da concentração total dos carboidratos no meio de cultura, de forma que as menores médias (44,5; 57,0 e 51,0mm) foram averiguadas nos tratamentos AG7 (175,28mM Sac + 87,64mM Sorb), AG11 (175,28mM Sac + 87,64mM Man) e AG12 (219,10mM Sac + 87,64mM Man), respectivamente (Figura 5). A diminuição no comprimento da maior raiz de *C. pyramidalis* em função da redução do potencial osmótico

do meio de cultura, corrobora os resultados obtidos por Léo et al. (2007) em plantas de *C. nucifera* conservadas *in vitro* com a utilização de concentrações maiores de manitol (300 e 400mM). Entretanto, os mesmos autores relataram que nestas concentrações foi observada a necrose das culturas com redução na sobrevivência das plântulas, comportamento que também foi verificado em *C. pyramidalis* (Figura 1).

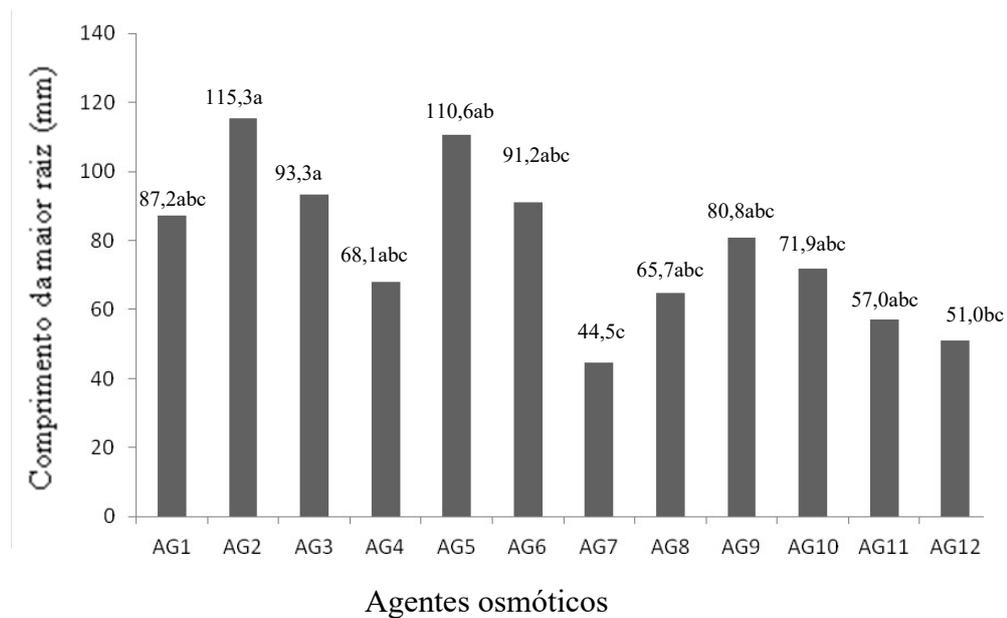


Figura 5: Comprimento da maior raiz de plantas de *C. pyramidalis*, aos 240 dias, submetidas a diferentes concentrações do agente osmóticos sacarose (Sac), sorbitol (Sorb) e manitol (Man). AG1→ 87,64mM Sac; AG2→ 131,46mM Sac; AG3→175,28mM Sac; AG4→219,10mM Sac; AG5→ 87,64mM Sac+ 87,64mM Sorb; AG6→ 131,46mMSac+87,64mM Sorb; AG7→ 175,28mM Sac + 87,64mM Sorb;AG8→ 219,10mM Sac + 87,64mM Sorb; AG9→87,64mM Sac + 87,64mM Man; AG10→ 131,46mMSac+87,64mM Man; AG11→ 175,28mM Sac + 87,64mM Man; AG12→ 219,10mM Sac + 87,64mM Man. Feira de Santana, BA. 2012.

Para matéria fresca da parte aérea registrou-se os menores valores médios (188,8; 197,5 e 203,3mg) nos tratamentos AG7, AG10 e AG12, respectivamente (Figura 6A). Já para a matéria seca da parte aérea observou-se a menor média (73,3mg) no tratamento AG10 (Figura 6B) . Ao avaliar a matéria fresca das raízes foi constatada a menor média (111,0mg) no tratamento AG12 (Figura 7A). Comportamento similar foi encontrado para matéria seca das raízes, cuja menor média (39,2mg) também foi obtida no tratamento AG12, seguida do tratamento AG4 no qual obteve-se o valor médio de 43,8mg (Figura 7B).

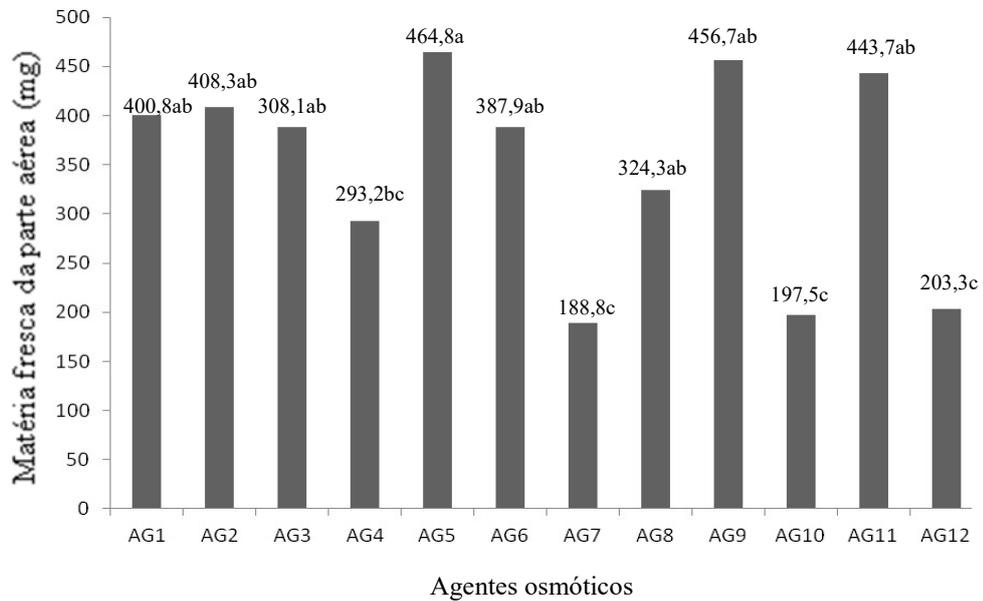
O valor da matéria fresca é uma variável que expressa o crescimento e a conservação das plantas *in vitro*, já que, as mesmas com maior crescimento apresentam geralmente,

valores de matéria fresca superiores ao das menores, sendo que, a partir dessa variável, pode-se associar menores valores de matéria fresca a um maior patamar de conservação da cultura *in vitro*, ao passo que, maiores valores de matéria fresca indicam menor conservação da cultura (AMARAL, 2005). Característica essa que, também pode ser associada ao material seco, visto que este representa ainda o crescimento real da cultura pelo fato de apresentar apenas o que foi absorvido de nutrientes pelas plantas, sem a presença de água.

O decréscimo no peso fresco e seco da parte aérea e das raízes de *C. pyramidalis* em função da redução do potencial osmótico do meio de cultura, pode ser explicado possivelmente, pela característica que os agentes osmóticos possuem de reduzir o potencial hídrico do sistema quando adicionados ao meio de cultura, provocando um estresse osmótico que inibe a absorção de água e nutrientes do meio, induzindo a uma desaceleração no crescimento do cultivo (FORTES; PEREIRA, 2001; LEDO et al., 2007). No entanto, o aumento da concentração de carboidratos no meio de cultura não é indicado para a conservação *in vitro* de *C. pyramidalis*, visto que diminuiu o vigor das plantas (Figura 2). A condição *in vitro* por si só, já é uma situação estressante para a planta, dessa forma o uso de reguladores osmóticos tem provocado, em várias culturas, drástica redução na viabilidade dos explantes, além de estarem relacionados com incidência de instabilidade genética no material micropropagado (AMARAL, 2005).

O meio de cultivo mais indicado para os propósitos da conservação *in vitro* é o que proporciona a redução ou paralisação do crescimento das plantas, o que aumenta o intervalo entre os subcultivos e, ao mesmo tempo promove maior sobrevivência, possibilitando a regeneração e multiplicação posterior (ALVES, 2008). Verificou-se que o tratamento AG4, justamente o tratamento que continha a maior concentração de sacarose isolada (219,10mM), foi o que melhor se comportou para os fins objetivados durante o período em que foi mantido em conservação *in vitro*.

A



B

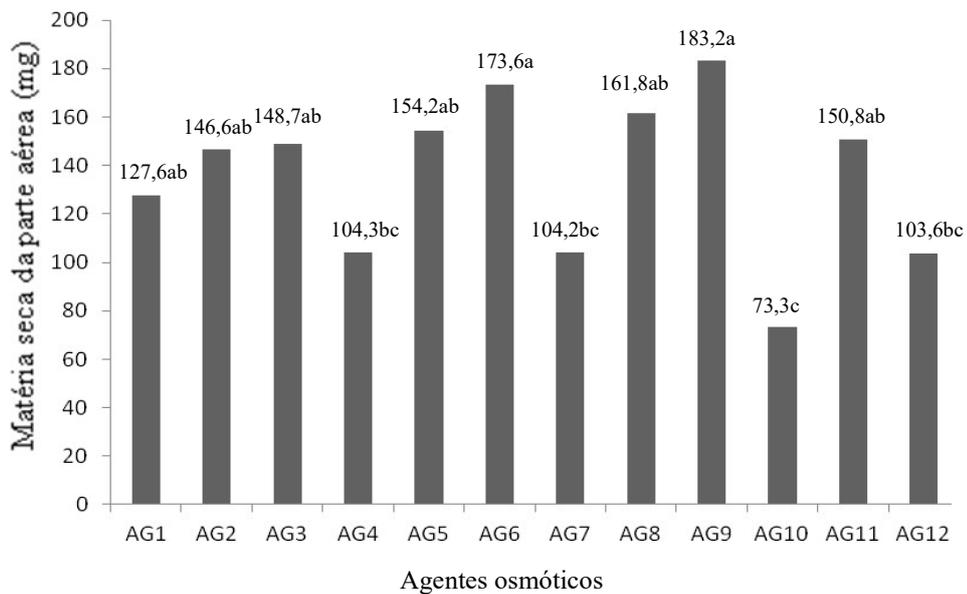


Figura 6: Matéria fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plantas de *C. pyramidalis*, aos 240 dias, submetidas a diferentes concentrações do agente osmótico sacarose (Sac), sorbitol (Sorb) e manitol (Man). AG1→ 87,64mM Sac; AG2→ 131,46mM Sac; AG3→175,28mM Sac; AG4→219,10mM Sac; AG5→ 87,64mM Sac+ 87,64mM Sorb; AG6→ 131,46mMSac+87,64mM Sorb; AG7→ 175,28mM Sac + 87,64mM Sorb;AG8→ 219,10mM Sac + 87,64mM Sorb; AG9→87,64mM Sac + 87,64mM Man; AG10→ 131,46mMSac+87,64mM Man; AG11→ 175,28mM Sac + 87,64mM Man; AG12→ 219,10mM Sac + 87,64mM Man. Feira de Santana, BA. 2012.

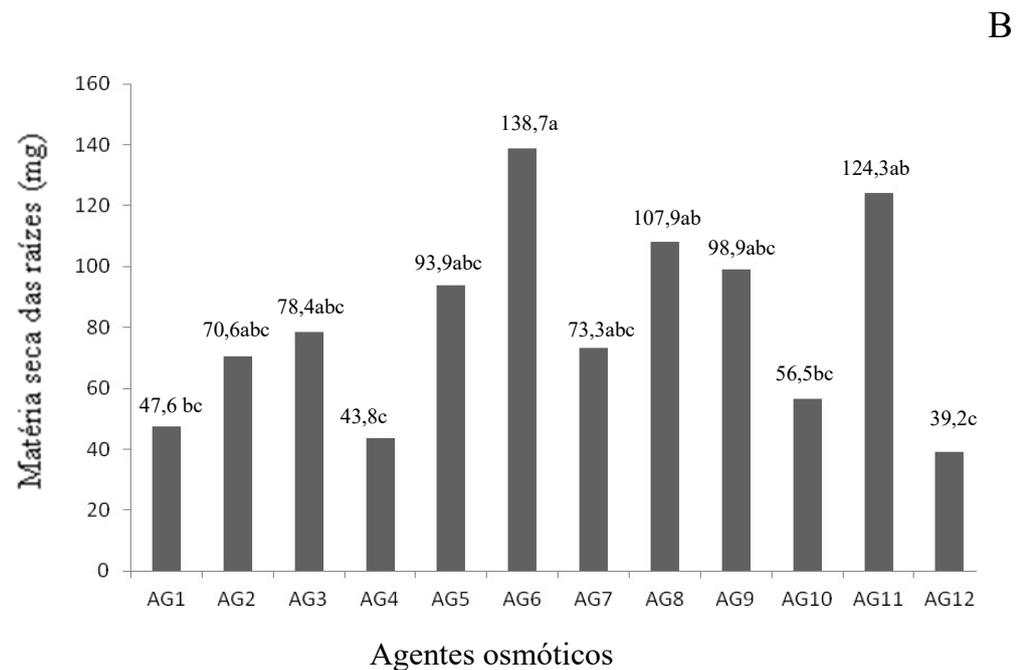
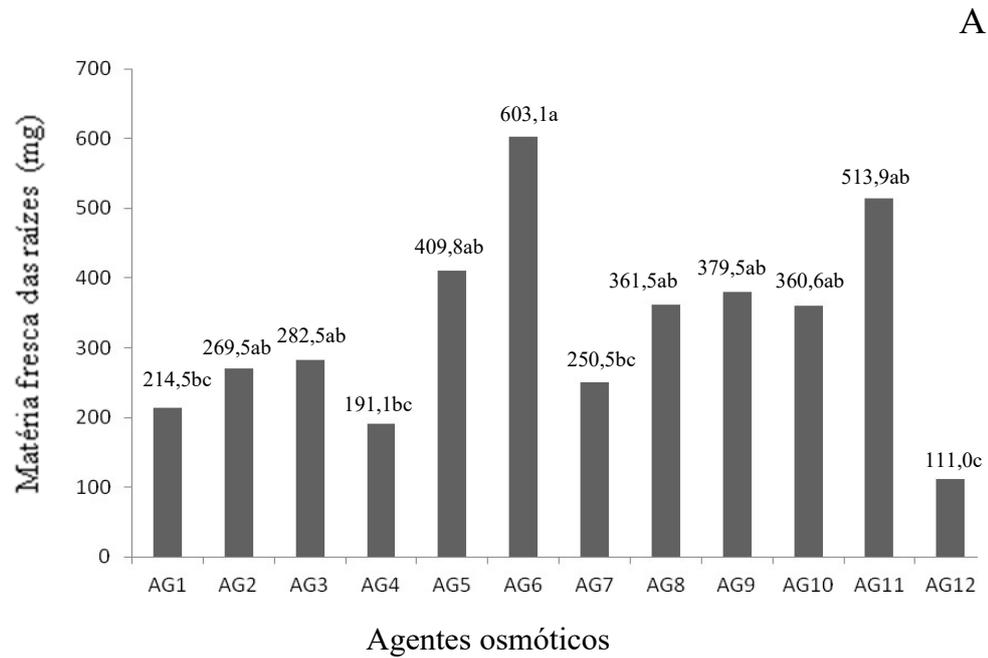


Figura 7: Matéria fresca (A) e seca (B) das raízes de plantas de *C. pyramidalis*, aos 240 dias, submetidas a diferentes concentrações do agente osmótico sacarose (Sac), sorbitol (Sorb) e manitol (Man). AG1→ 87,64mM Sac; AG2→ 131,46mM Sac; AG3→175,28mM Sac; AG4→219,10mM Sac; AG5→ 87,64mM Sac+ 87,64mM Sorb; AG6→ 131,46mMSac+87,64mM Sorb; AG7→ 175,28mM Sac + 87,64mM Sorb;AG8→ 219,10mM Sac + 87,64mM Sorb; AG9→87,64mM Sac + 87,64mM Man; AG10→ 131,46mM Sac+87,64mM Man; AG11→ 175,28mM Sac + 87,64mM Man; AG12→ 219,10mM Sac + 87,64mM Man. Feira de Santana, BA. 2012.

2.3.2 Efeito do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ) na conservação *in vitro* de *C. pyramidalis*

A análise de variância revelou que a interação “tempo de cultivo x concentração de PBZ” apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para a porcentagem de sobrevivência das plantas de *C. pyramidalis* (Tabela 4).

Tabela 4: Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência em função de diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ) ao longo do tempo (240 dias) de *C. pyramidalis*. Feira de Santana, BA. 2012.

FV	GL	Quadrados médios
PBZ	4	0,07**
Tempo	3	4,62**
Tempo x PBZ	12	0,08**
Resíduo	100	0,01
CV(%)		8,91

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Dados transformados em arco-seno $\sqrt{\frac{y}{b}}$.

Ao analisar as demais variáveis, observou-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) das concentrações de PBZ para matéria fresca da parte aérea, matéria fresca e seca das raízes e, efeito significativo ($p < 0,05$) para número de folhas verdes e matéria seca da parte aérea (Tabela 5).

Tabela 5: Resumo da análise de variância para número de folhas verdes (NFV), comprimento da parte aérea (CPA), número de foliólulos senescentes (NFS), comprimento da maior raiz (CR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca das raízes (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca das raízes (MSR) de plantas de *C. pyramidalis* aos 240 dias, submetidas a diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ). Feira de Santana, BA. 2012.

FV	GL	Quadrados médios							
		NFV	CPA	NFS	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
PBZ	4	2,9*	79,6 ^{ns}	65,7 ^{ns}	339,9 ^{ns}	24214,1**	275898,9**	745,3*	12977,2**
Resíduo	25	0,9	175,9	101,3	411,3	2973,1	14029,1	247,2	559,3
CV (%)		26,0	12,3	24,9	23,4	17,5	20,2	13,8	17,9

** * e ^{ns} significativo ao nível de 1% de probabilidade, significativo ao nível de 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

Ao analisar a taxa de sobrevivência bimestral, foi constatada uma tendência linear decrescente ($p < 0,01$) na ausência e na presença das concentrações 3,0 e 6,0 μM de PBZ e comportamento quadrático ($p < 0,01$) nas concentrações 1,5 e 4,5 μM de PBZ. Ao final de 240 dias, a maior taxa de sobrevivência (75,63%) foi obtida quando o meio de cultura foi

suplementado com a maior concentração testada de PBZ (6 μ M) (Figura 8). Entretanto, as plantas obtidas no tratamento controle (isento de PBZ) apresentaram porcentagem (68,06%) de sobrevivência, superior às observadas nas demais concentrações de PBZ testadas (Figura 8). De acordo com Silva et al. (2003), o PBZ é um composto ativo que alcança os meristemas subapicais da planta, inibindo a oxidação do kaureno para ácido kaurenóico, o qual é precursor do ácido giberélico, resultando na diminuição da divisão celular sem ocasionar citotoxicidade. Características essas que podem influenciar de forma direta na sobrevivência das plantas ao longo do tempo, visto que essa redução na divisão celular pode acarretar na redução do metabolismo vegetal. No entanto, as concentrações ideais de PBZ variam bastante para cada espécie vegetal.

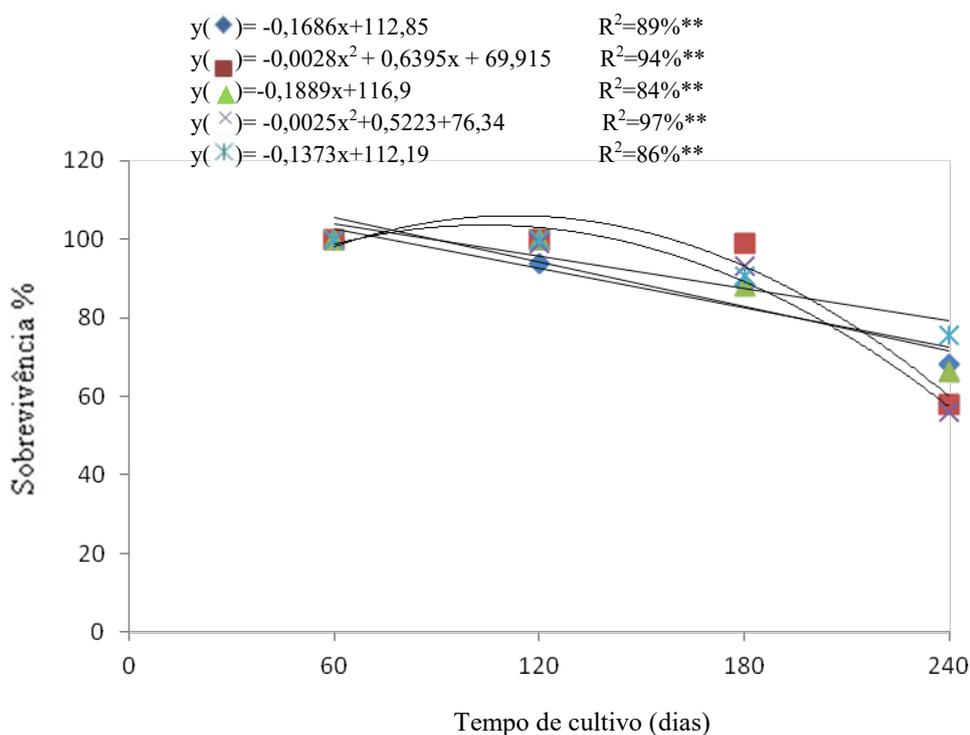


Figura 8: Porcentagem de sobrevivência ao longo do tempo de *C. pyramidalis*, obtidas a partir de diferentes concentrações do retardante de crescimento PBZ (\diamond 0,0; \blacksquare 1,5; \blacktriangle 3,0; \times 4,5 e \blackstar 6,0 μ M de PBZ) Feira de Santana, BA. 2012.

Para número de folhas verdes, a análise de regressão mostrou comportamento quadrático, sendo a maior média (4,40) registrada na utilização de 4,5 μ M de PBZ. A menor média (2,61) para esta variável, foi obtida quando o meio de cultura estava isento de PBZ, o

que resultou numa redução de 68,58% se comparado ao melhor resultado encontrado com a utilização do retardante de crescimento (Figura 9). Esse resultado discorda de Canto et al. (2004) em culturas de *Ananas comosus*, na qual foi observado maior número de folhas verdes na ausência de PBZ. Já Siqueira et al. (2008), não observaram alterações no número médio de folhas de *Citrus volkameriana* com a utilização de PBZ.

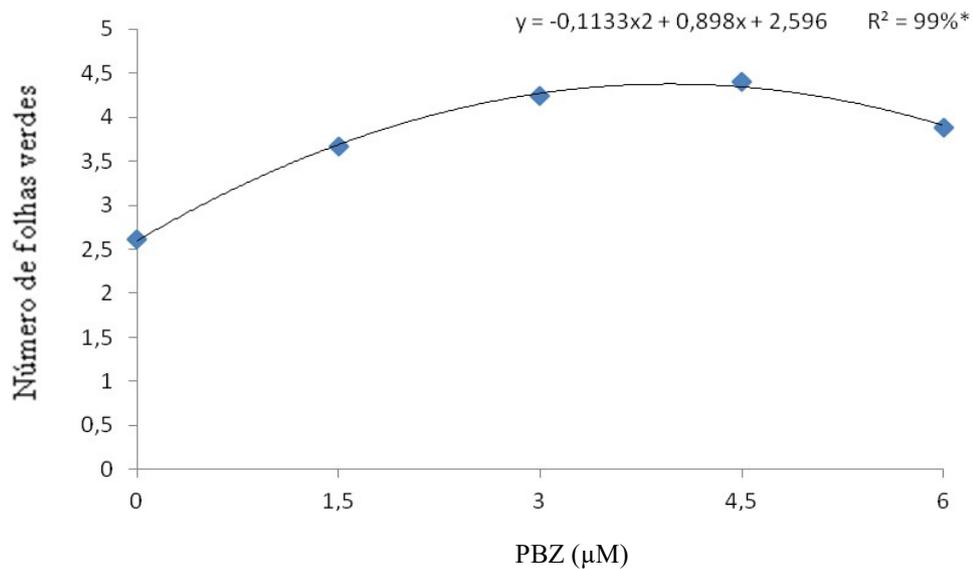


Figura 9: Número de folhas verdes de *C. pyramidalis*, aos 240 dias, submetidas a diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ). Feira de Santana, BA. 2012.

O número de folhas verdes é uma variável de suma importância em trabalhos de conservação *in vitro* por longos períodos, pois com o passar do tempo, as plantas tendem a iniciar o estágio de senescência, que podem possuir inúmeras causas, estando entre elas o acúmulo de etileno ou mesmo a falta de nutrientes causados pela própria exaustão do meio de cultura, que pode culminar na morte da planta. A utilização do PBZ em trabalhos de conservação pode influenciar de forma direta na coloração das folhas, pois de acordo com Togumpai et al. (1991), as plantas que são tratadas com PBZ, possuem tonalidade de suas folhas verde-escura e com maior conteúdo de clorofila. No entanto o efeito do paclobutrazol é variável, não só em função da concentração aplicada, mas também em função da espécie ou variedade (SIQUEIRA et al., 2008).

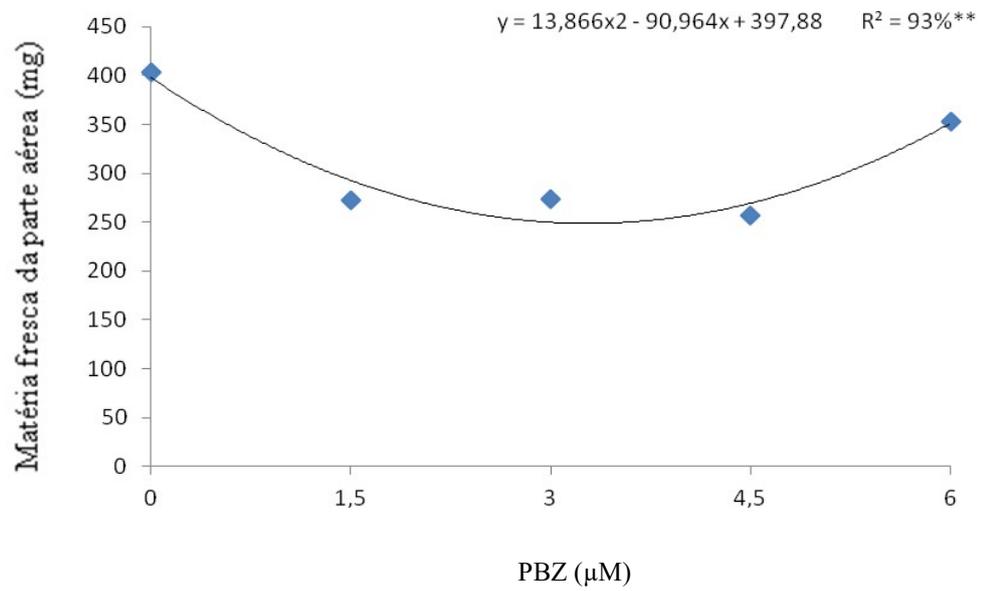
Foi constatado efeito quadrático descendente das concentrações de PBZ para as variáveis matéria fresca ($p < 0,01$) e seca ($p < 0,05$) da parte aérea. Sendo que, as maiores médias (403,85 e 131,35mg, respectivamente) foram obtidas na ausência de PBZ (Figura 10A e B). A redução do peso fresco e seco da parte aérea de *C. pyramidalis* observado em resposta aos tratamentos contendo PBZ, pode ser explicado com base na ação deste inibidor hormonal, pois o paclobutrazol é um triazol que bloqueia a biossíntese de GA₃ (Ácido giberélico), que são os grupos de hormônios que mais influenciam no crescimento e altura da planta (SILVA, 2008), refletindo de forma direta no peso destas, visto que as plantas com menor tamanho tendem a ter menor peso se comparadas com plantas maiores.

Em trabalhos de crescimento mínimo *in vitro*, a redução do peso fresco e seco das plantas é muito importante, pois através dessas variáveis pode-se avaliar o crescimento das culturas, principalmente do peso seco, no qual é possível saber o ganho de matéria na forma de esqueletos de carbono. Nepomuceno et al. (2007) também constataram redução no peso seco da parte aérea de plantas de *Anadenanthera colubrina* tratadas com a maior concentração de PBZ testada (13,6 μ M), na qual verificou-se uma redução de 32,9% quando comparado ao tratamento controle.

Ao analisar a matéria fresca das raízes constatou-se efeito linear crescente ($p < 0,01$) das concentrações de PBZ sob esta variável (Figura 11A), já para a matéria seca das raízes, o efeito foi quadrático ($p < 0,01$) (Figura 11B). Observou-se aumento significativo do peso fresco e seco das raízes tratadas com PBZ em relação ao tratamento isento do mesmo (Figura 10A e B), sendo que as raízes oriundas dos tratamentos contendo PBZ, independente da concentração testada, apresentaram-se visivelmente mais grossas (Figura 12). Comportamento semelhante foi obtido em *Lilium longiflorum* e *A. colubrina* (THAKUR et al., 2006; NEPOMUCENO et al., 2007), onde também foram constatados o engrossamento das raízes de plantas tratadas com PBZ. Segundo Nepomuceno et al. (2007), esse aspecto de engrossamento das raízes pode ser benéfico na etapa de aclimatização, pois raízes mais vigorosas tendem a facilitar maior pegamento das mudas.

A maior média observada (775,63mg) para matéria fresca das raízes foi constatada na concentração mais alta testada de PBZ (6 μ M), representando um ganho de 237,11% de massa fresca em relação ao controle, cujo peso fresco observado foi de 230,08mg (Figura 11A). Para matéria seca das raízes registrou-se a maior média (158,77mg) também na presença de 6 μ M de PBZ, tendo um incremento de 210,95% em relação aos 51,06mg obtidos no tratamento isento de paclobutrazol (Figura 11B).

A



B

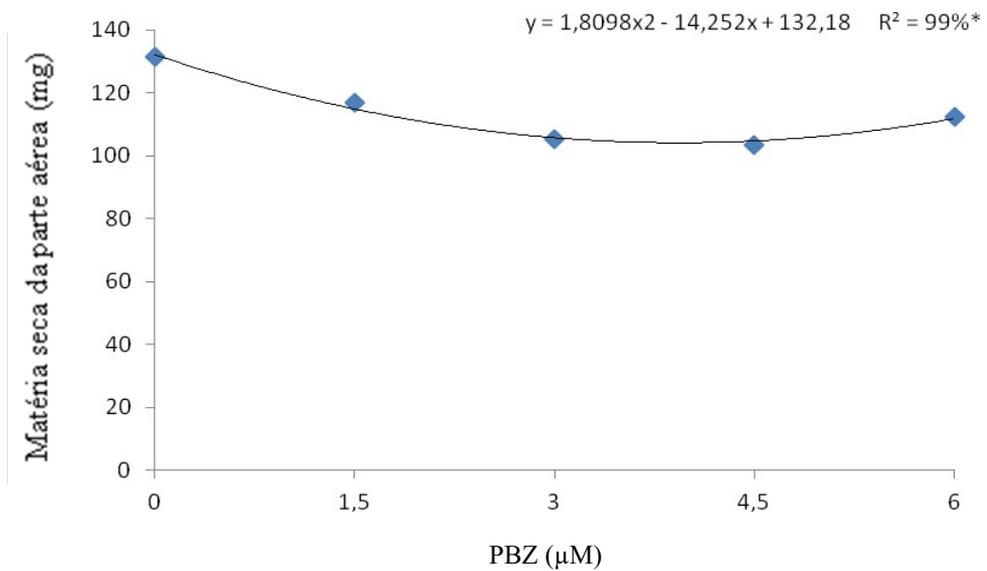


Figura 10: Matéria fresca (A) e seca (B) da parte aérea de *C. pyramidalis*, aos 240 dias submetidas a diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ). Feira de Santana, BA. 2012.

O comportamento observado para *C. pyramidalis* pode ser explicado pelo fato de que a utilização do PBZ possui como consequência morfológica direta, a redução do crescimento vegetativo, no entanto os efeitos secundários refletem na alteração da força-dreno dentro da

planta, ocorrendo como consequência, maior partição de assimilados, o que provavelmente pode ter contribuído para um maior ganho no sistema radicular (SELEGUINE, 2007).

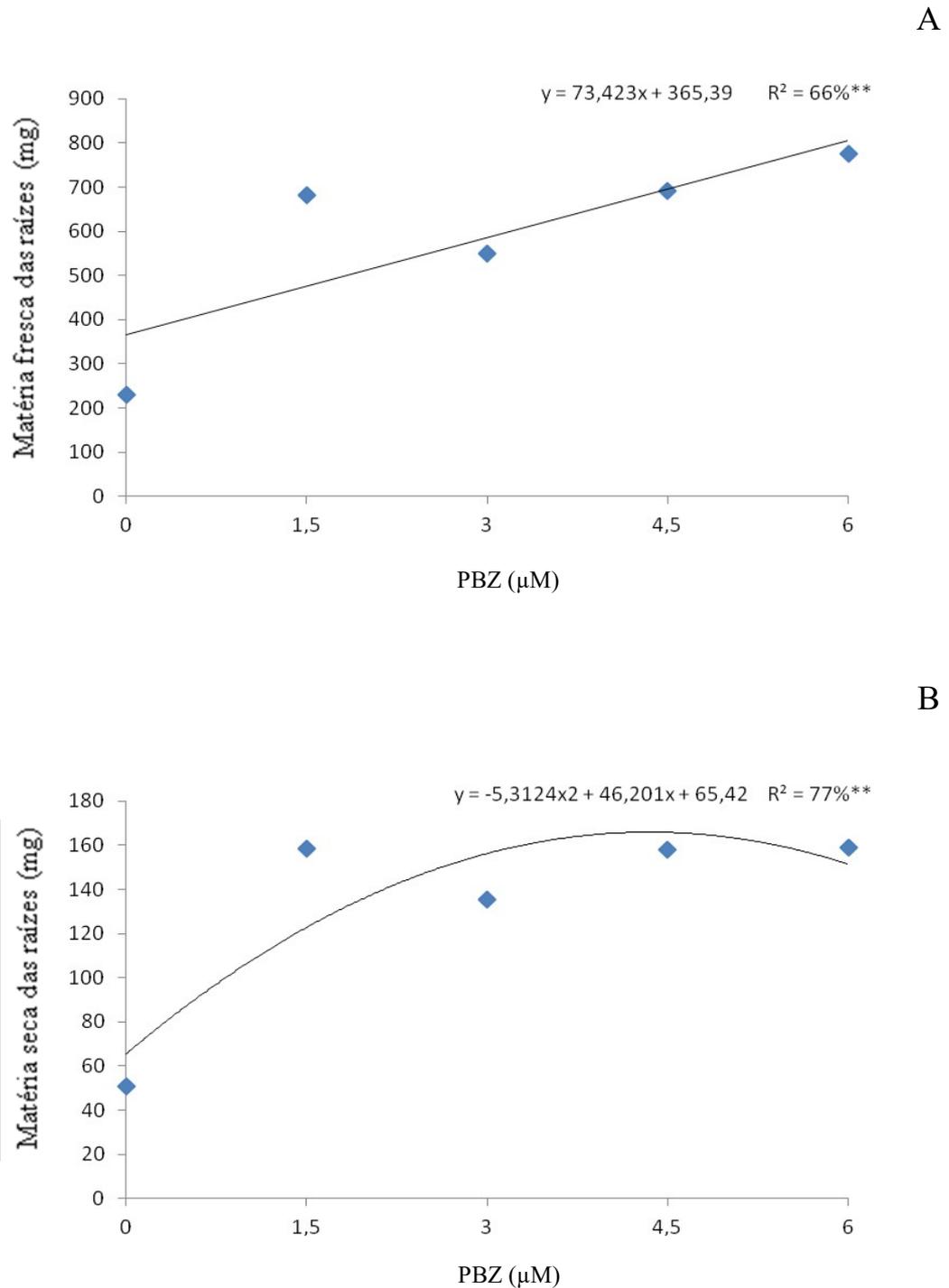


Figura 11: Matéria fresca (A) e seca (B) das raízes de *C. pyramidalis*, aos 240 dias submetidas a diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ). Feira de Santana, BA. 2012.



Figura 12: Aspecto das raízes das plantas vivas de *C. pyramidalis* Tul. aos 240 dias submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ). A- 0,0; B- 1,5; C- 6,0 μ M de PBZ. Feira de Santana, BA. 2012.

CONCLUSÃO

O sorbitol e o manitol não se mostraram efetivo para a conservação *in vitro* da catingueira. Pode-se conservar plantas de catingueira por até 240 dias na presença de 219,10mM de sacarose.

A adição de PBZ no meio de cultura WPM favoreceu o maior engrossamento das raízes independente da concentração testada, sendo possível a conservação *in vitro* com a utilização de 6,0 μ M de PBZ por um período de até 240 dias.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A. A.; FERREIRA, A. C. A. F.; JUNIOR, E. C. L. *Etileno*. Disponível em <<http://www.dbi.ufla.br/amauri/fitormonios/Fitohormonios%20e%20Fitoreguladores.doc>>

Acesso em 10 de janeiro de 2012.

ALVES, R. B. N. *Caracterização morfológica, química e conservação in vitro de Pfaffia glomerata (SPRENGEL) PEDERSEN*. 2008. 129f. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrônomicas do Campus de Botucatu–SP. Disponível em:

<<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp060361.pdf>> Acesso em 05 de janeiro de 2012.

AMARAL, L. *Conservação e propagação in vitro de três cultivares híbridas de amarilis*. 2005. 94f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético). Governo do Estado de São Paulo- Secretaria de Agricultura e Abastecimento – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstitutoposgraduacao/dissertacoes/pb1804303.pdf>> Acesso em 05 de janeiro de 2012.

BAHIA, M. V. et al. Biflavonoids and other Phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 16, n. 6B, p. 1402-1405. 2005.

BERTONI, B.W. et al. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.

CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n 7, p.717-720, jul. 2004.

DANTAS, T. *Etileno*. Disponível em:

<<http://www.mundoeducacao.com.br/biologia/etileno.htm>> Acesso em 10 de janeiro de 2012.

DAVIS, T.; CURRY. E. Chemical regulation of vegetative growth. *Critical Reviews in Plant Sciences*. Boca Raton, v.10, n.2, p.151-158. 199.

DUMET, D. et al. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *Cryo-Letters*, London, n. 14, p. 243-250. 1993.

FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* *Passiflora giberti* N. E. Brown. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal – SP, v. 28, n. 2, p. 267-270. 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FLETCHER, R. A. et al. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural reviews*, New York, v. 24, p. 55-138. 2000.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* de batata em ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n. 10, p.1261-1264, out. 2001.

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. v. 1 The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 01–28

GUERRA, M. P.; POMPELLI, M. F. *Conservação de germoplasma in vitro*. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciências Agrárias, Departamento de Fototecnia. disponível em <<http://www.lfdgv.ufsc.br/CONSERVAINVITRO.pdf>>. Acesso em 29 de outubro de 2011.

HARDING, K.; BENSON, E. E.; CLACHER, K.; Plant conservation biotechnology : An overview. *Agro Food Industry Hi Tech*, maio/jun. 1997.

LÉDO, A. S. et al. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento do coqueiro anão. *Magistra*, Cruz das Almas, v.19, n.4 p.346-351, out./dez. 2007.

LEMOS, E. E. P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. V. 37, n. 10, p. 1359-1364, Out. 2002.

LIMA, M. R. F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 105, p. 137–147, abr. 2006.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendronn* ssp. *HortScience*, Alexandria, v.15, n. 3, p.416-420, Jun. 1980.

MAIA, G. N. *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. Ed. Leitura & Arte, São Paulo, 2004. 413 p.

NEPOMUCENO, C. F. et al. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v. 31, n. 5, p. 967-975, 2007.

PASQUAL, M. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos da tangerina 'poncã': concentrações do meio MS e da sacarose. *Revista Ceres*, v. 49, n. 282, p. 181-189. 2002.

SÁ, A. J.; LEDO, A. S.; LEDO.; Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. *Ciência Rural*. Santa Maria. v. 41, n. 1, p. 57-62. jan, 2011.

SALVAT, A. et al. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine*, v. 11, p. 230-234. 2004.

SAMPAIO, E. V. S. B. Uso das plantas da caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETE, A. M. VIRGÍLIO, J. & GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (eds.). *Vegetação e flora da caatinga*. Recife, Associação Plantas do Nordeste e Centro Nordestino de Informação sobre Plantas. 2002. p. 49-68.

SANTOS, M. C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. *Revista Ciência Agronômica*. v. 42, n. 3, p. 735-741, jul-set. 2011.

SELEGUINI, A. *Uso de paclobutrazol na produção de mudas, no crescimento, produção e qualidade de frutos de tomateiro em ambiente protegido*. 2007. 101f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira. 2007. Disponível em : <http://www.ppga.feis.unesp.br/teses2007/alexander2007_dr.pdf> acesso em 29 de outubro de 2011.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; JONSSON, C. M. Paclobutrazol: regulador de crescimento vegetal. In: SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. *Impacto ambiental do regulador de crescimento vegetal paclobutrazol*. Jaguariúna, (Documentos, 30). Embrapa. p.11-16, fev. 2003. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_30.pdf> acesso em 05 de outubro de 2011.

SILVA, K. S. *Uso de Paclobutrazol em tomateiro cultivado em dois ambientes*. 2008. 79f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira.

Disponível em:< <http://www.ppga.feis.unesp.br/teses2008/katiane2008.pdf>> acesso em 29 de outubro de 2011.

SILVA, T. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. In vitro conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions, *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 46, n.4, p. 384-389, abr. 2011.

SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R.; SALOMÃO, L. C. C.; Desenvolvimento do limoeiro 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana* Pasq.) submetido a doses de paclobutrazol e ácido geberélico, *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 3, p. 764-768, Set., 2008.

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

TEIXEIRA, N. C. et al. Efeito do estresse hídrico sobre a viabilidade e o vigor de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* TUL. (Leguminosae-caesalpinoideae). In VII CONGRESSO DE ECOLOGIA DE BRASIL. *Anais*. Brasil. Caxambu – MG: SEB, 2007. p. 1-3. Disponível em <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiiceb/pdf/374.pdf>>. Acesso em 10 de novembro de 2011.

THAKUR, R. et al. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. *Plant Cell Reports*, v.25, n. 5, p. 382-391. 2006.

TONGUMPAI, P. et al. Variation in level of giberellin-like substances during vegetative growth and flowering of mango cv. Khiew Sawoey. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n. 291, p.105- 107. 1991.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS J. T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, C. A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa, CNPH, v.1, 1998. p. 297-329.

CONCLUSÃO GERAL

O segmento nodal apresentou-se como o melhor explante na ausência de reguladores de crescimento vegetal, sendo que a presença dos mesmos no meio de cultura, nas concentrações testadas, inibiu a formação de brotos em segmentos nodais, uma vez que apenas o explante segmento cotiledonar demonstrou competência organogênica na presença de $2\mu\text{M}$ de cinetina.

O sorbitol e o manitol não se mostraram efetivo para a conservação *in vitro* da catingueira. Pode-se conservar plantas de catingueira por até 240 dias na presença de 219,10 mM de sacarose.

A adição de PBZ no meio de cultura WPM favoreceu o maior engrossamento das raízes independente da concentração testada. Sendo possível a conservação *in vitro* com a utilização de $6,0\mu\text{M}$ de PBZ por um período de até 240 dias.

Com a realização desse estudo não foi observada uma taxa de multiplicação satisfatória para a catingueira. Dessa forma sugere-se a realização de novos estudos a fim de se obter um maior número de brotos por explante.