

## LIGNIFICAÇÃO E CRESCIMENTO DE *Eucalyptus grandis* (HILL EX MAIDEN) COM GA<sub>3</sub> E BAP

LIGNIFICATION AND GROWTH OF *Eucalyptus grandis* (HILL EX MAIDEN) WITH GA<sub>3</sub>  
AND BAP

Regina Paula Willemen Pereira<sup>1</sup> Maria Beatriz de Oliveira Monteiro<sup>2</sup> Heber dos Santos Abreu<sup>3</sup>

### RESUMO

Nesta pesquisa foram realizados experimentos com duas classes de hormônios vegetais (giberelina e citocinina); com o objetivo de verificar o efeito do ácido giberélico e 6-benzilaminopurina (GA<sub>3</sub> e BAP) sobre a lignificação e o crescimento longitudinal em mudas de *Eucalyptus grandis*. O experimento foi realizado em casa de vegetação, na qual foram aplicados os reguladores de crescimento combinados ou isolados, nas seguintes concentrações: GA<sub>3</sub> (49,13 µM e 98,26 µM); BAP (111 µM e 222 µM), com cinco repetições para cada tratamento. As comparações entre as médias da altura das plantas aos 6 meses mostraram que os alongamentos mais pronunciados do caule corresponderam aos tratamentos com a maior concentração de GA<sub>3</sub>. No tratamento em que foi combinada a menor concentração de GA<sub>3</sub> com a menor concentração de BAP (49,13 µM de GA<sub>3</sub> + 111 µM de BAP), ocorreu o menor teor de lignina 23,37%.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus grandis*; parede celular; lignina; biotecnologia florestal.

### ABSTRACT

In this research experiments were accomplished with two classes of vegetable hormones (gibberellin and cytokinin); with the objective of verifying the effect of gibberellic acid and 6-Benzylaminopurine (GA<sub>3</sub> and BAP) on the lignification and the longitudinal growth in seedlings of *Eucalyptus grandis*. The experiment was accomplished greenhouse, where were the growth regulators combined or isolated applied, in the following concentrations: GA<sub>3</sub> (49.13 µM e 98.26 µM); BAP (111 µM e 222 µM), with five repetitions for each treatment. The comparisons among the averages of the height of the plants to the 6 months showed that the most pronounced prolongations of the stem corresponded to the treatments G<sub>[2]</sub>, G<sub>[2]</sub>C<sub>[1]</sub> and G<sub>[2]</sub>C<sub>[2]</sub> where the largest concentration of GA<sub>3</sub> was used. In the treatment G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub> where it was combined to smallest concentration of GA<sub>3</sub> with to smallest concentration of BAP (49,13 µM de GA<sub>3</sub> + 111 µM de BAP), it happened the smallest lignin tenor 23,37%.

**Keywords:** *Eucalyptus grandis*; cell wall; lignin; forest biotechnology.

### INTRODUÇÃO

Os pesquisadores têm formulado ao longo dos anos, através de diversos estudos, as características de fundamentos fisiológicos

inerentes à lignificação. É conhecido que junto a essas características necessárias às plantas - como a defesa ao estresse biótico e abiótico promovida pela lignina - há um antagonismo desses efeitos benéficos frente à necessidade da indústria de base

1 Engenheira Florestal, Dr<sup>a</sup>., Pós-doutoranda no Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/CAPES, Caixa Postal 74586, CEP 23897-970, Campus UFRRJ, Seropédica (RJ), Brasil. willemen@bol.com.br

2 Engenheira Florestal, Dr<sup>a</sup>., Pós-doutoranda no Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/FAPERJ, Caixa Postal 74586, CEP 23897970, Campus UFRRJ, Seropédica (RJ), Brasil. betyka@bol.com.br

3 Engenheiro Florestal, Dr., Professor Associado do Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 07, CEP 23890-000, Seropédica (RJ), Brasil. abreu@ufrj.br

florestal na redução do teor e/ou um possível redirecionamento composicional das unidades fenólicas que formam a macromolécula da lignina.

O conhecimento das propriedades (químicas, físicas e bioquímicas) relacionado à lignificação é importante. As propriedades relacionadas à lignificação estão altamente associadas à produção de celulose, principalmente das espécies economicamente mais utilizadas.

A lignina interfere também em outros aspectos como na digestibilidade animal e obtenção do bioetanol. A lignina torna a parede celular resistente à digestibilidade e nutrição dos animais ruminantes (SHRIVASTAVA; NANDALA, 2012) e inibe a sacarificação no processo de bioetanol (CHEN; DIXON, 2007). O teor de lignina pode influenciar na dinâmica e custo do processamento de materiais lignocelulósicos e sua redução pode minimizar os custos para a indústria de processamento de biomassa (polpa e papel, forragem e etanol lignocelulósico) (ZIEBELL et al., 2010).

A polimerização de três monômeros – álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinápico – formam a macromolécula de lignina que é um dos três principais componentes da parede celular secundária de plantas e tem um importante papel no crescimento de plantas vasculares facilitando o transporte de água e proporcionando uma barreira de defesa contra patógenos (ZHAO et al., 2010).

Desta forma, o processo de formação da lignina (caminho dos fenilpropanóides) é imprescindível à fisiologia de defesa contra os patógenos. A lignina interfere decisivamente em alguns setores da indústria de base florestal.

Todos os mecanismos para ampliar os conhecimentos da lignina e até mesmo interferir no seu teor e/ou modulação, são de importante utilidade. Assim, o pensamento que direcionou essa pesquisa foram as relações da lignina com os reguladores de crescimento.

Uma maior atenção tem sido evidenciada, por pesquisadores, ao uso de reguladores de crescimento quando objetivam o aumento da produtividade (LANA et al., 2009; ABRANTES et al., 2011).

Os reguladores de crescimentos aplicados nesse trabalho foram o ácido giberélico ( $GA_3$ ) e o 6-benzilaminopurina (BAP). O ácido giberélico é um dos principais hormônios vegetais por exercer muitos papéis na biologia das plantas (QIN et al., 2011); pertence à família das giberelinas que são um grupo de diterpenoides de ocorrência natural com

papel vital no crescimento e desenvolvimento das plantas (SMOAK et al., 2010).

A 6-benzilaminopurina é uma das citocininas mais eficazes e disponíveis, muito utilizada em biotecnologia de plantas (WERBROUCK et al., 1996). As citocininas regulam vários processos biológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento de plantas (NISLER et al., 2010); promovem aumento da atividade metabólica e, conseqüentemente, atingem o desenvolvimento de plantas (LARA et al., 2004); quando adicionadas exogenamente, estimulam a atividade cambial e a indução de auxina e também estimulam a divisão celular (MORK; MORK, 2001).

Imprescindível, além da escolha dos reguladores de crescimento, foi optar pela espécie vegetal para o experimento. Houve a necessidade de trabalhar com uma *Tracheophyta*, isto é, uma planta com o sistema vascular definido, para enfatizar a lignificação e segmentos da indústria florestal afetados pela lignina. Assim, o *Eucalyptus* é o melhor representante, principalmente pela extensa adaptabilidade e importância comercial no Brasil.

Para tal, a espécie utilizada foi o *Eucalyptus grandis*, cujas plantas, após receberem, de forma sistemática, aplicações exógenas de  $GA_3$ , apresentaram respostas fenotípicas (alturas diferentes) e químicas (diferentes teores de lignina) características importantes e inerentes ao setor produtivo industrial. Foi possível perceber que mesmo com um crescimento longitudinal maior e redução no teor de lignina em comparação à testemunha, as plantas aos seis meses de idade, mantidas em casa de vegetação, que receberam exogenamente, na parte aérea, solução de  $GA_3$  e BAP, não apresentaram problemas de sustentação.

O *Eucalyptus grandis* está entre as espécies mais plantadas no Brasil, dos 5.4 milhões de hectares de florestas plantadas, o *Eucalyptus* abrange 62% (QUEIROZ et al., 2010).

O objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos da aplicação de ácido giberélico e 6-benzilaminopurina na relação crescimento longitudinal caulinar e teor de lignina em plantas de *Eucalyptus grandis* aos seis meses de idade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Estatística e implantação do experimento

O experimento implantado foi fatorial completo com delineamento inteiramente

casualizado, sendo composto de três fatores e cada fator com três níveis. Para a análise química do teor de lignina (lignina de Klason) dos caules moídos foram usadas 3 repetições e para o crescimento longitudinal 5 repetições. Foram feitos testes de normalidade (5% de probabilidade), análises de variância, teste de Tukey (5% de probabilidade), testes de homogeneidade de variâncias (Bartlett) para todos os tratamentos.

A primeira fase do experimento ocorreu em viveiro. As sementes foram germinadas em tubetes com capacidade de 53 cm<sup>3</sup>, preenchidos com o substrato (60% de composto orgânico, 20% de argila, 10% de areia e 10% de vermiculita). Foram utilizadas sementes certificadas do IPEF de procedência conhecida de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden). No viveiro foram realizados tratamentos silviculturais rotineiros para a formação de plantas saudáveis (raleio, limpeza, irrigação). Após 80 dias, foi feita repicagem para 45 tubetes com capacidade de 3,8L, com uma planta por tubete.

A segunda fase ocorreu em casa de vegetação, na qual foram realizadas as aplicações dos reguladores de crescimento. A primeira aplicação foi feita nas plantas com 90 dias (segunda quinzena do mês de junho). Nas aplicações hormonais cada uma das quarenta e cinco mudas recebeu, na parte aérea, através de pulverização - garrafa plástica acoplada a um sistema de nebulização e ligada a um compressor - soluções de reguladores de crescimento. A garrafa recobriu toda parte aérea das plantas pulverizando os hormônios em solução.

## Tratamentos

As soluções de reguladores de crescimento ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) utilizadas foram elaboradas com duas diferentes concentrações para cada um respectivamente: GA<sub>3</sub> (49,13 µM e 98,26 µM); BAP (111 µM e 222 µM).

A simbolização para caracterizar os tratamentos de acordo com cada concentração ficou assim: G<sub>[1]</sub> (49,13 µM), G<sub>[2]</sub> (98,26 µM); C<sub>[1]</sub> (111 µM), C<sub>[2]</sub> (222 µM) e G<sub>[0]</sub>C<sub>[0]</sub> (água bidesionizada).

Os tratamentos foram elaborados aplicando-se os reguladores de crescimento isolados e conjuntamente. Dessa forma, os 9 tratamentos foram estabelecidos da seguinte maneira: G<sub>[1]</sub>; G<sub>[2]</sub>; C<sub>[1]</sub>; C<sub>[2]</sub>; G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub>; G<sub>[1]</sub>C<sub>[2]</sub>; G<sub>[2]</sub>C<sub>[1]</sub>; G<sub>[2]</sub>C<sub>[2]</sub> e G<sub>[0]</sub>C<sub>[0]</sub> (testemunha) utilizando as respectivas concentrações, com cinco repetições para cada tratamento.

## Aplicações

Somente o substrato de cada vaso recebeu, diariamente, 350 mL de água durante toda a segunda fase do experimento; porém, nos dias de temperaturas mais elevadas, foram realizadas duas irrigações. Também nesta fase foram feitas medições diárias de temperatura e luminosidade para justificar a realização de uma ou duas irrigações. As aplicações dos reguladores de crescimento foram iniciadas sempre às 5 horas da manhã.

Antes das aplicações dos reguladores de crescimento, foi adicionada uma quantidade de 3µg de solução aquosa concentrada de um tenso ativo (classe de espalhante adesivo; grupo químico alquilfenol-etoxilado) para cada 15 mL de solução de reguladores de crescimento, inclusive na testemunha (água bidesionizada). Este produto foi utilizado para diminuir a tensão superficial nas folhas de maneira a facilitar a absorção da solução aplicada pela parte aérea das plantas.

Após recobrir a planta com a garrafa acoplada ao sistema de nebulização, o compressor foi ligado. O tempo de aplicação foi de 2 minutos/planta, nas mesmas condições de fluxo e pressão. Foram realizadas 7 aplicações, com um intervalo de 10 dias entre aplicações. No término dos tratamentos, as plantas ficaram mais 10 dias na casa de vegetação para, posteriormente, coleta das amostras das plantas tratadas e, início das análises. Este intervalo foi definido com o objetivo de certificar o efeito da última aplicação.

## Coleta e preparação das amostras para as análises

As amostras de caule utilizadas para a análise química foram retiradas do caule principal até terceiro entrenó. As amostras de caule para análise química foram descascadas e acondicionadas em câmara climatizada e depois moídas.

Certa quantidade de material moído e homogêneo a 20-40 mesh passaram por uma extração contínua com solventes em um extrator do tipo Soxhlet, utilizando os solventes, segundo a série elutropica: ciclo hexano, acetato de etila, metanol por 24 horas/cada solvente e por fim uma extração com água a 60°C em um Becker (BROWNING, 1967). O material solúvel foi concentrado em um evaporador rotatório e em seguida, esse concentrado foi armazenado em um dessecador até secar completamente. Um grama do material livre

de extrativos foi colocado em frasco Erlenmeyer de 250 mL (um frasco por tratamento) com 40 mL de solução de pepsina (1% em ácido clorídrico 0.1 N) em banho-maria a 40°C (13 horas para padronizar todas as amostras). Após este período, as amostras foram filtradas em um funil de placa sinterizada sob vácuo, em seguida foram lavadas duas vezes com 48 mL de água quente 12,8 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) (5%). Depois a amostra foi transferida para um balão de vidro (fundo redondo) com 240 mL de  $H_2SO_4$  (5%) e colocada em refluxo por uma hora. Posteriormente, a amostra foi transferida para um filtro sob vácuo e lavada três vezes com 48 mL de água bideionizada quente (para cada lavagem); duas vezes com 32 mL de etanol (para cada lavagem) e duas vezes com 24 mL de éter (para cada lavagem), nessa ordem, respectivamente (LIN; DANCE, 1992).

As amostras livres de extrativos e proteínas totais foram transferidas para um tubo de ensaio, adicionando-se 3 mL de ácido sulfúrico 72%. Foram maceradas com um macerador mecânico de tecidos (Potters – B. Braun Biotech Internacional) por 3 minutos e maceração manual contínua durante 1 hora. Os tubos de ensaio, durante a maceração foram mantidos em banho-maria a uma temperatura entre 25 a 30°C. O material foi transferido para um balão (fundo redondo) de 250 mL (um balão por tratamento) e diluído em solução de ácido sulfúrico e depois foi adicionado 84 mL de água bidesionizada. O material ficou em refluxo por 4 horas seguidas e em repouso para sedimentação da lignina. A solução de lignina ácida foi filtrada em um cadinho de porcelana e posteriormente colocada em estufa a 105°C. Depois de mantidos em ausência de umidade em um dessecador, os filtros contendo as amostras foram pesados calculando-se a porcentagem de lignina na madeira (EFFLAND, 1977).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os dados analisados tiveram distribuição normal, quando submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, ao nível de significância de 5% para teor de lignina e altura final. Foi também verificada a homogeneidade das variâncias, pelo teste de Bartlett com a mesma significância.

A faixa de redução no teor de lignina dos tratamentos em relação à testemunha ( $G_{[0]}C_{[0]}$ ) variou no intervalo de 0,24 a 21,2%.

Em uma visão abrangente desta pesquisa, em relação ao crescimento em altura, houve um

aumento percentual do alongamento caulinar, em relação à testemunha, que variou entre 4,69 a 106,88%. Valeri et al. (1983) obtiveram como resposta a um experimento, o seguinte resultado: plantas de *Eucalyptus grandis*, apresentaram, aos seis meses de idade, um maior crescimento em altura com a aplicação de 20g de N, 60 g de  $P_2O_5$  e 20 g de  $K_2O$  por planta. Entretanto, neste presente trabalho, exceto os reguladores de crescimento ( $GA_3$  e BAP) e água bidesionizada utilizados, para todos os tratamentos, nenhuma suplementação nutricional foi feita às plantas e nem ao substrato. Com isso pode-se garantir que os resultados apresentados foram obtidos somente com as interações ocorridas devido às aplicações realizadas com os reguladores de crescimento.

As amostras do tratamento  $G_{[1]}$  (49,13  $\mu M$  de  $GA_3$ ) analisadas diferenciaram significativamente no teor de lignina em relação à testemunha ( $G_{[0]}C_{[0]}$ ). Nesse tratamento ( $G_{[1]}$ ), houve uma redução de 6,41% no teor de lignina e um alongamento caulinar de 38,75% também em relação à testemunha.

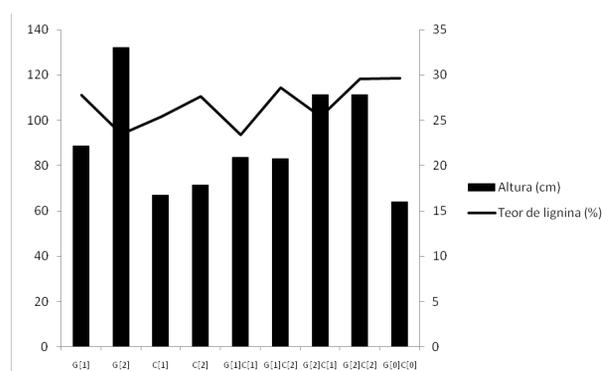
Entre os vários processos fisiológicos promovidos pelas giberelinas, está o alongamento caulinar, verificado principalmente no tratamento  $G_{[2]}$  (98,26  $\mu M$  de  $GA_3$ ), no qual foi utilizada a maior concentração do  $GA_3$  isoladamente (Figura 1). Esse tratamento apresentou uma redução do teor de lignina de 20,99% e um aumento no alongamento caulinar de 106,88% em relação à testemunha.

Os tratamentos  $G_{[1]}$  e  $G_{[2]}$  elaborados somente com o  $GA_3$ , apresentaram uma relação direta entre a altura e o teor de lignina: com a menor concentração de  $GA_3$  (49,13  $\mu M$ ), a planta apresentou um maior teor de lignina e um menor crescimento em altura e; com a maior concentração de  $GA_3$  (98,26  $\mu M$ ) ocorreu o contrário, isto é, o crescimento em altura foi maior, apresentando uma redução no teor de lignina. Esse efeito direto do tratamento  $G_{[2]}$  (98,26  $\mu M$  de  $GA_3$ ) para o teor de lignina pode ser devido à atuação da giberelina na parede celular. O estímulo do crescimento longitudinal de um vegetal pela giberelina afeta a plasticidade da parede celular (PHARIS et al., 1991), pois controla aspectos importantes do crescimento e desenvolvimento das plantas (TOKUNAGA et al., 2006; BHATTACHARYA et al., 2010).

A redução do teor de lignina apresentado pelas amostras das plantas que receberam o tratamento  $C_{[1]}$  (111  $\mu M$  de BAP) em relação à testemunha ( $G_{[0]}C_{[0]}$ )

foi de 14,44% e esse tratamento mostrou também um efeito de 4,69% de aumento no alongamento caulinar em relação à testemunha. Já o tratamento C<sub>[2]</sub>, que utilizou o dobro da concentração de BAP (222 µM de BAP), apresentou uma redução de 6,75% no teor de lignina e um aumento no alongamento caulinar de 11,56%, ambos em relação à testemunha.

Entretanto, os tratamentos C<sub>[1]</sub> (111 µM de BAP) e C<sub>[2]</sub> (222 µM de BAP), ambos elaborados com soluções de BAP isoladamente, não proporcionaram às plantas um alongamento caulinar significativo em relação à testemunha, porém, mantiveram o teor de lignina crescente nos tratamentos C<sub>[1]</sub> e C<sub>[2]</sub> respectivamente (Figural).



Tratamentos: G<sub>[0]</sub> (ausência de GA<sub>3</sub>), G<sub>[1]</sub> (49,13 µM de GA<sub>3</sub>), G<sub>[2]</sub> (98,26 µM de GA<sub>3</sub>), C<sub>[0]</sub> (ausência de BAP), C<sub>[1]</sub> (111 µM de BAP), C<sub>[2]</sub> (222 µM de BAP), G<sub>[1]C<sub>[1]</sub></sub> (49,13 µM de GA<sub>3</sub> + 111 µM de BAP); G<sub>[1]C<sub>[2]</sub></sub> (49,13 µM de GA<sub>3</sub> + 222 µM de BAP); G<sub>[2]C<sub>[1]</sub></sub> (98,26 µM de GA<sub>3</sub> + 111 µM de BAP), G<sub>[2]C<sub>[2]</sub></sub> (98,26 µM de GA<sub>3</sub> + 222 µM de BAP) e G<sub>[0]C<sub>[0]</sub></sub> (ausência de GA<sub>3</sub> + ausência de BAP).

(98,26 µM de GA<sub>3</sub> + 222 µM de BAP) e G<sub>[0]C<sub>[0]</sub></sub> (sem GA<sub>3</sub> e BAP).

FIGURA 1: Altura média e teor de lignina de plantas de *Eucalyptus grandis* tratadas com BAP e GA<sub>3</sub> aos seis meses de idade.

FIGURE 1: Average height and content of lignin of plants of *Eucalyptus grandis* treated with BAP and GA<sub>3</sub> to the six months of age.

Baseada em evidências experimentais, Kapchina-Toteva e Yakimova (1997), após subculturarem nós isolados de um tipo de roseira (*Rosa hybrida* L.) *in vitro*, utilizando dois tipos de citocininas em três concentrações diferentes, concluíram que 1.0 µM de N<sup>6</sup>-benziladenina (BA) acelerou a atividade da peroxidase (enzima ligada à biossíntese de lignificação).

Para as amostras das plantas que receberam o tratamento G<sub>[1]C<sub>[1]</sub></sub> (49,13 µM de GA<sub>3</sub> + 111 µM de BAP), os resultados apresentados, comparando-os com a testemunha, foram uma redução de lignina de 21,2% e um aumento no alongamento caulinar de 30,94%. A síntese dos metabólitos secundários também parece ser influenciada pelos reguladores de crescimento (MUJIB et al., 2012).

No tratamento G<sub>[1]C<sub>[1]</sub></sub> (49,13 µM de GA<sub>3</sub> + 111 µM de BAP), em que foi combinada a menor concentração de GA<sub>3</sub> com a menor concentração de BAP, ocorreu o menor teor de lignina (23,37%) (Tabela 1). Dessa forma, esse tratamento apresentou uma redução de 21,2% em relação à testemunha.

TABELA 1: Efeito da aplicação foliar de BAP e GA<sub>3</sub> no teor de lignina insolúvel Klason (%) de plantas de *Eucalyptus grandis*.

TABLE 1: Effect in the content of insoluble lignin Klason (%) in plants of *Eucalyptus grandis* after application of BAP and GA<sub>3</sub>.

		GA <sub>3</sub>		
		G <sub>[0]</sub>	G <sub>[1]</sub>	G <sub>[2]</sub>
BAP	C <sub>[0]</sub>	29,64aA	27,74bA	23,42cA
	C <sub>[1]</sub>	25,36aB	23,37bB	25,35aB
	C <sub>[2]</sub>	27,64aC	28,57bC	29,57cC

Em que: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância; sendo G<sub>[0]</sub> (ausência de GA<sub>3</sub>), G<sub>[1]</sub> (presença de 49,13 µM de GA<sub>3</sub>), G<sub>[2]</sub> (presença de 98,26 µM de GA<sub>3</sub>), C<sub>[0]</sub> (ausência de BAP), C<sub>[1]</sub> (presença de 111 µM de BAP), C<sub>[2]</sub> (presença de 222 µM de BAP), G<sub>[1]C<sub>[1]</sub></sub> (presença de 49,13 µM de GA<sub>3</sub> + presença de 111 µM de BAP); G<sub>[1]C<sub>[2]</sub></sub> (presença de 49,13 µM de GA<sub>3</sub> + presença de 222 µM de BAP); G<sub>[2]C<sub>[1]</sub></sub> (presença de 98,26 µM de GA<sub>3</sub> + presença de 111 µM de BAP), G<sub>[2]C<sub>[2]</sub></sub> (presença de 98,26 µM de GA<sub>3</sub> + presença de 222 µM de BAP) e G<sub>[0]C<sub>[0]</sub></sub> (ausência de GA<sub>3</sub> + ausência de BAP).

Porém, no tratamento  $G_{[1]}C_{[1]}$ , o crescimento em altura não foi significativo, assemelhando-se ao tratamento  $G_{[2]}$ ; e, também, assemelhando-se ao tratamento  $G_{[2]}$  em relação à redução no teor de lignina muito significativa para ambos os tratamentos. Percebe-se nesse caso, uma possível predominância do efeito do  $GA_3$  em sua segunda e maior concentração sobre o efeito do BAP. Em relação ao teor de lignina, possivelmente o efeito sinérgico do tratamento ( $G_{[1]}C_{[1]}$ ) se equiparou ao efeito apresentado pelo tratamento  $G_{[2]}$ , que atuou somente com o ácido giberélico em maior concentração.

As amostras do tratamento  $G_{[1]}C_{[2]}$  (49,13  $\mu M$  de  $GA_3$  + 222  $\mu M$  de BAP) apresentaram, após as análises, uma redução no teor de lignina de 3,61% e um aumento do alongamento caulinar de 30%, ambos em relação à testemunha. Foram usadas nesse tratamento a menor concentração do  $GA_3$  e a maior concentração do BAP, 49,13  $\mu M$  e 222  $\mu M$ , respectivamente (Figura 1). É possível que a maior concentração de BAP, do tratamento  $G_{[1]}C_{[2]}$ , inibiu ou atenuou o efeito do  $GA_3$ , pois, apesar do crescimento em altura desse tratamento não ter apresentado, estatisticamente, diferença significativa com o tratamento  $G_{[1]}C_{[1]}$ , o teor de lignina aumentou.

Já na situação em que as plantas receberam uma maior concentração de  $GA_3$ , como no tratamento  $G_{[2]}C_{[1]}$  (presença de 98,26  $\mu M$  de  $GA_3$  + presença de 111  $\mu M$  de BAP), os valores foram maiores quando os resultados apresentaram uma redução de 14,5% no teor de lignina e um aumento no alongamento caulinar de 74,06%, ambos em relação à testemunha. O tratamento  $G_{[2]}C_{[1]}$  foi composto da maior concentração de  $GA_3$  com a menor concentração do BAP e o efeito dessa combinação foi uma possível predominância do efeito do  $GA_3$  sobre o efeito do BAP.

O aumento no alongamento caulinar das plantas analisadas do tratamento  $G_{[2]}C_{[2]}$  (presença de 98,26  $\mu M$  de  $GA_3$  + presença de 222  $\mu M$  de BAP) apresentou o mesmo resultado do tratamento  $G_{[2]}C_{[1]}$  (presença de 98,26  $\mu M$  de  $GA_3$  + presença de 111  $\mu M$  de BAP) no qual as comparações entre as médias das alturas das plantas apresentaram o mesmo valor (111,40 cm) (Figura1). Entretanto, o mesmo não ocorreu para a redução do teor de lignina para os tratamentos acima citados, pois, houve uma redução no teor de lignina de apenas 0,24% para o tratamento  $G_{[2]}C_{[2]}$ , isto é, semelhante ao teor de lignina apresentado pela testemunha ( $G_{[0]}C_{[0]}$ ). No

entanto, houve diferença significativa no teor de lignina, pois é provável que a maior concentração do BAP predominou; mesmo em presença da maior concentração de  $GA_3$  ( $G_{[2]}C_{[2]}$ ) (Tabela1).

No tratamento  $G_{[2]}C_{[2]}$ , no qual foram usadas as maiores concentrações de ambos os reguladores de crescimento, houve, talvez, um predomínio do efeito do BAP sobre o efeito do  $GA_3$ , minimizando a redução no teor de lignina. É possível, nesse caso, que o efeito da maior concentração do BAP tenha predominado sobre o efeito da maior concentração do  $GA_3$ , pois o crescimento em altura nos tratamentos  $G_{[2]}C_{[1]}$  e  $G_{[2]}C_{[2]}$  foi de 111,40 cm (Figura 1).

A interferência dos tratamentos resultou em alturas claramente diferentes, exceto, entre os tratamentos  $G_{[2]}C_{[1]}$ ,  $G_{[2]}C_{[2]}$ , pois, na média, esses dois tratamentos apresentaram plantas com a mesma altura, porém, com teores de lignina de 25,35% e 29,57%, respectivamente (Figura1).

Segundo Gallego-Giraldo et al. (2011), não está claro se é possível reduzir conteúdo de lignina em paredes das células de plantas sem causar mudanças estruturais com efeitos danosos.

Entretanto, os dados que foram obtidos revelaram que a biossíntese da lignina foi afetada pelos reguladores de crescimento  $GA_3$  e BAP e não houve danos às plantas de *Eucalyptus grandis* aos seis meses de idade.

As citocininas e giberelinas são envolvidas na vascularização. A giberelina é atuante na diferenciação do floema e xilema apenas em presença de auxina e quando aplicada isoladamente e em altas concentrações a giberelina proporciona fibras longas com paredes delgadas o que leva a crer, neste último caso, que as paredes das fibras apresentem menos deposição de lignina. Já as citocininas, assim como as auxinas, participam da atividade do meristema cambial em plantas lenhosas e na síntese de enzimas ligadas à lignificação (PEREIRA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2012).

Os tratamentos mais proeminentes na redução do teor de lignina foram o  $G_{[2]}$  e  $G_{[1]}C_{[1]}$ . Dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho, com *Eucalyptus grandis*, corroboram com as características das classes dos reguladores de crescimento  $GA_3$  e BAP utilizados (giberelina e citocinina, respectivamente) supracitadas.

A auxina é o componente primário de sinalização necessário para a regulação de lignificação e desenvolvimento de tecido vascular, requerendo uma ligação estreita com outros hormônios vegetais como citocininas e giberelinas

(DETTMER et al., 2009).

Assim, é possível considerar, através dos resultados apresentados, a possibilidade de que o GA<sub>3</sub> e/ou o BAP tenham inibido a ação da auxina endógena, ou até mesmo o efeito de ambos os reguladores, isolados ou combinados, tenham se sobreposto ao da auxina endógena e, assim, reduzido o teor de lignina.

## CONCLUSÕES

Foi possível concluir, após tratamentos utilizando soluções de reguladores de crescimento GA<sub>3</sub> e BAP, em plantas de *Eucalyptus grandis* com seis meses de idade que:

- Os reguladores de crescimento GA<sub>3</sub> e BAP interferem no alongamento caulinar e no teor de lignina em plantas de *Eucalyptus grandis* analisadas aos seis meses após tratamentos;

- O GA<sub>3</sub>, quando aplicado isoladamente, apresentou um aumento do alongamento caulinar significativamente mais elevado em plantas de *Eucalyptus grandis*;

- O GA<sub>3</sub>, quando aplicado combinado com o BAP em uma mesma solução, apresentou uma redução no teor de lignina significativamente mais proeminente em plantas de *Eucalyptus grandis*;

- O BAP, quando aplicado combinado com o GA<sub>3</sub> em uma mesma solução, atua inibindo ou minimizando o efeito do GA<sub>3</sub> em relação ao alongamento caulinar.

- A interferência do GA<sub>3</sub> e do BAP, isolados ou conjuntamente, no teor de lignina e no alongamento caulinar, não causaram danos às plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, F. L. et al. Uso de regulador de crescimento em cultivares de feijão de inverno. Pesquisa Agropecuária Tropical, **Goiânia**, v. 41, n. 2, p. 148-154, 2011.

BHATTACHARYA, A. et al. Practical Applications of Manipulating Plant Architecture by Regulating Gibberellin Metabolism. Journal of Plant Growth Regulation, **Heidelberg**, v. 29, n. 2, p. 249-256, 2010.

BROWNING, B. L. Methods of wood chemistry. Interscience Publishers, **New York**, v. 1, p. 75-89, 1967.

CHEN, F., DIXON, R. A. Lignin Modification Improves Fermentable Sugar Yields for Biofuel

Production. Nature Biotechnology, v. 25, p. 759-761, 2007.

DETTMER, J. et al. Hormone interactions during vascular development. Plant Molecular Biology, **Netherlands**, v. 69, p. 347-360, 2009.

EFFLAND, M. J. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. Tappi, **Canada**, v. 60, n. 10, p. 143-144, 1977.

GALLEGO-GIRALDO, L. et al. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin ownregulated plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 108, n. 51, p. 20814-20819, 2011.

KAPCHINA-TOTEVA, V.; YAKIMOVA, E. Effect of purine and phenylureacytokinins on peroxidase activity in relation to apical dominance of in vitro cultivated Rosa hybrid L. Bulgarian Journal of Plant Physiology, **Sofia**, v. 23, n. 1-2; p. 40-48, 1997.

LANA, A. M. Q. et al. Aplicação de reguladores de crescimento na cultura do feijoeiro. Bioscience Journal, **Uberlândia**, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2009.

LARA, M. E. B. et al. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. The Plant Cell, **Rockville**, v. 16, p. 1276-1287, 2004.

LIN, S. Y.; DANCE, C. W. Methods in lignin chemistry. **Berlin**: Springer, 1992. 608 p.

MONTEIRO, M. B. O. et al. Análise composicional por espectrometria de infravermelho da lignina de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake tratados com reguladores de crescimento. Biochemistry and Biotechnology Reports, **Londrina**, v. 1, n. 2, 2012.

MORK, D. W.; MORK, M. C. Cytokinin metabolism and action. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **Palo Alto**, v. 52, p. 89-118, 2001.

MUJIB, A. et al. Catharanthusroseus alkaloids: application of biotechnology for improving yield. Plant Growth Regulation, **Switzerland**, v. 68, p. 111-127, 2012.

NISLER, J. et al. Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine.

Phytochemistry, **Palode**, v. 71, p. 823-830, 2010.

PEREIRA, R. P. W. et al. Bioinformação do Processo de Lignificação. 1. ed. **Seropédica**: EDUR, 2012.

PHARIS, R. et al. Superior growth potential in trees: what is its basis, and can it be tested for at an early age. Canadian Journal of Forest Research, **Canadá**, v. 21, p. 368-374, 1991.

QIN, F. et al. Spindly, a Negative Regulator of Gibberellic Acid Signaling, Is Involved in the Plant Abiotic Stress Response. Plant Physiology,

**Copenhagen** v. 157, p. 1900–1913, 2011.

QUEIROZ, D. L. et al. Feeding and oviposition preferences of *Ctenarytainaspatulata* Taylor (Hemiptera, Psyllidae) for *Eucalyptus* spp. and other Myrtaceae in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **Curitiba** v. 54, n. 1, p. 149–153, 2010.

SHRIVASTAVA, B.; NANDALA, P. Solid state bioconversion of wheat straw into digestible and nutritive ruminant feed by *Ganoderma* sp. rckk02. *Bioresource Technology*, **Netherlands**, v. 107, p. 347–351, 2012.

SMOAK, E. M. et al. Self-assembly of gibberellic amide assemblies and their applications in the growth and fabrication of ordered gold nanoparticles. *Nanotechnology*, **Philadelphia**, v. 21, n. 2, p. 25101–25704, 2010.

TOKUNAGA, N. et al. Involvement of gibberellin in tracheary element differentiation and lignification in *Zinnia elegans* xylogenic culture.

*Protoplasma*, **Heidelberg**, v. 228, n. 4, p. 179–187, 2006.

VALERI, S. V. Efeitos da adubação NPK e do calcário dolomítico no desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. *Silvicultura*, **São Paulo**, v. 8, n. 28, p. 531–5366, 1983.

WERBROUCK, S. P. O. et al. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum*, **Copenhagen**, v. 98, p. 291–297, 1996.

ZHAO, Q. et al. Syringyl lignin biosynthesis is directly regulated by a secondary cell wall master switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **Boston**, v. 107, p. 14496–14501, 2010.

ZIEBELL, A. et al. Increase in 4-coumaryl alcohol units during lignification in alfalfa (*Medicago sativa*) alters the extractability and molecular weight of lignin. *Journal of Biological Chemistry*, **Maryland**, v. 285, n. 50, p. 38961–38968, 2010.