

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE FLORESTAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**AMBIENTAIS E FLORESTAIS**

**DISSERTAÇÃO**

**Aplicação da biotecnologia ao estudo de lignificação**  
**em espécies lenhosas**

**Desiane Amaral de Deus**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E  
FLORESTAIS**

**APLICAÇÃO DA BOTECNOLOGIA AO ESTUDO DE  
LIGNIFICAÇÃO EM ESPÉCIES LENHOSAS**

**DESIANE AMARAL DE DEUS**

*Sob a orientação do professor*

**Dr. Heber dos Santos Abreu**

*e Co-orientação da Professora*

**Dr<sup>a</sup> Helena Regina Pinto Lima**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS  
E FLORESTAIS**

**DESIANE AMARAL DE DEUS**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2010.

Heber dos Santos Abreu. Prof. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

Cláudia Simões. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. UERJ

Tatiana de Felice Elias. Dr<sup>a</sup> UFRRJ

582.16

Deus, Desiane Amaral de,

D486a

Aplicação da biotecnologia ao estudo de lignificação em espécies lenhosas. / Desiane Amaral de Deus. – 2010. 77 f. : il.

T

Orientador: Heber dos Santos Abreu. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais. Bibliografia: f. 42-50.

1. Árvores - Teses. 2. *Lophanthera lactescens* – Análise – Teses. I. Abreu, Heber dos Santos, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais. III. Título.

À Lúcia e Satoshi Yokota, por terem me dado a chance de reescrever a minha história, dedico essa e todas as conquistas da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os anjos que tem colocado no meu caminho.

À Lúcia Yokota e Satoshi Yokota por financiaram meus estudos, e por acreditarem na minha capacidade de superação.

Ao meu querido irmão Roni que, mesmo longe, sempre me deu forças e palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

Aos meus sobrinhos Kathleelen e Felipe pela alegria e docilidade.

Às amigas Claudinha, Samantha, Mariana, Michele, Joyce e Camila pelo incentivo.

Às amigas joseenses Regina, Wilza, Carla e Rafaela, por todo carinho e cumplicidade.

Ao André pela dedicação, incentivo e companheirismo, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Professor Heber pela orientação, incentivo e exemplo de sucesso.

À Professora Helena, anjo de luz que iluminou meus pensamentos, e muito além de orientação nesse trabalho, me deu ensinamentos de vida.

À querida amiga Kathlyn, pela ajuda na confecção das lâminas, pelas aulas particulares, e por toda dedicação.

Às amigas Sabrina, Ana Elisa e ao técnico Thiago por toda a ajuda e pelos momentos de descontração.

Às professoras do Departamento de Botânica, Dória, Mercedes, Verônica, Genise e Rejane por todo carinho com que me receberam, e principalmente pela ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Madeira, Jairo, Cléssio, Camila, Leticia, Ananda, Beatriz e Regina por toda ajuda na realização dos procedimentos de laboratório.

À Gisely pela ajuda com os reagentes.

Ao técnico José Carlos por toda a ajuda nos processos de extração e manuseio de equipamentos.

À Tatiana pela ajuda na realização dos espectros de infravermelho, pela paciência e dedicação.

Ao Mendes, que sempre me salvou nas situações mais complicadas de trabalho.

Aos funcionários Lígia, Luis Claudio e a Carminha.

Às funcionárias da Pós-Graduação Solange e Lenice por toda a ajuda e dedicação.

Ao professor Roberto Carlos Costa Lelis por sempre esclarecer com muita boa vontade as minhas dúvidas.

Ao Fernando pela ajuda com a formatação, Camila, Gabriela e Anakim, pelo acolhimento com tanto carinho.

Ao Rafael Pimentel, pela ajuda na confecção das pranchas.

A Capes pela bolsa concedida.

E a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

## RESUMO

DEUS, Desiane Amaral de. **Aplicação da biotecnologia ao estudo de lignificação em espécies lenhosas.** 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2010.

A madeira é o quinto produto mais consumido no mercado mundial e apresenta expectativa de crescimento de consumo de 20% para a próxima década. Sua constituição estrutural é formada por celulose, hemicelulose e lignina. Plantas lenhosas, de maneira geral, possuem alto teor de lignina, podendo alcançar valores superiores a 35% em relação ao seu peso seco. Esta pesquisa teve o objetivo de estudar o processo de lignificação em cultura de calos obtidas das espécies *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, do híbrido *E. urograndis* e da espécie *Lophanthera lactescens* Ducke e acompanhar esse processo em plantas de *L. lactescens* cultivadas *in vitro*. O trabalho está dividido em dois capítulos. O primeiro é referente à espécie *L. lactescens* e trata da determinação de um protocolo para indução da calogênese e avaliação do processo de lignificação nos calos e em raízes e caules de plantas cultivadas *in vitro*. O processo de lignificação nas plantas foi acompanhado através de caracterização anatômica. O segundo capítulo, referente às duas espécies de *Eucalyptus* e o híbrido trata do estabelecimento de protocolo para indução da calogênese e avaliação da produção de lignina nos calos produzidos a partir de diferentes tipos de explantes. Para avaliação do processo de lignificação foram realizados testes histoquímicos e estudos de microscopia de campo claro, fluorescência, espectrometria e microscopia no infravermelho. O melhor protocolo de indução da calogênese em *L. lactescens* foi alcançado em meio MS + 9,06  $\mu\text{M}$  2,4-D. Os calos oriundos de diferentes fontes de explante avaliados pela espectrometria de infravermelho apresentaram lignina do tipo guaiacólica e siringólica. Através da microscopia e espectrometria de infravermelho foi possível verificar que a lignificação em planta de *L. lactescens* cultivadas *in vitro* inicia-se nos ângulos das células, desde os tecidos mais jovens e que plantas que tiveram crescimento limitado pelo recipiente de germinação apresentaram a ocorrência de fibras gelatinosas. Para as espécies de *Eucalyptus*, o protocolo que induziu uma maior produção de calos foi o protocolo MS + 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, + 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina + 20  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose. A espécie *E. urophylla* apresentou calos mais friáveis e maiores. Os calos oriundos de diferentes fontes de explantes avaliados no infravermelho também apresentaram sinais indicativos da presença de lignina do tipo guaiacólica e siringólica.

Palavras-chave: *Lophanthera lactescens*; *Eucalyptus* spp; lignificação; cultura de tecido; infravermelho

## ABSTRACT

**DEUS, Desiane Amaral. Application of biotechnology the study of lignifications in woody species.** 77p. (Dissertation, Master's degree in Environmental and Forest Sciences). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2010.

Wood is the fifth most consumed product on the world market and has the expectation of consumption growth of 20% for the next decade. Their structural constitution is formed by cellulose, hemicellulose and lignin. Woody plants, in general, have a high lignin content, reaching values above 35% compared to its dry weight. This research aimed to explore the process of lignification in callus culture obtained from *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* hybrid *E. urograndis* and species *Lophanthera lactescens* Ducke and monitor this process in plants of *L. lactescens* cultured *in vitro*. The work is divided in two chapters. The first is related to the species *L. lactescens* and deals with the determination of a protocol for callus induction and evaluation of the process of lignification in callus and in roots and stems of plants grown *in vitro*. The process of lignification in plants was accompanied by anatomical characterization. The second chapter, referring to two species of Eucalyptus and the hybrid is the establishment of protocol for callus induction and assessment of the production of lignin in callus produced from different types of explants. To evaluate the process of lignification histochemical tests were made and studies of bright field microscopy, fluorescence microscopy and infrared spectrometry. The best protocol for callus induction in *L. lactescens* was achieved on MS medium + 9.06 mM 2,4 D. Callus from different explant sources evaluated by infrared spectroscopy showed lignin guaiacyl and syringyl type. Through the microscope and infrared spectroscopy was possible to verify that the lignification in plant *L. lactescens in vitro* starts at the corners of cells, tissues from young and that plants whose growth was limited by the container germination showed the occurrence of gelatinous fibers. For species of Eucalyptus, the protocol that induced a higher production of callus was MS protocol + 10 mM of 2,4-D + 2.5 mM kinetin + 20 gL<sup>-1</sup> sucrose. The species *E. urophylla* callus showed larger and more friable. Callus from different sources of explants were also evaluated at the infrared signals indicative of the presence of lignin guaiacyl and syringyl type.

Keywords: *Lophanthera lactescens*; *Eucalyptus*; lignification, tissue culture; infrared

## LISTA DE ABREVIATURA

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AIA - Ácido Indol Acético

BOD - Demanda Biológica de Oxigênios

ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz

HCl – Ácido clorídrico

IPEF - Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais

IV – Infravermelho

KBr – Brometo de potássio

LBM - Laboratório de Biotecnologia da Madeira

MOE - Módulo de elasticidade

MOR - Módulo de ruptura

MS – Meio de Murashige & Skoog

NH<sub>4</sub>OH – Hidróxido de Amônio

PVP - Polovinilopirrolidina

USP - Universidade de São Paulo

μM – Micromol

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Precusores da lignina ..... 4
- Figura 2: Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D no tamanho e matéria fresca de calos de explante apical de *L. lactescens* cultivada in vitro..... 16
- Figura 3: Calos de *Lophanthera lactescens*. A e B - calos de explante apical induzido com MS +18,12  $\mu$ M 2,4-D (A) e MS + 9, 06  $\mu$ M 2,4-D (B), respectivamente; C a F - calo de explante apical, foliar, caulinar e radicular, respectivamente, induzido com MS + 9, 06  $\mu$ M 2,4-D. .... 17
- Figura 4: Células de calos de *Lophanthera. lactescens*. A - D - células de calos provenientes de explante apical, foliar, caulinar e radicular, respectivamente, submetidas ao teste de Wiesner; E e G- células de calos de explantes apical e caulinar vista ao microscópio óptico; F e H- respectivas células submetidas a microscopia de fluorescência com reagente auramina O. .... 19
- Figura 5: Raiz adventícia de *Lophanthera lactescens* cultivada in vitro. A – Detalhe da raiz adventícia. B–I – Seção transversal. B – Aspecto geral da raiz a 1-4 cm do ápice radicular. C – Aspecto geral, evidenciando os pêlos absorventes (→) e os quatro pólos do xilema. D – Aspecto geral da raiz na região proximal, mostrando as lacunas (→). E – Detalhe da raiz triarca, destacando a estria de Caspary na endoderme (→).F – Detalhe da raiz diarca lignificada e das estrias de Caspary suberificadas (→) evidenciada pela microscopia de fluorescência. G – Detalhe da lignificação no xilema (→), evidenciado pelo teste de Wiesner. H – Detalhe da raiz na região proximal, mostrando as células parenquimáticas e as fibras com paredes espessas e lignificadas (→). I – Detalhe da região cortical, mostrando a presença de substâncias fenólicas no parênquima e na endoderme. Rp= Região proximal, Rd= Região distal; Ep= Epiderme; Ex= Exoderme; Co= Córtex; Fl= Floema; Xl= Xilema; Me= Medula; En= Endoderme; Pe= Periciclo. Barras= C= 200 $\mu$ m. B, D, F, G, I= 100  $\mu$ m. E, H= 50  $\mu$ m. .... 22
- Figura 6: *Lophanthera. lactescens* cultivada in vitro. A - Visão geral de indivíduo com caule retilíneo, aos nove meses. B- C, E-J - Seção transversal do caule. B – Aspecto geral do caule no 2º entrenó. C – Detalhe do tricoma tector unicelular. D – Vista frontal do tricoma tector dibráqueado. E – Aspecto geral do córtex, mostrando colênquima angular e idioblastos com drusa (→). F – Detalhe do cilindro central, mostrando as fibras pericíclicas. G – Detalhe do processo de lignificação do xilema com microscopia de fluorescência. H – Detalhe do cilindro central com início de formação do câmbio fascicular (→). I – Detalhe da diferenciação do felogênio. J – Detalhe da suberificação (→). Ep= Epiderme; Col= Colênquima; Pa= Parênquima; Fl= Floema; Xi= Xilema; Fp= Fibra parenquimática; Me= Medula; Fe= Felogênio; Esp= Estrato subepidérmico. Barras= B= 200 $\mu$ m; H, G, E, D= 100 $\mu$ m; C, J, I, F= 50 $\mu$ m. .... 24
- Figura 7: Seção transversal do caule de *Lophanthera. lactescens*. A – Detalhe do xilema secundário, no 7º entrenó, com elementos celulares de parede espessas (→).

B – Aspecto geral da periderme, evidenciado pelo sudan IV (→). C – Lignina nas paredes secundárias, evidenciadas pelo teste de Wiesner (→). D – Lignificação das células confirma pela microscopia de fluorescência e uso de auramina O. E – Lignina siringílica nas paredes dos elementos do xilema, evidenciada pelo teste de Maüler (→). F – Presença de idioblastos com substâncias lipídicas (→), pelo sudan IV. G - Detalhe dos cristais de oxalato de cálcio na medula, tipo drusa (→) e poliédrico ( ). H – Detalhe do grão de amido (→) e da drusa (→) na região medular observado em microscopia de polarização. Fb= Fibra; Ra= Raios parenquimáticos; Ev= Elementos de vaso. Barras= B, D= 200µm; A, C, E= 100µm; F, G, H= 50 µm..... 26

Figura 8: *Lophanthera lactescens* propagada in vitro. A – Vista geral de indivíduo com caule retorcido. B-F – Seção transversal do caule. B – Aspecto geral do caule no 3º entrenó, evidenciando fibras gelatinosas (→) e câmbio (→). C – Detalhe da diferenciação do felogênio (→). D – Detalhe das fibras gelatinosas, com teste de Wiesner, mostrando paredes lignificadas (→) e camada G ( ). E – Detalhe da lignificação das paredes das fibras, utilizando o teste de Maüler. F – Detalhe da lignificação das fibras gelatinosas através da microscopia de fluorescência. Barras= B, D, F= 100µm; C, E= 50µm. .... 28

Figura 9: Organograma interativo que inclui o espectro de infravermelho registrando sinal de lignina (→) da região do xilema na figura central (→); à esquerda reação positiva para o teste de Wiesner e à direita a indicação da lignina através da fluorescência. Barras= 100µm. .... 30

Figura 10: Efeito de diferentes concentrações de sacarose na formação de calos friáveis de *E. grandis*. .... 38

Figura 11: Indução de calogênese em *E. grandis*, *E. urograndis* e *E. urophylla*. A e B- Calos de explante apical de *E. grandis* induzido em meio MS + 3% e 2% de sacarose, respectivamente. C - Calos de explante caulinar de *E. urophylla* (1) e *E. urograndis* (2). D- Calo de explante caulinar de *E. grandis*. E- Células de calos de *E. grandis* submetidos ao teste de Wiesner, evidenciando maior reatividade do calo de explante caulinar ao teste (→). F- células vistas ao microscópio. G e H - Células de *E. urograndis* e *E. grandis* submetidas à fluorescência. Barras= G, H= 50µm. .... 39

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Lignina.....	3
2.2 Cultura de Tecidos Vegetais.....	5
2.3 <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke.....	6
2.4 <i>Eucalyptus</i> spp.....	7
<b>CAPÍTULO I - LIGNIFICAÇÃO EM PLANTAS <i>in vitro</i> E CULTURA DE CALOS DE <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Desinfestação e Germinação <i>in vitro</i> de Sementes de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke.....	13
2.2 Estabelecimento de Protocolo para Indução de Calogênese .....	13
2.3 Estudo de Lignificação em Calos de <i>L. lactescens</i> Produzidos <i>in vitro</i> .....	13
2.4 Análise de Lignina de Raiz e Caule de Plantas de <i>L. lactescens</i> cultivadas <i>in vitro</i> submetidos a diferentes processos de extração.....	14
2.5 Caracterização Anatômica e Avaliação da Lignificação de Raiz e Caule de <i>Lophanthera lactescens</i> Cultivadas <i>in vitro</i> .....	14
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
3.1 Estabelecimento de Protocolo para Indução da Calogênese .....	15
3.2 Estudo de Lignificação em Calos de <i>L. lactescens</i> .....	18
3.3 Análise de Lignina em Raiz e Caule de Plantas de <i>L. lactescens</i> cultivadas <i>in vitro</i> submetidos a diferentes processos de extração.....	20
3.4 Caracterização Anatômica e Avaliação da Lignificação em Raiz e Caule de <i>Lophanthera lactescens</i> Cultivadas <i>in vitro</i> .....	20
3.4.1 Raiz Adventícia .....	20
3.4.2 Anatomia do Caule.....	22

<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO II - LIGNIFICAÇÃO EM CULTURA DE CALOS DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Eucalyptus</i> spp .....</b>	<b>32</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>33</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
2.1 Indução de Calogênese em Diferentes Teores de Sacarose.....	36
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
3.1 Efeito da Concentração de Sacarose na Indução de calos em <i>E. grandis</i> .....	37
3.2 Lignificação em cultura de Calos de <i>Eucalyptus grandis</i> , <i>E. urophylla</i> e <i>E. urograndis</i> .....	38
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>3 PESPECTIVAS.....</b>	<b>41</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Pesquisas realizadas com espécies florestais de interesse econômico têm sido auxiliadas por técnicas biotecnológicas, como por exemplo, cultura de tecidos. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, denominado explantes, são isolados de um vegetal, desinfestados e cultivados em meio nutritivo asséptico (ANDRADE, 2002; COSTA, 2006). Os explantes podem ser retirados de folha, caule ou qualquer outra parte do vegetal capaz de responder às condições do meio de cultura (TORRES, 2000).

A cultura de tecidos surgiu da teoria da totipotência (TORRES *et al.*, 1998, ANDRADE, 2002), segundo a qual, células vegetais sob estímulos apropriados são capazes de iniciar um novo indivíduo multicelular (TORRES *et al.*, 2000) e apresenta-se como importante ferramenta na clonagem de plantas com interesse comercial e conservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção.

No estudo dos componentes da madeira, a cultura de tecidos permite avaliar os efeitos fisiológicos dos nutrientes, dos hormônios vegetais e de outros constituintes químicos (GALLO & CROCOMO, 1995).

A formação da madeira é um processo biológico com interesse econômico significativo e sua constituição baseia-se fundamentalmente em componentes macromoleculares: celulose, hemicelulose e lignina, presentes em percentuais variáveis (MORAIS *et al.*, 2005).

A lignina é um dos componentes majoritários da madeira. Depois da celulose, é a substância macromolecular mais abundante no reino vegetal (BACHA, 2006). É um componente estrutural que dá à madeira propriedades de elasticidade e resistência bastante únicas; tem como principais funções nas plantas o aumento da rigidez da parede celular, a propriedade de unir as células umas às outras, a redução da permeabilidade da parede celular à água, e a proteção contra microorganismos (HIGUCHI *apud* KIRK 1980; KLOCK *et al.*, 2005). Espécies florestais têm sido estudadas visando a compreensão da estrutura molecular da lignina e sua influência nas propriedades da madeira.

As espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam vantagens como rápido crescimento e grande diversidade, o que possibilita a adaptação desta cultura a diferentes tipos de clima e solo, além de possibilitar sua utilização para diversos fins (AMPARADO *et al.*, 2008). A madeira dessas espécies vem se constituindo em uma das principais fontes de matéria-prima para as indústrias brasileiras de base florestal (TRUGILHO *et al.*, 2007). No entanto, ainda apresenta obstáculos quanto a sua utilização, como rachaduras durante seu processamento e usinamento (ABREU *et al.*, 2009), o que justifica investimentos em busca de soluções capazes de aperfeiçoar tecnologicamente a utilização no mais amplo aspecto do mercado consumidor (ABREU *et al.*, 2003). Nesse sentido, a cultura de tecidos apresenta-se como um método alternativo na propagação (HIGASHI *et al.*, 2002) e estudo (ABREU *et al.*, 1990) de *Eucalyptus* spp., abrindo caminho para estudos inovadores referentes ao gênero.

Apesar de adaptado as condições edafoclimáticas brasileiras, o gênero *Eucalyptus* é exótico, e o Brasil, por ser considerado o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo (SANDES & DI BLASI, 2000), apresenta potencial para fornecimento de novas matérias-primas para o setor madeireiro.

Por esse motivo o Grupo de Estudos do Laboratório de Biotecnologia da Madeira do Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Florestas, que desde 2002 concentra esforços na busca de novas ferramentas biotecnológicas para o estudo do

processo de lignificação em *Eucalyptus* spp busca o desenvolvimento de pesquisas com espécies brasileiras. A exploração e o uso mais adequado, a produção *in vitro*, e o desenvolvimento de plantas buscando características de interesse para a indústria florestal, tem sido meta do laboratório.

Com este fim, foi escolhida *Lophanthera lactescens* Ducke (Malpighiaceae) espécie arbórea endêmica da Amazônia. Nesta região é utilizada pelos nativos como agente febrífugo sobre a malária e tem sido alvo de estudo químico. A partir de extratos da madeira foi isolado um nor-triterpeno com atividades de interesse farmacológico com ação antiálgica, antitérmica e bloqueador dos canais de potássio (ABREU *et al.*, 1990). Testes *in vitro*, também mostraram atividade contra *Leishmania amazonensis* (DANELLI, *et al.*, 2009). Além do interesse farmacológico a espécie apresenta propriedades que possibilitam o seu uso na indústria de base florestal, como fuste ereto cilíndrico, madeira de densidade de média a alta e resistência a broca (TREVISAN, 2003). O conhecimento de sua composição química, sobretudo da lignina, mostra-se relevante, tendo em vista a insuficiência de informações descritas na literatura (ABREU *et al.*, 1990).

O objetivo geral do trabalho foi acompanhar o processo de lignificação em calos das espécies *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. urograndis* e em calos e plântulas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*, afim de estabelecer possíveis modelos de estudo de lignificação.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Estabelecer a germinação *in vitro* das espécies *L. lactescens*, *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. urograndis*;
- ✓ Induzir a calogênese a partir de diferentes tipos de explantes obtidos das plantas germinadas *in vitro*;
- ✓ Avaliar a estrutura anatômica de raiz e caule das plantas de cultivadas *in vitro*;
- ✓ Avaliar o processo de lignificação pelos métodos de infravermelho, microscopia de campo claro e fluorescência em calos e plantas *in vitro* para *L. lactescens* e m calos das espécies de *Eucalyptus*.

O capítulo I abordou a lignificação em plantas *in vitro* e cultura de calos de *Lophanthera lactescens* Ducke.

O capítulo II tratou da lignificação em cultura de calos de três espécies de *Eucalyptus* spp.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Lignina

Em estudos realizados há mais de 150 anos, foi verificado o interesse científico e econômico sobre a lignina (SALIBA *et al.*, 2001). Segundo Santos (2001), o termo lignina foi introduzido, pela primeira vez, por Anselmo Payen (1838) para designar o resíduo insolúvel obtido no tratamento da madeira por ácido nítrico. Peter Klason (1917) (apud SJOSTROM, 1989) propôs que a lignina seria uma substância macromolecular constituída de unidades do álcool coniferílico, e Freudenberg (1968) propôs a primeira fórmula química para a lignina (SJOSTROM, 1989).

Diversos autores afirmaram que a lignina permitiu a adaptação das plantas aquáticas ao ambiente terrestre (MONTIES, 1989; BARCELÓ, 1997; INOUE *et al.*, 1998). Acreditava-se que esta substância estava presente apenas em plantas vasculares e que vegetais primitivos como fungos, líquens e algas, não são lignificados (FENGEL & WEGENER, 1984). Porém, Martone *et al.* (2009), observaram a presença de parede secundária e presença de lignina na alga vermelha *Calliarthron cheilosporioides* (Corallinales, Rhodophyta). Essa nova descoberta demonstra que mesmo com todos os estudos envolvendo esse polímero, ainda existem muitos aspectos a serem avaliados.

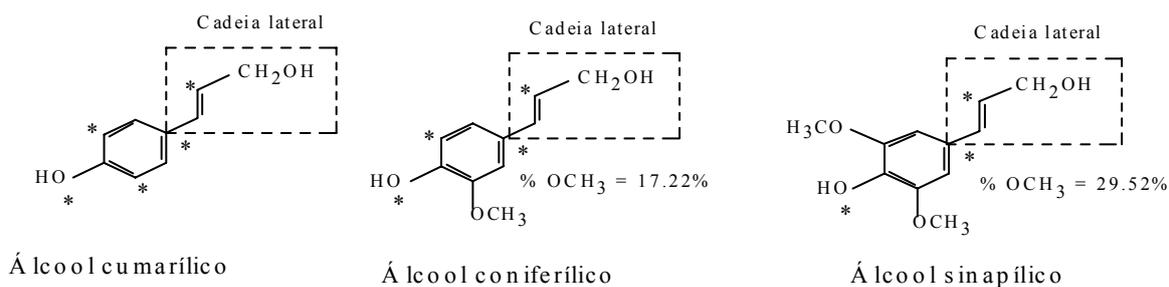
Lignina é um termo que se aplica as macromoléculas que apresentam composição básica formada por unidades cumarílica, guaiacílica e siringílica de origem fenilpropanoídica, com estrutura molecular tridimensional. É um termo que vem do latim, da palavra “*lignun*” e significa madeira (ABREU *et al.*, 2009), sendo detectada em maior quantidade na parede secundária de células, sobretudo nas fibras, vasos e traqueídeos do xilema, dotando-os de rigidez, suporte mecânico e impermeabilidade; na periderme ocorre em menor quantidade associado à suberina onde age como uma barreira contra patógenos (BROWNING, 1967; GUIMARÃES *et al.*, 2003). A lignificação é uma das fases finais de diferenciação das células do xilema, onde a lignina é depositada dentro da matriz de carboidratos da parede celular pelo preenchimento dos vazios interlamelar; inicia-se nos cantos da célula na lamela média e nas regiões S<sub>1</sub>, e se espalha através da parede secundária em direção ao lúmen (DONALDSON *et al.*, 2001).

É variável entre as espécies, tecidos, estágio de desenvolvimento e localização celular. Essas variações podem ser resultados de diferenças em atividades enzimáticas entre a enzima e o substrato específico (monolignol) de angiospermas e gimnospermas (LEWIS & YAMAMOTO, 1990).

Algumas características da madeira como tensão (PILATE *et al.*, 2004) e compressão (FOSKET, 1994) podem ser influenciadas pela lignificação. Segundo Boyd (1972) e Sales (1986), o surgimento das tensões de crescimento está intimamente ligado à lignificação das paredes celulares, uma vez que a lignina provoca o aumento de volume irreversível na parede secundária da célula. Bidlack *et al.*, (1992) acreditam que a composição, estrutura molecular e orientação espacial da lignina contribuem significativamente para as propriedades da madeira. ABREU *et al.*, (2009) supõem que uma mudança induzida em relação ao tipo de lignina (guaiacílica ou siringílica) pode estar relacionada com o aumento de resistência da madeira.

Ao processo de deposição de lignina nos tecidos vegetais dá-se o nome de lignificação. Este é um processo bioquímico que abrange a formação de monolignóis, o seu

transporte e a polimerização na parede celular. Em um primeiro estágio (oxidação horizontal) é altamente mediado por enzimas intrínsecas à formação dos precursores (figura 1) e ocorre no compartimento citoplasmático (ABREU *et al.*,1999) Na etapa seguinte a formação de lignina (oxidação vertical) ocorre na parede celular e caracteriza-se pela reação de oxidação desidrogenativa dos monolignóis disponíveis. As enzimas oxidoredutoras como peroxidases e isoenzimas correspondentes, atuam na polimerização da lignina, dentro da parede celular, formando um complexo coordenado com peróxido de hidrogênio. A lacase entre outras oxidases também promovem oxidação desidrogenativa dos monolignóis na parede celular (ABREU *et al.*,1990). A lignina provém da rota biossintética do ácido chiquímico, a partir de precursores intermediários que são ativados pelas radiações eletromagnéticas (PEREIRA, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2004). Dentre os precursores intermediários importantes na biossíntese da lignina estão uma série de enzimas: fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), hidroxicinamoil-COA-ligase (4CL),4-hidroxicinamato 3-hidroxilase (C3H),5-adenosil-metionine:cafeato/5-hidroxi (OMT), ferulato-5-hidroxilase (F5H), hidroxicinamoil COA redutase (CCR) e cinamil álcool desidrogenase (CAD). As ligninas são classificadas nos seguintes grupos: tipo G (ligninas guaiacílicas); tipo G-S (ligninas guaiacil-siringílicas); e tipo H-G-S (ligninas 4-hidroxifenil-guaiacil-siringílicas) (CHEN, 1991; PILÓ-VELOSO *et al.*, 1993).



**Figura 1:** Precursores da lignina

Para formar os precursores terminais (ésteres de ácidos fenilpropanóides) sucessivas oxidações e metilações são descritas (CHOINOWSKI *et al.*,1999). O éster *p*-cumarato, por exemplo, é hidroxilado na posição meta da cadeia lateral, formando o éster cafeato. Este precursor intermediário é determinante na síntese dos demais precursores monolignóis. Três reações mediadas por cinamil redutase levam aos aldeídos correspondentes (cumaraldeído, coniferaldeído e sinapaldeído), os quais são reduzidos a álcoois através da enzima cinamil álcool desidrogenase (CAD). Todo este processo enzimático ocorre no compartimento citoplasmático, incluindo a oxidação dos três monolignóis na condição de precursores terminais.

A arquitetura molecular da lignina difere segundo a origem botânica dos táxons, entre células e até mesmo dentro da parede celular, respondendo aos efeitos abióticos e bióticos do ambiente (LARROQUE & PLANCHON, 1990 *apud* PEREIRA, 2005). Sua estrutura tem sido objeto de estudo em inúmeros trabalhos científicos, os quais estabelecem propostas estruturais e formação biossintética (BOERJAN, 2003). Considera-se para os mesmos a existência de um provável controle biológico diferenciado segundo os aspectos inerentes a classe botânica a que o vegetal pertence, a influência genética, os

aspectos espaciais da subestrutura da parede celular, entre outros aspectos. Os precursores terminais já mencionados anteriormente apresentam vários sítios reativos capazes de constituírem ligações cruzadas entre si, preferencialmente sobre a cadeia lateral (HIGUCHI, 1980). O aumento do grau de metoxilação a partir dos precursores: ácido cumárico, ácido coniferílico e ácido sinápico correspondem à diminuição do número de ligações intermoleculares, possibilitando a formação de uma rede de ligações intermonoméricas na maioria envolvendo ligações C-C. Isso constitui base na composição química e conseqüentemente nas formas estruturais adquiridas após a polimerização na parede celular (ABREU *et al.*, 2009).

## 2.2 Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas que tem como princípio o isolamento de um explante (célula, tecido ou um órgão) e o cultivo sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (PASQUAL *et al.*, 1998), ampliando os conhecimentos para a compreensão dos fenômenos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas.

Segundo Higashi *et al.*, (2002) a cultura de tecidos apresenta-se como um método alternativo na propagação de *Eucalyptus* spp. por oferecer vantagens como: taxa mais elevada de multiplicação, menor necessidade de espaço físico, ausência de pragas e doenças durante o cultivo *in vitro*, além de ser uma técnica mais segura, graças ao maior controle dos fatores envolvidos.

Em espécies florestais com interesse farmacológico a cultura de tecidos apresenta-se como alternativa por permitir a seleção e multiplicação em escala comercial de variedades vegetais resistentes à pragas e outras condições de estresse (ZENCK, 1998). O sistema *in vitro* pode se constituir, ainda, em uma excelente ferramenta para a produção, em grande escala, de metabólitos bioativos (BUFFA FILHO *et al.*, 2001).. Outra vantagem do uso da cultura de células para obtenção de substâncias químicas relaciona-se a desvinculação do processo de produção em relação a aspectos fisiológicos do organismo, como sazonalidade e biossíntese tecido-específica (FOWLER, 1988; DI COSMOS & MISAWA, 1995; BARRUETO, 1999; AKALEZI *et al.*, 1999).

O crescimento e o padrão de desenvolvimento da maior parte dos cultivos *in vitro* estão diretamente relacionados com a composição do meio e a concentração dos reguladores de crescimento presentes no meio (CORDEIRO *et al.*, 2004). Entre os meios de cultura utilizados, o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) é o mais usado (SILVA *et al.*, 2006). Entretanto, é importante destacar que, para cada tipo de célula, há a necessidade de se empregar um meio de cultura específico, que contenha, adequadamente, os nutrientes e agentes indutores (suplementação hormonal) necessários ao desenvolvimento das células, pois, é adequada composição hormonal nos meios nutritivos que fornece as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). Além da composição dos meios de cultura, as condições físicas de incubação, como a temperatura, umidade, intensidade, qualidade e duração do período de luz, e o próprio genótipo do material vegetal cultivado, influem sobre a morfogênese dos tecidos vegetais (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário como os polifenóis, os quais exercem importante papel no metabolismo destas espécies, bem como na defesa contra predadores e microorganismos.

Contudo, a oxidação fenólica constitui um dos principais problemas enfrentados para o estabelecimento de culturas *in vitro* de espécies arbóreas (COSTA, 2006; ANDRADE, 2006).

A propagação de plantas através da cultura de tecidos tem sido realizada pelo emprego das culturas de calos, órgãos, células e protoplastos (HIGASHI *et al.*, 2000). A formação de calos a partir de um explante é denominada calogênese (VENTURIERI & VENTURIERI, 2004). O calo corresponde a uma massa de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, tamanho, conteúdo celular e espessura da parede (FLORES *et al.*, 1998), ou seja, é um tecido amorfo e desorganizado, formado pela intensa atividade de células vegetais (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Para que haja a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante (FLORES *et al.*, 1998). Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (FLORES *et al.*, 1998). Em geral induz-se a formação de calos, a partir de explantes cultivados em meio de cultura contendo fitorregulador auxina isolado, ou em associação com citocinina (RIOS, 2004).

Altas concentrações de auxinas associadas a baixas concentrações de citocinina propiciam o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. Concentrações iguais, em geral, induzem a produção de calos.

As citocininas pertencem a uma classe de hormônios associada ao crescimento e desenvolvimento das plantas, participando no controle da divisão celular, alongamento celular, crescimento e senescência foliar (NISHIMURA *at al.*, 2004), além de favorecerem a produção de calos embriogênicos (CHEE & CANTLIFFE, 1988). A cinetina está envolvida na regulação da dominância apical, formação de órgãos, retardamento da quebra de clorofila, desenvolvimento dos cloroplastos, abertura e fechamento dos estômatos, desenvolvimento das gemas e brotações e na regulação da expressão gênica (CASTRO, 2002).

As auxinas são produzidas nos ápices caulinares, e transportadas para outras regiões da planta. São caracterizadas, principalmente, pela capacidade de estimular o alongamento celular, mas também é responsável pela formação inicial das raízes, diferenciação vascular, tropismo, desenvolvimento de gemas axilares, flores e frutos (CATO, 2006). Como auxina, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos reguladores de crescimento mais freqüentemente utilizados (AMMIRATO, 1983; KRIKORIAN *et al.*, 1990), principalmente em cultura de tecidos, para indução de calo, e em culturas em suspensão (GASPAR *et al.*, 1996).

Os reguladores de crescimento como indutores exógenos da lignificação podem ser testados durante a formação de calos *in vitro* (CATO, 2006). Silva (2007) comprovou que 2,4-D induz a lignificação em calos de *E. grandis*, e Souza (2007) testou concentrações de 2,4-D e cinetina na indução de lignina extracelular em cultura de células em suspensão de *E. urophylla*, comprovando sua eficiência para estudos de lignificação. Pereira (2005) testou o 2,4 -D em aplicações realizadas direto em plantas de *E. grandis* cultivadas em casa de vegetação, e comprovou a eficácia do regulador de crescimento no favorecimento da lignificação.

### 2.3 *Lophanthera lactescens* Ducke

A família Malpighiaceae de distribuição tropical e subtropical (LORENZI *et al* 2008), apresenta sua maior diversidade na América do Sul (JUDD *et al.*,1999 *apud* SILVA, 2007). Apresenta cerca de 1.300 espécies, organizadas em 75 gêneros (LORENZI *et al.*,2008), sendo referida como uma das dez mais bem representadas no bioma cerrado (MENDONÇA *et al.*,1998 *apud* SILVA, 2007).

O gênero *Lophanthera* possui cinco espécies, quatro delas encontradas na Amazônia (ANDERSON, 1983). *Lophanthera lactescens* Ducke (anexo 9) tornou-se popular nas últimas décadas como árvore ornamental. Sua dispersão é bastante restrita, sendo encontrada, naturalmente, apenas no baixo Tapajós, em matas de várzea alta. A ocorrência dá-se tanto no interior da mata primária densa, como em formações secundárias (PAOLI, 1997). O florescimento ocorre durante os meses de fevereiro-maio e a maturação dos frutos em setembro-outubro (LORENZI, 1992). Na região sudeste do país é utilizada para a arborização urbana, pela sua beleza, quando florida, sendo indicada, para plantios em áreas degradadas de preservação permanente. Algumas espécies produzem frutos que são consumidos em grande escala no comércio e utilizados na indústria de refrigerantes, geléias e compotas (PAOLI, 1997).

Trevisan *et al.*(2003) ao avaliar as propriedades físicas e mecânicas da madeira de cinco espécies florestais em função da deterioração em dois ambientes por um período de doze meses, constataram que a densidade, a resistência à compressão e os módulos de elasticidade (MOE) e ruptura (MOR) na flexão estática da madeira de *L. lactescens* não foram afetados significativamente pelo intemperismo nos ambientes estudados. Esses autores atestaram ainda, a maior durabilidade da densidade da madeira em campo de apodrecimento a céu aberto, maior resistência à compressão e menor susceptividade ao ataque a organismos xilófagos, entre as espécies estudadas. Pêgos (2007), também confirma a resistência da madeira de *Lophanthera*, ao expor toras de madeira desta espécie ao ataque de *C. gestroi* em seu trabalho e Lunz & Carvalho (2002), verificaram em seu trabalho a resistência da madeira ao ataque de escolitídeos.

Além das qualidades inerentes à madeira; estudos envolvendo a obtenção e análise de constituintes químicos permitiu o isolamento de terpenóides codificados como LLD-1, LLD-3, LLD-4, LLD-7a, LLD-7b, LLD-8a e LLD-8b. Alguns testes farmacológicos *in vivo* permitiram comprovar os principais efeitos do nor - triterpeno extraído da madeira e codificado como LLD-3, tais como hipotermia, redução do tônus muscular, aumento das secreções brônquica e salivar, diarreia e diminuição do limiar para convulsão pelo pentilenotetrazol. Pode produzir bradicardia e contrações cíclicas e irregulares em coração e íleo isolados, respectivamente, além de outros efeitos mais complexos que podem explicar os efeitos *in vivo* (ABREU *et al.*, 1990).

Em decorrência do potencial madeireiro e farmacológico, faz-se necessário um estudo mais aprofundado da cultura de tecidos usando esta espécie; uma vez que a reprodução de espécies herbáceas medicinais com ciclo de vida curto, via de regra, não oferece maiores dificuldades, mas, a propagação de espécies arbóreas que apresentem substâncias e características de interesse, frequentemente se constitui um desafio devido às limitações de germinação, desenvolvimento lento de propágulos e difícil enraizamento (BUFFA FILHO *et al.*, 2002).

## 2.4 *Eucalyptus* spp

As plantações florestais brasileiras são compostas, sobretudo, por espécies de híbridos e clones de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e de pinheiro (*Pinus* spp.) (MORA & GARCIA, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2003). Além da madeira e da celulose, os plantios florestais podem oferecer outros produtos, como resinas, óleos essenciais e medicamentos, além de colaborarem para o sequestro de carbono e contribuírem para a conservação das florestas naturais (SOARES *et al.*, 2003).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae (ANDRADE, 2006), um dos gêneros predominantes da flora australiana, estendendo-se das áreas subalpinas às florestas úmidas costeiras, florestas temperadas e à zona mais árida da Austrália, cobrindo também a maior área dos reflorestamentos no mundo (JÚNIOR, 2004). As espécies deste gênero têm merecido atenção de empresas e instituições de pesquisa no Brasil devido ao aumento crescente de novos plantios, em função dos ganhos alcançados em produtividade florestal, visando a atender a crescente demanda de madeira (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2005). O grande número de espécies, a grande plasticidade ecológica e a sua excelente produção, tornaram-no matéria-prima de inúmeras indústrias florestais, (FINGER *et al.*, 1993), permitindo considerá-lo como potencial fornecedor de uma madeira bem definida para a produção de múltiplos produtos (TRUGILHO *et al.*, 2007).

*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Eucalyptus. urophylla* S.T. Blake e o híbrido *Eucalyptus urograndis*, estão entre as principais espécies cultivadas no Brasil (SOUZA *et al.*, 2004; ABRAF, 2006).

O *Eucalyptus grandis* caracteriza-se pela maior produtividade de madeira (m<sup>3</sup>/ha) entre as espécies (CRUZ, 2007). Possui excelente resposta silvicultural com rápido crescimento e propriedades desejáveis para usos múltiplos como tronco retilíneo, resistência mecânica elevada e boa trabalhabilidade (TOMASELLI, 2000; ROCHA, 2004). A madeira é destinada à produção de celulose e papel, carvão vegetal, painéis de fibra e aglomerado, produtos de serraria; apresentando, ainda, propriedades de isolamento térmico e acústico (SOARES *et al.*, 2003; ROCHA, 2004).

*Eucalyptus urophylla* é uma espécie importante para plantios em regiões tropicais úmidas devido ao excelente vigor, grande capacidade de rebrota e resistência ao cancro (EMBRAPA, 2003).

*Eucalyptus urograndis* é o híbrido resultante da combinação entre *E. grandis* e *E. urophylla*, e reúne as melhores características dessas espécies, como rápido crescimento, qualidade da madeira, boa adaptação a condições adversas de solo e resistência a doenças (MARQUES, 2008).

As espécies de eucalipto possuem em média a seguinte composição química da madeira: 40-62 % de celulose, 12-22 % de hemicelulose e 15-25 % de lignina (HILLIS & BROWN, 1978). O estudo qualitativo e quantitativo de seus constituintes pode levar à obtenção de vários outros produtos (TRUGILHO *et al.*, 2007), indicando a necessidade de maiores estudos sobre cultura de tecidos do gênero.

## CAPÍTULO I

LIGNIFICAÇÃO EM PLANTAS *in vitro* E CULTURA DE CALOS DE  
*Lophanthera lactescens* Ducke

## RESUMO

*Lophanthera lactescens* Ducke (Malpighiaceae) é uma espécie endêmica da Amazônia brasileira que além de propriedades medicinais apresenta potencial para a indústria de produtos florestais. Plantas de *L. lactescens* foram cultivadas *in vitro* visando o estabelecimento de protocolo eficiente da indução de calogênese, avaliação de ligninas produzidas nos calos, e avaliação do padrão de lignificação nas plantas cultivadas *in vitro*. Para o estudo anatômico foram utilizadas as técnicas usuais. A lignificação nas paredes celulares foi acompanhada através de microscopia de infravermelho e de fluorescência, e de testes histoquímicos. A lignificação nas paredes celulares foi acompanhada através de microscopia de infravermelho, fluorescência, e testes histoquímicos. Sinais em 1325-1330  $\text{cm}^{-1}$  e 1260-1270  $\text{cm}^{-1}$ , característicos de ligninas tipo siringílica e guaiacílica foram registrados nos calos e no caule. Sinais em 1738  $\text{cm}^{-1}$ , indicando presença de celulose e hemicelulose, foram observados em caules com entorses que apresentavam fibras gelatinosas. No calo proveniente de explante radicular e na raiz foi encontrada somente lignina do tipo guaiacílica. Através da microscopia de fluorescência foi observada a deposição de lignina inicialmente nos ângulos das células, com o depósito progressivo ocorrendo na parede secundária.

Palavras – chave: *Lophanthera lactescens* Ducke, calogênese, lignificação.

## ABSTRACT

*Lophanthera lactescens* Ducke (Malpighiaceae) is an endemic species in the Brazilian Amazon that besides medical properties has potential for the forest products industry. Plants of *L. lactescens* were cultured *in vitro* towards establishing an efficient protocol for callus induction, evaluation of lignin produced in the callus, and evaluation of the pattern of lignification in plants grown *in vitro*. For anatomical study, we used the usual techniques. The lignification in the cell walls was accompanied by micro-FTIR and fluorescence, and histochemical tests. The lignification in the cell walls was accompanied by micro-FTIR, fluorescence and histochemical tests. Signs in 1325-1330 and 1260-1270  $\text{cm}^{-1}$ , characteristic of syringyl and guaiacyl type lignins were recorded in the callus and stem. Signs at 1738  $\text{cm}^{-1}$ , indicating the presence of cellulose and hemicellulose, were observed in stems with sprains that had gelatinous fibers. In callus from root explants and the root was found only guaiacyl lignin type. By fluorescence microscopy we observed the deposition of lignin in the angles of the cells initially, with the progressive deposition occurring in the secondary wall.

Keywords: *Lophanthera lactescens* Ducke, callus formation, lignification.

## 1 INTRODUÇÃO

*Lophanthera lactescens* Ducke, conhecida popularmente, como lofantera-da-amazônia e chuva-de-ouro, atinge de 10-20m de altura, com tronco variando de 30-40 cm de diâmetro. A espécie é semidecídua, heliófita ou esciófita, seletiva higrófila, característica da floresta pluvial equatorial da região Amazônica (PAOLI, 1997). A madeira é moderadamente pesada e compacta, sendo empregada na construção civil, como vigas, forros, caibros, para marcenaria e carpintaria (PIO-CORRÊA, 1926; LORENZI, 1992; CARREIRA *et al.*, 1991 *apud* PAOLI, 1997). Trevisan *et al.* (2003) estudaram a durabilidade natural e a ocorrência de térmitas em madeiras de cinco espécies (em contato com o solo) por um período de dois anos, e constataram que a madeira dessa espécie foi a mais durável em termos de resistência, dureza e ataque de térmitas.

Visando o aproveitamento da biodiversidade florestal brasileira, a madeira se destaca para indústria de base florestal e, portanto o estudo da composição química possibilita o seu melhor aproveitamento (ABREU *et al.*, 1990). A ausência de informações sobre os aspectos biológicos de *L. lactescens* estimula o desenvolvimento de protocolos para a cultura de tecidos, padrões de crescimento, desenvolvimento e lignificação *in vitro*, preenchendo as lacunas de conhecimento sobre espécies arbóreas brasileiras.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Madeira do Departamento de Produtos Florestais, Instituto de Florestas da UFRRJ. As sementes para a produção dos explantes foram coletadas no campus dessa universidade próximo ao Instituto de Biologia e armazenadas à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar à 62%. A espécie foi identificada e registrada sob o nº (RBR 34066), no Herbário do Departamento de Botânica, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### 2.1 Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Lophanthera lactescens* Ducke

As sementes foram desinfestadas em capela de fluxo laminar, com solução de hipoclorito de sódio 2,5% + 0,2 mL/L de detergente tween 20 por 20 minutos, lavadas 5 vezes em água bideionizada estéril e imersas em peróxido de hidrogênio 1% por 30 minutos, sendo posteriormente inoculadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo  $30\text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e acrescido de 7 g de Agar (Vetec®). O pH foi ajustado em 5,7 e a esterilização do meio foi feita em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, por 30 minutos. As sementes foram inoculadas em frascos (6 cm X 10 cm) de vidro transparente com tampa translúcida, contendo 50 mL de meio de cultura, sendo distribuída de 5 a 7 sementes por frasco, perfazendo um total de 30 frascos. Os recipientes foram mantidos em sala de germinação com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , e umidade relativa do ar à 62% por um período de 60 dias para a indução de calogênese e de 9 a 20 meses para realização da caracterização anatômica e estudo de lignificação.

### 2.2 Estabelecimento de Protocolo para Indução de Calogênese

Nessa etapa foi realizado teste de indução de calogênese em diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), para definir o melhor protocolo de indução de calos da espécie.

Ápices caulinares (0,3 cm) de plântulas com idade de 20 dias, cultivadas nas condições descritas anteriormente, foram inoculados em meio MS, contendo  $30\text{ g.L}^{-1}$  de sacarose,  $18,12\ \mu\text{M}$  2,4-D, 6 g de Agar (Vetec®), pH ajustado em 5,7 e esterilização em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, por 20 minutos. Os explantes foram subcultivados a cada duas semanas e em cada subcultura subdivididos para efeito de clonagem. Após 90 dias de indução, fragmentos dos calos medindo aproximadamente  $0,3\text{ cm}^2$ , foram transferidos para novos meios de cultura MS, modificados nas concentrações de 2,4-D: (P<sub>1</sub>: MS +  $4,53\ \mu\text{M}$  2,4-D; P<sub>2</sub>: MS +  $9,06\ \mu\text{M}$  2,4-D; P<sub>3</sub>: MS +  $18,12\ \mu\text{M}$  2,4-D; P<sub>4</sub>: MS +  $27,18\ \mu\text{M}$  2,4-D e P<sub>5</sub>: MS +  $36,24\ \mu\text{M}$  2,4-D) e acrescido de  $20\text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. Os fragmentos foram inoculados nos meios de cultura em placas de petri; sendo distribuído 4 fragmentos por recipientes e 5 recipientes por tratamento, totalizando 20 fragmentos por tratamento. Os recipientes foram acondicionados em BOD, onde permaneceram em ausência de luz, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e UR de  $\pm 62\%$ , sendo subcultivados a cada duas semanas. Ao final de 120 dias após a primeira subcultura, os calos foram avaliados quanto ao crescimento, friabilidade e oxidação para determinação do meio de cultura mais eficiente na indução da calogênese.

### **2.3 Estudo de Lignificação em Calos de *L. lactescens* Produzidos *in vitro***

Após a definição do melhor protocolo, foi induzida calogênese usando como fonte de explantes órgãos vegetativos, para avaliação de lignificação em calos da espécie estudada.

Segmentos de raiz (0,5 cm), ápice (0,3 cm), folha (0,5 cm<sup>2</sup>) e caule (0,5 cm) de plantas germinadas *in vitro* foram inoculados em meio MS acrescido de 9,06 µM 2,4-D (P<sub>2</sub>), nas mesmas condições descritas anteriormente (escuro, 25° C ± 1°C, UR 62%, subcultivadas a cada duas semanas), sendo distribuídos cinco explantes por recipientes, totalizando cinco recipientes por tipo de explante. Após 120 dias de indução, os calos foram avaliados por espectrometria de infravermelho, teste de Wiesner (LIN & DENCE, 1992) e microscopia de fluorescência.

Para a análise por espectrometria de infravermelho, os calos passaram por pré-extração segundo metodologia de Bruce & West (1989). Posteriormente foram congelados em nitrogênio líquido por 30 segundos e liofilizados por 24 horas. Após a liofilização, 1,0 mg do material seco foi misturado e triturado com 100 mg de KBr (MORAIS *et al.*, 2005), prensado em forma de pastilha e introduzido no compartimento do espectrômetro, modelo VARIAN 640-IRFT-IR spectrometer. Os espectros foram registrados no modo transmitância. Para o teste de Wiesner, foram retirados fragmentos dos calos com auxílio de um pincel e transferidos para a solução do reagente preparado por uma combinação de 50 mL de uma solução de floroglucinol 2% em etanol 95% e 25 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado (LIN & DENCE, 1992). Para as análises em microscopia de fluorescência, fragmentos dos calos foram transferidos para solução de auramina 0,01%, por 1 minuto, lavados em água bideionizada e observados em microscópio de fluorescência, com filtro de excitação em 470-490 nm e emissão em 515-565 nm (BARROS & MIGUENS, 1998).

### **2.4 Análise de Lignina de Raiz e Caule de Plantas de *L. lactescens* cultivadas *in vitro* submetidos a diferentes processos de extração.**

Plantas com idade de 15 meses foram retiradas do meio de cultura, secas ao ar (± 30 °C) e posteriormente moídas (caule e raiz, separadamente) em um micro-moinho de facas do tipo Willey 340 Modelo TE 040 e moinho de bolas giratório para redução da granulometria. Parte das amostras de caule e raiz passou por extração em etanol (BRUCE & WEST, 1989) e o restante em extração contínua em um extrator do tipo Soxhlet, segundo a escala eliotrópica: ciclohexano, acetato de etila, e metanol, durante 18 horas. Posteriormente essas amostras foram extraídas em água a 75 °C ± 2 °C, repetidamente, por até 10 horas (BROWNING, 1967), secas ao ar e posteriormente em estufa a 60 °C até adquirir peso constante.

O material obtido foi tritura e moído com KBr, como descrito anteriormente na metodologia de análise de calos, e posteriormente foi avaliado por espectrometria de infravermelho.

## 2.5 Caracterização Anatômica e Avaliação da Lignificação de Raiz e Caule de *Lophanthera lactescens* Cultivadas *in vitro*

Para avaliação da estrutura anatômica e acompanhamento do processo de lignificação, foram realizados cortes transversais do caule, do 1º ao 8º entrenós e das raízes adventícias (2 a 17,5 cm da coifa) de indivíduos com idade entre 9 e 20 meses. As plantas mediam entre 8 e 12 cm de altura, possuíam de 5 a 8 entrenós, caule verde claro, levemente estriado, naturalmente retilíneo, e retorcido quando a planta atingia crescimento superior a capacidade do recipiente; folhas opostas, simples com estípula na base.

As amostras de raízes analisadas apresentavam 14-17,5 cm de comprimento e aproximadamente 1 mm de diâmetro. As raízes, geralmente, apresentaram cor branca, muito delgadas e em alguns trechos acima da região apical, ocorreram partes espessadas seguidas de estreitamentos. Com o desenvolvimento das raízes há o enrolamento das mesmas no recipiente e uma mudança de coloração, passando a marrom. Como o estudo foi realizado em plantas com estágio de desenvolvimento avançado (a partir dos nove meses de idade), não foi possível definir a raiz primária.

Seções transversais do caule e raiz foram seccionadas com auxílio de micrótomo de Ranvier, para o preparo das lâminas semipermanentes. As seções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 50%, neutralizadas em água acética a 1%, lavadas em água destilada, e coradas com mistura de azul de astra a 2% e safranina a 0,5% diluídos em água (BUKATSCH, 1972). Foram montadas em lâmina e lamínulas com água e lutadas com esmalte incolor.

Fotomicrografias foram obtidas com microscópio Olympus BX 51 acoplado ao computador, provido de sistema de processamento de imagens Cell Imaging Software.

Na confecção de lâminas permanentes o caule foi colocado diretamente em álcool 30% seguindo série alcoólica 100% e emblocadas em historresina Leica (GERRITS & SMID, 1983). Foram feitas seções transversais com 3 µm no micrótomo rotativo que foram a seguir, coradas com azul de toluidina 0,05% (O' BRIEN *et al.* 1981).

Para os testes histoquímicos foram obtidas seções histológicas com material fresco para detectar: amido, pelo uso de lugol (BERLYN & MIKSCHE, 1976); lignina, pelo teste de Wiesner (LIN & DENCE, 1992); teste de Maüler para identificação do tipo de lignina guaiacólica (coloração marron) e siringílica (coloração vermelha) (LIN & DENCE, 1992). Esse teste foi modificado para evitar ruptura das células, utilizando-se a concentração de NH<sub>4</sub>OH com diluição de 50%, durante 15 segundos. A natureza dos cristais de oxalato de cálcio foi verificada, pela dissolução em ácido clorídrico sem efervescência (CHAMBERLAIN, 1932) e por observação em luz polarizada; substâncias lipídicas foram evidenciadas pelo Sudan IV (JENSEN, 1962) e as substâncias fenólicas, com uso de dicromato de potássio (GABE, 1968).

Para a microscopia de infravermelho os cortes foram colocados em recipientes de vidro (2 cm X 4 cm), congelados em nitrogênio líquido por 30 segundos e liofilizados por 12 horas entre lâminas de vidro. Após a liofilização, os cortes foram colocados sobre uma lâmina de KBr e os espectros registrados em espectrômetro VARIAN 610-IRFT-IR acoplado ao microscópio usando o modo reflectância.

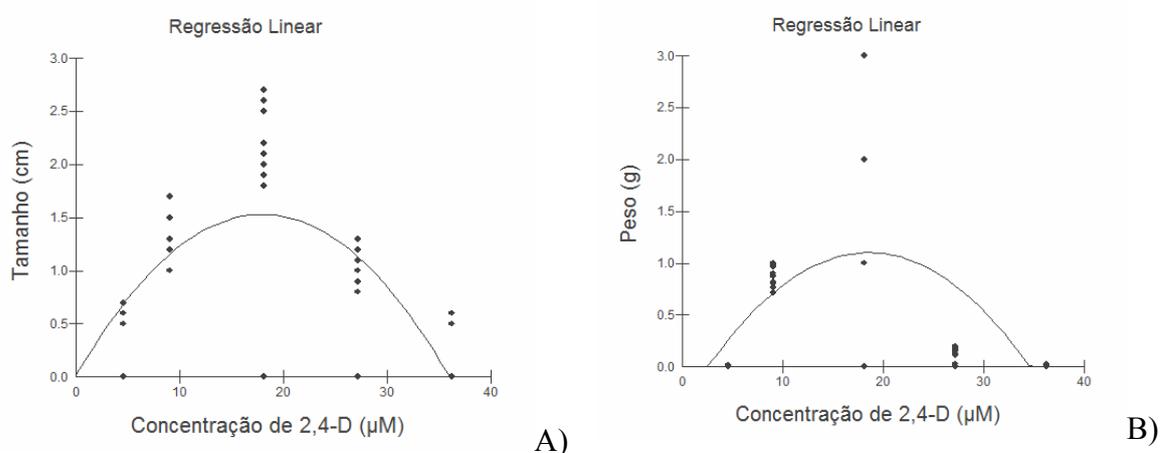
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Estabelecimento de Protocolo para Indução da Calogênese

Os resultados demonstraram diferenças no crescimento (Figura 2), friabilidade e oxidação entre os calos submetidos aos meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D.

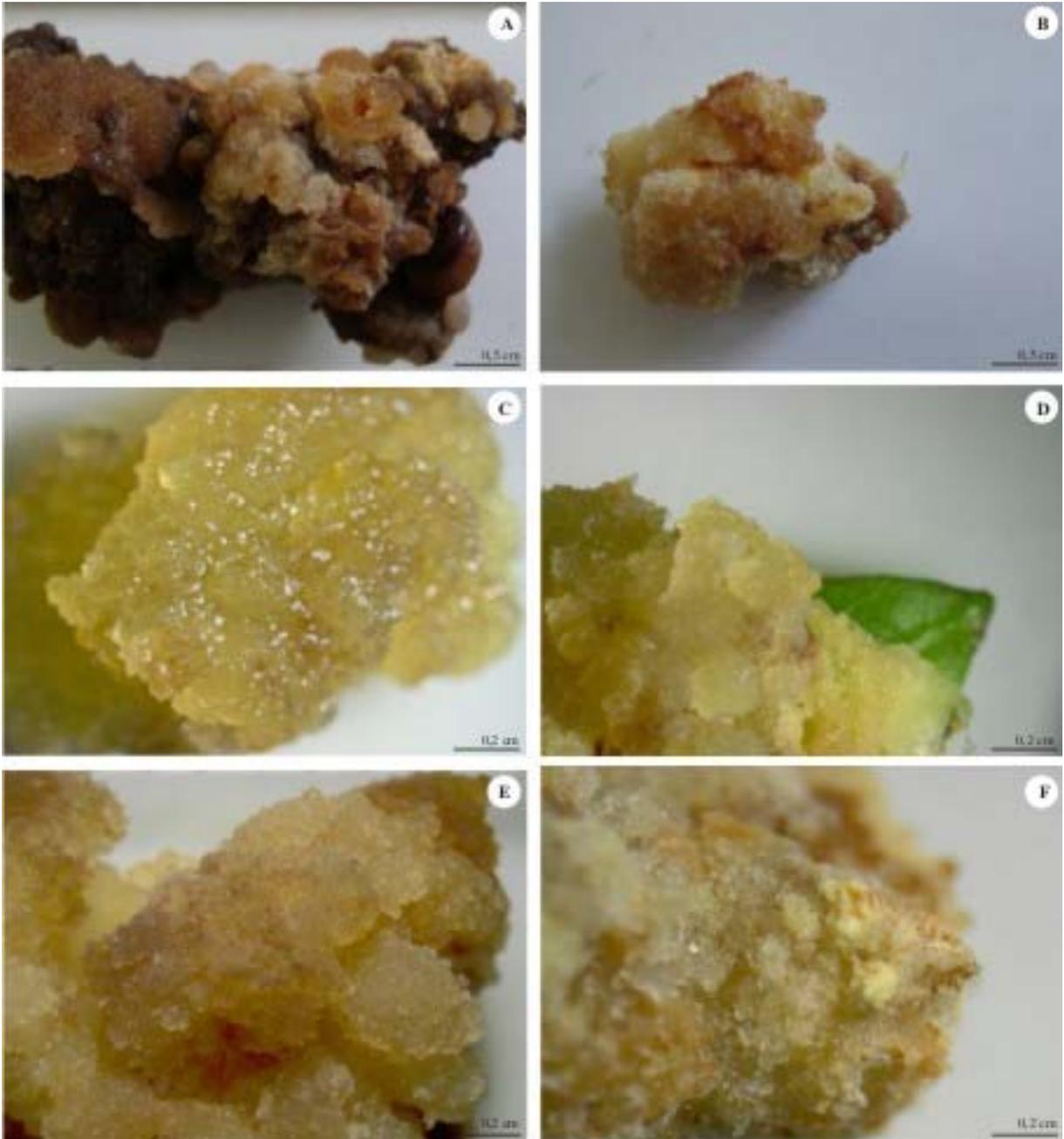
O protocolo 2 (9,06  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) apresentou os melhores resultados para calejamento de *L. lactescens*, com formação de calos de consistência mais friáveis e sem apresentar sinais de oxidação. Em diversas pesquisas com *Coffea arabica* (FORNI, 1993), *Smilax japecanga* (SANTOS *et al.*, 1997) e *Fragaria* sp (FLORES *et al.*, 1998), foram obtidos efeitos similares com uso desse hormônio em diferentes concentrações. O protocolo 3 (18, 12  $\mu\text{M}$  2,4-D) resultou numa maior produção de massa calogênica; no entanto, neste tratamento os calos apresentaram-se mais oxidados e menos friáveis, comparado ao protocolo 2.

Apesar de Grattapaglia & Machado (1990 *apud* Silva 2007) afirmarem que a indução da calogênese é favorecida por altas concentrações de auxinas, verificou-se que na espécie estudada protocolos com concentrações superiores a 18,12  $\mu\text{M}$  2,4-D apresentaram calos menores, oxidados e pouco friáveis, sugerindo uma menor eficiência deste regulador de crescimento. Por outro lado, protocolos com concentrações inferiores a 9,06  $\mu\text{M}$  também apresentaram calejamento de baixa qualidade (Figura 3 A e B), corroborando os resultados encontrados por Silva 2007.



**Figura 2:** Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D no tamanho e matéria fresca de calos de explante apical de *L. lactescens* cultivada *in vitro*.

Os explantes apicais e foliares apresentaram os melhores resultados de calejamento dentre os órgãos vegetativos induzidos. Esse resultado coaduna com Alves *et al.* (2004) que obtiveram 100% de calejamento em explantes foliares de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* submetidos a tratamento *in vitro* com reguladores de crescimento. Calos oriundos de raiz apresentaram 30% e explantes caulinares apresentaram 70% de calejamento. Lima *et al.* (2002) utilizando explantes caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para indução de calogênese *in vitro*, observaram a formação de calos mesmo na ausência de reguladores vegetais. Na avaliação da friabilidade, os calos oriundos de folha e ápice apresentaram friabilidade superior ao observado nos calos de origem caulinar e radicular (Figura 3 C - F).

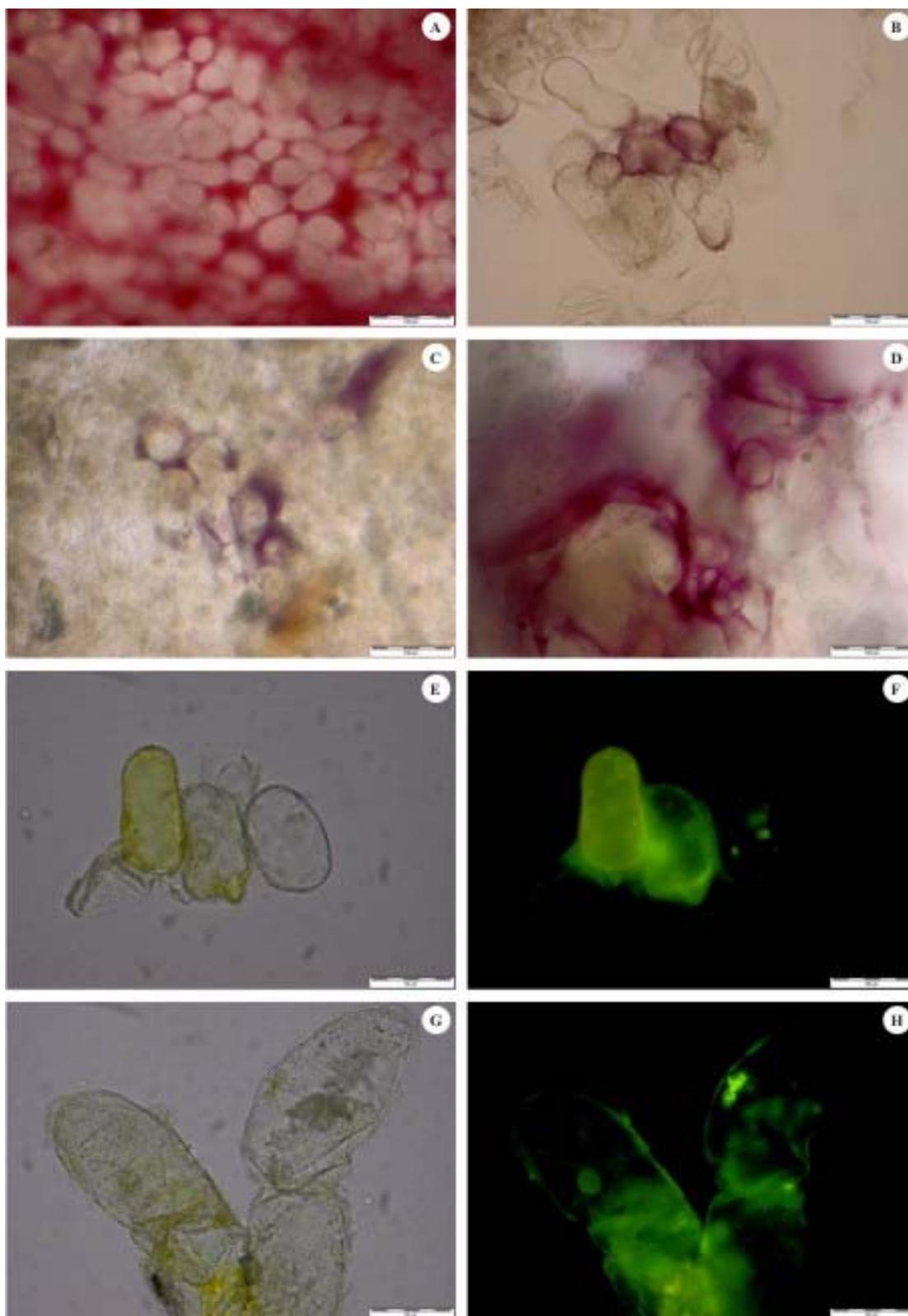


**Figura 3:** Calos de *Lophanthera lactescens*. A e B - calos de explante apical induzido com MS +18,12  $\mu$ M 2,4-D (A) e MS + 9,06  $\mu$ M 2,4-D (B), respectivamente; C a F - calo de explante apical, foliar, caulinar e radicular, respectivamente, induzido com MS + 9,06  $\mu$ M 2,4-D.

### 3.2 Estudo de Lignificação em Calos de *L. lactescens*

O teste de Wiesner realizado indica a presença de lignina em todas as amostras. Calos oriundos de ápices apresentaram uma coloração mais intensa em todas as células (Figura 4 A). Nos calos provenientes de raiz, folha e caule nem todas as células reagiram ao teste (Figura 4 B - D), o que sugere que a lignina não tenha sido formada de forma homogênea. A microscopia de fluorescência através do reagente auramina O confirmou a presença de lignina em todos os calos avaliados (Figura 4 E-H).

Os resultados dos testes histoquímicos corroboram os resultados obtidos com a espectrometria de infravermelho (anexo 5). Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentaram sinais em  $1325-1330\text{ cm}^{-1}$ , característico de respiração (movimento) de anel sirigílico com contribuição do estiramento  $\text{C}=\text{O}$  e de estruturas condensadas; e sinais intensos em  $1266-1270\text{ cm}^{-1}$ , característicos de respiração do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de  $\text{C}=\text{O}$ . Os sinais em  $1030-1095\text{ cm}^{-1}$  indicam deformação de  $\text{C}-\text{H}$  de anel guaiacílico (ABREU, 1990). Sinais correspondentes ao estiramento de  $\text{OH}$  em  $3412-3460\text{ cm}^{-1}$  e vibração do esqueleto aromático em  $1505-1515\text{ cm}^{-1}$  também foram observados (anexo 1, espectros 1- 4).



**Figura 4:** Células de calos de *Lophanthera lactescens*. A - D - células de calos provenientes de explante apical, foliar, caulinar e radicular, respectivamente, submetidas ao teste de Wiesner; E e G- células de calos de explantes apical e caulinar vista ao microscópio óptico; F e H- respectivas células submetidas a microscopia de fluorescência com reagente auramina O.

### **3.3 Análise de Lignina em Raiz e Caule de Plantas de *L. lactescens* cultivadas *in vitro* submetidos a diferentes processos de extração.**

Através da análise das amostras de caule e raiz submetidas a extração em etanol e extração contínua (ciclohexano, acetato de etila, e metanol), obtiveram-se espectros de infravermelho que permitiram verificar a presença de lignina (anexo 6). Os sinais em 1325-1330  $\text{cm}^{-1}$  e 1260-1270  $\text{cm}^{-1}$  apresentaram-se claramente e com intensidades diferentes nos espectros de caule, tanto nas amostras livres de extrativos como nas amostras tratadas com etanol, revelando se tratar de uma lignina guaiacólica/siringólica com alta proporção de unidade guaiacila (anexo 2, espectros 5 e 7). Morais *et al.* (2005) também observaram a presença de sinais indicativos de lignina do tipo guaiacólica, analisando madeira de *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl através de espectrometria de infravermelho. Também foi observado sinal em 1738  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento de C=O em cetonas não conjugadas, de grupo éster, indicando presença de celulose e hemicelulose (ABREU & OERTEL, 1999). Os espectros registrados a partir de calos caulinares não apresentaram estes sinais, indicando uma característica observada apenas em indivíduo com desenvolvimento completo.

No órgão raiz não foram evidenciados sinais característicos de presença de lignina tipo siringólica. O mesmo ocorreu em calos obtidos a partir de explantes radiculares. Espectros de amostras de raiz, em ambos os tratamentos (etanol e extração contínua), e espectros de calos radiculares apresentaram sinais em 1260-1270  $\text{cm}^{-1}$  característico de lignina guaiacólica. Sinais intensos em 1030-1095  $\text{cm}^{-1}$  indicando presença deste tipo de lignina também foram evidenciados. (anexo 2, espectros 6 e 8).

### **3.4 Caracterização Anatômica e Avaliação da Lignificação em Raiz e Caule de *Lophanthera lactescens* Cultivadas *in vitro***

#### **3.4.1 Raiz Adventícia**

O estudo da raiz adventícia de *L. lactescens* foi realizado nas regiões distal e proximal (Figura 5 A).

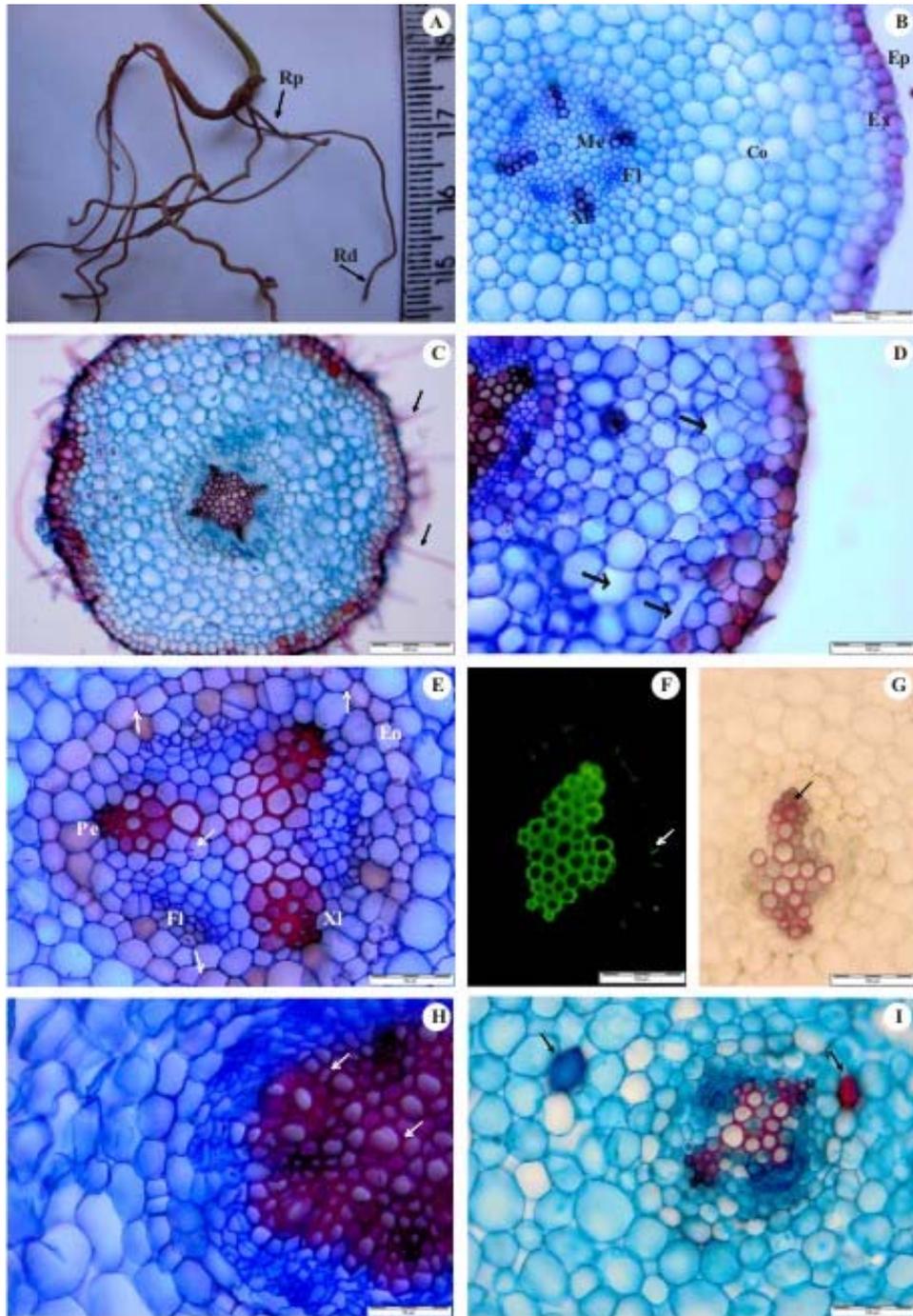
A raiz, em seção transversal, a 1-4 cm do ápice radicular (região distal), apresenta estrutura primária, formada inicialmente por epiderme com células altas, que logo se expandem, constituindo os pêlos absorventes (Figura 5 B e C). O córtex apresenta uma camada de células da exoderme bem desenvolvidas e que se encontram suberificadas a 3-4 cm do ápice. O parênquima é formado por sete camadas de células isodiamétricas, circundadas por pequenos espaços intercelulares que se expandem na região proximal entre 12-17,5 cm, caracterizando lacunas (Figuras 5 D). Nessa região algumas células adjacentes à exoderme, sofrem divisões periclinais e anticlinais. As células da endoderme apresentam somente estrias de caspary em toda a extensão da raiz (Figura 5 E e F). No cilindro central, o periciclo é formado por uma camada de células parenquimáticas. O xilema primário variou o número de pólos de diarco, triarco a tetarco (Figura 5 C, E e G). Na maioria das espécies de eudicotiledôneas o número de pólos de xilema varia entre os espécimes ou em raízes diferentes de uma mesma planta (ESAU, 2000; FAHN, 1990). O número de pólos de protoxilema, segundo Mauseth (1988), pode estar relacionado com o vigor da raiz e seu diâmetro. Algumas vezes, numa mesma raiz em estágio de desenvolvimento avançado,

quando mais robusta, pode haver um avanço no número de pólos do xilema. Para Dickison (2000), essa variação é influenciada pelo nível de hormônios encontrados no ápice radicular.

A medula é formada por células parenquimáticas, que a 3-4 cm do ápice, se lignificam completamente. Somente na região proximal as fibras do xilema encontram-se lignificadas e espessas tornando-as conspícuas (Figura 5 H).

No tecido parenquimático de raízes tuberosas de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae) foi observado um grande número de drusas e cristais prismáticos, bem como idioblasto com polifenóis (Marques *et al.* 2007).

Metcalf e Chalk (1950), já mencionavam para a família a presença de cristais de oxalato de cálcio solitários ou agrupados e células com tanino. Em *L. lactescens*, na região distal, foi observado nas células corticais, inúmeros idioblastos com substâncias fenólicas (Figura 5 I). Nas plantas, os taninos servem para proteger contra apodrecimento e lesões causadas por microorganismos (FAHN, 1982). No entanto, apesar dos indivíduos estudados estarem em ambiente estéril, apresentaram tais substâncias, indicando outra atividade fisiológica da espécie.



**Figura 5:** Raiz adventícia de *Lophanthera lactescens* cultivada *in vitro*. A – Detalhe da raiz adventícia. B–I – Seção transversal. B – Aspecto geral da raiz a 1-4 cm do ápice radicular. C – Aspecto geral, evidenciando os pêlos absorventes (→) e os quatro pólos do xilema. D – Aspecto geral da raiz na região proximal, mostrando as lacunas (→). E – Detalhe da raiz triarca, destacando a estria de Caspary na endoderme (→). F – Detalhe da raiz diarca lignificada e das estrias de Caspary suberificadas (→) evidenciada pela microscopia de fluorescência. G – Detalhe da lignificação no xilema (→), evidenciado pelo teste de Wiesner. H – Detalhe da raiz na região proximal, mostrando as células parenquimáticas e as fibras com paredes espessas e lignificadas (→). I – Detalhe da região cortical, mostrando a presença de substâncias fenólicas no parênquima e na endoderme. Rp= Região proximal, Rd= Região distal; Ep= Epiderme; Ex= Exoderme; Co= Córte; Fl= Floema; Xl= Xilema; Me= Medula; En= Endoderme; Pe= Periciclo. Barras= C= 200µm. B, D, F, G, I= 100 µm. E, H= 50 µm.

### 3.4.2 Anatomia do Caule

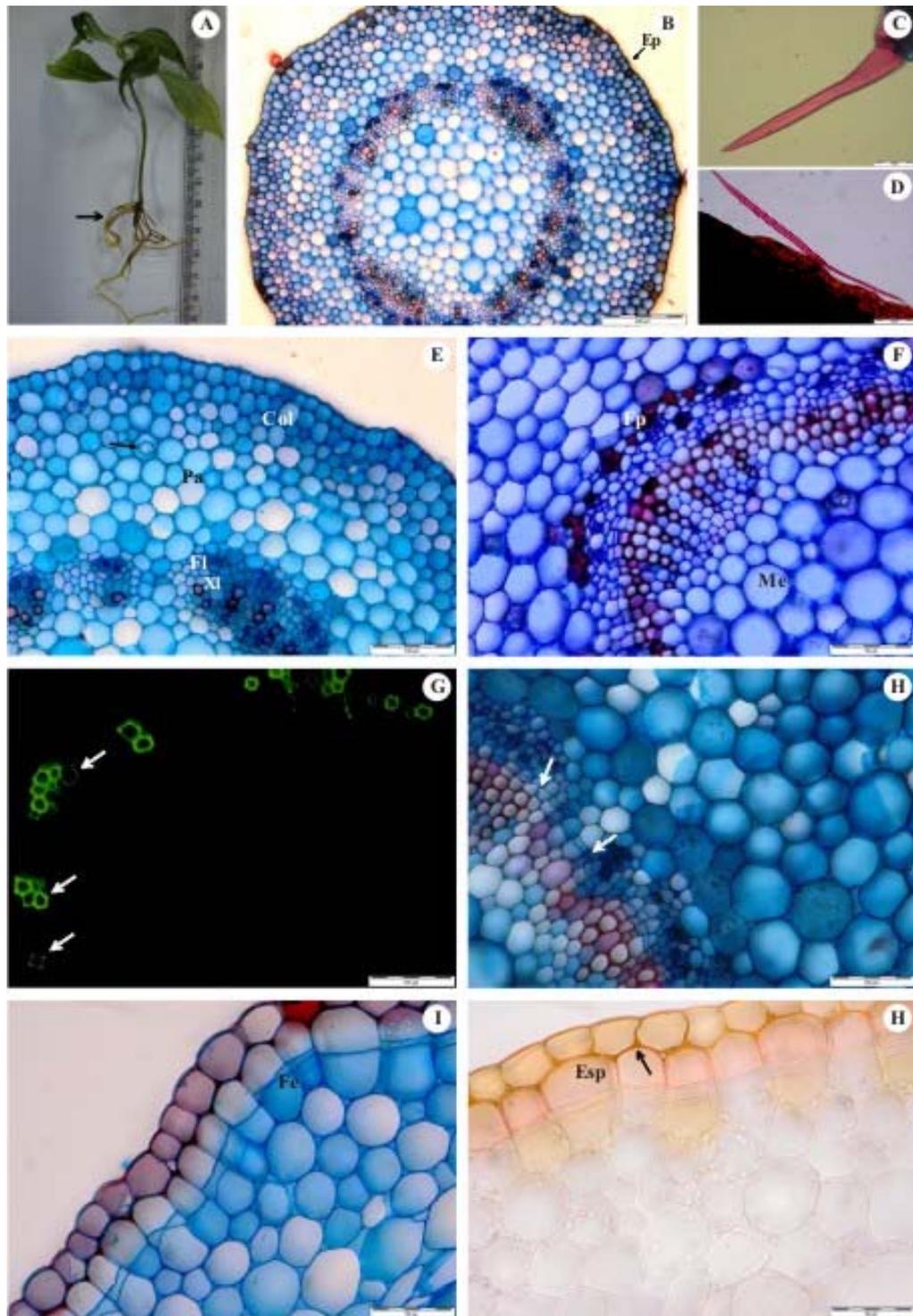
A seguir a descrição anatômica dos espécimes que apresentaram um desenvolvimento normal, com caules cilíndricos e retilíneos (Figura 6 A.).

No caule, do primeiro ao terceiro entrenós, em seção transversal, observa-se uma epiderme uniestratificada, cujas células apresentam formas e tamanhos variados e paredes periclinais externas convexas, revestida por uma cutícula delgada (Figura 6 B). São observados tricomas tectores unicelulares e tricomas com dois braços horizontais (dibraqueados), suspensos por uma célula basal de parede espessa (Figura 6 C e D). Metcalfe & Chalk (1950), mencionaram a presença desses tricomas em *Malpighia urens* L.

O córtex, nos primeiros entrenós, é constituído por 2-3 camadas de colênquima angular, 5-6 camadas de células parênquimáticas (Figura 6 E) e uma bainha amilácea, geralmente conspícua até 5º entrenó (não ilustrado).

No cilindro central, observa-se a lignificação das fibras pericíclicas, ocorrendo nos primeiros entrenós. Os elementos condutores estão organizados em feixes colaterais, interrompidos por células parenquimáticas, caracterizando um cilindro descontínuo (Figura 6 F). O floema é formado por elementos de tubo crivado e células companheiras diminutas. Ocorrem frequentemente, idioblastos com conteúdos diversos. Essas características observadas em *L. lactescens* corroboram as descrições feitas por Metcalfe & Chalk (1950) para alguns gêneros da família.

O xilema, em desenvolvimento primário, apresenta fileiras radiais com 2-8 elementos condutores. É possível acompanhar o processo de lignificação dos elementos de protoxilema e metaxilema através de microscopia de fluorescência. Em *L. lactescens*, a deposição de lignina inicia-se nos ângulos das células, com o depósito progressivo na parede secundária, corroborando a descrição feita por Donaldson *et al.* (2001). O processo é finalizado com a impregnação ocorrendo por completo na parede secundária (Figura 6 G). A partir do 4º e 5º entrenós, observou-se a presença de uma a duas camadas de células cambiais no cilindro central (Figura 6 H). No mesmo estágio, na região cortical, entre os primeiros estratos subepidérmicos, ocorre a diferenciação do felogênio (Figura 6 I). Nesse momento, observa-se nas células do primeiro estrato subepidérmico, um espessamento da parede periclinal externa, que se estende às paredes anticlinais. A reação com sudan IV confirma o início da suberificação (Figura 6 J). Segundo Metcalfe & Chalk (1950), no início do surgimento da periderme, células de paredes delgadas podem apresentar um grande espessamento na parede tangencial e de menor extensão nas paredes laterais, reiterando os resultados obtidos para a espécie estudada.



**Figura 6:** *Lophanthera lactescens* cultivada *in vitro*. A - Visão geral de indivíduo com caule retilíneo, aos nove meses. B- C, E-J - Seção transversal do caule. B - Aspecto geral do caule no 2º entrenó. C - Detalhe do tricoma tector unicelular. D - Vista frontal do tricoma tector dobrado. E - Aspecto geral do córtex, mostrando colênquima angular e idioblastos com drusa (→). F - Detalhe do cilindro central, mostrando as fibras pericíclicas. G - Detalhe do processo de lignificação do xilema com microscopia de fluorescência. H - Detalhe do cilindro central com início de formação do câmbio fascicular (→). I - Detalhe da diferenciação do felogênio. J - Detalhe da suberificação (→). Ep= Epiderme; Col= Colênquima; Pa= Parênquima; Fl= Floema; Xi= Xilema; Fp= Fibra parenquimática; Me= Medula; Fe= Felogênio; Esp= Estrato subepidérmico. Barras= B= 200µm; H, G, E, D= 100µm; C, J, I, F= 50µm.

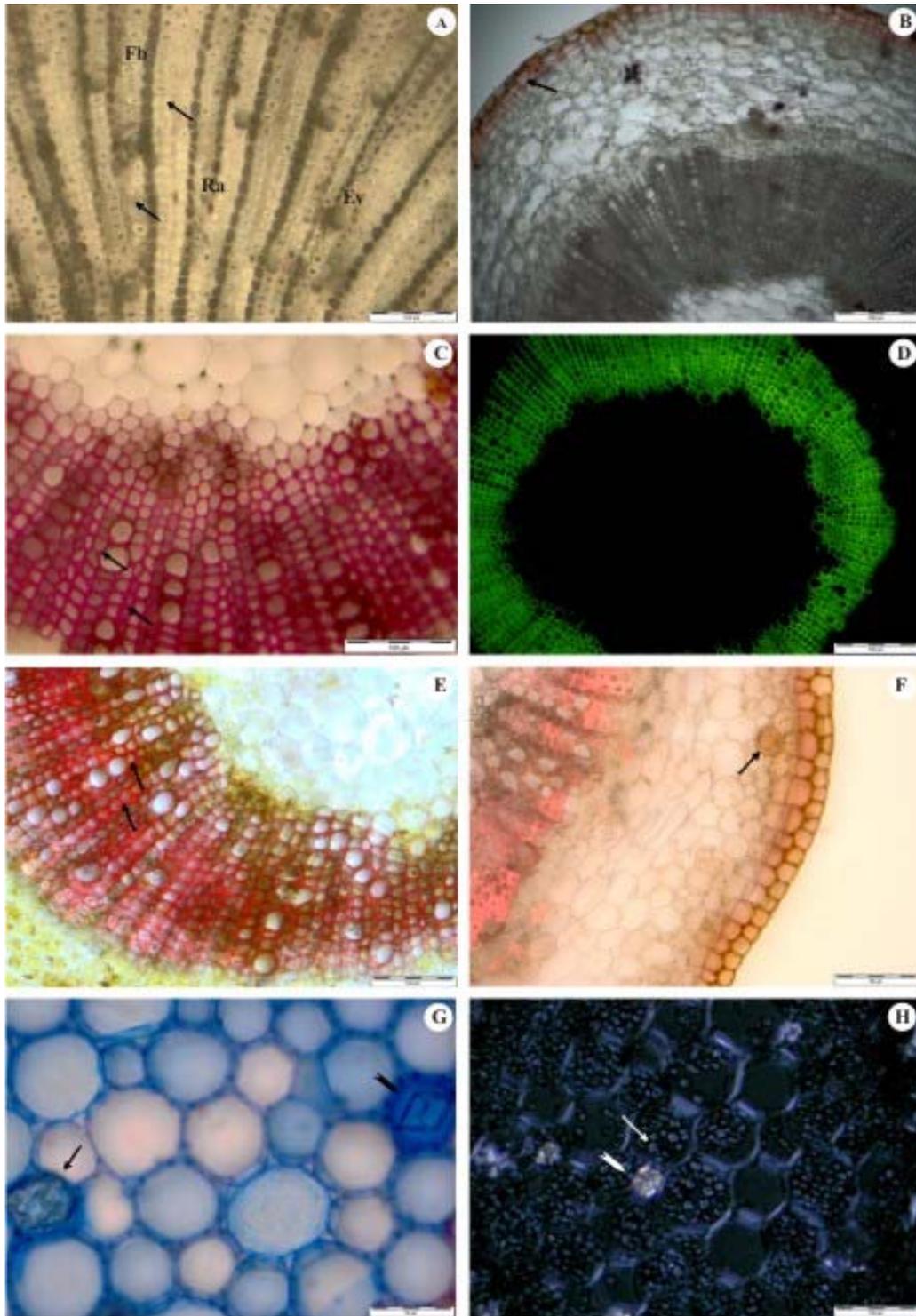
Nos 7º e 8º entrenós observa-se o xilema com seus elementos secundários bem expandidos, região cortical reduzida e periderme formada, porém, pouco desenvolvida. Em seção transversal, o xilema secundário de *L. lactescens* apresenta os elementos de vasos solitários e com contorno de circular a poligonal; fibras com paredes bem espessas e lúmen reduzido; raios parenquimáticos unisseriados (Figura 77 A e B). Os elementos celulares apresentam paredes lignificadas e espessas, confirmadas pelo teste de Wiesner e microscopia de fluorescência (Figura 77 C e D). Através do teste de Maüler observa-se a coloração vermelha intensa nas paredes, destacando o predomínio de lignina siringílica nessa estrutura (Figura 7 E). Esses resultados corroboram os registros obtidos através da microscopia de infravermelho, com sinais em 1325-1330  $\text{cm}^{-1}$ .

Diversos conteúdos celulares são identificados através dos testes histoquímicos, nos distintos entrenós do caule de *L. lactescens*, desenvolvida *in vitro*. Substâncias lipídicas estão presentes na cutícula, no súber e em idioblastos com paredes espessas, distribuídos no parênquima cortical (Figura 7 F). Abreu *et al.* (1990) estudaram a madeira dessa espécie e identificaram esteróides e terpenóides no extrato benzênico.

Idioblastos cristalíferos, portadores de drusas de oxalato de cálcio, são observados nos parênquimas cortical e medular, bem como no floema, desde o 2º entrenó. Porém, nota-se uma abundância desses cristais nos 3º e 4º entrenós. Foi observada apenas na medula, a presença de cristal poliédrico (Figura 7 G). Metcalfe & Chalk (1950), constataram que a frequência desses cristais é maior nas espécies do Velho Mundo que nas espécies americanas.

Substâncias fenólicas são também identificadas em idioblastos na epiderme, no parênquima cortical e no floema. Como foi mencionado anteriormente, são metabólitos especiais envolvidos com diversas atividades biológicas, como defesa química e captação de radicais livres (FAHN, 1982; GOTTLIEB, 1996).

Grãos de amido compostos estão presentes em grande quantidade no parênquima cortical e medular dos caules jovens nos 4º e 5º entrenós e no parênquima radial a partir do 7º entrenó (Figura 7 G e H).



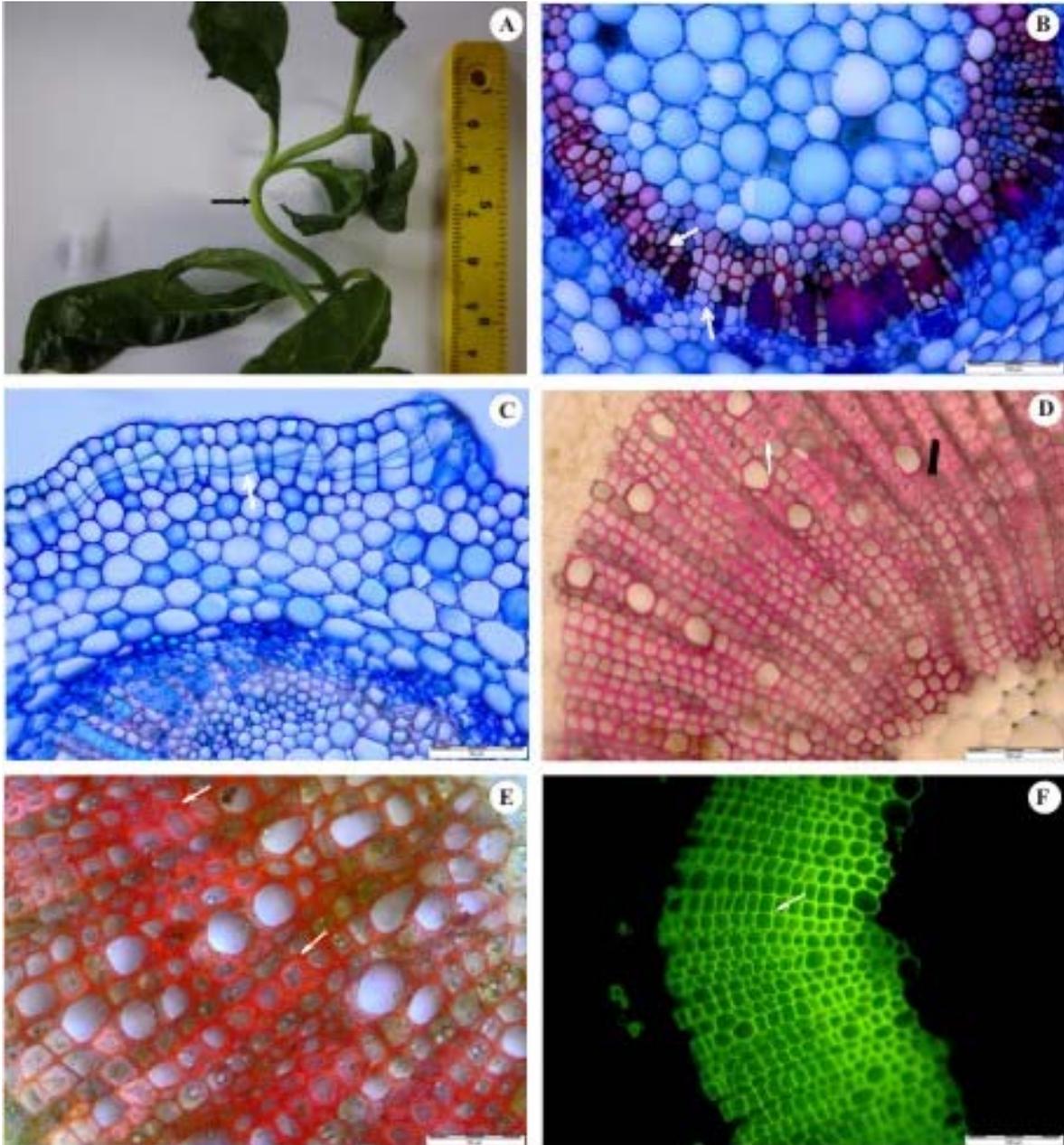
**Figura 7:** Seção transversal do caule de *Lophanthera lactescens*. A – Detalhe do xilema secundário, no 7º entrenó, com elementos celulares de parede espessas (→). B – Aspecto geral da periderme, evidenciado pelo sudan IV (→). C – Lignina nas paredes secundárias, evidenciadas pelo teste de Wiesner (→). D – Lignificação das células confirma pela microscopia de fluorescência e uso de auramina O. E – Lignina siringílica nas paredes dos elementos do xilema, evidenciada pelo teste de Maüler (→). F – Presença de idioblastos com substâncias lipídicas (→), pelo sudan IV. G - Detalhe dos cristais de oxalato de cálcio na medula, tipo drusa (→) e poliédrico (▸). H – Detalhe do grão de amido (→) e da drusa (→) na região medular observado em microscopia de polarização. Fb= Fibra; Ra= Raios parenquimáticos; Ev= Elementos de vaso. Barras= B, D= 200µm; A, C, E= 100µm; F, G, H= 50 µm.

Alguns espécimes estudados, em decorrência do seu desenvolvimento acentuado, apresentaram entorse no caule em todos os níveis, que resultaram em modificações estruturais (Figura 8 A).

Observa-se desde o 2º entrenó a formação de fibras gelatinosas no floema e no xilema, ocupando a metade do cilindro central. O câmbio apresenta de uma a duas camadas celulares em toda extensão caulinar. Concomitantemente, diferencia-se o felogênio, entre as primeiras camadas de células do colênquima. A diferenciação dos meristemas secundários e a produção dos novos tecidos parece ser uma resposta ao grande desenvolvimento do órgão no recipiente de crescimento (Figura 8 B e C).

Espécies arbustiva-arbóreas que crescem algumas vezes em encostas ou em regiões instáveis geram galhos e troncos inclinados, que apresentam em sua estrutura interna, o chamado lenho de reação. Nas angiospermas, o seu desenvolvimento dá-se na porção superior, sendo denominado lenho de tração. A identificação dessa estrutura é facilmente realizada pela presença de fibras ou fibrotraqueídes gelatinosas. Essas células apresentam paredes com uma camada interna espessa (camada G), constituída por alfa-celulose e com pouca ou nenhuma quantidade de lignina (COSTA, 2006). Tais fibras são consideradas altamente higroscópicas, possibilitando o armazenamento de água (PAVIANI, 1974; LUCHI, 2004; JACOMASSI *et al.* 2007). Em *L. lactescens*, desde o 3º até o 7º entrenós, é possível observar essas características da parede através dos testes de Wiesner, Maüler e da auramina O na microscopia de fluorescência (Figura 8 D, E e F). Estes resultados coadunam com a hipótese de que tecidos especiais de tração possuem ligninas com alto teor de unidade siringílica.

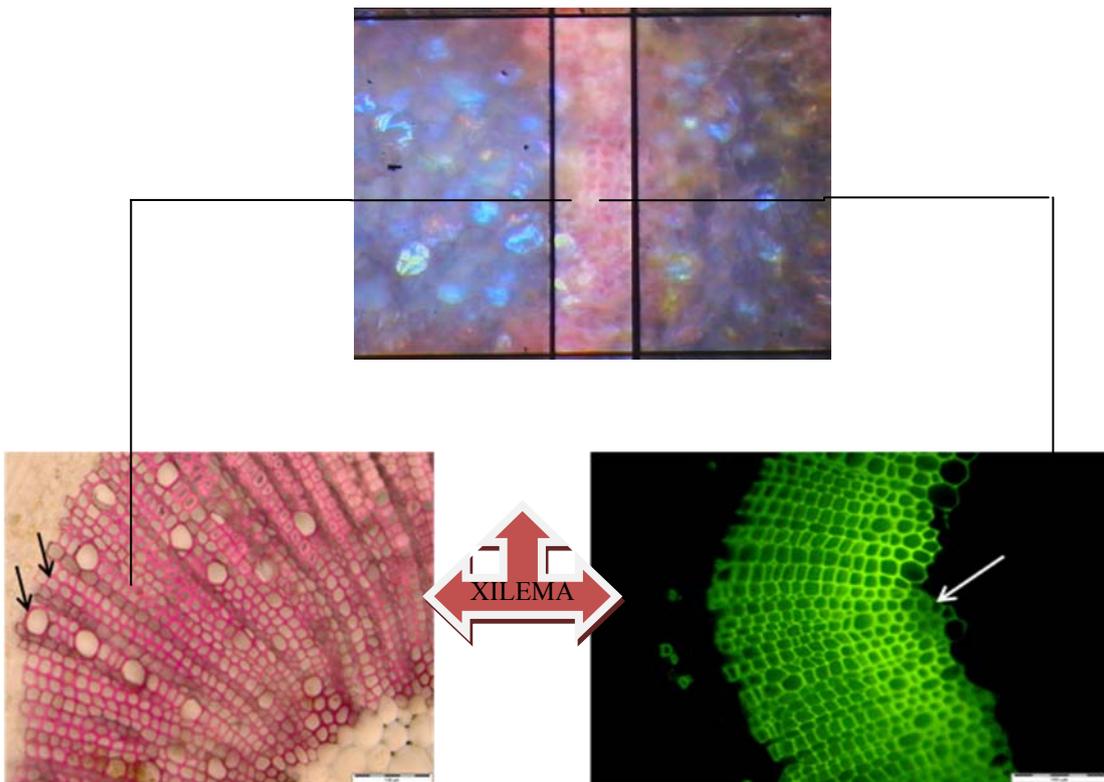
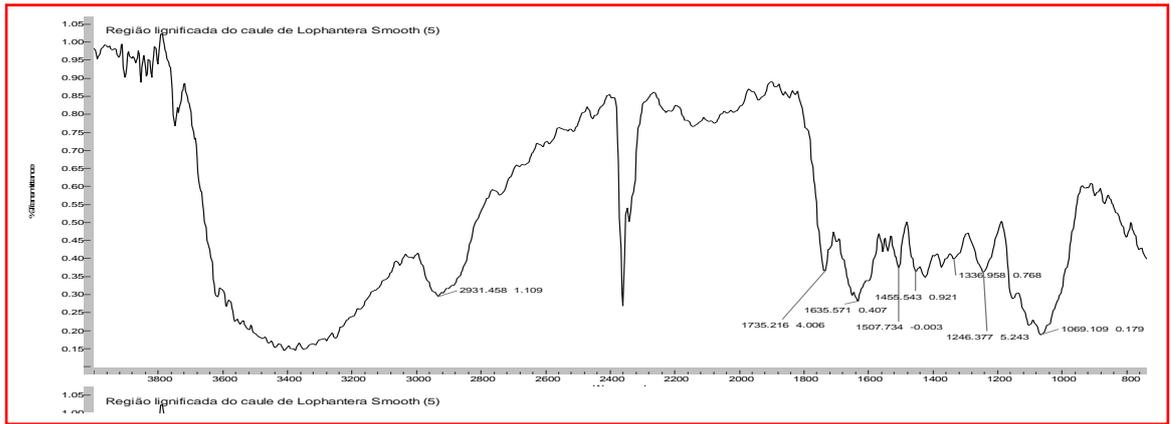
O aumento da atividade cambial na metade do cilindro central e a ocorrência de fibras gelatinosas nos caules retorcidos de *L. lactescens*, parece uma estratégia de sobrevivência em resposta ao ambiente de crescimento *in vitro*. Muito embora, Heimsch (apud METCALFE & CHALK, 1950) tenha citado a ocorrência de fibras gelatinosas no lenho de espécies da família Malpighiaceae e Marques *et al.* (2007), observado nas raízes tuberosas de *Heteropteris aphrodisiaca*, espécie crescida no cerrado.



**Figura 8:** *Lophanthera lactescens* propagada *in vitro*. A – Vista geral de indivíduo com caule retorcido. B-F – Seção transversal do caule. B – Aspecto geral do caule no 3º entrenó, evidenciando fibras gelatinosas (→) e câmbio (→). C – Detalhe da diferenciação do felôgênio (→). D – Detalhe das fibras gelatinosas, com teste de Wiesner, mostrando paredes lignificadas (→) e camada G (●). E – Detalhe da lignificação das paredes das fibras, utilizando o teste de Maüler. F – Detalhe da lignificação das fibras gelatinosas através da microscopia de fluorescência. Barras= B, D, F= 100µm; C, E= 50µm.

Através da análise das seções pelo infravermelho (Figura 9) foram obtidos espectros que mostraram sinais característicos de lignina em todas as regiões, desde os tecidos mais jovens (próximo ao ápice) (anexo 3, espectros 1-16, anexo 7). Os espectros de absorção no infravermelho do 3º e 4º entrenós evidenciaram melhores características para indicar presença de lignina. Espectros de absorção da região da periderme com sinais em  $1325-1330\text{ cm}^{-1}$ ,  $1260-1270\text{ cm}^{-1}$ ,  $1030-1095\text{ cm}^{-1}$  podem ser característicos de substâncias fenólicas identificadas na região da epiderme nos testes histoquímicos. O sinal correspondente ao estiramento de C=O em cetonas não conjugadas de grupo éster, que pode ser característico de presença celulose e hemicelulose, foi evidenciado ao longo de todos os entrenós avaliados. Abreu & Oertel, (1999) ao estudarem a propriedade de maleabilidade do lenho de *Paullinia rubiginosa* Cambess também observaram a presença de grupamento éster que sugere a existência de plasticidade em diversos materiais.

As amostras obtidas através de diferentes métodos de extração possibilitaram a identificação no infravermelho de lignina siringílica/guaiacólica no caule e lignina guaiacólica na raiz.



**Figura 9:** Organograma interativo que inclui o espectro de infravermelho registrando sinal de lignina (→) da região do xilema na figura central (→); à esquerda reação positiva para o teste de Wiesner e à direita a indicação da lignina através da fluorescência. Barras= 100µm.

## 4 CONCLUSÕES

- ✓ *Lophanthera lactescens* Ducke apresenta-se como possível modelo de estudo de lignificação para espécies lenhosas, tendo em vista a observação de acentuado crescimento de tecidos secundários na espécie *in vitro*.
- ✓ A estrutura caulinar de *L. lactescens in vitro* apresenta uma diversidade de conteúdos celulares quando comparado à raiz, que apresenta somente substâncias fenólicas.
- ✓ O processo de lignificação nas raízes adventícias de *L. lactescens in vitro* ocorre com mais intensidade na região proximal.
- ✓ A microscopia de infravermelho associada à microscopia de fluorescência se mostrou eficiente para a identificação da composição da lignina *in loco*.
- ✓ Foi observado *in loco* que o processo de lignificação em *L. lactescens* inicia-se nos ângulos das células.
- ✓ Indivíduos com estresse de crescimento apresentam fibras gelatinosas e ligninas com alto índice de unidades sinapílicas paredes das células do xilema.
- ✓ O cultivo de explantes apicais em meio MS suplementado com MS +9,06  $\mu\text{M}$  2,4-D, resultou na maior produção de calos friáveis e sem sinal de oxidação.
- ✓ Uma maior produção de lignina foi verificada em calos obtidos a partir de explantes de ápice caulinar, que apresentaram reação mais intensa ao teste de Wiesner.
- ✓ Foram evidenciadas ligninas do tipo siringílica/guaiacílica no caule e lignina do tipo guaiacílica na raiz.

## **CAPÍTULO II**

### **LIGNIFICAÇÃO EM CULTURA DE CALOS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Eucalyptus spp***

## RESUMO

O gênero *Eucalyptus*, originário da Austrália, apresenta as espécies mais cultivadas em plantios florestais no Brasil, devido principalmente, à excelente resposta silvicultural com rápido crescimento e a propriedades desejáveis para usos múltiplos da madeira. Entre essas espécies o *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake e o híbrido *Eucalyptus urograndis*, entre as mais importantes. A árvore possui tronco retilíneo, madeira com elevada resistência mecânica e boa trabalhabilidade, sendo destinada, entre outros, à produção de celulose e papel, carvão vegetal, painéis de fibra e aglomerado. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de indução da calogênese e avaliar o processo de lignificação em calos produzidos com diferentes fontes de explantes. O protocolo que induziu uma maior produção de calos foi o protocolo MS + 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, + 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina + 20  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose. A espécie *E. urophylla* apresentou calos mais friáveis e maiores. Os calos oriundos de diferentes fontes de explantes avaliados no infravermelho também apresentaram sinais indicativos da presença de lignina do tipo guaiacilica e siringilica.

Palavras-chave: Calogênese, *Eucalyptus* spp, Lignina.

## ABSTRACT

The genus *Eucalyptus*, originating in Australia, presents the most cultivated species in forest plantations in Brazil, due mainly to the excellent response to silvicultural rapid growth and desirable properties for multiple uses of wood. Among these species, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake and the hybrid *Eucalyptus urograndis* among the most important. The tree has a straight trunk, wood with high strength and good workability, and is aimed, among others, the production of pulp and paper, charcoal, fiber panels and crowded. The aim of this study was to establish a protocol for callus induction and evaluate the process of lignification in callus produced with different sources of explants. The protocol that induced a higher production of callus was MS protocol + 10 mM 2.4-D + 2.5 mM kinetin + 20 gL<sup>-1</sup> sucrose. The species *E. urophylla* callus showed larger and more friable. Callus from different sources of explants were also evaluated at the infrared signals indicative of the presence of lignin guaiacyl and syringyl type.

Keywords: Callus, *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. urograndis*

## 1 INTRODUÇÃO

Espécies de crescimento rápido como o eucalipto, apresentam determinados obstáculos quanto ao seu aproveitamento comercial, o que justifica investimentos em busca de soluções capazes de aperfeiçoar tecnologicamente sua utilização (ABREU *et al.*, 2003).

Pela sua importância no setor de produção de papel e celulose, o gênero *Eucalyptus* vem sendo estudado com o objetivo de se entender as vias metabólicas envolvidas no processo de formação da celulose e lignina (POKE *et al.*, 2005). Com o intuito de estudar o processo de formação de lignina nessa espécie, o grupo do Laboratório de Biotecnologia da Madeira/ LBM vem realizando pesquisas na área de biotecnologia, com espécies desse gênero.

Nesse capítulo são apresentados os experimentos realizados para determinação de um protocolo eficiente de produção de calogênese em *Eucalyptus*, e identificação de lignina em calos produzidos a partir de explantes de órgão vegetativos das espécies *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e o híbrido *Eucalyptus urograndis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Madeira/DPF/IF/UFRRJ. As sementes para a produção de plântulas usadas como fonte de explantes foram adquiridas no IPEF (Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais) da Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP). Essas sementes foram coletadas no Pomar de sementes por Mudanças, Talhão A11A21 do IPEF na cidade de Anhembi, estado de São Paulo.

Os procedimentos de desinfestação e germinação de sementes, realizados para as espécies, são idênticos aos procedimentos realizados para *L. lactescens*, descritos no capítulo anterior. As concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e cinetina utilizadas no protocolo para indução da calogênese para as espécies estudadas foram determinadas em experimentos realizados anteriormente no laboratório.

### 2.1 Indução de Calogênese em Diferentes Teores de Sacarose

Para avaliação da influência da sacarose na calogênese de *Eucalyptus*, foi utilizado como fonte de explante, plântulas de *Eucalyptus grandis* com idade de 30 dias. Gemas apicais foram e inoculada em meio MS acrescido de 0,8 g/L de antioxidante PVP, 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, + 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina, 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e adição de 6 g de agar (Vetec<sup>®</sup>), após ajuste do pH para 5.7. A esterilização foi feita em autoclave (121 °C, 1 atm) por 30 minutos. Após quatro subculturas para meio de igual composição em intervalos de 21 dias, fragmentos de aproximadamente 0,3 cm do calo formado foram transferidos para meio MS com diferentes concentrações de sacarose (0,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0  $\text{g.L}^{-1}$ ), quatro fragmentos por recipiente, quatro recipientes por tratamento. A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação, sendo quantificado o percentual de explantes com calos friáveis. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o *software* SISVAR (FERREIRA, 2000).

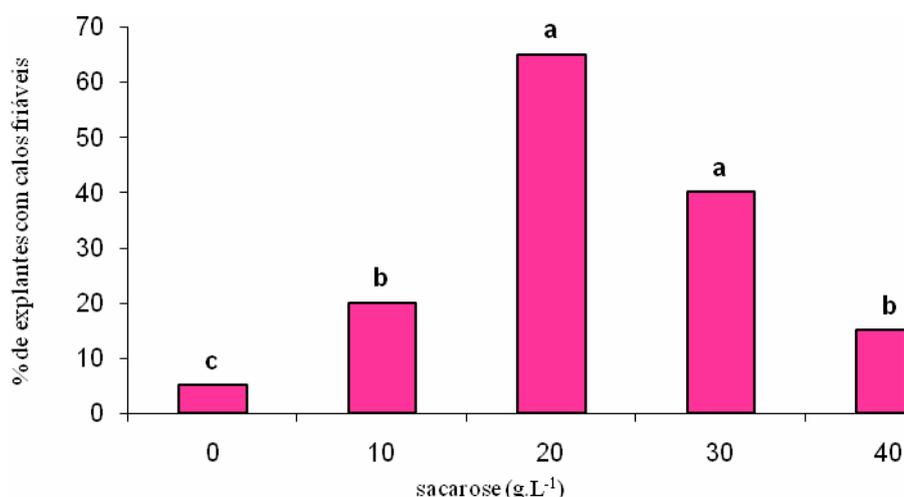
## 2.2 Lignificação em cultura de Calos de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e *E. urograndis*

Para a cultura de calos foram utilizados como fonte de explantes, segmentos de raiz, caule, folha e ápice de plântulas de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e *E. urograndis* com 30 dias. Os explantes foram inoculados em placas de petri contendo meio MS com a mesma formulação descrita anteriormente e teor de 2% de sacarose. Foram utilizados explantes com 0,3 cm para ápice, 0,5 cm<sup>2</sup> para explante foliar e 0,5 cm para caule e raiz; cinco explantes por recipiente, cinco recipientes por tratamento, totalizando 25 explantes por tratamento. Os explantes foram mantidos em BOD com temperatura de 25 °C ± 1°C, em ausência de luz. A cada três semanas os calos foram subcultivados para meio de cultura de igual composição. Após cerca de 90 dias, os calos foram submetidos à mesma metodologia de análise de lignificação descrita para *L. lactescens* (teste de Wiesner, espectrometria no infravermelho e fluorescência).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Efeito da Concentração de Sacarose na Indução de calos em *E. grandis*

Maior porcentagem de calos friáveis foi obtida em meio MS suplementado com 20 g. L<sup>-1</sup> (60%) e 30 g. L<sup>-1</sup> (40%) de sacarose (Figura 10, Figura 11 A e B). A suplementação do meio com 10 g. L<sup>-1</sup> de sacarose resultou na produção calos oxidados e pouco friáveis. Concentrações de sacarose inferiores a 20 g.L<sup>-1</sup> podem resultar em clorose na cultura, enquanto concentrações acima de 40 g.L<sup>-1</sup> podem elevar excessivamente o potencial osmótico do meio, dificultando o desenvolvimento do material (CHONG & PUA, 1985; FLORES *et al.*, 1999; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).



**Figura 10:** Efeito de diferentes concentrações de sacarose na formação de calos friáveis de *E. grandis*. Letras iguais não diferem estaticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

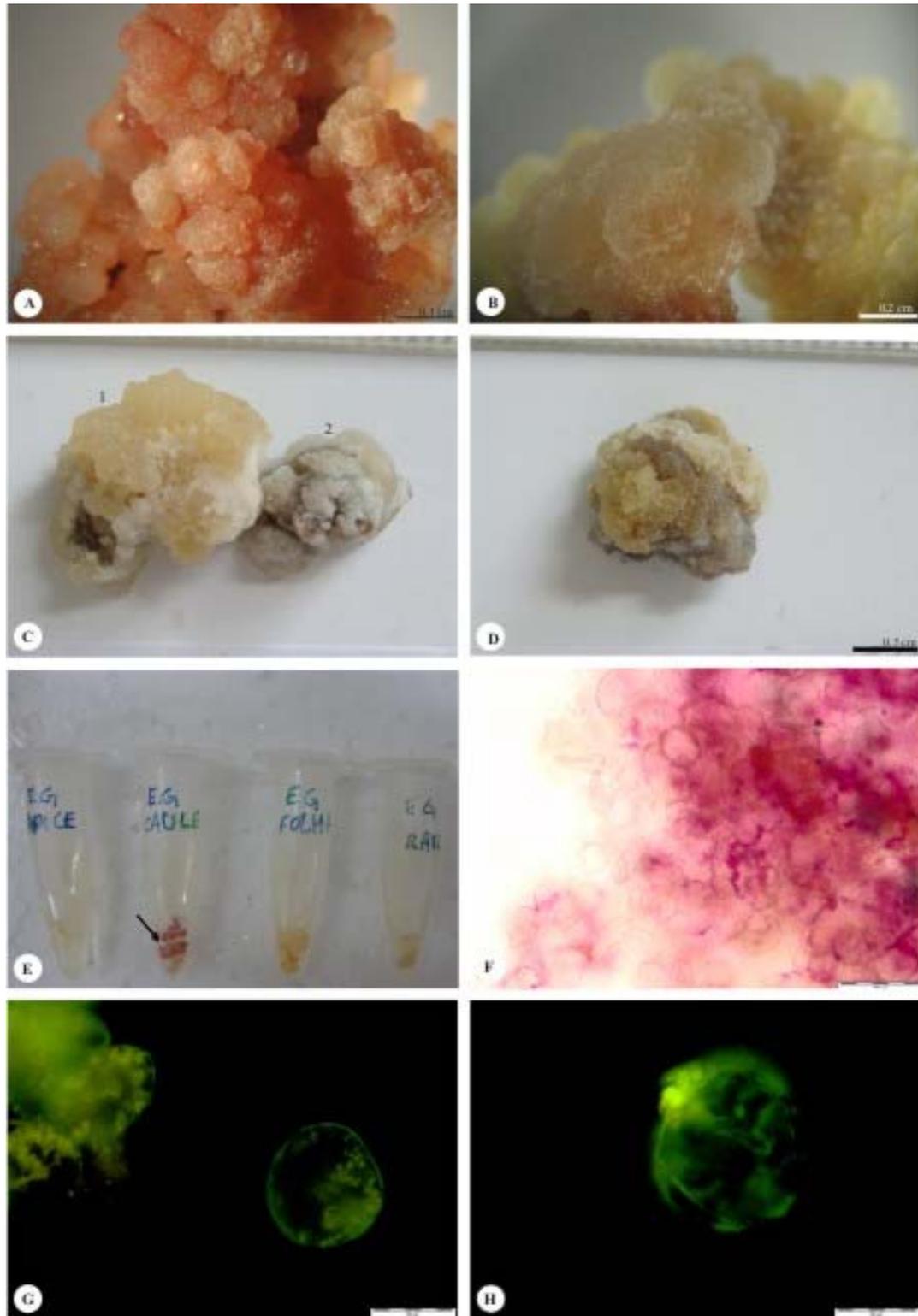
### 3.2 Lignificação em cultura de Calos de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e *E. urograndis*

Em meio de cultura suplementado com concentração de 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, + 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina, e 20  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, os calos da espécie *E. urophylla* apresentam maior crescimento e friabilidade, seguidos de *E. grandis* e *E. urograndis* (Figura 11 C e D). Assim como observado para *L. lactescens* os explantes foliares e apicais apresentaram os melhores resultados, com 80% de calejamento; enquanto que calos oriundos de explantes radiculares obtiveram calejamento inferior a 20%. Souza & Abreu, 2007 obtiveram excelentes resultados de calejamento de explantes foliares de *E. urophylla* em meio suplementado com 2,4-D. Os calos produzidos à partir de explantes vegetativos de *E. urograndis* apresentaram calos oxidados, pouco friáveis e de tamanho reduzido comparado aos produzidos por *E. grandis* e *E. urophylla*.

O teste histoquímico de Wiesner indicou lignina em todos os calos, com reação mais intensa naqueles provenientes de explantes caulinares (Figura 11 E e F). A análise com fluorescência utilizando o reagente auramina O indica a presença de lignina em todos os calos (Figura 11 G e H). Hamada *et al.* 2003 e Silva 2007 observaram lignificação em calos de explantes apicais tratados com 2,4-D em associação com cinetina.

A presença de lignina do tipo guaiacólica foi observada nos espectros de calos oriundos de explantes caulinar e apical nas três espécies de *Eucalyptus* (anexo 8). O espectro de infravermelho evidencia sinais significativos em 817-827  $\text{cm}^{-1}$  característicos de deformação de C=H fora do plano do C-H nas posições 2,5 e 6 de unidades guaiacólicas e em 1030- 1095  $\text{cm}^{-1}$ , indicando também a presença dessas unidades. Os sinais em 1325-1335  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de lignina do tipo siringílica nos calos oriundos de explante radicular.

A indução de calogênese foi realizada com sucesso em meio MS suplementado com 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, + 2,5  $\mu\text{M}$  de Cinetina e 20  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose para as espécies de *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. urograndis*, no entanto, outros experimentos deverão ser realizados para uma melhor avaliação do processo de lignificação nessas espécie.



**Figura 11:** Indução de calogênese em *E. grandis*, *E. urograndis* e *E. urophylla*. A e B- Calos de explante apical de *E. grandis* induzido em meio MS + 3% e 2% de sacarose, respectivamente. C - Calos de explante caulinar de *E. urophylla* (1) e *E. urograndis* (2). D- Calo de explante caulinar de *E. grandis*. E- Células de calos de *E. grandis* submetidos ao teste de Wiesner, evidenciando maior reatividade do calo de explante caulinar ao teste (→). F- células vistas ao microscópio. G e H - Células de *E. urograndis* e *E. grandis* submetidas à fluorescência. Barras= G, H= 50µm.

#### 4 CONCLUSÕES

- ✓ Existe uma variação interespecífica na calogênese das três espécies de *Eucalyptus* em relação ao protocolo utilizado.
- ✓ Nas espécies de *Eucalyptus* estudadas, os explantes apicais e foliares, seguidos dos caulinares, foram os que apresentaram maior percentual de calejamento, em relação a raiz.
- ✓ Calos de explantes caulinares das espécies de *Eucalyptus* cultivadas *in vitro* apresentaram reação mais acentuada ao teste de Wiesner, comparado aos resultados obtidos a partir de explantes de outros órgãos.
- ✓ Foi observada por espectrometria de infravermelho, lignificação intensa e homogênea nos calos de explantes caulinares e mais sutil e heterogênea nos calos de outros órgãos.

### 3 PESPECTIVAS

- ✓ O trabalho de caracterização anatômica da espécie *Lophanthera lactescens* Ducke *in vitro*, inédito para a espécie, terá continuidade com a caracterização anatômica de folhas de plantas.
- ✓ Será feita comparação anatômica de indivíduos germinados *in vitro* e *in vivo*.
- ✓ Protocolos para cultura de células em suspensão serão determinados para a indução de lignina extracelular para a espécie *L.lactescens*.
- ✓ Os trabalhos com as espécies de *Eucalyptus* terão continuidade com formulação de novos protocolos, de indução de calogênese e cultura de células em suspensão específicos para cada espécie.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H. S.; LATORRACA, J. V.; PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, F. A.; AMPARADO, K. F. A Supramolecular Proposal of Ligninin Structure And its Relation with the Wood Properties. **Academia Brasileira de Ciência**. v. 81. nº 1. P. 202- 211, 2009.

ABREU, H.; MAÊDA, J.; LATORRACA, J.; PEREIRA, R.; MONTEIRO, M.B.; ABREU, F.; CARMO, J. Proposta de Modificação da Biossíntese da Lignina como Estratégia para Correção de Defeitos em Madeiras. **Silva Lusitana**. v.11. p. 217 - 225, 2003.

ABREU, H.S.; R. B.; GOTTLIEB, H. E. SHOOLERY, J. N. A *nor* - triterpenoid from *Lophanthera lactescens*. **Phytochemistry**, v. 29, n.7, p.2257-2261, 1990.

ABREU, H.S.; NASCIMENTO, A.M.; MARIA, M.A. Lignin and structure. **Wood and Fiber**, v. 31, p. 426-433, 1999.

ABREU, H. S.; OERTEL, A. C. Estudo químico da lignina de *Paullinia rubiginosa*. **Revista Cerne**, v.5, n.1, p. 52-60,1999.

AKALEZI, C. O.; LIU, S.; LI, Q. S.; YU, J. T.; ZHONG, J. –J. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspensio cultures of *Panax ginseng*. **Progress Biochemistry**, v. 34, p.639-642, 1999.

ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v.39, n.5, p.421-430, 2004.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V. & YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture-techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan Publishing, 1983, p. 82-123.

AMPARADO, K. F., MONTEIRO de CARVALHO, A., APARECIDA GARCÍA, R. Y DE FIGUEREDO LATORRACA, J. V. Characterization of the sawnwood productivity of *Eucalyptus saligna* Smith in humid and dry conditions. **Revista Forestal Venezolana**, v. 52, p. 64-70, 2008.

ANDERSON, W. R. *Lophanthera*, A new genus of Malpighiaceae to Central America. Brittonia, **New York Botanical Garden** v. 35, p. 37-41. 1983.

ANDRADE, S. R. M., **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. n.58, 16p. Embrapa Cerrados, 2002.

ANDRADE, A.; CELEDÓN, P.A.F.; LABATE, C.A. O proteoma da madeira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.36, p. 10-17, 2006.

BACHA, C.B. **Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações de “Cornell Net carbohydrate and protein system”**. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal)- Departamento de Produção e Nutrição Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

BARCELÓ, A. R. Lignification in plant cell-walls. **International Review of Cytology**. v. 176, p. 87-132, 1997.

BARROS, C. F. & F. C. MIGUENS. Leaf epidermis of *Beilchmiedia rigida* (Mez.) Kosterm. (Lauraceae). **Acta Microscopica**, v.6 p. 54-62. 1998.

BARRUETO, L.P.C. Suspensão celular. In: TORRES, A.C. (Ed.). **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. v.1, p.331-353.

BERLYN G.P., MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, p. 121-276, 1976.

BIDLACK, J. MALONE, M. AND BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants. **Proc. Okla Acad Sci**, 72: 51-56. 1992.

BOERJAN, W; RALPH, J; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v.54, p.519–546, 2003.

BOYD, J.D. The growth stresses: evidence of a origin in differentiation and lignification. **Wood Science Technology**, v. 6, p. 251-262, 1972.

BROWNING, B.L. **Methods of wood chemistry** – Interscience Publishers – New York, v.2. 800 p, 1967.

BRUCE, R.J. & WEST, C.A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of *Castor bean*. **Plant Physiology**, v.91, p.889-897, 1989.

BUFFA FILHO, W. *et al.* Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus Ilicifolia*. **Eclética Química**, v.27, n. especial, p.403-416, 2002.

BUKATSCH, F. Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos** v. 61, 255 p., 1972.

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

CASTRO, P.R.C; VIEIRA, E.L. **Aplicação de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 132 p, 2002.

CATO, S.C. **Ação de bioestimulante nas culturas do amendoizeiro, sorgo e trigo e interações hormonais entre auxinas, citocininas e giberilinas**. 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CHAMBERLAIN, C.J. **Methods in plant histology**. The University of Chicago Press, 1932.

CHEE, R.P., CANTLIFFE, D.J. Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir. Embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 15:149-159, 1988.

CHOINOWSKI, T.; BLODIG, W.; WINTERHALTER, K. H.; PIONTEK, K. The crystal structure of lignin peroxidase at 170 Å resolution reveals a hydroxy group on the C<sub>β</sub> of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. **Journal of Molecular Biology**, V.286, p. 809-827, 1999.

CHONG, C.; PUA, E.C. Carbon nutrition of Ottawa 3 apple rootstock during stages of *in vitro* propagation. **Journal of Horticultural Science**, v.60, n.3, p.285-290, 1985.

CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Revista Cerne**, v. 10, n. 1, p.118-124, 2004.

COSTA, A.S. **Sustentabilidade da Produção de Alecrimpimenta (*Lippia sidoides* Cham.): Micropropagação visando à conservação *in vitro***. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)- Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.

CRUZ, M. B. **Efeitos do capim-colonião sobre o crescimento inicial de clones de eucalipto**. 2007. 36 f. Dissertação (mestrado em biologia vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

DANELLI, M.G.M. SOARES, D.C. ABREU H.S., PEÇANHA, L.M.T., SARAIVA, .E.M. Leishmanicidal effect of LLD-3 (1), a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. **Phytochemistry** v. 70, p. 608–614, 2009.

DICKISON, W.C. Integrative Plant Anatomy. **Harcourt Academic Press**, 533 p., 2000.

DICOSMOS, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternative for metabolite production, **In: Biotechnology Advances**. Pergamon, v.13, n.3, p.425-453, 1995.

DONALDSON, L.A. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p.859-873, 2001.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. 15<sup>o</sup> ed. São Paulo, Edgard Blucher, 2000, 293p.

- FAHN, A. **Anatomia vegetal**. 3°. ed. Madri, Ediciones Pirâmide, S. A, 1982, 600p.
- FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultra structure, reactions**. New York : Walter & Grupter, 613p, 1984.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: **45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Intercontinental de Biometria**. UFSCar, p. 255-258, 2000.
- FINGER, C.A.G.; SCHNEIDER, P.R.; KLEIN, J.E.M. Produção de florestas de *Eucalyptus grandis* hill ex maiden em segunda rotação, conduzidas com um broto por touça e submetidas a interplântio. **Revista Ciência Florestal**, v.3, n.1, p. 185-201, 1993.
- FLORES, R.; GOMES, P.R.; FARIA J. T. C.; CENTELLAS, A. Q.; FORTES G.R.L.; PETERS, J.A. Calogênese com Disco Foliar de Morangueiro. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n. 1, p. 09-14, 1998.
- FLORES, R. et al. Efeito da sacarose e do benomyl na multiplicação *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.12, p.2363-2368, 1999.
- FOSKET, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego, Academic Press, 580 p. 1994.
- FOWLER, M. W. Plant cell culture: natural products and industrial application. In: **Biotechnology of Higher Plants**. Reino Unido, Intercept, p.107-158, 1988.
- FREUDENBERG, K., NEISH, A.C. **The constitution and biosynthesis of lignin**. Berlin : Springer-Verlag, 129 p. 1968.
- GABE, M. **Techniques Histologiques**. Masson Cle, Paris, p. 230. Grinwich, 1968.
- GALLO, L.A.; CROCOMO, O.J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p. 494-506, 1995.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Exegetics, 709 p. 1984.
- GERRITS, P.O. & SMID, L. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, n. 132, p.81-85, 1983.
- GIRI, A.; AHUJA, P.S. & AJAYKUMAR, P.V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.32, p.213-218, 1993

GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C. & BORIN, M.R. de M.R. de M.B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro, Editora UFRJ, 286 p., 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998.

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

GUIMARÃES, C.S.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A.C.M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v.13, n. 1, p. 167-178, 2003.

HAMADA, K.; TOMI, R.; ASADA, Y.; FURUYIA, T. Phytoremediation of bisphenol A by cultured suspension cells of *Eucalyptus perriniana* – regioselective hydroxylation and glycosilation. **Tetrahedron letters**, v. 43, p. 4087-4089, 2002.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.A. de; GONÇALVES, A.N. **Nutrição e adubação em mini jardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Piracicaba, IPEF, 21 p., 2002.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.A. de; GONÇALVES, A.N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil**. Piracicaba, IPEF, n. 192, 14 p., 2000.

HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. In: KIRK, T. K; HIGUCHI, T.; CHANG, H. **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications**. Boca Raton, v. 1, p. 02. 1980.

INOUE, K.; SEWALT, V.J.; MURRAY, G.B.; NI, W. STURZER, C.; DIXON, R.A. Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase in relation to lignification. **Plant Physiology**, v.117, p.761–770, 1998.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S.R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosium gaudichaudii* Trécul (Moraceae). **Acta Botânica Brasileira**. v. 21, n. 3, 2007

JENSEN, D. H. **Botanical Histochemistry (Principles and Practice)**. São Francisco: W, H. Freeman and Company, 408p., 1962.

JÚNIOR, J.E.P. **RMEL/ BLUP para a análise de múltiplos experimentos, no melhoramento genético de *Eucalyptus grandis* w. hill ex maiden**. 2004. 127 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)- Departamento de fitotecnia e fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KLOCK, U.; MUNIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A.S. **Apostila de química da madeira**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

KRIKORIAN, A.D.; KELLY, K.; SMITH, D. L. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: **Plant Hormones and their role in plant growth and development**. Kluwer Academic Publishers: Holanda, p. 593-613, 681 p., 1990.

LIN, S. Y. & DENCE, C.W. **Methods in lignin chemistry**. Berlim: Springer-Verlag, 568p., 1992.

LIWIS, N. G. & YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annu. Plant Mol. Biol.**, v. 41, p. 455-496, 1990.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v. 1. 352 p., 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v. 1. 360 p., 2008.

LUCHI, A. E. 2004. Anatomia do lenho de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) de solos com diferentes níveis de umidade. **Revista Brasileira de Botânica**, 27: p. 271-280.

LUNZ, A. M.; CARVALHO, A. G.; Degradação da Madeira de Seis Essências Arbóreas Disposta Perpendicularmente ao Solo Causada por Scolytidae (Coleoptera). **Neotropical Entomology**, p.351-357, 2002.

MARQUES, D. **Eucalipto: oportunidades para um desenvolvimento sustentável**. 2008. Disponível em: [www.cib.org.br/pdf/Guia\\_do\\_Eucalipto\\_junho\\_2008.pdf](http://www.cib.org.br/pdf/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf). Acesso em: 26 de Março de 2010.

MARQUES, L.C., *et al.*, Controle farmacognóstico das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 17, n 4, p. 604-615, 2007.

MARTONE, P. T. ESTEVEZ, J. M. LU, F. RUEL, K. DENNY, SOMERVILLE, C. RALPH J. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. **Current Biology**. v.19, p. 169–175. 2009.

MAUSETH, J.D. **Plant Anatomy**. Califônia, The Benjamin/Cummings publishing company, Inc., 560 p., 1988.

METCALFE, C. R. & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxord, Claredon Press, v.2, 1950.

MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W. ABREU, H. S. Bioquímica da lignificação de células xilêmicas. **Revista Floresta e Ambiente**. v. 11, n. 2, p. 48-57, 2004.

MONTIES, B. Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation with possible self-organization of lignin network. **Annales des Sciences Forestières**. v. 46, p., 846-855, 1989.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **Eucalypt cultivation in Brazil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 112 p., 2000.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. Chemical analysis of the *Pinus oocarpa* wood. Part II - characterization of the milled wood lignin. **Revista Árvore**, v. 29, n.3, 2005.

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

NISHIMURA, C.; OHASHI, Y.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; UEGUCHI, C. Histidine kinase homologs that acts as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Baltimore, v.16, p.1365-1377, 2004.

O'BRIEN, T.P. & MCCULLY, M.E.. **The study of plant structure. Principles and selected methods**, Termarcarphi Pty Ltd., Melbourne, 1981.

PAOLI, A. A. S. Morfo-anatomia de frutos e sementes de *Lophantera lactescens* Ducke (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 19, no 2, p.237-243, 1997.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D., **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998.

PAVIANI, T. I. Sobre a ocorrência de fibras gelatinosa em *plathymenia reticulata* BENTH. **Revista Ciência e Cultura**, v. 26, n. 8, p. 783-78, 1974.

PÊGOS, M.R.A.; **Resistência natural de nove espécies de madeiras ao ataque de *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) (Isoptera: Rhinotermitidae)**. 24p. Monografia, UFRRJ, Seropédica, 2007.

PEREIRA, R. P. W. **Atenuação do processo de lignificação em *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) por GA3 e BAP**. 98 p. Tese de Mestrado, UFRRJ, Seropédica, 2005.

PILATE G, CHABBERT B, CATHALA B, YOSHINAGA A, LEPLÉ JC, LAURANS F, LAPIERRE C, RUEL K. Lignification and tension wood. **C R Biol**, v. 327 p.889-901, 2004.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química nova**. v.16, n. 5, p.435-448, 1993.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v.3, Imprensa Nacional. Rio de Janeiro. 1926.

PLOMION, C.; LEPROVOST, C.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, v.127, p., 1513-1523, 2001.

POKE, F. S.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B.M.; REID, J. B. Genomic research in *Eucalyptus*. **Genetica, Dordrecht**, v.125, p. 79-101, 2005.

QUISEN, R.C.; **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulenseis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba.

RIOS, J.F. **Micropropagação de *Gypsophila paniculata* pela cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de segmentos foliares**. 2004. 72p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ROCHA, F. T.; FLORSHEIM, S. M. B.; COUTO, H. T. Z. Variação das dimensões dos elementos anatômicos da madeira de árvores de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden aos sete anos. **Revista Instituto Florestal**, v. 16, n. 1, p. 43-55, 2004.

SALES, C.G. **Growth stresses: main results obtained on the study of guyana species and consequences for and use**. In: IUFRO WORLD CONGRESS, 18, Ljubljana. Proceedings IUFRO, v. 5, p. 234-248, 1986.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUES, M. N.; MORAIS, S. A.L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas - Métodos de Obtenção e caracterização Química. **Ciência Rural**, v. 31, n.5, p., 917-928, 2001.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G.B. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.2, n.13, p. 28-32, 2000.

SANTOS, B.R. *et al.* Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, v.35, n.3, p. 510-514, 2001.

SILVA, H. R. **Avaliação da morfologia e lignificação de calos de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) sob efeito de cinetina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético**. 67p. Dissertação. UFRRJ, Seropédica, 2007.

SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; ERIG, A.C.; ANTUNES, L.E.C. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.

SILVA, S. I. **Floração e frutificação de duas variedades de *Byrsonima sericea* DC**. 64 p. Dissertação - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. 2007.

SJOSTROM, E; **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**, New York. Academic Press, p.71. 1989.

SOARES, T.S.; CARVALHO, R.M.M.A.; VALE, A.B. Avaliação econômica de um povoamento de *Eucalyptus grandis* destinado a multiprodutos. **Revista Árvore**, v.27, n.5,p.689-694, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2005. **Silviculture-se**. Disponível em: <http://www.sbs.org.br>. Acesso em: 25 de maio 2008.

SOUZA, K. C. A. **Atenuação do processo de lignificação em células de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, em suspensão, por 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)**. 62p. Dissertação. UFRRJ, Seropédica. 2007.

TREVISAN, H. Ocorrência de térmitas subterrâneas (Isoptera: Rhinotermitidae e Termitidae) e durabilidade natural da madeira de cinco essências florestais. **Revista Ciência Florestal**, v. 13, n. 2, p.153-158, 2003.

TREVISAN, H.; TIEPPO, F. M. M.; CARVALHO, A. G.; LELIS, R. C. C.; Avaliação de propriedades físicas e mecânicas da madeira de cinco espécies florestais em função da deterioração em dois ambientes. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.1, p.93-101, 2007.

TRUGILHO, P.F.; BIANCHI, M.L.; ROSADO, S.C.S.; LIMA, J.T. Qualidade da madeira de clones de espécies e híbridos naturais de *Eucalyptus*. **Scientia Florestalis**, n. 73, p. 55-62, 2007.

TORRES, A.C; CALDAS, L.S; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998, 2 v. 864p.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A. S.; BRIGIDO, M. M.; ROMANO, E. Glossário de biotecnologia vegetal. Brasília: Embrapa hortaliças, 2000. 128 p.

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T.obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, v. 34, p. 07-511, 2004.

ZENK, M.H. et al. Taxoids from cell cultures of *Taxus Chinensis*. **Phytochemistry**, v.49, p.113-125, 1998.

## ANEXOS

**Anexo I** - Espectros no Infravermelho de calos pré-extraídos em etanol (BRUCE & WEST, 1989) de explante apical, foliar, caulinar e radicular de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*. Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 ( $\text{cm}^{-1}$ ) / distância de corrida 4000 – 400 ( $\text{cm}^{-1}$ )

**Anexo II** - Espectros no Infravermelho de caule e raiz de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*, pré-extraídas em etanol (BRUCE & WEST, 1989) e totalmente livre de extratos solúveis (BROWNING, 1967). Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 ( $\text{cm}^{-1}$ ) / distância de corrida 4000 – 400 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

**Anexo III** - Espectros obtidos por Microscopia de Infravermelho de secções no plano transversal de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*. Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 ( $\text{cm}^{-1}$ ) / distância de corrida 4000 – 400 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

**Anexo IV** - Espectros no Infravermelho de calos pré extraídos em etanol (BRUCE & WEST, 1989) de explantes caulinar, foliar, apical e radicular, de plantas de *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*. Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 ( $\text{cm}^{-1}$ ) / distância de corrida 4000 – 400 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

**Anexo V** - Atribuição dos sinais no infravermelho das ligninas de calos de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*.

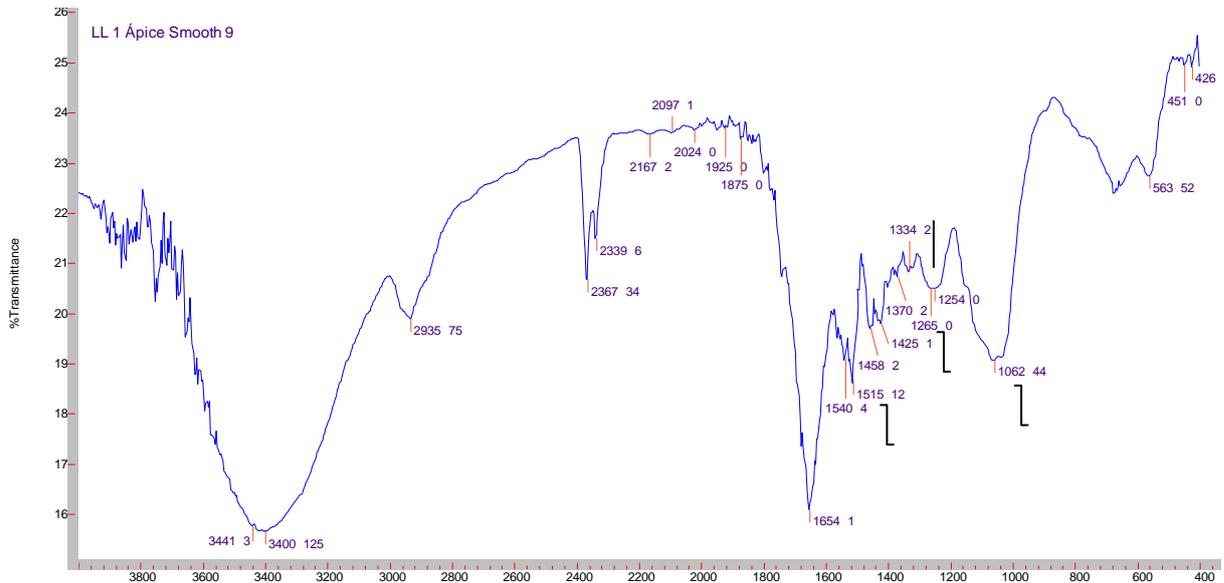
**Anexo VI** - Atribuição dos sinais no infravermelho dos espectros do caule e raiz de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*, pré-extraídas em etanol e livre de extrativos.

**Anexo VII** - Atribuição dos sinais a partir de espectrometria de infravermelho de seções no plano transversal do caule de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke germinadas *in vitro*. Pe = Periderme; Co = córtex; Xi = Xilema; Me = Medula.

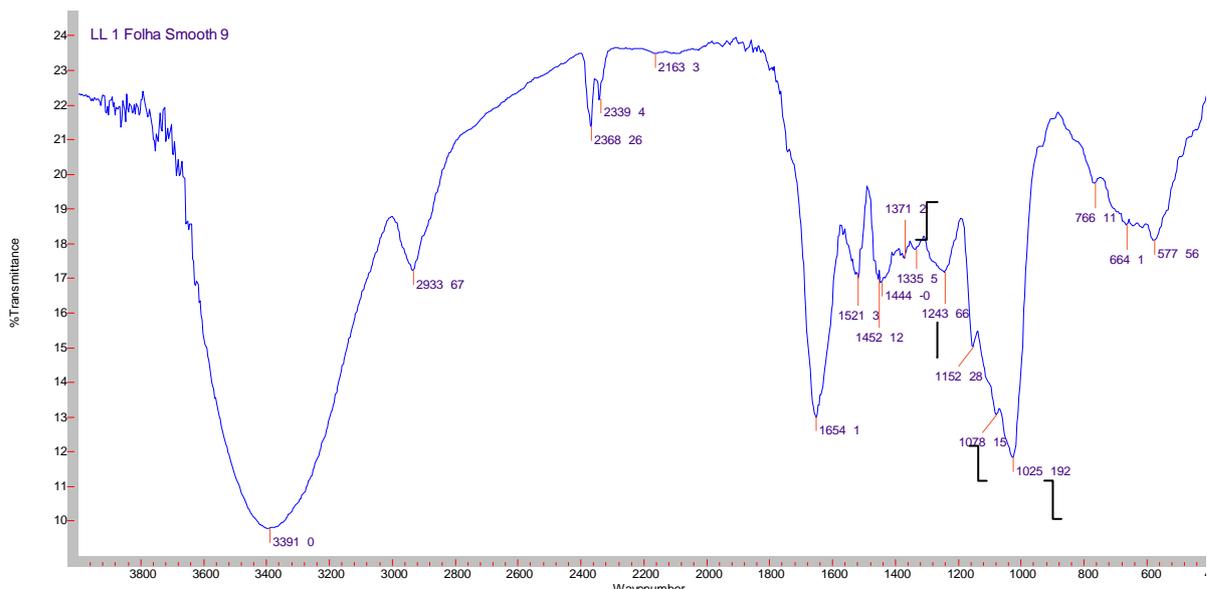
**Anexo VIII** - Atribuição dos sinais de espectrometria de infravermelho de calos de *Eucalyptus grandis*, *E. Urophylla* e do híbrido *E. urograndis*.

**Anexo IX** – *Lophanthera lactescens* Ducke no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

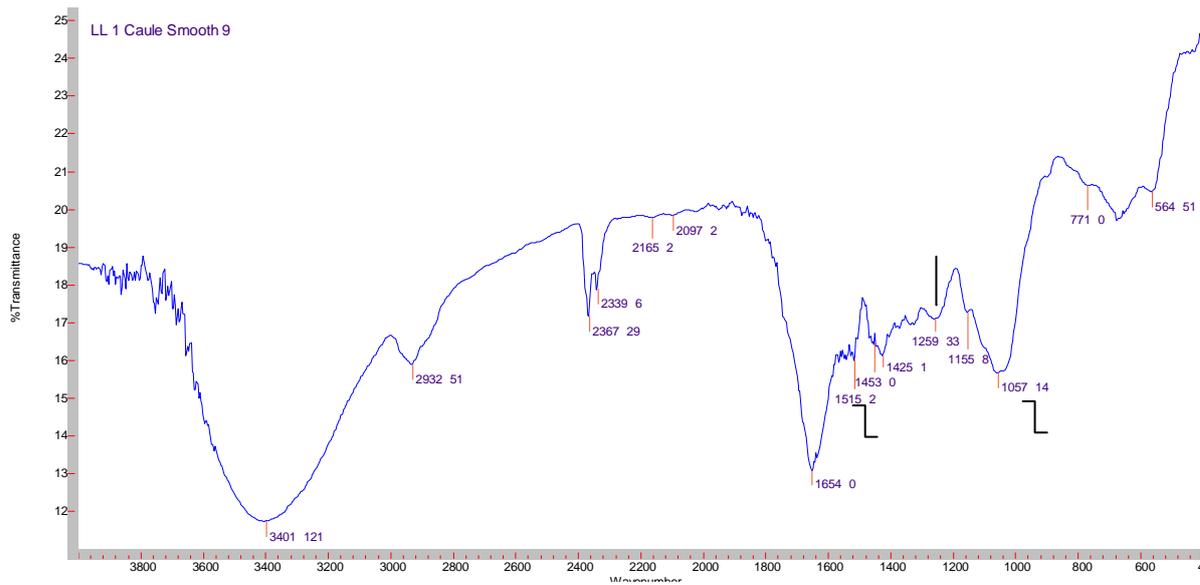
**Anexo 1:** Espectros no Infravermelho de calos pré-extraídos em etanol (BRUCE & WEST, 1989) de explante apical, foliar, caulinar e radicular de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*. Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 ( $\text{cm}^{-1}$ ) / distância de corrida 4000 – 400 ( $\text{cm}^{-1}$ )



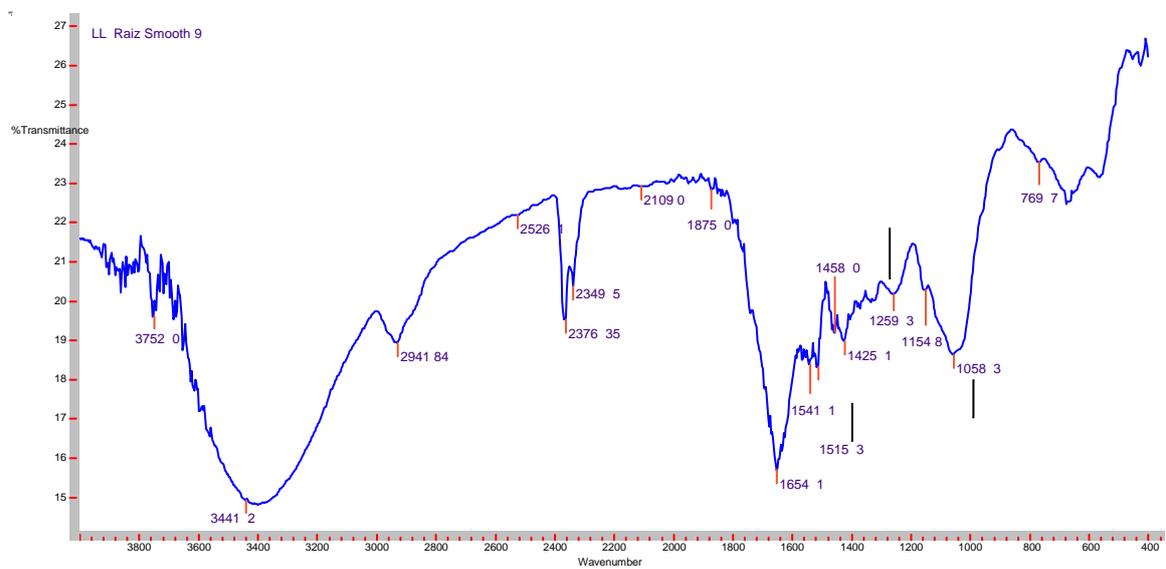
**Espectro 1:** Infravermelho de calo de explante apical de plantas de *L. lactescens*. Sinais indicativos de lignina (→).



**Espectro 2:** Infravermelho de calo de explante foliar de plantas de *L. lactescens*. Sinais indicativos de lignina (→).

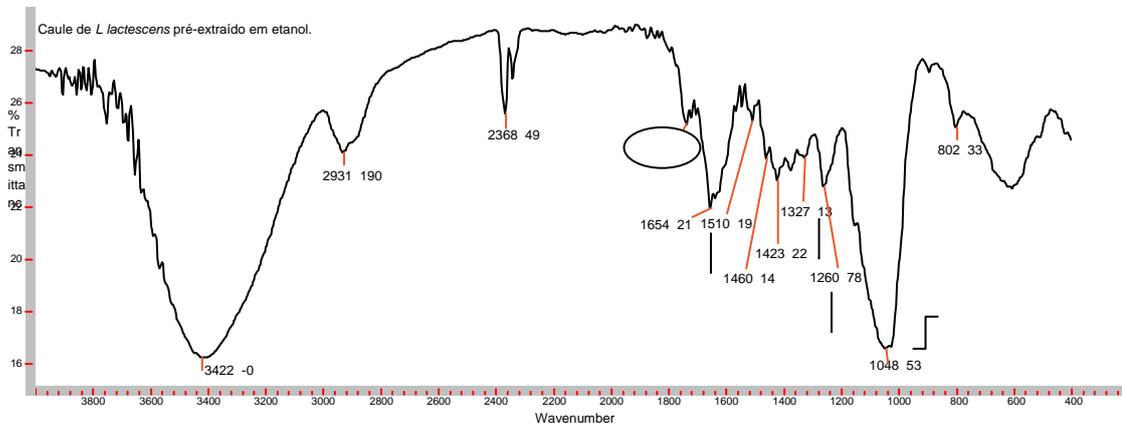


**Espectro 3:** Infravermelho de calo de explante caulinar de plantas de *L. lactescens*. Sinais indicativos de lignina (→).

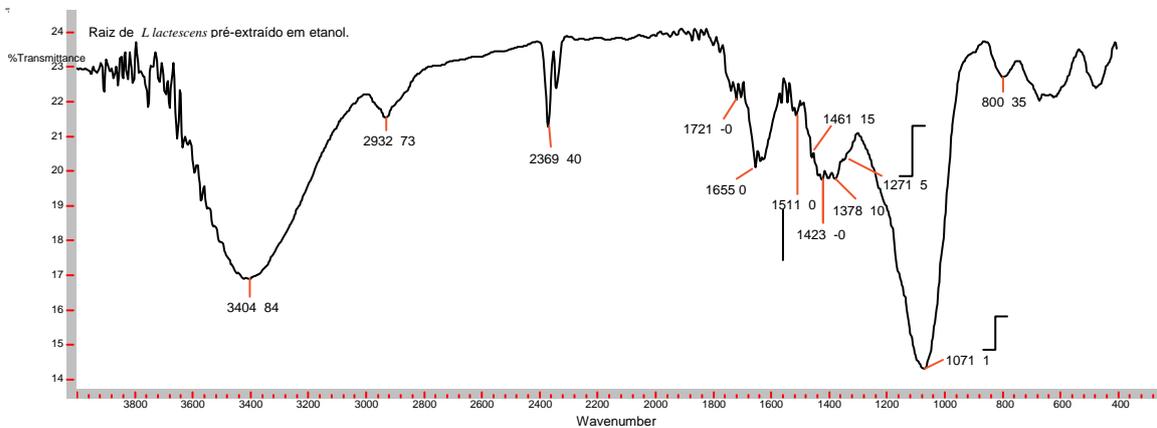


**Espectro 4:** Infravermelho de calo de explante radicular de plantas de *L. lactescens*. Sinais indicativos de lignina (→).

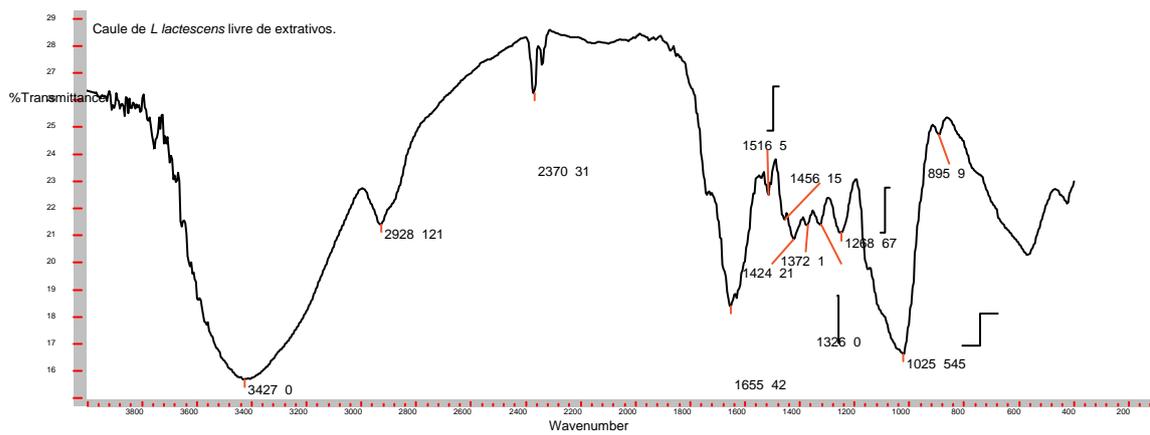
**Anexo 2:** Espectros no Infravermelho de caule e raiz de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*, pré-extraídas em etanol (BRUCE & WEST, 1989) e totalmente livre de extratos solúveis (BROWNING, 1967).



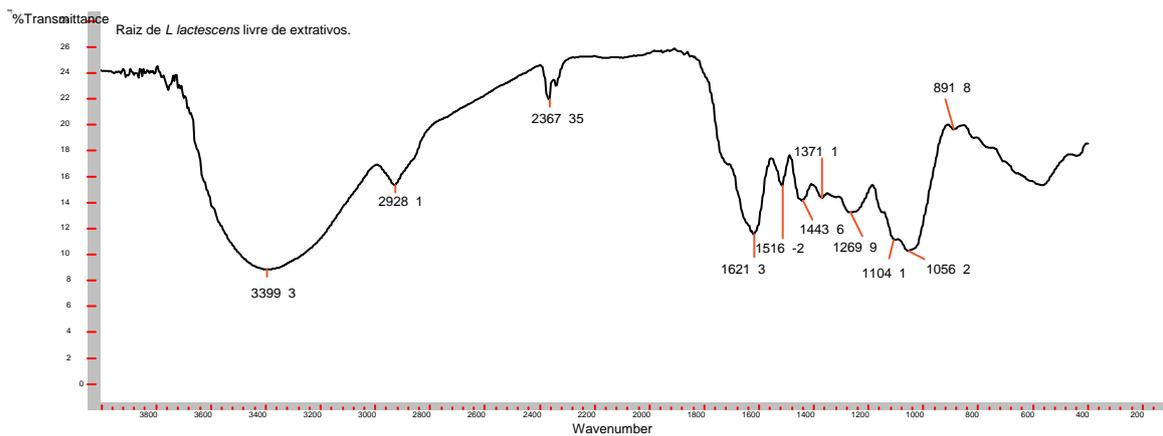
**Espectro 5:** Infravermelho do caule de planta de *L. lactescens*, pré extraído em etanol. Sinais indicativos de lignina (→). Sinal indicativo de celulose e/ou hemicelulose (○).



**Espectro 6:** Infravermelho da raiz de planta de *L. lactescens*, pré extraído em etanol. Sinais indicativos de lignina (→).

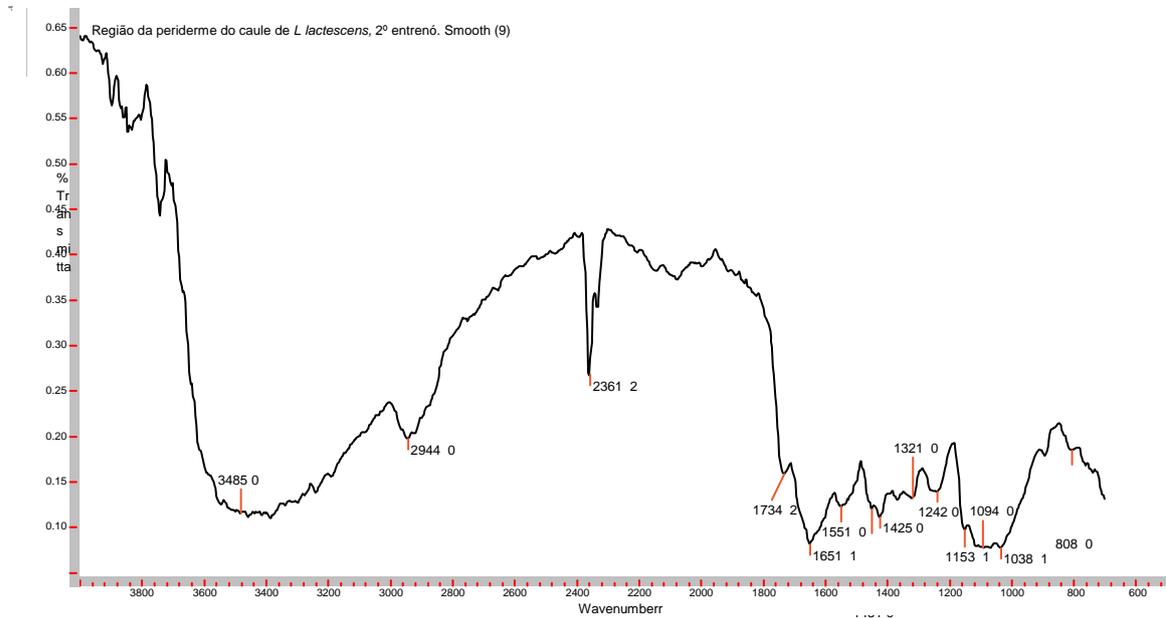


**Espectro 7:** Infravermelho do caule de planta de *L. lactescens*, livre de extratos solúveis. Sinais indicativos de lignina (→).

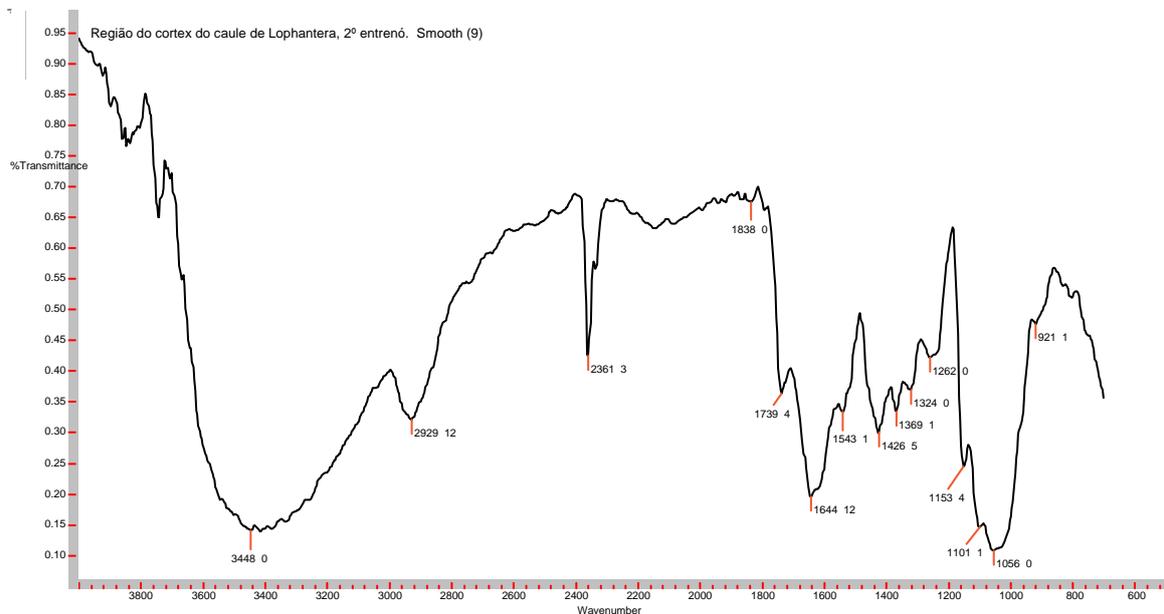


**Espectro 8:** Infravermelho da raiz de planta de *L. lactescens*, livre de extratos solúveis. Sinais indicativos de lignina (→).

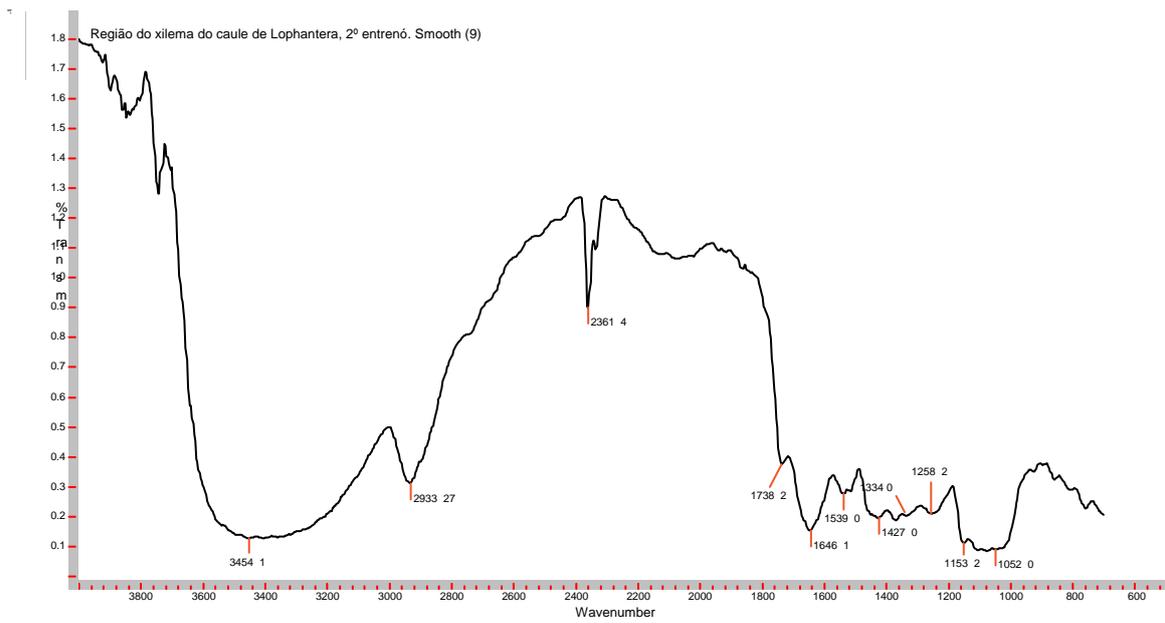
**Anexo 3:** Espectros obtidos por Microscopia de Infravermelho de secções no plano transversal de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*.



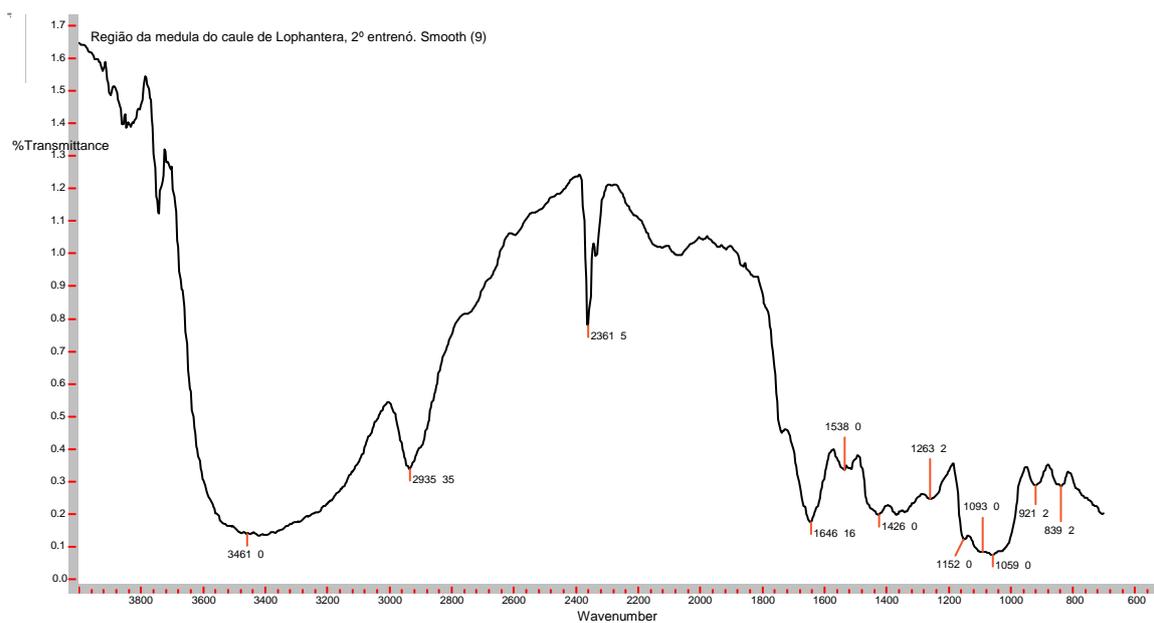
**Espectro 9:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 2º entrenó, região da periderme.



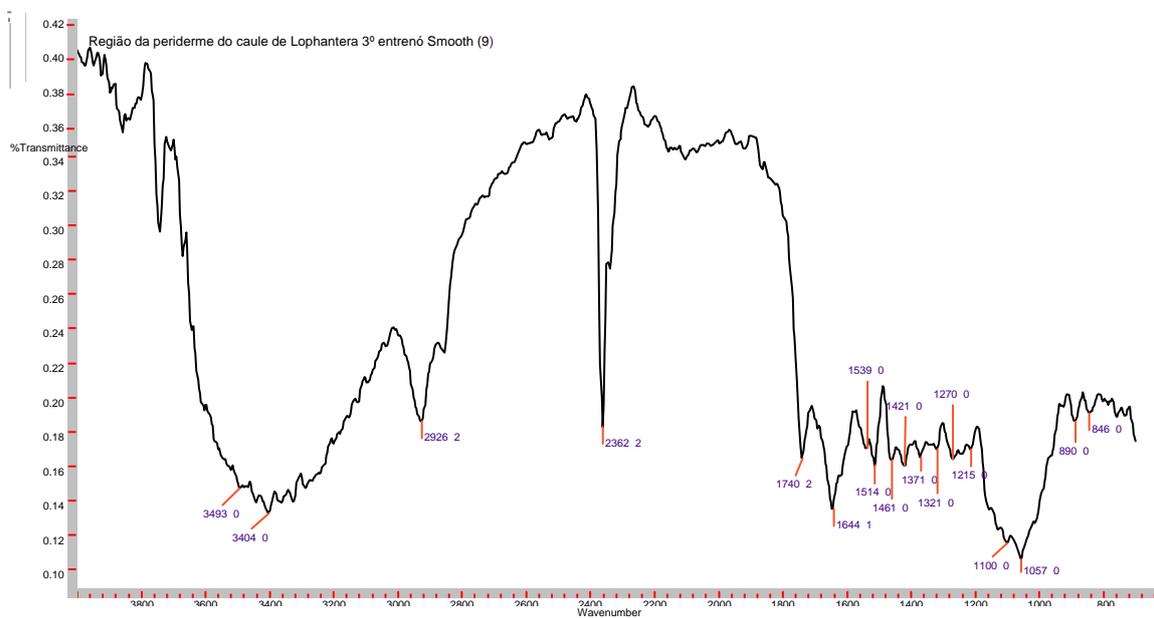
**Espectro 10:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 2º entrenó, região do cortex.



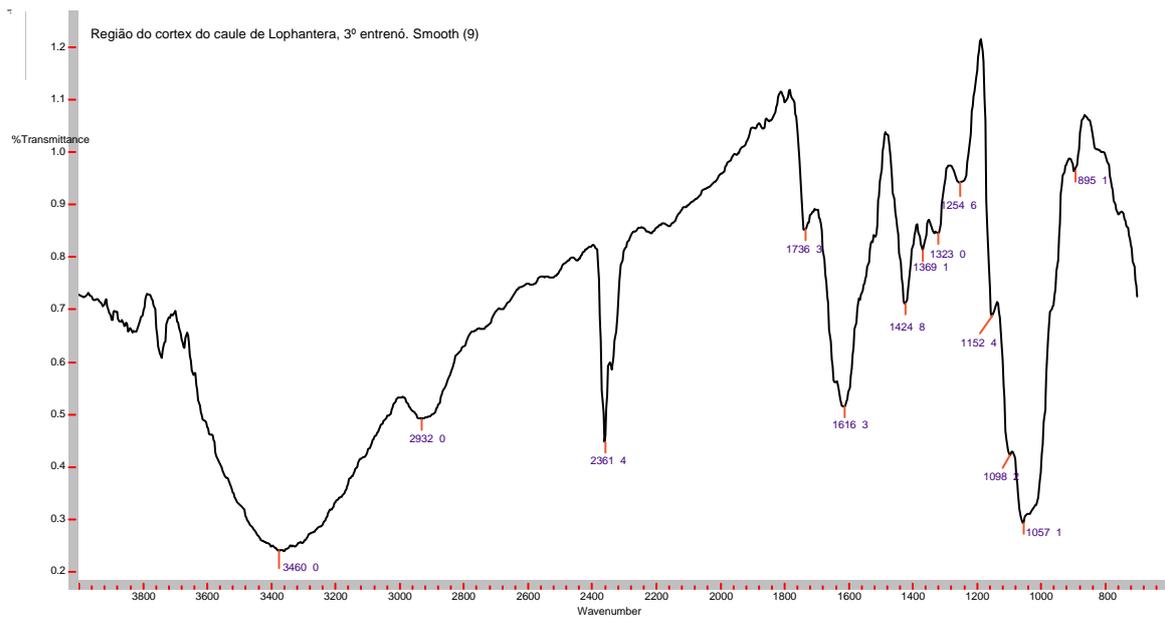
**Espectro 11:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 2º entrenó, região do xilema.



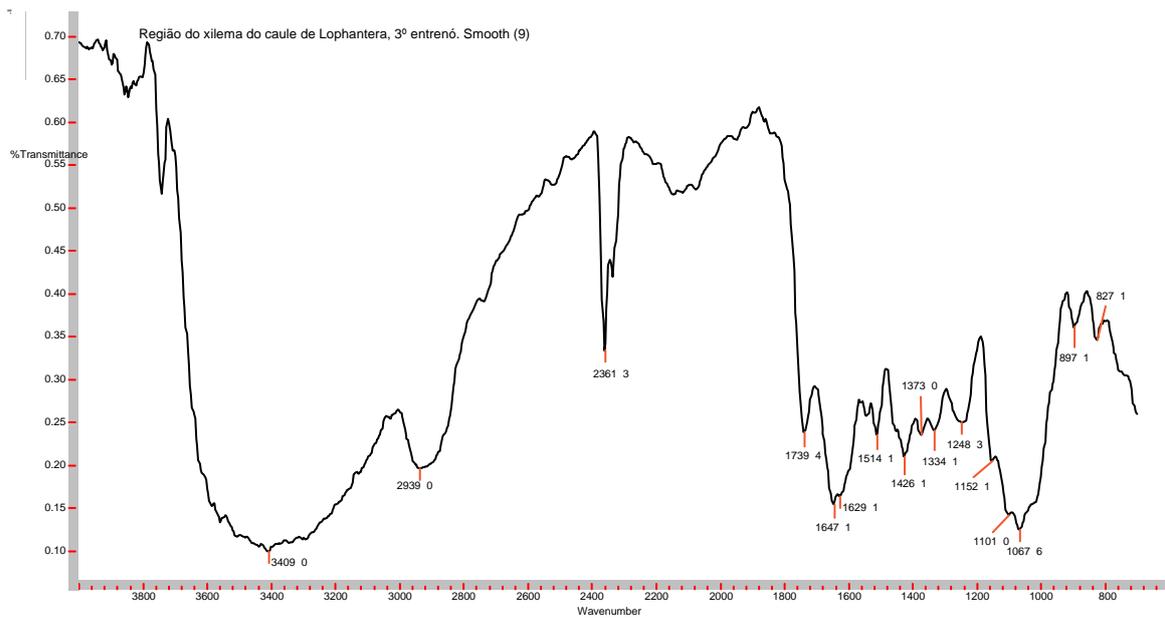
**Espectro 12:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 2º entrenó, região da medula.



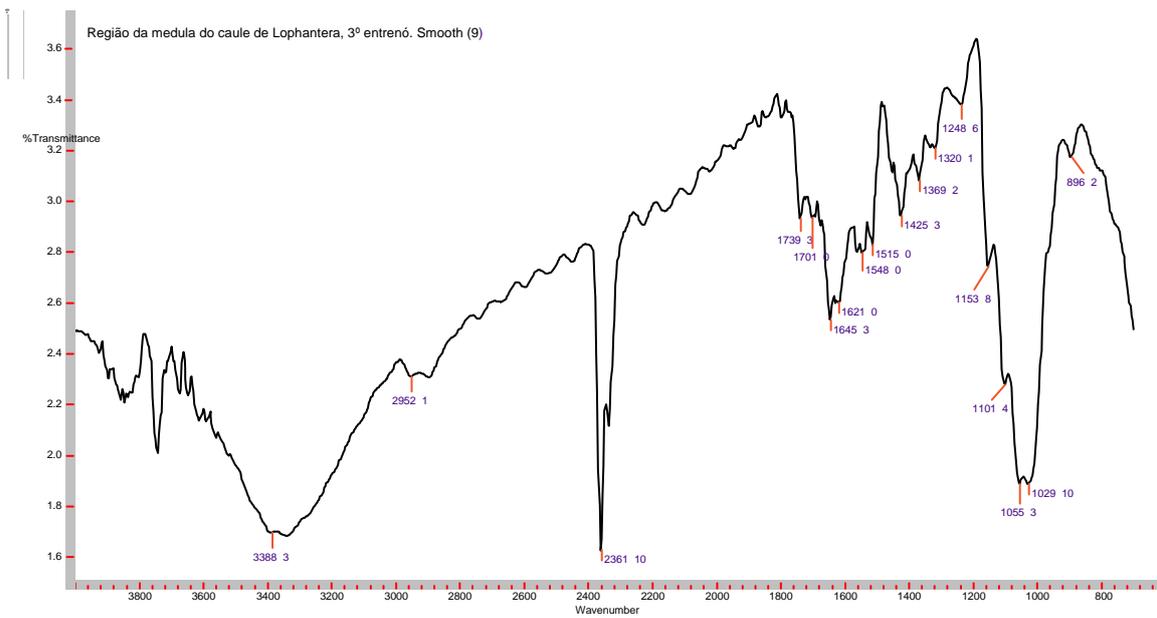
**Espectro 13:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 3º entrenó, região da periderme.



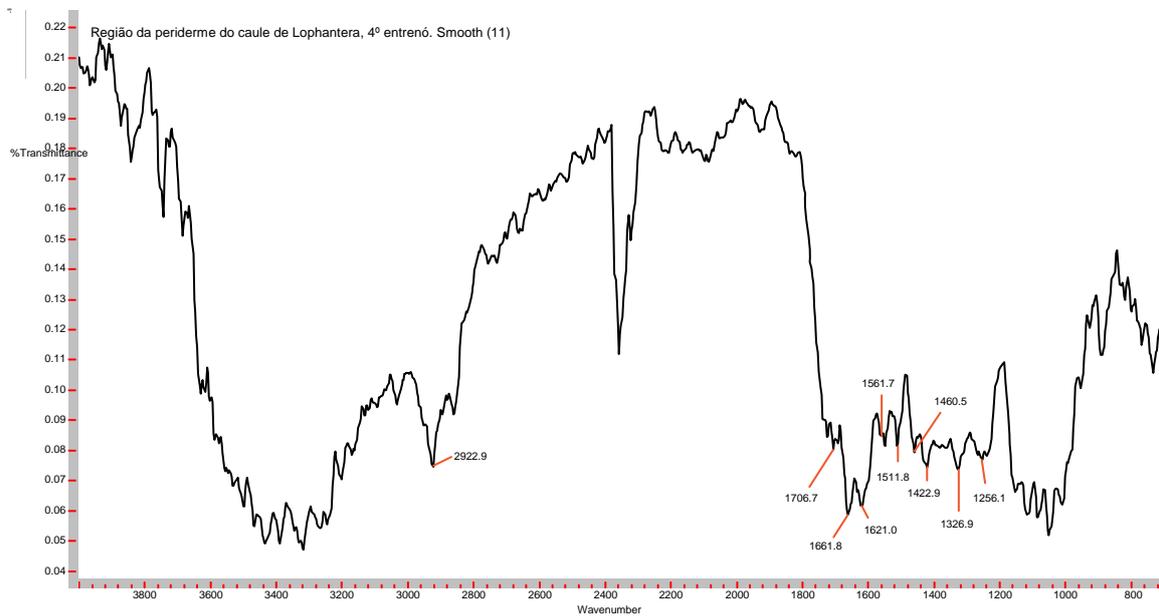
**Espectro 14:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 3º entrenó, região do cortex.



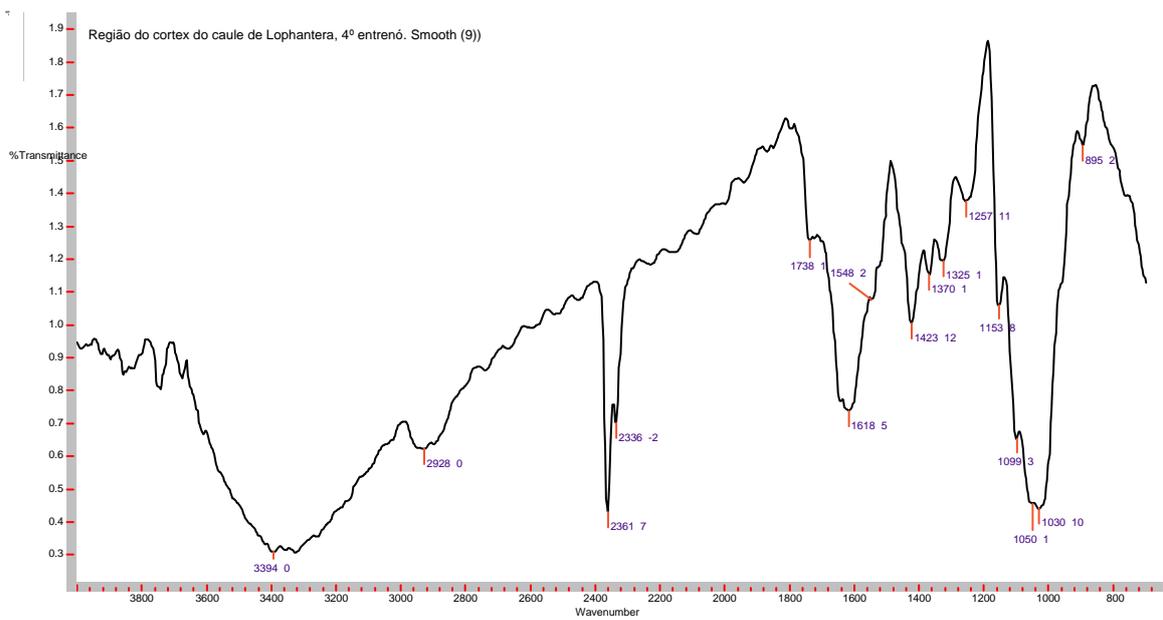
**Espectro 15:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 3º entrenó, região do xilema.



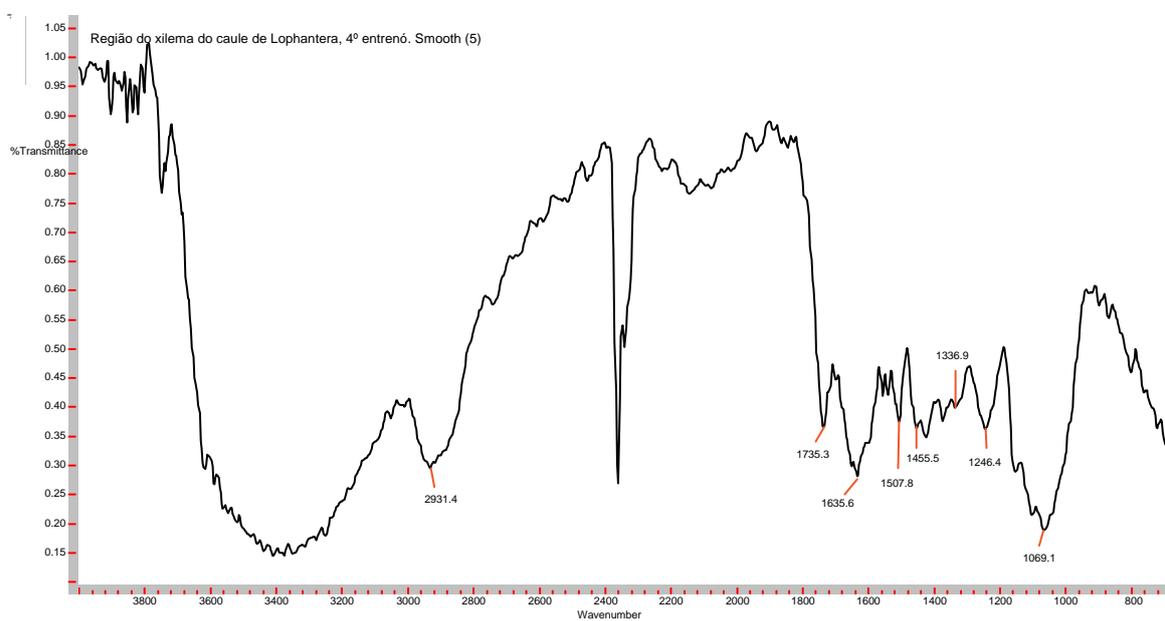
**Espectro 16:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 3º entrenó, região da medula.



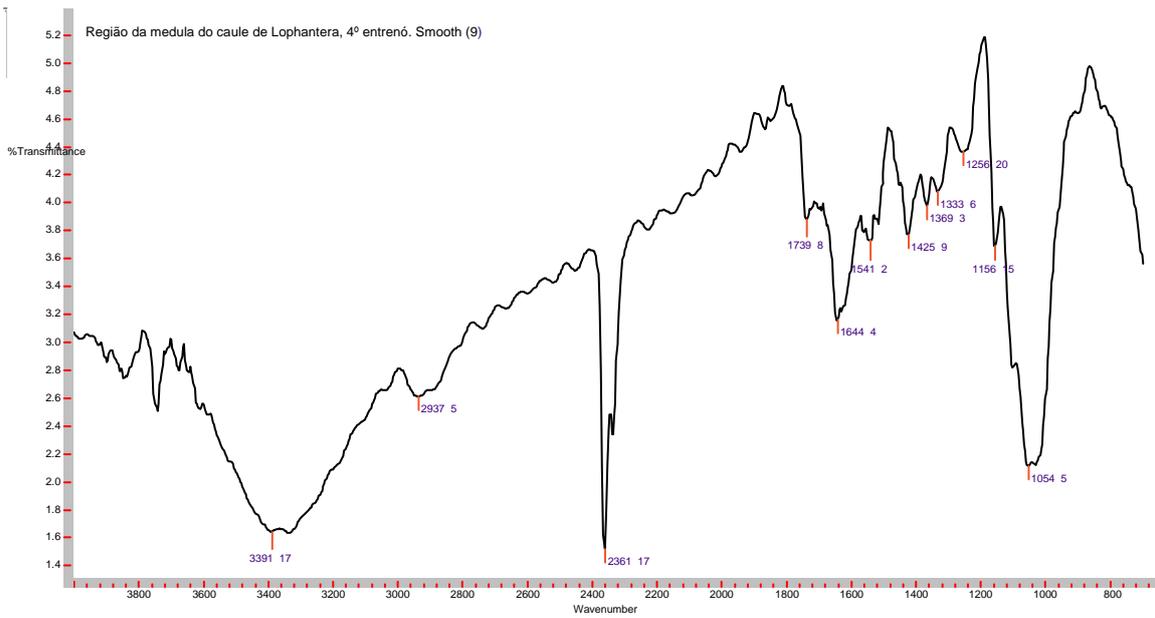
**Espectro 17:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 4º entrenó, região da periderme.



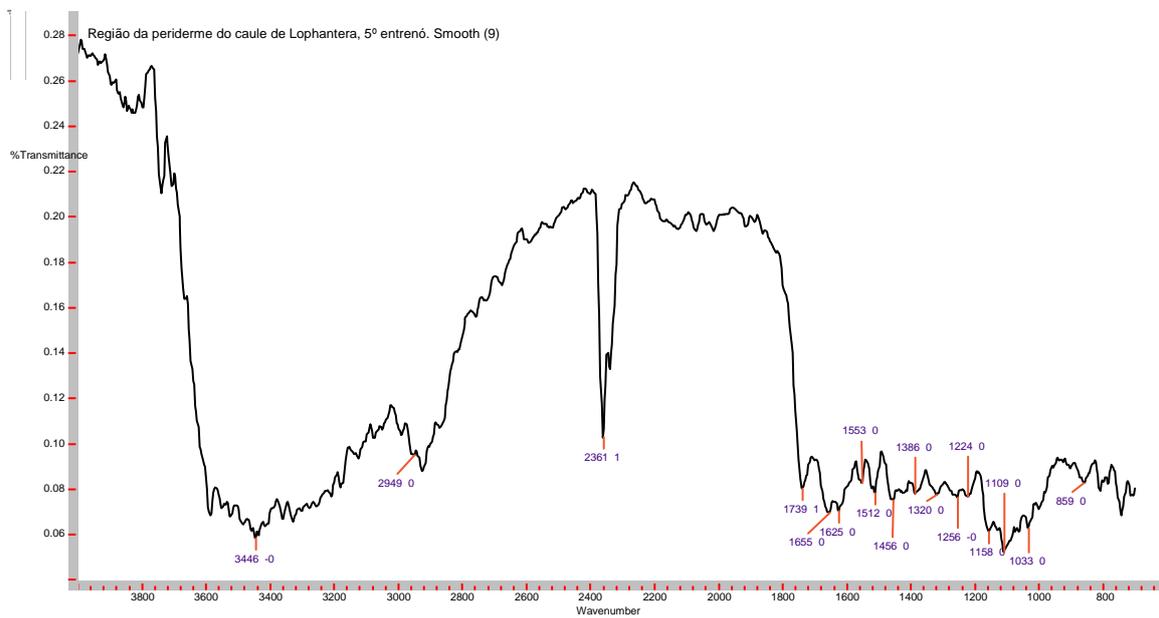
**Espectro 18:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 4º entrenó, região do cortex.



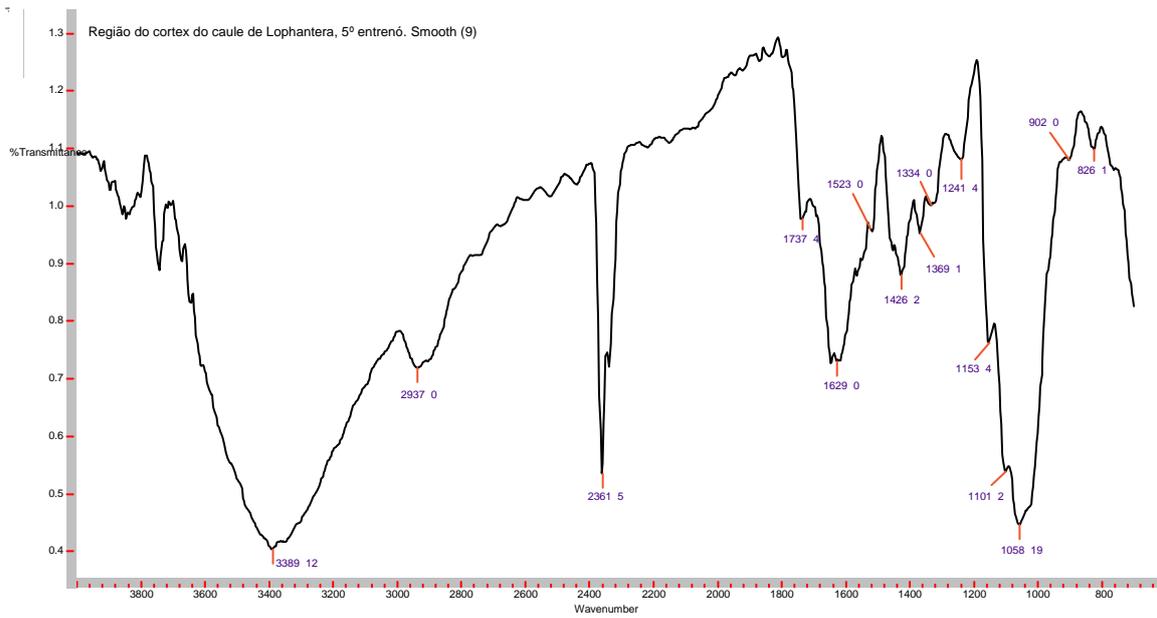
**Espectro 19:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 4º entrenó, região do xilema.



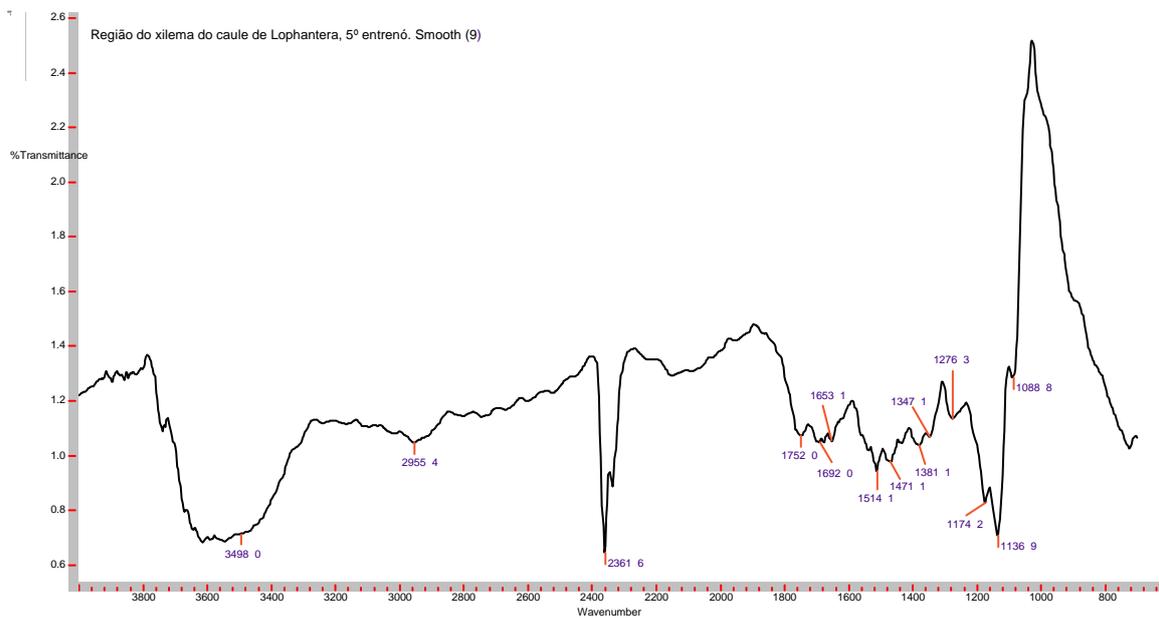
**Espectro 20:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 4º entrenó, região da medula.



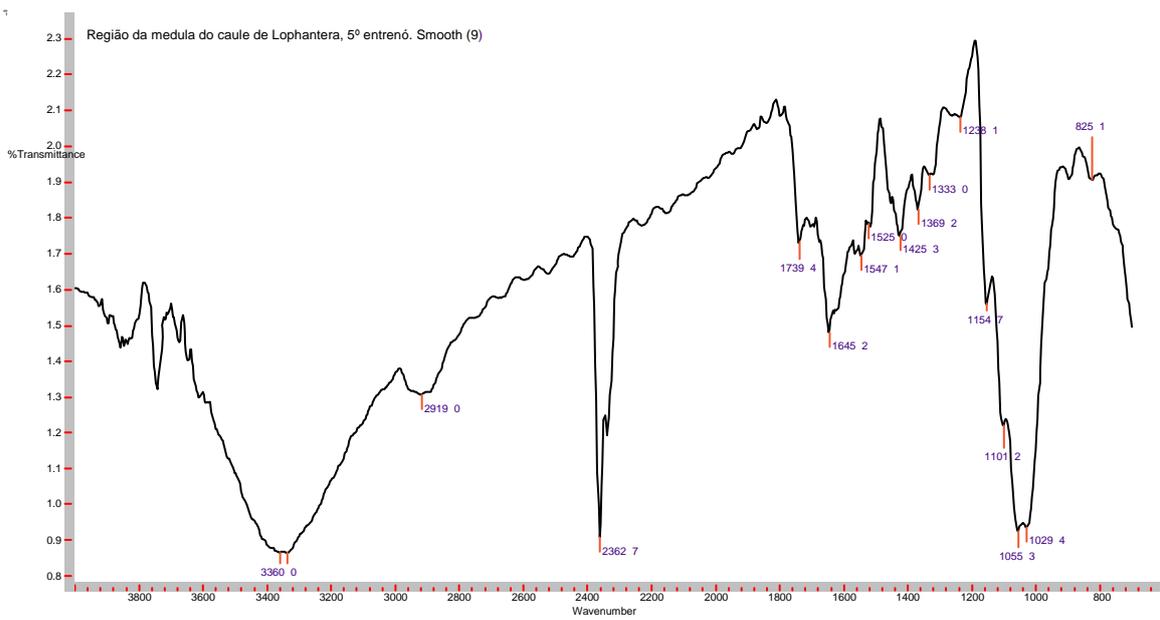
**Espectro 21:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 5º entrenó, região da periderme.



**Espectro 22:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 5º entrenó, região do cortex.

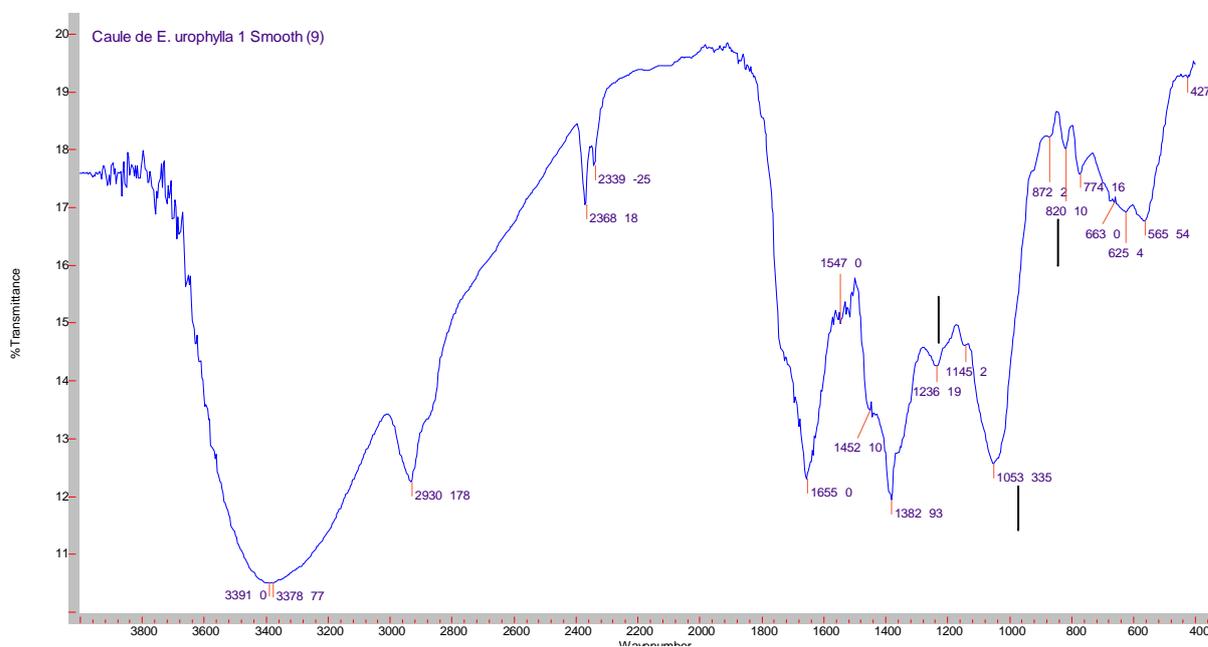


**Espectro 23:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 5º entrenó, região do xilema.

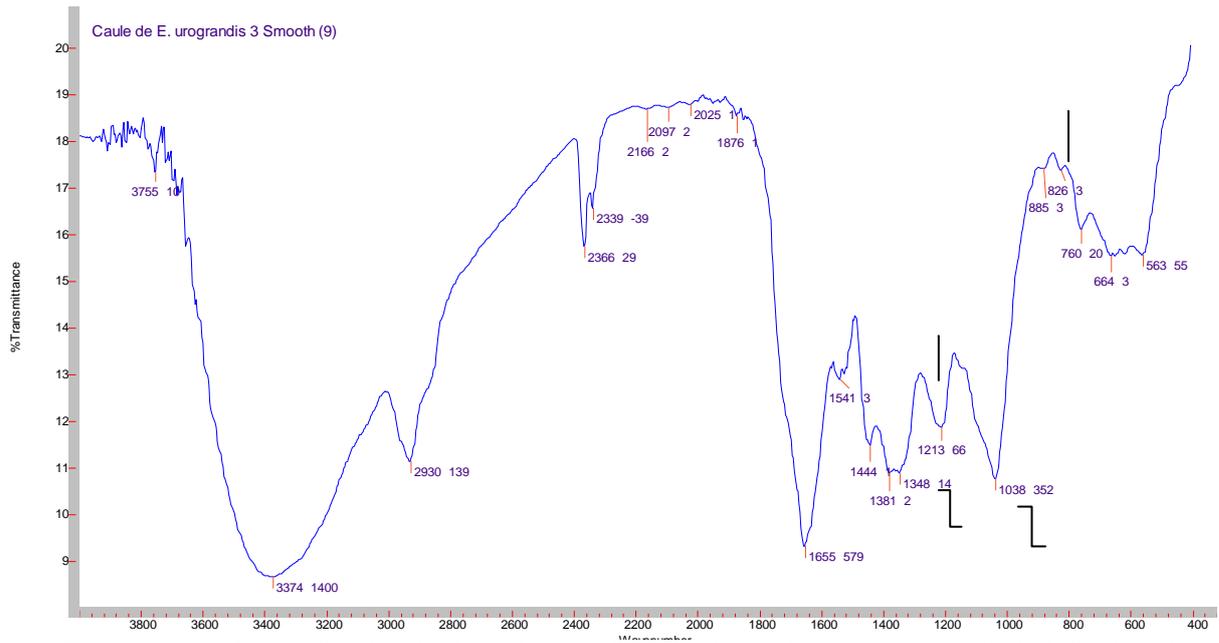


**Espectro 24:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 5º entrenó, região da medula.

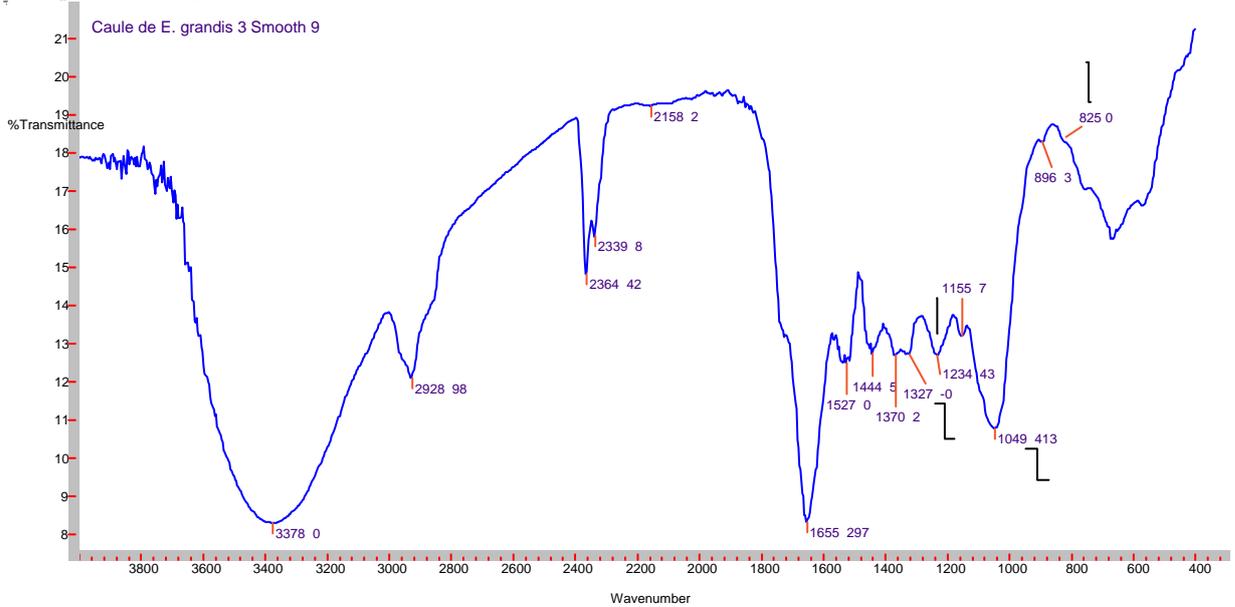
**Anexo 4:** Espectros no Infravermelho de calos pré extraídos em etanol (BRUCE & WEST, 1989) de explantes caulinar, foliar, apical e radicular, de plantas de *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*. Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 (cm<sup>-1</sup>) / distância de corrida 4000 – 400 (cm<sup>-1</sup>).



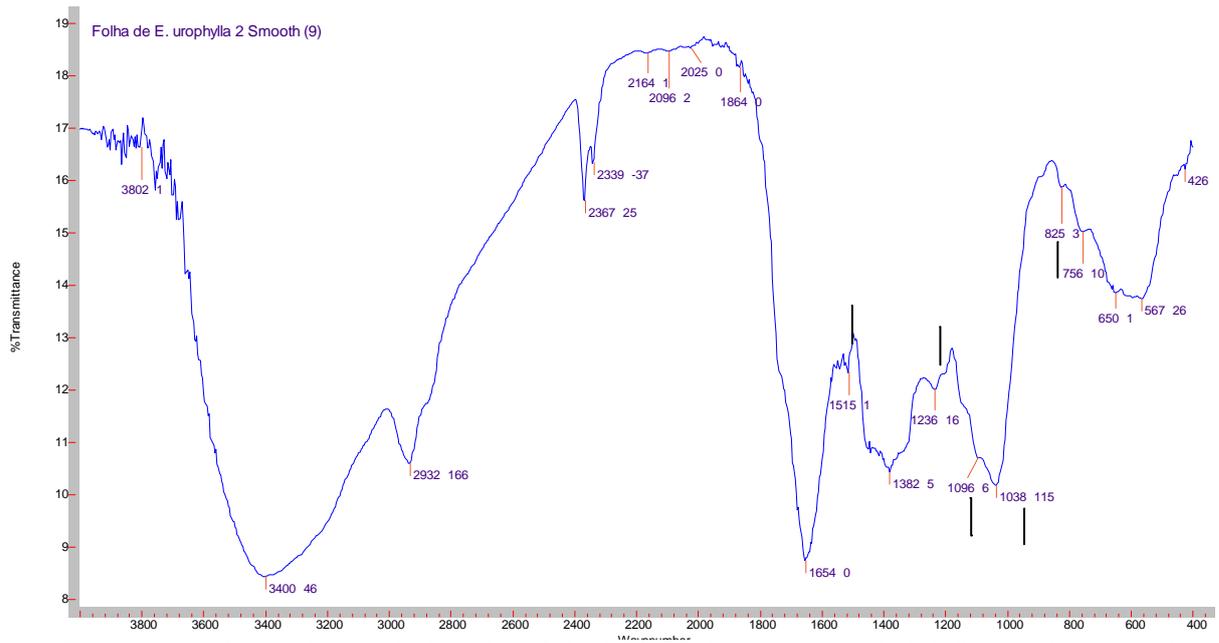
**Espectro 25:** Infravermelho de calo de explante caulinar de plantas de *E. urophylla*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



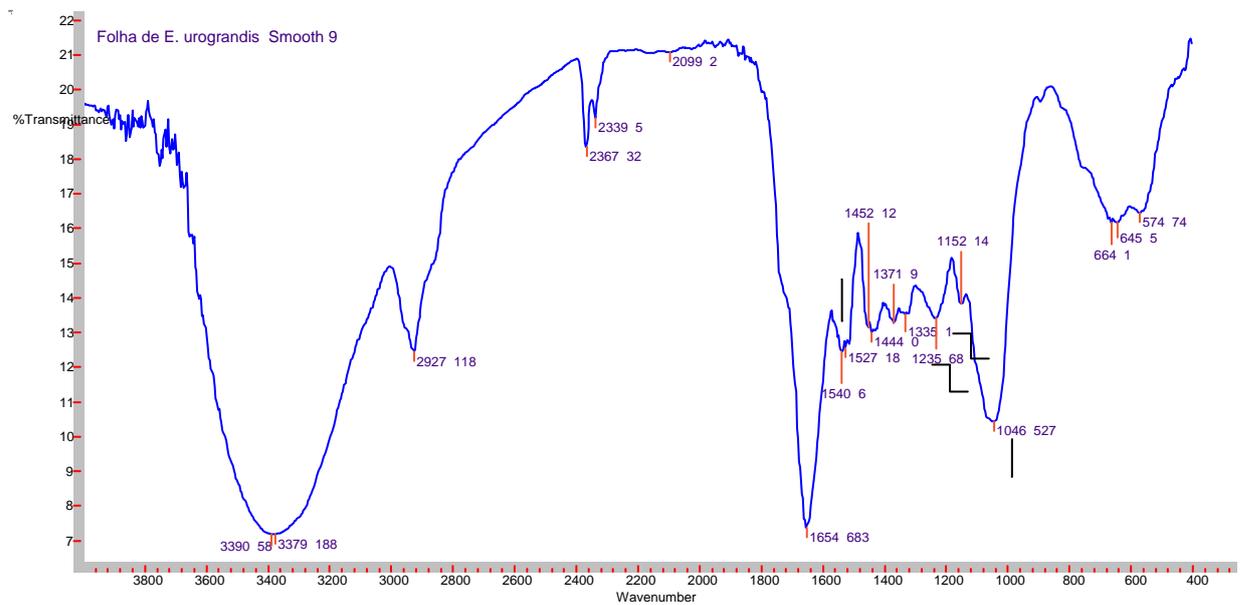
**Espectro 26:** Infravermelho de calo de explante caulinar de plantas de *E. urograndis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



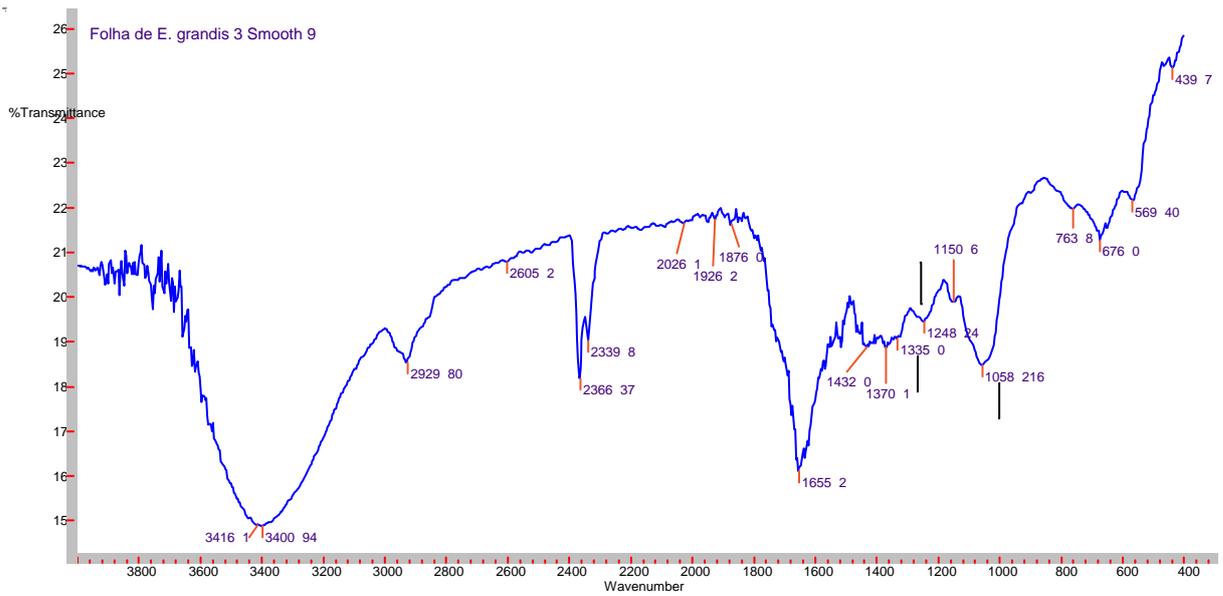
**Espectro 27:** Infravermelho de calo de explante caulinar de plantas de *E. grandis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



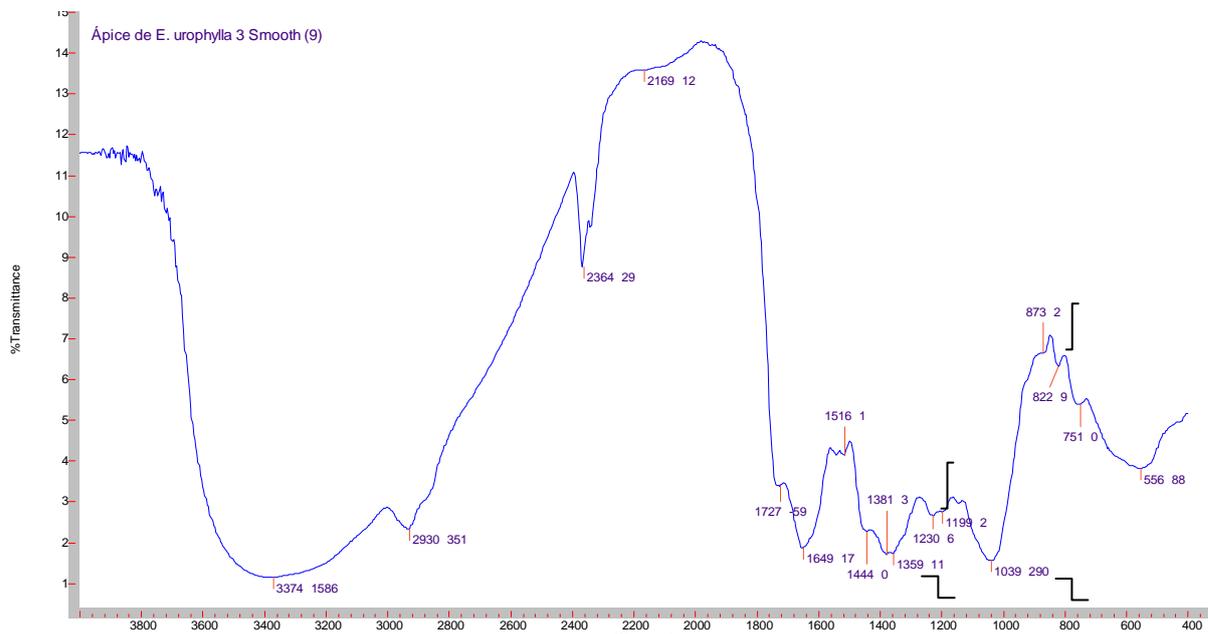
**Espectro 28:** Infravermelho de calo de explante foliar de plantas de *E. urophylla*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



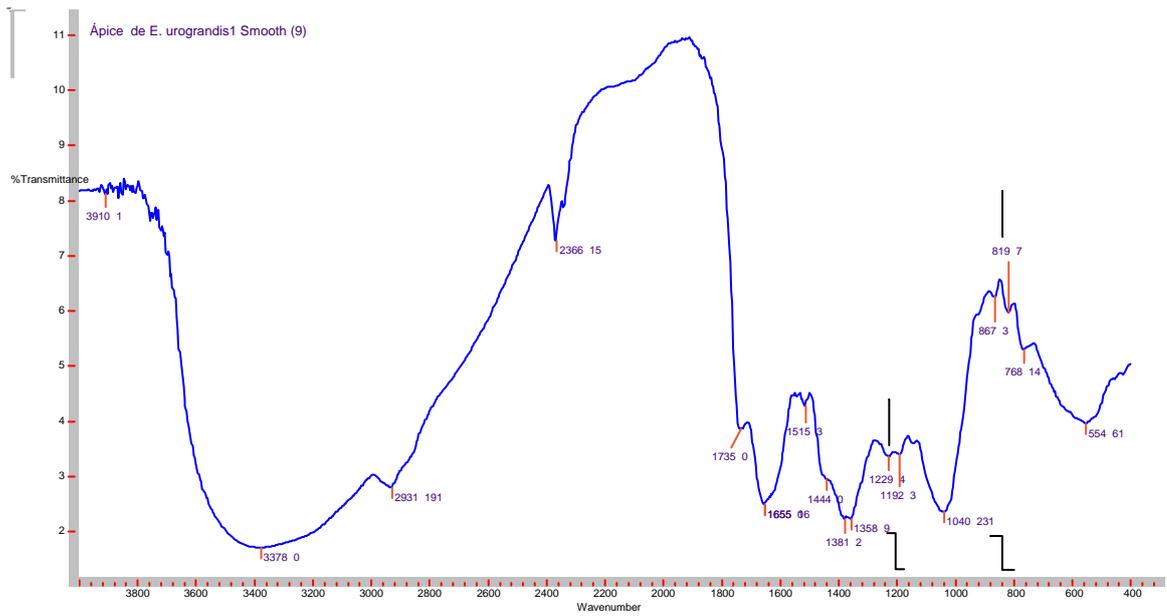
**Espectro 29:** Infravermelho de calo de explante foliar de plantas de *E. urograndis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



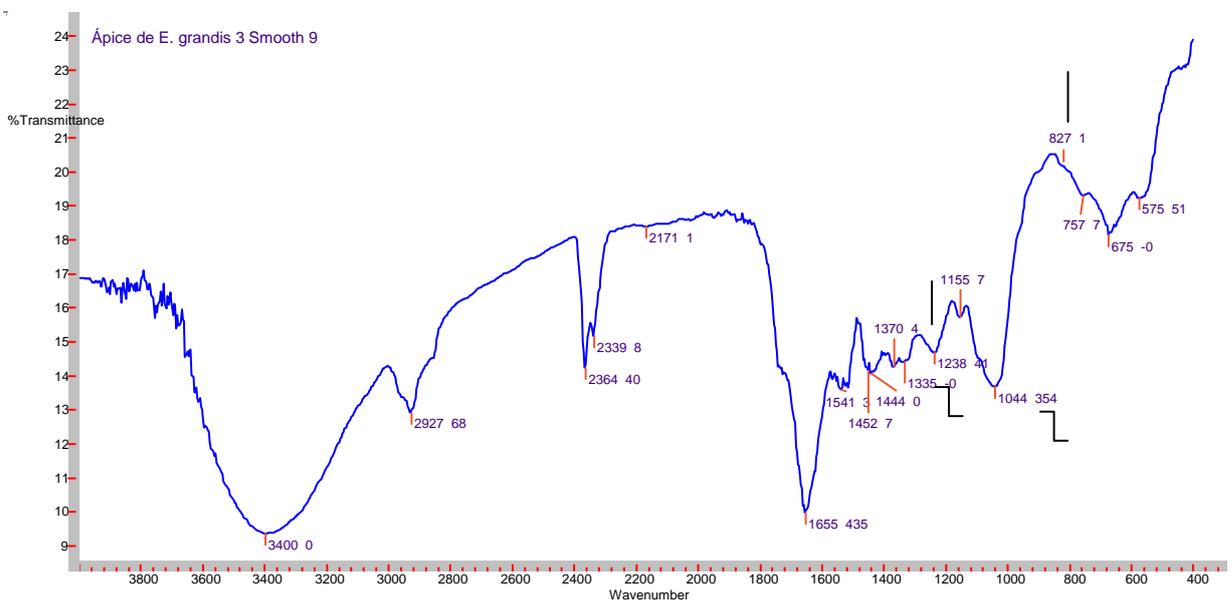
**Espectro 30:** Infravermelho de calo de explante foliar de plantas de *E. grandis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



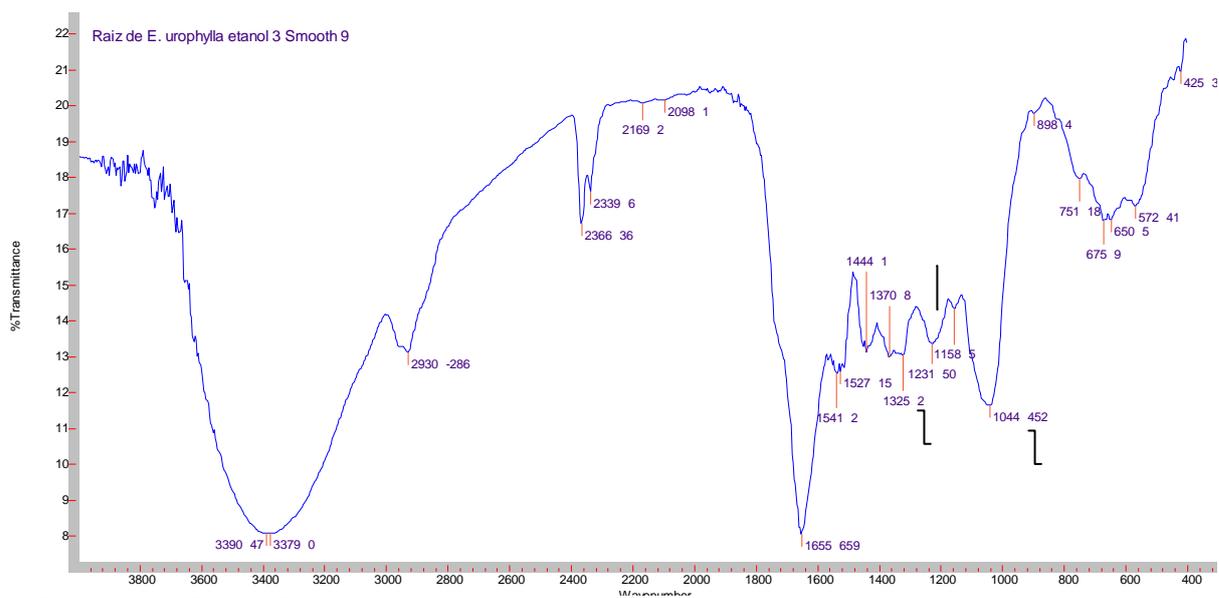
**Espectro 31:** Infravermelho de calo de explante apical de plantas de *E. urophylla*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



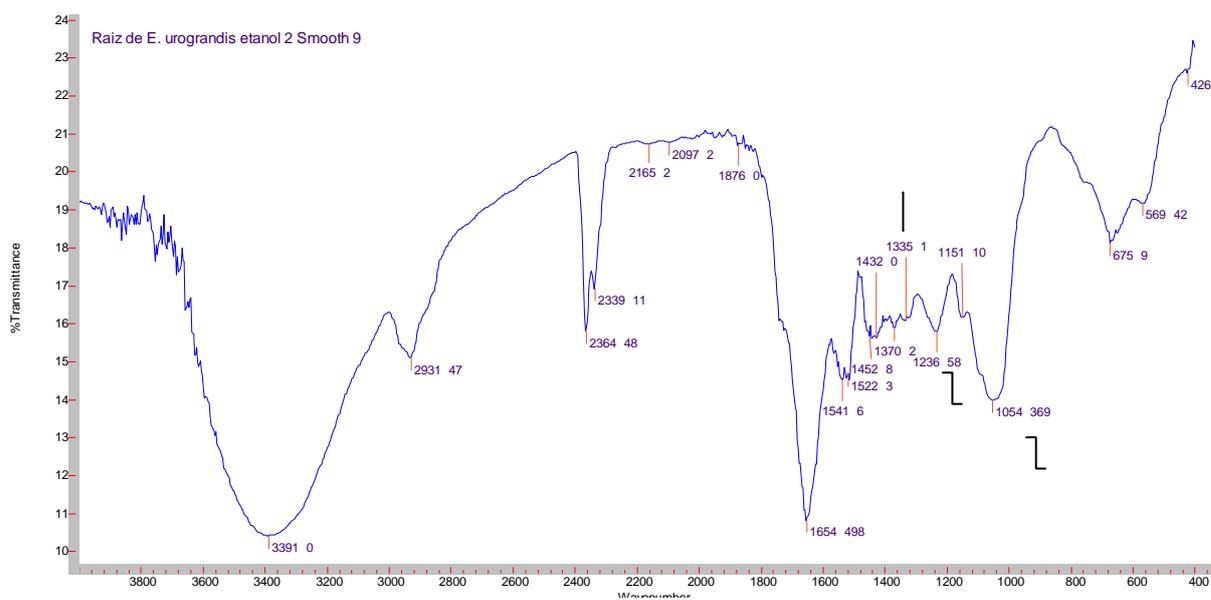
**Espectro 32:** Infravermelho de calo de explante apical de plantas de *E. urograndis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



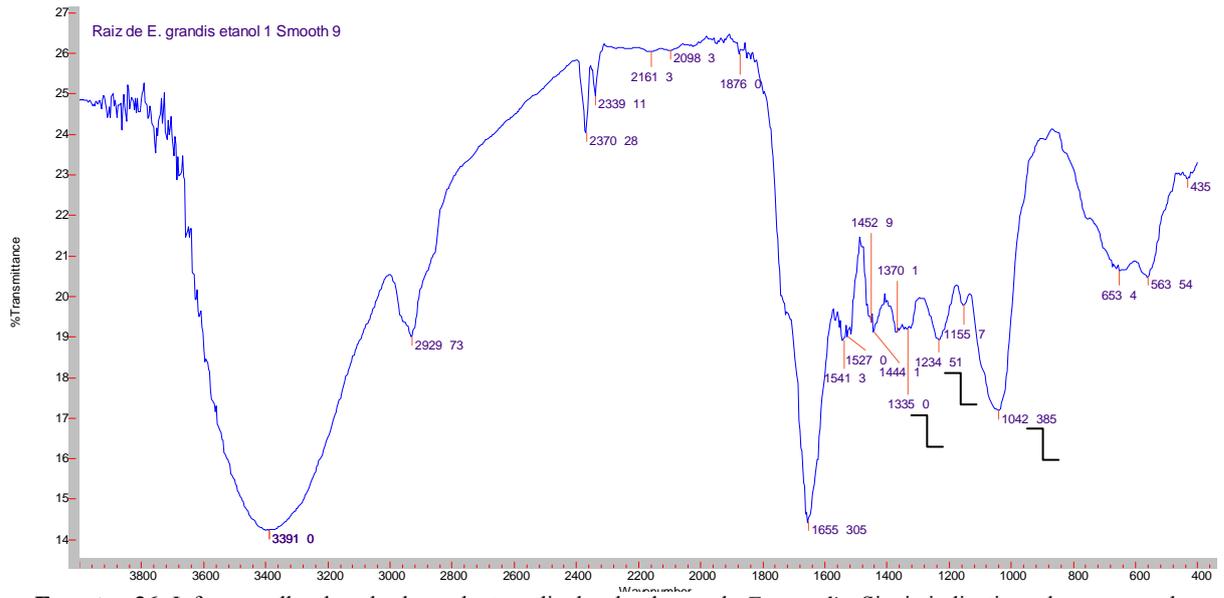
**Espectro 33:** Infravermelho de calo de explante apical de plantas de *E. grandis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



**Espectro 34:** Infravermelho de calo de explante radicular de plantas de *E. urophylla*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



**Espectro 35:** Infravermelho de calo de explante radicular de plantas de *E. urograndis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



**Espectro 36:** Infravermelho de calo de explante radicular de plantas de *E. grandis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).

**Anexo 5:** Atribuição dos sinais no infravermelho das ligninas de calos de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*.

cm <sup>-1</sup>	Atribuições	Absorções em cm <sup>-1</sup>			
		Ápice	Caule	Folha	Raiz
3412-3460	Estiramento de O-H	3441	3441		3445
3000-2842	Estiramento de C-H dos grupos metílicos e metilênicos	2935	2932	2933	2932
1738-1709	Estiramento de C=O em cetonas não conjugadas, de grupo éster				
1655-1675	Estiramento de C=O em cetonas conjugadas e em aldeídos conjugados	1654		1654	1656
1593-1605	Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O				
1505-1515	Vibração do esqueleto aromático	1515	1509	1517	1506

1460-1470	Deformação assimétrica em $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$				
1422-1430	Vibração do esqueleto aromático combinado com deformação no plano de C-H influenciado pela substituição do anel	1425	1425		
1365-1370	Estiramento de C-H alifático de $-\text{CH}_3-\text{CH}_3$	1370		1371	
1325-1330	Respiração (breathing) do anel sirigílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas	1335	1334	1335	1331
1266-1270	Respiração (breathing) do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O	1267	1269	1268	1268
1221-1230	Estiramento de C=O, C-C com estiramento de C=O sensível à substituição do anel aromático G condensado > G eterificado				
1140	Deformação (no plano) de C-H de anel aromático guaiacílico.				
1030-1095	Deformação (no plano) de C-H de anel guaiacílico mais deformação de C-O em álcool primário e em éter com contribuição de estiramento de C=O não conjugado				

**Anexo 6:** Atribuição dos sinais no infravermelho dos espectros do caule e raiz de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*, pré-extraídas em etanol e livre de extrativos.

cm <sup>-1</sup>	Atribuições	Absorções em cm <sup>-1</sup>			
		Extração em etanol		Livre Extrativos	
		Caule	Raiz	Caule	Raiz
3412-3460	Estiramento de O-H	3422	3405	3427	3399
3000-2842	Estiramento de C-H dos grupos metílicos e metilênicos	2931	2933	2928	2928
1738-1709	Estiramento de C=O em cetonas não conjugadas, de grupo éster	1738	1721	1736	1720
1655-1675	Estiramento de C=O em cetonas conjugadas e em aldeídos conjugados	1654	1655	1655	1621

1593-1605	Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O				
1505-1515	Vibração do esqueleto aromático	1510	1511	1516	1516
1460-1470	Deformação assimétrica em -CH <sub>3</sub> e -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	1460	1461	1456	1444
1422-1430	Vibração do esqueleto aromático combinado com deformação no plano de C-H influenciado pela substituição do anel	1423	1423	1424	
1365-1370	Estiramento de C-H alifático de -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>		1378	1372	1371
1325-1330	Respiração (breathing) do anel sirigílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas	1327		1326	
1266-1270	Respiração (breathing) do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O	1261	1271	1268	1270
1221-1230	Estiramento de C=O, C-C com estiramento de C=O sensível à substituição do anel aromático G condensado > G eterificado				
1086-1125	Deformação de C-O de álcool secundário e de éter alifático				
1030-1095	Deformação (no plano) de C-H de anel guaiacílico mais deformação de C-O em álcool primário e em éter com contribuição de estiramento de C=O não conjugado	1048	1071	1025	1056

---

**Anexo 7:** Atribuição dos sinais obtidos a partir de espectrometria de infravermelho de seções no plano transversal do caule de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke germinadas *in vitro*. Pe = Periderme; Co = córtex; Xi = Xilema; Me = Medula

cm <sup>-1</sup>	Atribuições dos Sinais	Absorções cm <sup>-1</sup>															
		Região do 2º Entrenó				Região do 3º Entrenó				Região do 4º Entrenó				Região do 5º Entrenó			
		Pe	Co	Xi	Me	Pe	Co	Xi	Me	Pe	Co	Xi	Me	Pe	Co	Xi	Me
3412-3460	Estiramento de O-H	3438	3493	3389	3442	3447	3389		3396	3448	3442	3437	3388	3457	3405		3384
3000-2842	Estiramento de C-H dos grupos metílicos e metilênicos	2935	2936	2938	2936	2930	2936	3941	2932	2928	2944	2937	2942	2927	2938	2951	2934
1738-1709	Estiramento de C=O em cetonas não conjugadas, de grupo éster	1741	1739	1733	1733	1734	1725	1738	1726	1738	1725	1738	1737	1737	1736	1741	1737
1675-1655	Estiramento de C=O em cetonas conjugadas e em aldeídos conjugados	1644		1651	1645	1643		1646	1644	1644		1642	1646	1640		1652	1645
1505-1515	Vibração do esqueleto aromático	1511	1523	1511		1515		1514		1512		1513	1515	1514		1415	
1422-1430	Vibração do esqueleto aromático combinado com deformação no plano de C-H influenciado pela substituição do anel	1418	1423	1422	1423	1429	1424	1424	1424	1422	1424	1426	1425	1425	1422		1424
1365-1370	Estiramento de C-H alifático de -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>		1370		1370	1367	1369	1369	1368	1368	1370	1370	1368	1369	1369	1381	1369
1325-1330	Respiração (breathing) do anel sirigílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas	1331	1331	1329	1333	1327	1330	1331		13124	1331	1332	1330	13329	1324		1330
1266-1270	Respiração (breathing) do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O	1278		1271	1262	1253		1265	1263	1256	1262	1247		1253		1273	1240
1140	Deformação (no plano) de C-H de anel aromático guaiacílico. G condensado > G eterificado	1148				1151	1153	1136				1155	1154		1153	1136	1154
1030-1095	Deformação (no plano) de C-H de anel guaiacílico	1036	1056	1069	1033	1060	1057	1085	1058	1074	1059	1077	1056	1053	1056	1089	1056

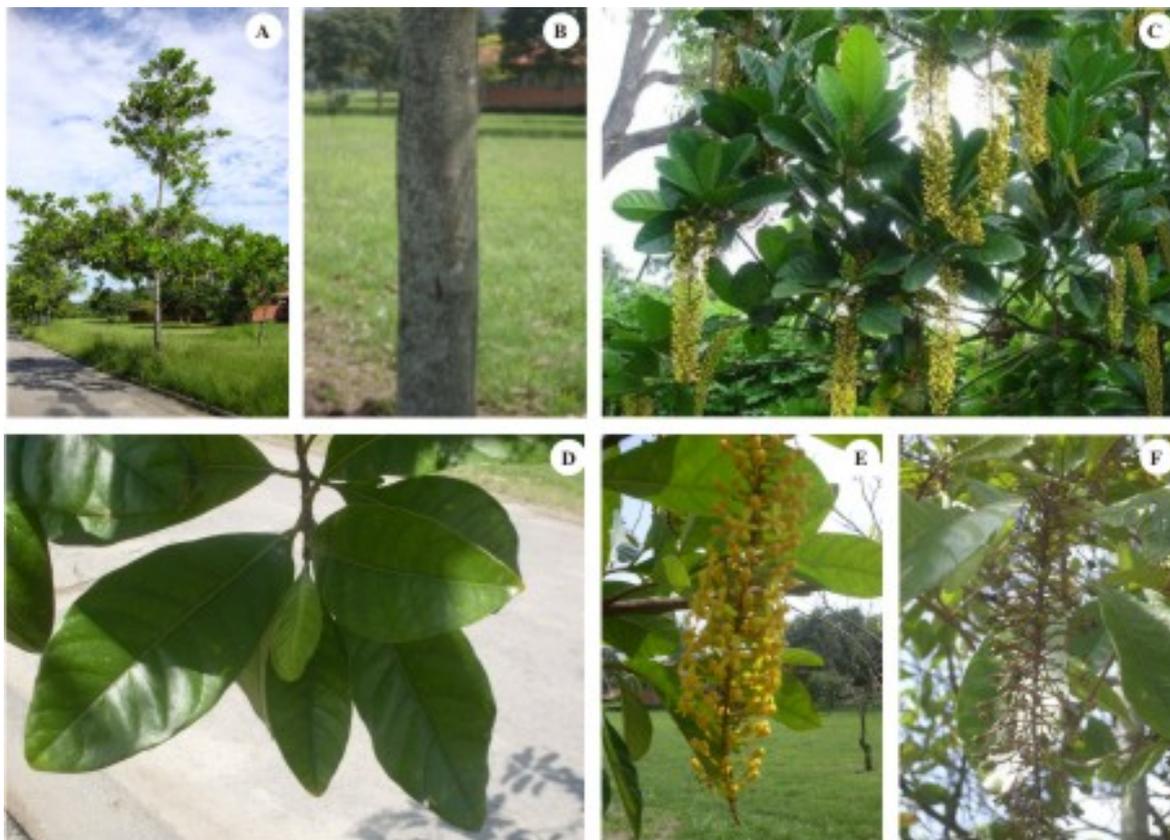
**Anexo 8:** Atribuição dos sinais de espectrometria de infravermelho de calos de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e do híbrido *E. urograndis*.

cm <sup>-1</sup>	Atribuições dos Sinais	Absorções cm <sup>-1</sup>											
		<i>E. grandis</i>				<i>E. urophylla</i>				E. urograndis			
		Ápice	Folha	Caule	Raiz	Ápice	Folha	Caule	Raiz	Ápice	Folha	Caule	Raiz
3412-3460	Estiramento de O-H	3400	3400	3378	3391	3364	3368	3362	3367		3400	3391	3391
3000-2842	Estiramento de C-H dos grupos metílicos e metilênicos	2927	2928	2929	2929	2929	2930	2929	2933		2928	2929	2931
1738-1709	Estiramento de C=O em cetonas não conjugadas, de grupo éster							1713	1703		1799		
1675-1655	Estiramento de C=O em cetonas conjugadas e em aldeídos conjugados	1655	1655	1654	1655	1631	1622	1622	1646		1655	1654	1654
1593-1605	Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O	1541		1527	1541						1541		1541
1505-1515	Vibração do esqueleto aromático				1527				1515		1527	1522	1522
1460-1470	Deformação assimétrica em -CH <sub>3</sub> e -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	1452		1444	1452						1458	1452	1452
1422-1430	Vibração do esqueleto aromático com deformação no plano de C-H influenciado pela substituição do anel	1444	1432		1444						1431	1444	1432
1365-1370	Estiramento de C-H alifático de -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	1370	1370	1370	1370	1383	1384	1385	1369			1370	1370
1325-1330	Respiração (breathing) do anel sirigílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas	1335	1335	1333	1335	1359	1354	1351			1325	1335	1335
1266-1270	Respiração do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O		1248	1256		1264	1257				1260		

continuação

1221-1230	Estiramento de C=O, C-C com estiramento de C=O sensível à substituição do anel aromático G condensado > G eterificado	1233		1235	1234				1222		1231	1233	1236
1140	Deformação (no plano) de C-H de anel aromático guaiacílico. G condensado > G eterificado	1154			1156						1161	1151	1151
1128-1125	Deformação (no plano) de C-H (típico de anel siringílico)	1154	1150										
1030-1095	Deformação (no plano) de C-H de anel guaiacílico mais deformação de C-O em álcool primário e em éter com contribuição de estiramento de C=O não conjugado	1049	1058	1051	1042	1056	1057	1057	1058		1041	1047	1054
915-925	Deformação de C-H (monohidrogênio) fora do plano do anel aromático siringílico					921	925						
853-858	Deformação de C-H fora do plano dos H do C-2, C-5 e C-6 (anel gaiacílico)					859	871	873	876			895	
817-827	Deformação de C-H fora do plano do C-H nas posições 2,5 e 6 de unidades guaiacílicas					822	824	827	827		817		

**Anexo 9** – *Lophanthera lactescens* Ducke no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



Indivíduo arbóreo de *L. lactescens* Ducke. A: Vista do indivíduo no *Campus*; B: Detalhe do tronco colunar; C: Inflorescência; D: Detalhe do ramo com folhas opostas; E: Detalhe da inflorescência em racemos terminais pendentes; F: Detalhe do fruto seco.