

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
DEPARTAMENTO DE PRODUTOS FLORESTAIS  
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DA MADEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO E ANÁLISE DE  
CALOS DE *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden, VISANDO ESTUDO SOBRE A  
BIOSSÍNTESE DA LIGNINA.**

**DESIANE AMARAL DE DEUS**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu**

**SEROPÉDICA – RJ  
AGOSTO – 2007**

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a interferência dos reguladores de crescimento, cinetina e ácido 2,4 - diclorofenoxiacético em 25 tratamentos, com a formação e desenvolvimento de calos de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden para estudo de formação de lignina. Foi utilizado meio de cultura Murashige & Skoog (MS) para germinação e desenvolvimento. Os experimentos com meio de cultura modificado para calo ocorreram em 25 tratamentos nas concentrações de 2,4 – D (1; 2,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{M.L}^{-1}$ ) e cinetina (0; 0,5; 1; 2,5 e 5  $\mu\text{M.L}^{-1}$ ). Os resultados foram estatisticamente avaliados quanto à friabilidade e nível de oxidação. Concentrações altas de 2,4 – D induziram a formação de calos maiores, parcialmente oxidados e pouco friáveis.

Palavras – chave: *Eucalyptus grandis*, calo, cinetina, Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
DEPARTAMENTO DE PRODUTOS FLORESTAIS  
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DA MADEIRA**

**DESIANE AMARAL DE DEUS**

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO E ANÁLISE DE  
CALOS DE *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden, VISANDO ESTUDO SOBRE A  
BIOSSÍNTESE DA LIGNINA.**

Monografia apresentada ao Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu**

**SEROPÉDICA – RJ  
AGOSTO – 2007**

Aprovada em 16 de agosto de 2007

Banca Examinadora:

---

Dr. Heber dos Santos Abreu  
Diretoria do Instituto de Florestas  
Orientador

---

Msc. Maria Beatriz de Oliveira Monteiro  
Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais-IF

---

Dr<sup>a</sup> Rosilei Aparecida Garcia  
Departamento de Produtos Florestais-IF

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the interference of the growth regulators, kinetin and 2,4 – chlorophenoxy acetic acid with 25 treatments, for formation and development of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden for study of lignin formation. It was used modified of culture medium Murashige & Skoog (MS) for germination and development. The experiments with medium culture for callus formations carried out from modified 25 treatments in the followiw concentrations of 2,4 - D (1; 2,5; 5; 10 and 20  $\mu\text{M.L}^{-1}$ ) and kinetin (0; 0,5; 1; 2,5 and 5  $\mu\text{M.L}^{-1}$ ). The results were estatisticaly avaluated, as for truability and oxidation level. High 2,4 - D concentrations provided the formation of lorgest callus with parcial oxidation and low freeab lity.

Key - Words: *Eucalyptus grandis*, callus, kinetin, 2,4 – chlorophenoxy acetic acid.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 - Cultura de tecidos.....	3
2.2 - Meios de cultivo.....	5
2.3 - Reguladores de crescimento vegetal.....	5
3. OBJETIVO.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
4.1. Preparação do meio de cultura para germinação, indução de calos (clone), e indução de calos nos tratamentos.....	7
4.2. Desinfestação e inoculação das sementes.....	8
4.3. Cultura e sub-cultura de calos (clones).....	10
4.4. Cultura e sub-cultura de calos nos diferentes tratamentos.....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
6. CONCLUSÕES.....	18
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

## 1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Eucalyptus* sp 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 atender à crescente demanda de madeira destinada a fins energéticos e de produção de celulose e papel (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2005). O grande número de espécies deste gênero, a grande plasticidade ecológica e a sua excelente produção, tornou-o matéria-prima de inúmeras indústrias florestais, o que permitiu um rápido avanço no conhecimento silvicultural e tecnológico de muitas de suas espécies (FINGER et al, 1993). Entretanto, espécies de crescimento rápido como o eucalipto, apresentam determinados obstáculos quanto as suas utilizações, o que justifica investimentos em busca de soluções capazes de otimizar tecnologicamente a utilização no mais amplo espectro do mercado consumidor (ABREU et al, 2003).

O *Eucalyptus grandis* é um dos mais plantados no mundo devido às características silviculturais desejáveis e a aplicabilidade da madeira para diversos fins, aliada à grande variabilidade genética e à facilidade de aquisição de sementes em quantidade e qualidade. A sua diversidade de espécies, permite considerar o eucalipto como potencial fornecedor de uma madeira bem definida para a produção de vários produtos (TRUGILHO et al, 2007).

Em geral a maioria das espécies de eucalipto possui a seguinte composição química da madeira: 40-62 % de celulose, 12-22 % de hemicelulose e 15-25 % de lignina (HILLIS & BROWN, 1978). Depois da celulose, a lignina é o polímero orgânico mais abundante no reino vegetal (BACHA, 2006), encontrando-se ausente, apenas nos vegetais primitivos como fungos, algas e líquens, que não são lignificados (FENGEL & WEGENER, 1989). Devido à sua ação cimentadora, e por ser uma substância pioneira de defesa contra ataques de patógenos, desempenha importantes papéis na célula; desde a função de resistência estrutural da parede celular, até a proteção contra fatores bióticos e abióticos que possam de alguma forma danificar a planta.

A formação da lignina inicia-se, através da condensação envolvendo as substâncias 4-fosfato de eritrose e o ácido fosfoenolpirúvico. Sua composição tem sido manipulada pela engenharia genética atenuando as atividades de certas enzimas que participam na formação dos ácidos chiquímico, corísmico, prefênico e arogênico entre outros precursores (FENGEL & WEGENER, 1989). A organização estrutural contribui extensivamente às propriedades físicas e mecânicas da madeira. A flexibilidade estrutural dos vegetais, por exemplo, depende da rede de ligações carbono-carbono, carbono-oxigênio – ligações cruzadas - entre os constituintes químicos estruturais da madeira. De acordo com esta visão, a presença de ligações  $\beta$ -O-4 facilita a flexibilidade do polímero (ABREU, 1999).

Apesar de se tratar de um composto de suma importância para a planta, a lignina é indesejada pela indústria de polpa e celulose (GUIMARÃES et al, 2001). As pesquisas realizadas com o polímero lignina têm sido auxiliadas por uma técnica denominada cultura de tecidos.

A cultura de tecidos permite avaliar os efeitos fisiológicos dos nutrientes, os hormônios vegetais e outros constituintes químicos dando um grande impulso nos estudos sobre a formação da lignina “*in vitro*”, no que se refere aos reguladores da formação dos precursores e da polimerização na parede celular (GALLO & CROCOMO, 1995). Segundo Higashi et al. (2002) a cultura de tecidos apresenta-se como um método alternativo na propagação de *Eucalyptus* spp. por oferecer vantagens; tais 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.

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). 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 necessários ao desenvolvimento das células (COSTA, 2006), pois são os meios nutritivos que fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Para o estabelecimento de um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas “*in vitro*”, é necessário um adequado balanço entre auxinas e citocinas. Normalmente, as concentrações de auxinas são inferiores as das citocininas, mantendo o balanço auxina/citocinina menor que um (PIERIK, 1990). Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre a formação de raízes. Na situação oposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo (calogênese) é produzida (KRIKORIAN, 1995).

A formação de calos a partir de um explante é denominada calogênese (VENTURIERI & VENTURIERI, 2004). A calogênese consiste na formação de massas desorganizadas de células a partir de explantes foliares, denominada calo. O calo, depois de formado, pode dar origem a diferentes órgãos dependendo do interesse da pesquisa.

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). É um tecido amorfo e desorganizado, formado pela intensa atividade de células vegetais (GRATTAPAGLIA E 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 auxina, ou com alta relação auxina/citocinina (RIOS, 2004). A cultura de calo é uma ferramenta biotecnológica extremamente importante. Na embriogênese somática indireta, a calogênese é uma etapa essencial (FRANCO et al, 2006).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Cultura de tecidos

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 seu cultivo sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (COSTA, 2006)

Técnicas de cultura de tecidos possibilitam uma multiplicação mais rápida quando comparadas a outras técnicas de propagação assexuada e também são consideradas como um pré-requisito para futuros estudos de engenharia genética (LACORTE, 1991).

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 seu cultivo sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (COSTA, 2006). O sistema de cultura de tecidos vegetais é geralmente utilizado como base no estudo dos vários problemas fisiológicos,



bioquímicos, genéticos e estruturais relacionados às plantas (PASQUAI et al, 1998). Sendo uma expressão utilizada para designar a cultura de órgãos e células, a cultura de tecidos, além de proporcionar variação genética, condição essencial para a seleção de genótipos, amplia os conhecimentos para a compreensão dos fenômenos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas. Na cultura de tecidos, mais especificamente na indução de calos, são enfrentados diversos problemas, dentre os quais se destacam a oxidação fenólica e a contaminação.

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. *In vitro*, a oxidação fenólica constitui um dos principais problemas enfrentados no início do estabelecimento e durante o cultivo de explantes destas espécies (COSTA, 2006). Por tais motivos, explantes vegetativos da maioria das espécies arbóreas, são de difícil crescimento e diferenciação *in vitro* (ANDRADE, 2006). Segundo Flores et al. (1998) a liberação de compostos fenólicos é devido a danos celulares ocorridos durante a excisão dos explantes. Para estes autores, ainda, algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas que, além de causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes em um grande número de espécies, são responsáveis pela coloração marrom do material. Preece & Compton (1991) verificaram que as substâncias responsáveis pela oxidação de espécies lenhosas cultivadas *in vitro* eram fenóis, flavonóides e taninos. Adicionado ao fator biológico da produção de exsudatos, pode haver ainda uma ação residual do hipoclorito de sódio como oxidante (CARBOCLORO, 2007).

Para inibir ou diminuir a oxidação fenólica, deve-se ter maiores cuidados na manipulação do explante para evitar danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação. A adição de compostos antioxidantes, como cisteína e ácido ascórbico, além de adsorventes, como carvão ativado e PVP, também pode ser decisiva na prevenção à oxidação, a qual é mais acentuada nas fases iniciais de cultivo (TEIXEIRA, 2005). As soluções antioxidantes podem ser utilizadas como um enxágüe, após a desinfestação, ou serem colocadas na placa onde será feito o corte dos explantes. É sugerida, também, a adição ao meio de cultura, a fim de amenizar o problema (SCHUCH, et al., 2003).

Outro ponto crucial da cultura de tecidos é a instalação da planta *in vitro* livre de patógenos para sua melhor sobrevivência e crescimento, assim, é necessário determinar as condições de desinfestação adequadas para garantir um ambiente asséptico sem danificar os explantes (TORRES, et al 1998). Um dos maiores problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica, principalmente contaminação presente na superfície dos tecidos de folhas, gemas e segmentos nodais. Além desta contaminação superficial, é freqüente deparar-se com contaminação endógena, este tipo de contaminação é mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo. A contaminação por microrganismos é considerada um problema grave, podendo chegar, inclusive, a ser um fator limitante para o estabelecimento de cultivo *in vitro* de certos explantes (RIBAS et al., 2003). Na micropropagação de plantas, as contaminações causadas por fungos, bactérias e leveduras constituem as principais causas de perdas de material vegetal (LONG et al., 1988; LEIFERT & WOODWARD, 1998; DANTAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2003). Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar, no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000). Para minimizar os problemas relacionados à contaminação endógena e exógena é recomendável cultivar a planta em condições parcialmente ou inteiramente controladas (TEIXEIRA, 2005).

O método de desinfestação de sementes constitui-se como ferramenta básica e essencial para o estabelecimento *in vitro* de uma cultura. A desinfestação de segmentos de brotos, folhas e botões florais pode ser feita com sucesso utilizando álcool etílico comercial na concentração de 50 a 70%, por um período de 1 a 3 minutos, seguido de um tratamento com hipoclorito de sódio ou cálcio a 0,5 a 2% (p/v) por 5 a 20 minutos. O uso de cloreto de mercúrio, embora mais raro, devido a sua toxidez também pode dar bons resultados, numa concentração de 0,05 a 0,2% (p/v), por um período de 5 a 20 minutos, seguido de 3 a 5 lavagens com água destilada estéril. A última lavagem pode ser feita com uma suspensão aquosa de carvão ativo na concentração de 0,5%. Esta lavagem com carvão contribui para retirada do excesso de cloreto de mercúrio que fica aderido ao tecido. Isto evita ou minimiza os riscos de toxidez do mercúrio durante as fases de cultivo do explante. Órgãos e tecidos com contaminação endógena são de difícil desinfestação. Quando se detecta a presença de bactérias ou fungos endógenos deve-se dar preferência para outras fontes de explantes, sobretudo, aquelas derivadas de plantas cultivadas em ambientes controlados. Caso esta alternativa não seja possível, deve-se procurar eliminar esta contaminação, com cultivos em meios enriquecidos com antibióticos e fungicidas, após o material ter passado pelo tratamento de desinfestação superficial com álcool, hipoclorito, cloreto de mercúrio, ou ainda outros métodos de desinfestação citados na literatura. Vários antibióticos podem ser utilizados, mas a cefotaxima é uma das mais eficazes e pode ser utilizada na concentração de 100 a 250 mg/L. A contaminação fúngica endógena pode ser eventualmente eliminada com cultivos na presença de benomil, na concentração de 500 a 2000 mg/L (TEIXEIRA, 2005).

## 2.2 - Meios de cultivo

Meios de cultivo são combinações de sais minerais (macro e micro nutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Podem ser sólidos (adicionando-se Agar ou outro agente para geleificação) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo. (GUERRA & NODARI, 2006). Os meios nutritivos utilizados para as culturas fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento "*in vitro*" (TORRES et al, 1998). A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender em necessidades específicas (GUERRA & NODARI, 2006). O meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas usadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio. Os meios nutritivos são formados por múltiplos componentes, sendo bastante variáveis em função da espécie vegetal e da origem do explante. É constituído de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono e energia, vitaminas e substâncias reguladoras de crescimento. Entre os componentes adicionais estão incluídos os aminoácidos e amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas. (GUERRA & NODARI, 2006). 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 E SHERRINGTON, 1984). O meio nutritivo deve estar de acordo com a exigência da planta, porém, o fator chave da multiplicação é a presença dos reguladores de crescimento vegetal, particularmente citocininas e auxinas (CORDEIRO et al, 2004). As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (CALDAS et al., 1990).

### 2.3 - Reguladores de crescimento vegetal

Dentre os fatores que regulam o processo germinativo, a presença de hormônios e o equilíbrio entre eles, promotores e inibidores, exercem um papel fundamental (CATO, 2006). São chamados de reguladores ou biorreguladores vegetais, os hormônios (sejam eles naturais ou sintéticos) que quando aplicados exogenamente possuem ações similares aos grupos de hormônios vegetais conhecidos (citocininas, giberelinas, ácido indolil acético e etileno) (CASTRO, 2002). O controle químico da diferenciação da parte aérea foi primeiramente observado em cultura de calo de tabaco. Foi observada inibição na formação de gemas por auxinas, e reversão deste efeito estimulando brotações utilizando-se adenina bem como o fosfato inorgânico. Esta foi a constatação de que o processo de organogênese “in vitro” é controlado por substâncias hormonais sendo que o desenvolvimento de parte aérea, raiz ou calo é determinado pelo balanço entre auxinas e citocininas (GUERRA & NODARI, 2006). A resposta à adição de fitorreguladores depende do estado fisiológico dos explantes, o que está relacionado com a época do ano e com o estado geral da planta-matriz (ALTMAN & GOREN, 1977). O balanço de auxinas/citocininas em alto/baixo favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. Concentrações iguais promovem a produção de calos.

As citocininas pertencem a uma classe de hormônios associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, participando no controle da divisão celular, alongamento celular, crescimento e senescência foliar (NISHIMURA et al., 2004), além de favorecerem a produção de calo embriogênico (CHÉE & 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, metabolismo dos nutrientes e como reguladores da expressão dos genes (CASTRO, 2002). Aplicações de cinetina podem desencadear a formação de gemas laterais a partir da dominância apical (TEIXEIRA & MARBACH, 2000).

As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina (CIN), benziladenina (BAP), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e thidiazuron (TDZ) (GUERRA & NODARI, 2006). O efeito das citocininas em cultura de tecidos ou órgãos pode variar de acordo com a substância utilizada, o tipo de cultura, a variedade da planta e da idade do tecido que deu origem ao explante (ANDRADE, 2006). Elas podem estimular ou inibir uma variedade de processos metabólicos, fisiológicos e bioquímicos em plantas superiores (CATO, 2006).

As concentrações de citocinina podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante. Meios com 0,05 a 1,0 mg/L de BAP têm sido utilizados com bons resultados para o cultivo de ápices caulinares de várias espécies lenhosas (TORRES et al, 1998).

Auxinas são outras classes de fitorreguladores empregadas, embora com menor frequência e em concentrações menores. As auxinas são sintetizadas nos ápices caulinares, ramos e raízes e transportadas para outras regiões da planta, sendo caracterizadas, principalmente, pela capacidade de estimular o alongamento celular, mas também 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 mais frequentemente utilizados (KRIKORIAN et al., 1990), principalmente em cultura de tecidos, para indução de calo, e em culturas em suspensão (GASPAR et al., 1996). A indução da calogênese ocorre em meio com altas concentrações de auxinas (GRATTAPAGLIA &

MACHADO, 1990), e o 2,4-D é um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos (AMMIRATO, 1983). As auxinas nos meios variam de 0,01 a 10 mg/L, sendo as mais usadas: AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA, 2,4-D, 2,4,5-T, 4-CPA e picloran. As auxinas 2,4-D e ANA são sintéticas e têm efeitos semelhantes às auxinas de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação.

Auxinas, citocininas e interações auxinas/citocininas são consideradas, geralmente, como sendo as mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento organizado em culturas de células, tecidos e órgãos de plantas, e essas duas classes de hormônios são geralmente empregados (GASPAR et al., 1996).

Para Schwengber et al. (1999) a utilização de reguladores de crescimento é imprescindível para obter sucesso na multiplicação “*in vitro*”. Para o estabelecimento de um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas “*in vitro*”, é necessário um adequado balanço entre auxinas e citocinas. Normalmente, as concentrações de auxinas são inferiores as das citocininas, mantendo o balanço auxina/citocinina menor que um (PIERIK, 1990). Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre a formação de raízes. Na situação oposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida (KRIKORIAN, 1995).

### 3. OBJETIVO

Avaliar a interação dos reguladores de crescimento cinetina e do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em 25 tratamentos, na formação e no desenvolvimento de calos de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, para determinação do melhor protocolo de desenvolvimento de calos, para posteriores estudos sobre a biossíntese de lignina.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Madeira do Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As sementes para a produção dos 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), Piracicaba. Essas sementes foram coletadas no Pomar de sementes por Mudas, Talhão A11, A21 do IPEF na cidade de Anhembi, Estado de São Paulo.

Foram testados 25 protocolos para formação e desenvolvimento de calos de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. Todos os protocolos formulados com Meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), diferindo nas concentrações dos reguladores do crescimento cinetina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

#### **4.1 - Preparação do meio de cultura para germinação, indução de calos (clone), e indução de calos nos tratamentos.**

Para o desenvolvimento de mudas de *E. grandis*, indução de calos (clone), e indução de calos nos tratamentos foi utilizado meio de cultura MS modificado, para a germinação de sementes de *E. grandis* e indução de calos (em anexo). Os componentes do meio de cultura foram pesados em balança de precisão (Figura 1A) e colocados em Becker de 1000mL contendo aproximadamente 200mL de água bidesionizada, o meio foi mantido em agitação contínua para a dissolução dos componentes e sua completa homogeneização. Depois de colocados todos os componentes da fórmula, foram completados o volume de água no Becker até atingir 1000mL(Figura 1B). A solução foi mantida em agitação por aproximadamente 10 minutos e seguiu-se, após esse período, a aferição do pH que ficou em 4.8, sendo corrigido para pH 5.7 considerado ideal pela maioria dos autores (Figura 1C). Após atingir pH 5.7 foi acrescentado ao meio a concentração de agar-agar sendo aquecido posteriormente até atingir fervura. Após a fervura o meio de cultura foi distribuído nos frascos, próprios para germinação e indução de calos (30 mL por recipiente). Posteriormente os recipientes contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave por 30 minutos. Para a indução de calos nos diferentes tratamentos, o meio de cultura foi preparado seguindo o mesmo protocolo de preparo dos meios de germinação e clone, diferindo apenas na adição dos reguladores de crescimento que foram inseridos ao meio, em concentrações de acordo com cada protocolo, após a fervura.

Após a esterilização, os frascos foram levados para a capela de fluxo laminar ficando em presença de radiação ultravioleta por 30 minutos. Após esse período se seguiu a inoculação de sementes (Figura 1D), indução de calos (clone), e indução de calos nos tratamentos.



**Figura 1:** Preparo do meio de cultura, segundo formulação MS (A) nutrientes sendo pesados em balança de precisão, (B) meio em agitação para homogeneização dos componentes; (C) aferição do pH e (D) meio de cultura em recipientes próprios para germinação e material utilizado para cultura de tecidos, em capela de fluxo laminar.

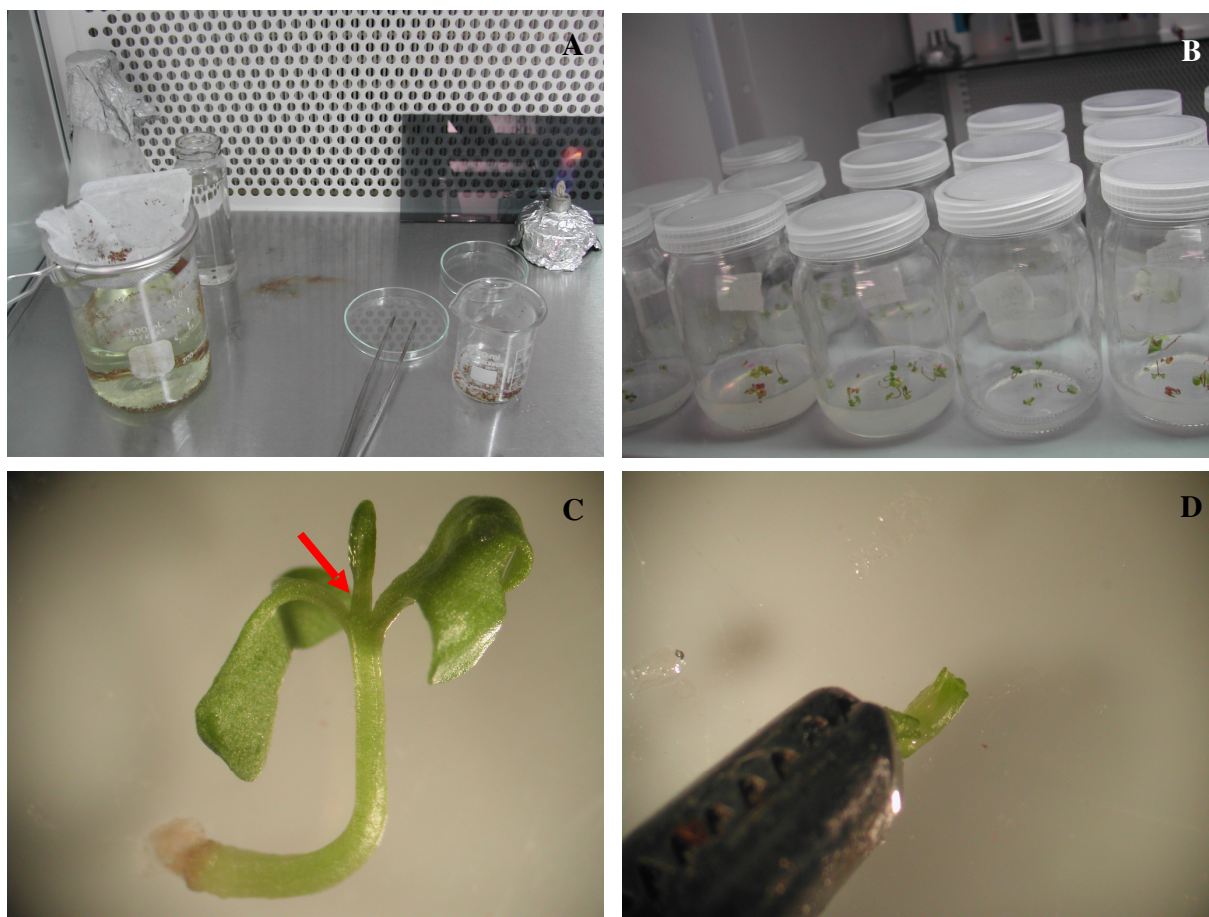
#### 4.2 - Desinfestação e inoculação das sementes

As sementes de *E. grandis* foram submetidas a seguinte condição de desinfestação (Figura 2): 10 minutos em presença de hipoclorito de sódio 2,5% contendo 0,2 mL/L de tween 20. Em seguida as sementes foram escorridas em peneira inox forradas com papel filtro e lavadas 5 vezes em água bidesionizada estéril. A cada lavagem as sementes foram novamente escorridas em peneira forrada com papel filtro, para garantir a total retirada do hipoclorito de sódio (Figura 2A). Após a última lavagem as sementes foram imersas em peróxido de hidrogênio 1% por 30 minutos. Decorrido esse período as sementes foram novamente escorridas e seguiram-se as práticas de inoculação de semente em meio de cultura para germinação.

Em capela de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas no meio de cultura formulado anteriormente; foram colocadas de cinco a dez sementes por recipiente (Figura 2B).

Após 21 dias da inoculação das sementes em fotoperíodo de 16 horas, as plântulas geradas no meio asséptico, que não apresentavam nenhum tipo de contaminação, foram usadas como fonte de explante (Figura 2C).

Com o auxílio de pinça e bisturi esterilizados, foram retiradas as gemas apicais de cada plântula germinada, essas gemas apicais foram usadas como explante para formação de calos (Figura 2D).



**Figura 2:** Desinfestação e germinação de sementes de *E. grandis*, e excisão de explantes. (A) sementes de *E. grandis* em presença de hipoclorito de sódio 2,5%; (B) plântulas inoculadas em recipientes contendo meio MS para germinação de sementes; (C) plântula com idade de 21 dias. A seta indica região meristemática usada como fonte de explante; e (D) explante retirado da plântula sadia, que será inoculado em meio MS modificado para indução de calo.

### 4.3 - Cultura e sub-cultura de calos (clones)

Em capela de fluxo laminar os explantes foram inoculados em meio MS para indução de calos. Em cada recipiente foram inoculados três explantes (Figura 3A). Os recipientes foram mantidos em ausência de luz à temperatura de 25°C. Para garantir a ausência de luz os recipientes foram enrolados em papel alumínio (Figura 3B). Após o período de três semanas o calo que apresentou menor nível de oxidação foi repicado em fragmentos menores de 0,3 cm cada. Esses fragmentos foram redistribuídos em dez recipientes, contendo meio de cultura renovado; um fragmento por recipiente, permanecendo

no escuro. A cada duas semanas os meios de cultura foram renovados, no total de duas subculturas (Figuras 3C e 3D, respectivamente).



**Figura 3:** Inoculação de explantes em meio de cultura modificado para formação de calos. (A) explantes inoculados em meio MS, (B) recipientes envoltos em papel alumínio para indução de calos em ausência de luz; (C e D) clones 15 e 45 dias respectivamente, após repicagem e inoculação em meio MS.

#### **4.4 - Cultura e sub-cultura de calos nos diferentes tratamentos**

Em capela de fluxo laminar os clones foram novamente repicados e distribuídos, três fragmentos de clones por recipiente (Figura 4A), nos meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de reguladores de crescimento, de acordo com cada tratamento (Tabela 1). Para efeito de testemunha foram usadas as concentrações de 0  $\mu$ M de cinetina e 0  $\mu$ M de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético.



**Tabela 1:** Valores das concentrações de 2,4-D e cinetina em cada tratamento

2,4D/CINETINA ( $\mu\text{M}$ )	0	0,5	1	2,5	5
<b>1</b>	<b>T1</b> 1/0	<b>T2</b> 1/0,5	<b>T3</b> 1/1	<b>T4</b> 1/2,5	<b>T5</b> 1/5
<b>2,5</b>	<b>T6</b> 2,5/0	<b>T7</b> 2,5/0,5	<b>T8</b> 2,5/1	<b>T9</b> 2,5/2,5	<b>T10</b> 2,5/5
<b>5</b>	<b>T11</b> 5/0	<b>T12</b> 5/0,5	<b>T13</b> 5/1	<b>T14</b> 5/2,5	<b>T15</b> 5/5
<b>10</b>	<b>T16</b> 10/0	<b>T17</b> 10/0,5	<b>T18</b> 10/1	<b>T19</b> 10/2,5	<b>T20</b> 10/5
<b>20</b>	<b>T21</b> 20/0	<b>T22</b> 20/0,5	<b>T23</b> 20/1	<b>T24</b> 20/2,5	<b>T25</b> 20/5

Os recipientes permaneceram em ausência de luz à temperatura de 25°C (Figura 4B). Após duas semanas os calos foram subculturados em meio de cultura renovado. Foram realizadas três subculturas, totalizando 60 dias (Figuras 4 C e 4D). Decorrido esse período os calos foram retirados do meio de cultura e passados para placas de petri para serem mensurados. Com auxílio de régua milimétrica, os calos foram medidos para avaliações comparativas de crescimento.

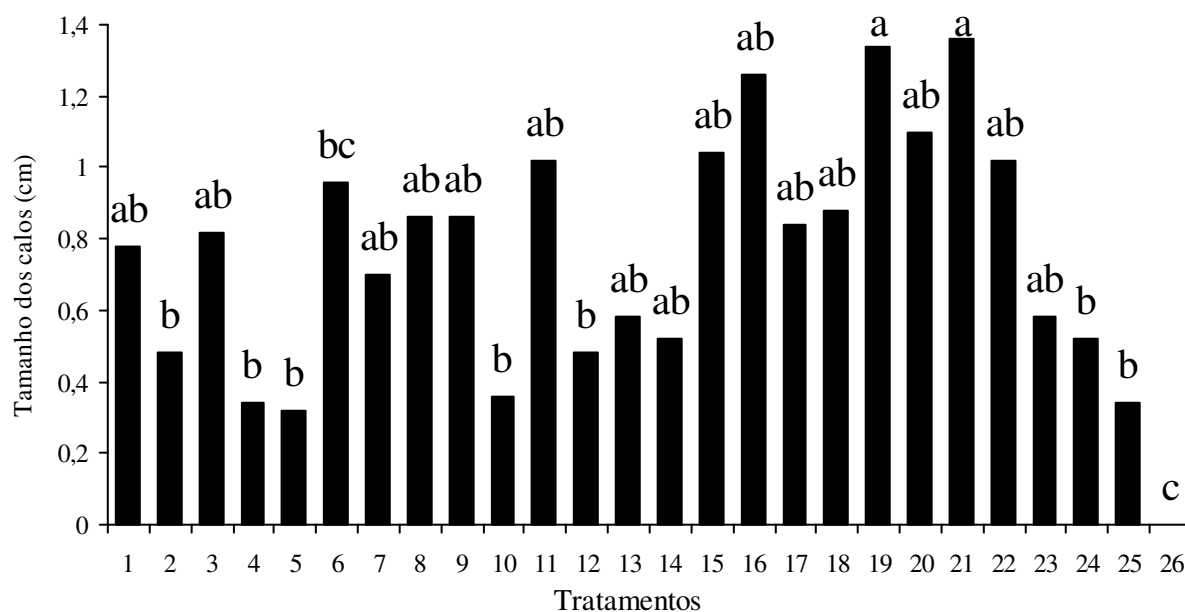


**Figura 4:** material clonal sendo inoculado em meio MS, modificado em 25 combinações dos reguladores de crescimento cinetina e ácido 2,4 - diclorofenoxiacético. (A) fragmentos clonais sendo distribuídos em recipientes próprios para indução de calos. (B) material mantido em ausência de luz; (C) e (D) clones 15 e 60 dias, respectivamente, após inoculação em meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 (cinco) repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 5 (cinco) frascos próprios para indução de calos em meio de cultura, contendo três segmentos clonais cada. Utilizou-se um esquema fatorial 5x5, sendo considerados como fatores, as concentrações do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (1; 2,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{M.L}^{-1}$ ) e cinetina (0; 0,5; 1; 2,5; 5  $\mu\text{M.L}^{-1}$ ), perfazendo-se 25 tratamentos. As avaliações foram feitas após 60 dias de cultivo, considerando-se as seguintes variáveis: número de calo desenvolvido por recipiente, crescimento dos calos (cm), usando-se como parâmetro a maior distância longitudinal, intensidade de oxidação e características dos calos (presença de raiz). Para a variável intensidade de oxidação, utilizou-se uma escala de 1 a 5, onde: 1= ausência de oxidação; 3= calos parcialmente oxidados e 5= calos totalmente oxidados (FLORES et al., 2000). Para a variável características dos calos fez-se correlação entre os tratamentos que apresentaram raiz e as respectivas concentrações de cinetina e ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Para análise dos dados fez-se o uso das equações de regressão utilizando o programa estatístico SAEG.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância para as diferentes concentrações na interação ácido 2,4 – diclorofenoxiacético e cinetina, mostrou diferenças significativas para algumas características analisadas. Os resultados demonstraram uma diferença significativa para a variável crescimento de calos (Figura 5), no aspecto de friabilidade e oxidação dos calos de *E. grandis* e no aspecto características dos calos (presença de raiz) tratados nas diferentes concentrações dos reguladores de crescimento cinetina e 2,4 – diclorofenoxiacético.

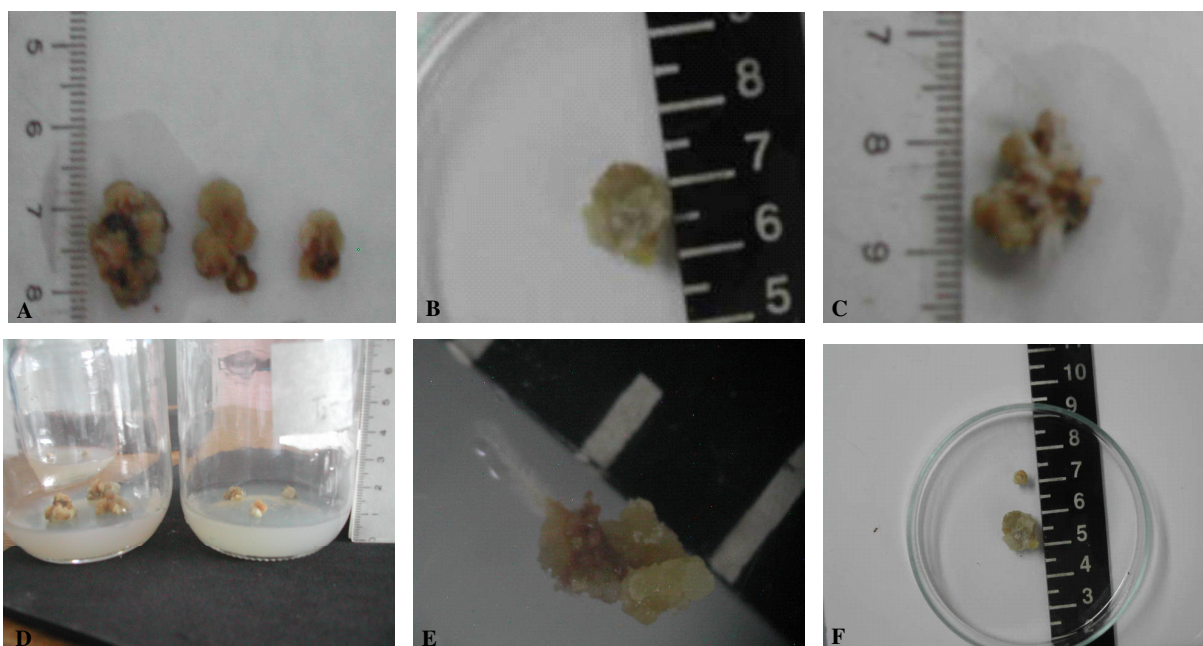


**Figura 5:** Médias dos tamanhos dos calos nos diferentes tratamentos. Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%.

Para o número de calo desenvolvido por recipiente, os resultados demonstraram que não houve diferença significativa a 5% de probabilidade, para as diferentes concentrações de reguladores de crescimento testadas nos protocolos. Todos os tratamentos desenvolveram, em média, três calos por recipiente. No tratamento em que a concentração de cinetina e ácido 2,4 – diclorofenoxiacético era  $0 \mu\text{M.L}^{-1}$ , não houve formação de calos. Indicando a necessidade de suplementação do meio de cultura com reguladores do crescimento, para o desenvolvimento de calo de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden.

Nos tratamentos em que as concentrações de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético foram superiores as concentrações de Cinetina houve maior crescimento de calos. O crescimento dos calos foi influenciado significativamente pela interação entre o explante, e as concentrações de auxina e citocinina combinadas. Os melhores resultados para a variável crescimento de calos, no que se refere aos comprimentos médios, foram obtidos com os protocolos, cujas concentrações eram:  $20 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de cinetina (T21) e  $10 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $2,5 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de cinetina (19); seguido das concentrações:  $10 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de cinetina (T16),  $10 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $5 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de cinetina (T20),  $5 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $5 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de cinetina (T15),  $5 \mu\text{M.L}^{-1} . \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0$

$\mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T11) e  $20 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T22). Esses tratamentos tiveram crescimento médio de calos, superior a 1,0 cm. Enquanto que os resultados menos expressivos para a variável crescimento de calos, foram observados nas concentrações:  $1 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T5),  $20 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T25),  $1 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $2,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T4),  $2,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T10),  $5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T2),  $1 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T12),  $20 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $2,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T24), (Figura 7).



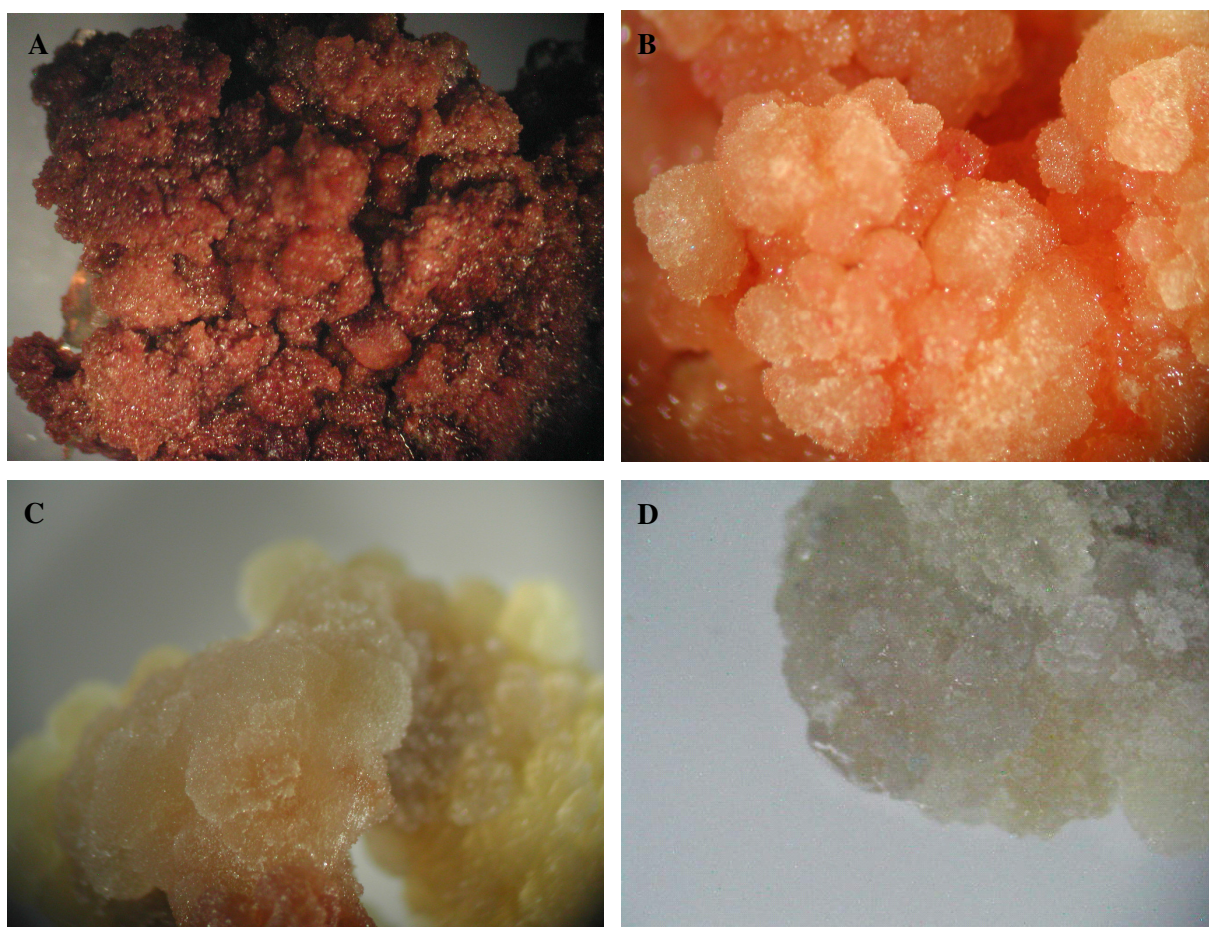
**Figura 6:** Análise da variável crescimento de calo nos diferentes tratamentos. (A) calos desenvolvidos nas concentrações dos tratamentos: T 21, T 19 e T 5, respectivamente. (B) calo desenvolvido em presença de T15, e (C) calos formados em presença de T16. (D) calos desenvolvidos em presença de T 21 e T 5; verificam-se ambos os tratamentos com três calos desenvolvidos. (E) calo formado em condição de T 24 e (F) comparação dos tamanhos de calos formados em condição de T 5 e T 15.

Os resultados do presente trabalho discordam, em parte, com GRATTAPAGLIA & MACHADO, (1990), e AMMIRATO, (1983), que dizem que a indução da calogênese ocorre em meio com altas concentrações de auxinas; uma vez que os resultados demonstraram que mesmo em concentrações pequenas ( $1 \mu\text{M.L}^{-1}$ ), a auxina foi capaz de induzir a formação de calos. Os resultados comprovaram que o ácido 2,4 – diclorofenoxiacético é um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990; AMMIRATO, 1983). Segundo Ponchia & Gardiman (1993), o uso associado de uma citocinina e uma auxina pode levar a bons resultados de multiplicação. Em cultura de tecidos de *Tabebuia caraíba*, a formação de calos foi favorecida quando explantes foliares foram encubados em meio MS suplementado com  $1,0 \text{ mg/L}$  de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético e  $0,2 \text{ mg/L}$  de cinetina (Lima & Caetano, 2002), indicando que há uma resposta favorável ao crescimento e desenvolvimentos de calo em concentrações superiores de auxina em relação às citocininas.

Para as variáveis friabilidade e oxidação, apesar de o material ter sido cultivado totalmente em ausência de luminosidade, níveis variados de oxidação foram observados nos

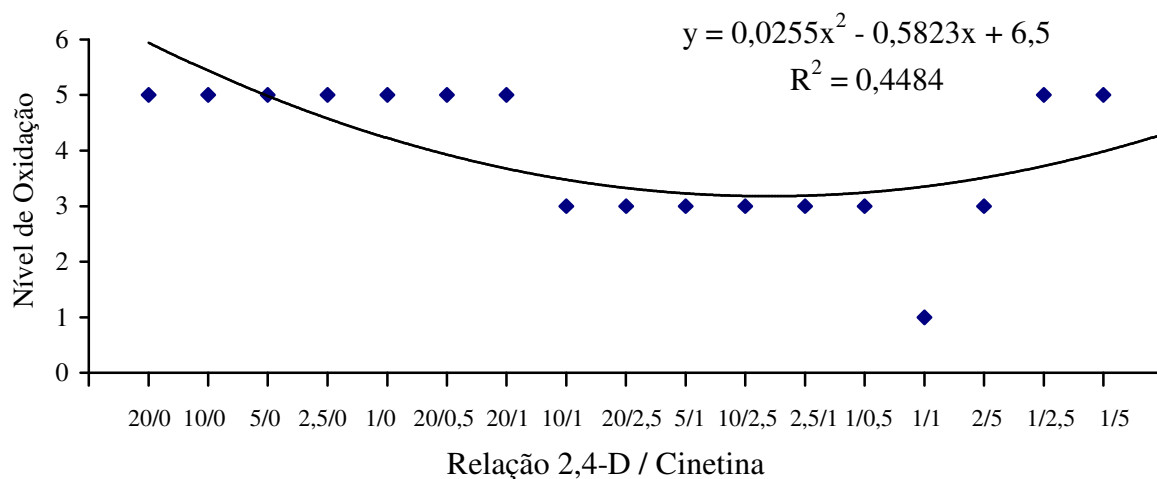
calos provenientes de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento. Foi observado que os calos formados nos protocolos em que as concentrações de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético e cinetina eram iguais, apresentaram-se friáveis, de fácil desagregação e coloração predominante branca. Concentrações altas de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético induziram formação de calos maiores, porém, apresentando-se parcialmente ou totalmente oxidados, com maior resistência a manipulação e menos friáveis, apesar de Ramachandra & Ravishankar, (2002) citarem que elevados níveis de auxina ácido 2,4 – diclorofenoxiacético no meio promovem desdiferenciação das células e diminui a formação de metabólitos secundários em algumas culturas. Giri, et al. (1993), no entanto, afirmam que a presença de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético no meio de cultura está associado a uma maior oxidação do tecido.

Nos protocolos testados com concentração de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético superior à concentração de cinetina foi observado maior número de calos totalmente oxidados, de coloração predominantemente escura e de difícil desagregação. Concentrações mais elevadas de cinetina em relação ao ácido 2,4 – diclorofenoxiacético também induziram formação de calos oxidados e de difícil desagregação. Neste experimento, os calos que apresentaram resultados menos favoráveis para estas características, foram os calos cujos meios de cultura foram suplementados com concentrações altas de cinetina em relação ao ácido 2,4 – diclorofenoxiacético e concentrações altas de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético em relação a cinetina (Figura 7 e 8).



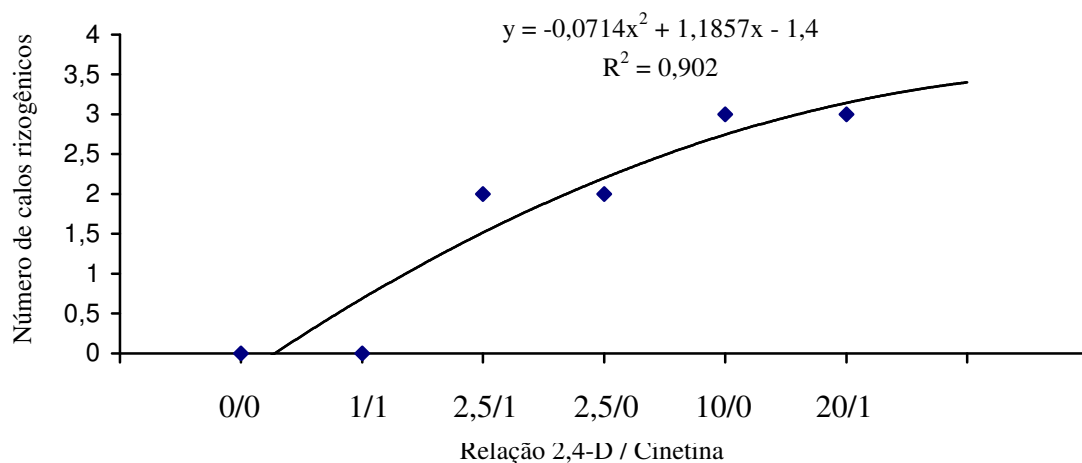
**Figura 7:** Análise da variável oxidação e friabilidade . (I) calo formado em presença de T 5. A coloração mais escura indica maior oxidação e menor friabilidade. (J) calo formado em presença de T4. (L) calo formado em presença de T19. (M) calo

formado em presença de T15. Nota-se que, entre os tratamentos, este foi o que apresentou melhores resultados, com calos mais claros e mais friáveis.



**Figura 8:** Análise do nível de oxidação dos calos de *E. grandis*. Nível de oxidação variando de 1 a 5, (1) calo não oxidado, (3) calo parcialmente oxidado e (5) calo totalmente oxidado.

Pelos resultados analisados foi possível avaliar, ainda, que nos meios de cultura suplementados com elevadas concentrações de 2,4-D, uma percentagem de calos rizogênicos foi observada (Figura 9 e 10). Os Tratamentos T6 ( $2,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina), T8 ( $2,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina), T 16 ( $10 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina) e T 23 ( $20 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina) apresentaram raízes durante a calogênese. Este resultado está de acordo com KRIKORIAN (1995), que verificou em suas pesquisas que, quando o nível de citocinina em relação ao de auxina é alto, ocorre à formação de brotos. Na situação oposta, pode ocorrer a formação de raízes e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida.



**Figura 9:** Análise da característica presença de raiz.



**Figura 10:** Análise da variável da característica dos calos (formação de raízes). (N) calo formado em condição de T6; (O) calo formado em condição de T8; e (P) calo formado em condição de T 16. As setas indicam a presença de raiz formada em cada tratamento.

## 6. CONCLUSÃO

- Os protocolos testados com concentrações de  $20 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (T21) e  $10 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $2,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina (19) apresentaram maior crescimento médio (cm) de calos para a espécie analisada.

- Para os protocolos testados com relação ácido 2,4 – diclorofenoxiacético superior à concentração de cinetina, os calos desenvolvidos apresentaram aumento significativo de oxidação. Tratamentos suplementados com concentração de cinetina superior ao ácido 2,4 – diclorofenoxiacético também desenvolveram calos mais oxidados.

- Os protocolos suplementados com elevadas concentrações de cinetina, apresentou menor desenvolvimento dos calos formados.

- Os protocolos testados com concentrações iguais de cinetina e ácido 2,4 – diclorofenoxiacético apresentaram calos menos desenvolvidos que os protocolos testados com elevadas concentrações de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético; porém, os calos desenvolvidos nestes protocolos apresentaram-se mais friáveis e menos oxidados quando comparado aos calos desenvolvidos nos outros protocolos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de ter sido observado maior crescimento de calos em concentrações superiores de ácido 2,4 – diclorofenoxiacético em relação à cinetina, o protocolo mais indicado para formação e desenvolvimento de calos de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden é o protocolo desenvolvido com  $2,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $2,5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina, e  $5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D +  $5 \mu\text{M.L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cinetina), cujas as concentrações para ambos reguladores de crescimento são iguais.

Para a indução de calo desta espécie busca-se protocolos em que a concentração de reguladores de crescimento seja favorável não somente ao desenvolvimento, mas também à menor oxidação.



## BIBLIOGRAFIA

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, Lisboa, 11(2): 217 - 225, 2003.

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

ALTMAN, A; GOREN, R. **Horticultural and physiological aspects of Citrus bud culture**. Acta Horticulturae, n.78, p.51-60, 1977.

ANDRADE, W.F. **Atuação do pulse na orgânogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro***. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais)- Universidade de São Paulo, Piracicaba.

AMMIRATO, P. V. **Embryogenesis**. In: Evans, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. eds. Handbook of Plant Cell Culture. MacMillan Publishing Co.. New York, 1983, 970p.

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.

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, 1998. v. 1, p. 87-132.

CALDAS, L.S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. e CALDAS, L. S. ed. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTB/EMBRAPA-CNPQ, 1990. 433p

CARBOCLORO, S. A. Indústrias Químicas. **Hipoclorito de sódio**. Disponível em: <http://www.carbocloro.com.br/produtos/default> Acesso em 15 junho 2007.

CASTRO, P.R.C.; SENA, J.O.A.; KLUGE, R.A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. cap. 06, p. 79-104.

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.

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

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).** *Cerne*, Lavras, v. 10, n. 01, 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.

DANTAS, A. C. M.; PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. **Descontaminação e efeito do fungicida benomil sobre a multiplicação do porta-enxerto de macieira M. 9.** *Agropecuária Clima Temperado, Pelotas*, v. 3, n. 2, p. 245-252, 2000.

FENGEL, D. E WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reaction**, Berlin 1 ed. Walter de Gruyter, 1989, p. 66.

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 interplantio.** *Ciência Florestal.*, Santa Maria, v.3, n.1, p. 185-201, 1993.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H.; MANTOVANI, N. **Regeneração *in vitro* de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.).** *Revista Brasileira de Agrociência*. v.4, n.3, p. 201-205, 1998.

FRANCO, E. T. H.; GAVIOLI, L. B.; FERREIRA, A. G. ***In vitro* Regeneration of *Didymopanax morototoni*.** *Braz. J. Biol.*, 66(2A): 455-462, 2006

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, 1995. v.1, cap.25, p.494-506.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. **Plant hormones and plant growth regulator in plant tissue culture.** *In Vitro Cellular Development Biology – Plant*, v. 32, p. 272-289, 1996.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant Propagation by Tissue Culture.** Eversley: Exegetics, 1984. 709p.

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.

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, 1998. v.1, p. 183-260.

GUIMARÃES, C.S.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A.C.M. **Transformação genética em espécies florestais**. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2001

GUERRA, M. P. & NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de biotecnologia**; edição da steinmacher.,2006, p. 1-48.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.A. de; GONÇALVES, A.N. **Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Piracicaba: IPEF (Circular técnica, 194), 2002.

HILLIS, W.E.; BROWN, A.G. **Eucalyptus for wood production**. Melbourne: CSIRO, 1938. 434 p.

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.

KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: **Plant Hormones**, 2<sup>a</sup> Ed., Davies P. J. (Ed)., **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 774 – 796. 1995.

LACORTE, C. **Suscetibilidade de *Arachis hypogea* L. (Amendoim) à transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens***. 1991. 96p. Dissertação (mestrado em Genética) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 83-88, 1998

LONG, R. D.; CURTIN, T. F.; CASSELLS, A. C. An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal cultures. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 83-91, 1988.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, n.36 e 37, p.5-10, 2000.

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

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.

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

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. **Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, jul. 2003.

PIERIK, R.L.M. 1990. In vitro Culture of Higher Plants. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 348 p.

PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotecnology in agriculture and forestry**: 17- High-Tech and micropropagation I. Berlin: Springer Verlag, 1991. p. 168-189.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. **Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polineurom***. Ciência Florestal, Santa Maria, v.13, n.1, p.115-122, jun. 2003. (Nota Técnica).

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.

SCHWENGBER, J. E.; RODRIGUES, A. C.; RUFATO, L. et al. **Efeito de diferentes concentrações de BAP e TDZ na multiplicação de microestacas do porta-enxerto de macieira cv. Mark**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 200-203. 1999.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C.; VITTI, R. M.; SAMPAIO, R. G.; CAMPOS, R. V.; SILVA, J. A. G. Efeito de antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de explantes de macieira cv. Galaxy. In: IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Atibaia/ SP, 2003. **Brazilian**

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2005. **Silviculture-se**. Disponível em: <http://www.sbs.org.br/>. Acesso em: 25 de maio 2007.

STAFFORD, A.; WARREN, G. **Plant cell and tissue culture**. Melksham: Red Wood Press, 1991. 251p.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P.A.S. Fitormônios. **Universa**, v.8, n.1, p.101,132, 2000.

TEIXEIRA, J. B. Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**,2005. Disponível em: [www.Embrapa.com.br](http://www.Embrapa.com.br) . Acesso em 16 de julho de2007

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: Embrapa – Serviço de Produção de Informação/Embrapa – CNPH. 1998. v. 1, p. 183 – 260

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, março 2007

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. **Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T.obovatum* (Sterculiaceae)**. Acta Amazônica, VOL. 34(4): 507 – 511, 2004.

## ANEXOS

### 1- Formulação do meio de cultura MS para desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden.

(continua)

Substância	Quantidade
<b>Macronutrientes</b>	
(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	1.650 mg/L
KNO <sub>3</sub>	1.900 mg/L
CaCl <sub>2</sub>	440 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/L
MgSO <sub>4</sub>	370 mg/L
<b>Micronutrientes</b>	
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,8 mg/L
Na <sub>2</sub> EDTA	33.6 mg/L
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,3 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,6 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/L
KI	0,83 mg/L
NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/L
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L
<b>Vitaminas</b>	
MYO-INOSITOL	100 mg/L
ÁCIDO NICOTÍNICO	5 mg/L
PIRIDOXINA. HCL	5 mg/L
TIAMINA. HCL	10 mg/L
BIOTINA	0,1 mg/L
PANTOTENATO DE CÁLCIO VITAMINA H GLICINA	0,1 mg/L
	2,0 mg/L
<b>Hormônios</b>	
ÁCIDO NAFTOÁCETICO (AIA)	5,71 µM
CINETINA	0,05 µM
6-BENZILAMINOPURINA (BAP)	0,4884 µM

ÁCIDO NAFTOACÉTICO 0,2148 µM  
(ANA)

**Outros**

SACAROSE 20 g/L

AGAR-AGAR 7,0 g/L

BENLATE 0,1 g/L

**2- Formulação do meio de cultura MS para formação e desenvolvimento de calos de Eucalyptus grandis Hill ex Maiden**

(continua)

<b>Substância</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Macronutrientes</b>	
(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	1.650 mg/L
KNO <sub>3</sub>	1.900 mg/L
CaCl <sub>2</sub>	440 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/L
MgSO <sub>4</sub>	370 mg/L
<b>Micronutrientes</b>	
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,8 mg/L
Na <sub>2</sub> EDTA	33,6 mg/L
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,3 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,6 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/L
KI	0,83 mg/L
NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/L
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L
<b>Vitaminas</b>	
MYO-INOSITOL	100 mg/L
ÁCIDO NICOTÍNICO	5 mg/L
PIRIDOXINA. HCL	5 mg/L
TIAMINA. HCL	10 mg/L
BIOTINA	0,1 mg/L
PANTOTENATO DE	0,1 mg/L
2 CÁLCIO VITAMINA H	
GLICINA	2,0 mg/L
<b>Hormônios</b>	
ÁCIDO NAFTOÁCETICO	5,71 µM

(AIA)

**Outros**

SACAROSE	20 g/L
AGAR-AGAR	7,0 g/L
BENLATE	0,1 g/L
PVP	0,8 g/L