

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE FLORESTAS**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E FLORESTAIS**

**DISSERTAÇÃO**

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

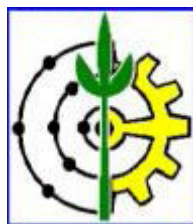
**DESIANE AMARAL DE DEUS**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



**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 Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais, área de concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 26 de fevereiro de 2010

  
Heber dos Santos Abreu. Prof. Dr. UFRRJ

(Orientador)

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

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

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

Aos meus sobrinhos Kathleleen e Felipe pela alegria e docilidade.

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

As 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 que, muito além de orientação nesse trabalho, me deu ensinamentos de vida.

À querida amiga Katlyn, 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.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Madeira, Jairo, Cléssio, Camila, Letícia, 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, e 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 minhas dúvidas.

Ao Fernando pela ajuda com a formatação, Camila, Gabriela e Anaquim, 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.** 95p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Departamento de Produtos Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2010.

A madeira é quinto maior produto 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*, *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 caules e raízes de plantas cultivadas *in vitro*. O processo de lignificação nas plantas foi acompanhado através de caracterização anatômica. O segundo capítulo, referente às três espécies de *Eucalyptus*, 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 e espectrometria/microscopia no infravermelho FTIR. 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/siringólica, e através da microscopia e espectrometria de infravermelho foi possível verificar que a lignificação em planta de *L. lactescens* cultivadas *in vitro* ocorre 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/siringólica.

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



## ABSTRACT

**DEUS, Desiane Amaral. Application of biotechnology the study of lignifications in woody species.** Seropédica: UFRRJ, 2010, 95p. (Dissertation, Master's degree in Environmental and Forest Sciences).

Wood is the fifth largest consumed product in the world market. It has expected an increasing of consumption around 20% for the next decade. Its structural constitution is formed by made cellulose, hemicellulose and lignin. Generally woody plants have high lignin content, reaching values above 35% if compared to its dry weight. This research aimed to explore the process of lignification in callus and plant cells of *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. urograndis* and seeding of *Lophanthera lactescens* Ducke cultivated in vitro. This dissertation is divided into two chapters. The first is related to *L. lactescens* and deals with the determination of a protocol for callus formation, evaluation of lignin in callus produced with a source of explants from vegetative organs, evaluation of lignin from cultivated plants in vitro and observation of the lignification process of the stem and the of root supported by anatomical characterization. The second one is on callus formation from three species of *Eucalyptus* toward the formulation of protocol for callus formation, and evaluation of lignin in callus produced with different sources of explants. Histochemical tests, microscopy of brightfield, and fluorescence, spectroscopy/microscopy in the infrared FTIR were carried out. The best protocol for induction of callus formation for *L. lactescens* was MS medium + 9.06 mM 2,4-D. Calli from different explant sources were evaluated by infrared spectroscopy showed occurrence of guaiacyl/syringyl lignin and also enabled to verify that the lignification in plant of *L. lactescens* occurs since the youngest tissues of plants and that growth in limited space showed production of the gelatinous fibers. The best callus from *Eucalyptus* was the MS + 10 mM of 2,4-D + 2.5 mM kinetin + 20 gL<sup>-1</sup> sucrose. The specie of *E. urophylla* presented largest and more friable callus. Calli from different sources of explants on infrared analysis showed occurrence of guaiacyl/syringyl lignin.

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

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Lignina.....	3
2.2 Cultura de Tecidos Vegetais.....	4
2.3 <i>Eucalyptus</i> spp.....	6
2.4 <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke.....	7
CAPÍTULO I .....	
LIGNIFICAÇÃO EM CALOS E PLANTAS DE .....	
<i>Lophanthera lactescens</i> Ducke .....	
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
2.2 Desinfestação e Germinação de Sementes de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke .....	13
2.3 Indução de Calogênese .....	13
2.4 Estabelecimento de Protocolo para Indução de Calogênese.....	13
2.5 Estudo de Lignificação em Calos de <i>L. lactescens</i> Produzidos <i>in vitro</i> .....	14
2.6 Análise de Lignina de Caule e Raiz de Plantas de <i>L. lactescens</i> cultivadas <i>in vitro</i> submetidos a diferentes processos de extração.....	144
2.7 Caracterização Anatômica e Avaliação da Lignificação de Raiz e Caule de <i>Lophanthera lactescens</i> Cultivadas <i>in vitro</i> .....	14
3 RESULTADOS .....	15
3.1 Estabelecimento de Protocolo para Indução de Calogênese .....	155
3.2 Estudo de Lignificação em Calos de <i>L. lactescens</i> .....	18
3.3 Análise de Lignina de Caule e Raiz 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 de 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 .....	23
4 CONCLUSÕES .....	31
CAPÍTULO II .....	
LIGNINA EM CALOS DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Eucaliptus spp</i> UTILIZANDO CULTURA DE TECIDO.....	
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1 INTRODUÇÃO .....	35
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
2.1 Indução de Calogênese em Diferentes Teores de Sacarose.....	36
2.2 Lignificação de Calos de <i>Eucalyptus grandis</i> , <i>E. urophylla</i> e <i>E. urograndis</i> Produzidos <i>in vitro</i> .....	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1 Indução de Calogênese de <i>Eucalyptus grandis</i> em Diferentes Teores de Sacarose..	37
3.2 Lignificação de Calos de <i>Eucalyptus grandis</i> , <i>E. urophylla</i> e <i>E. urograndis</i> Produzidos <i>in vitro</i> .....	38
4 CONCLUSÕES .....	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	41
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	42
7. ANEXOS .....	51
Anexo 1: Espectros no Infravermelho de calos pré-extraídos em etanol (BRUCE & WEST, 1989) de explante apical, foliar, caulinar e radicular de plantas de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke cultivadas <i>in vitro</i> . Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 (cm <sup>-1</sup> ) / distância de corrida 4000 – 400 (cm <sup>-1</sup> ) .....	52
Anexo 2: Espectros no Infravermelho de caule e raiz de plantas de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke cultivadas <i>in vitro</i> , pré-extraídas em etanol (BRUCE & WEST, 1989) e totalmente livre de extratos solúveis (BROWNING, 1967). .....	54
Anexo 3 : Espectros obtidos por Microscopia de Infravermelho de secções no plano transversal de plantas de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke cultivadas <i>in vitro</i> .....	56
Anexo 4: Espectros no Infravermelho de calos pré extraídos em etanol (BRUCE & WEST, 1989) de explantes caulinar, foliar, apical e radicular, de plantas de <i>Eucalyptus urophylla</i> , <i>Eucalyptus urograndis</i> e <i>Eucalyptus grandis</i> cultivadas <i>in vitro</i> . Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 (cm <sup>-1</sup> ) / distância de corrida 4000 – 400 (cm <sup>-1</sup> ). .....	65

Figura 1: 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 2: Calos de *Lophanthera lactescens*. A, B e C - calos de explante apical induzido com MS +18,12  $\mu\text{M}$  2,4-D (A), MS + 9, 06  $\mu\text{M}$  2,4-D (B) e MS + 4, 53  $\mu\text{M}$  2,4-D (C), respectivamente; D a G - calo de explante apical, foliar, caulinar e radicular, respectivamente, induzido com MS + 9, 06  $\mu\text{M}$  2,4-D. H - células de calo de explante foliar vistas em microscópio ótico. .... 17

Figura 3: 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 ótico; F e H- respectivas células submetidas a microscopia de fluorescência com reagente auramina O. .... 19

Figura 4: Raiz adventícia de *Lophanthera lactensces* 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; Em= Endoderme; Pe= Periciclo. Barras= C= 200 $\mu\text{m}$ . B, D, F, G, I= 100  $\mu\text{m}$ . E, H= 50  $\mu\text{m}$ ..... 22

Figura 5: *Lophanthera lactensces* 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 dibraqueado. 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; Co= Colênquima; Pa= Parênquima; Fl= Floema; Xi= Xilema; Fp= Fibra parenquimática; Me= Medula; Fe= Felogênio; Esp= Estrato subepidérmico. Barras= B= 200 $\mu\text{m}$ ; H, G, E, D= 100 $\mu\text{m}$ ; C, J, I, F= 50 $\mu\text{m}$ ..... 24

Figura 6: 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 da 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 7: *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 8: 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 9: Efeito de diferentes concentrações de sacarose na formação de calos friáveis de *E. grandis*. .... 38

Figura 10: 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

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Pesquisas realizadas com espécies florestais de interesse econômico têm sido auxiliadas por técnicas biotecnológicas, como por exemplo, cultura de tecidos. Técnicas de cultura de tecidos possibilitam uma multiplicação mais rápida quando comparadas a outras técnicas de propagação assexuada e são consideradas pré-requisito para futuros estudos de engenharia genética (LACORTE, 1991); constituindo uma ferramenta bastante útil para a obtenção de culturas de células *in vitro* e reprodução de explantes com as características desejadas (ZENCK, 1998). No estudo dos componentes da madeira, a cultura de tecidos permite avaliar os efeitos fisiológicos dos nutrientes, dos hormônios vegetais e 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 da madeira contra microorganismos (HIGUSHI, 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, 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., 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, *at 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 *at 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 plantas 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*.



## 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, recentemente, 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 (GUIMARÃES *et al.*, 2003; BROWNING, 1967). 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 das 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, seu transporte e a polimerização na parede celular. Em um primeiro estágio (oxidação

horizontal) é altamente mediado por enzimas intrínsecas à formação dos precursores 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 oxidadoras 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 biossíntese da lignina envolve uma série de enzimas desde a 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) até a cinamil álcool desidrogenase (CAD).

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, 2004). 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).

DESCREVER OS TIPOS DE LIGNINAS!!!!

## 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, pois, além da resistência a pragas e outras condições de estresse, alta produtividade e elevado rendimento de substâncias ativas de interesse podem ser obtidos (ZENCK, 1998), uma vez que a cultura de tecidos pode ser usada para produção de metabólitos de interesse. 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 (BARRUETO, 1999; AKALEZI *et al.*, 1999; DI COSMOS & MISAWA, 1995; FOWLER, 1988).

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 necessários ao desenvolvimento das células, 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). 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. *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).

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 fitoreguladores auxina, ou com relação auxina/citocinina (RIOS, 2004).

A resposta à adição de fitoreguladores 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).

Auxinas são outras classes de fitorreguladores empregadas em cultura de tecidos vegetais, sendo sintetizadas nos ápices caulinares, ramos e raízes e transportadas para outras regiões da planta. São 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 reguladores de crescimento 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), é o 2,4-D é um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos (AMMIRATO, 1983).

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 de 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 em calos. 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 *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-o 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).

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). A grande variação genotípica em resposta aos meios de cultura constitui importante fator na propagação *in vitro* das diversas espécies deste gênero, (ALVES *et al.*, 2004). Isso indica a necessidade de maiores estudos sobre cultura de tecidos do gênero.

#### **2.4 *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, S. L. 2007).

O gênero *Lophanthera* possui cinco espécies, quatro delas encontradas na Amazônia (ANDERSON, 1983). *Lophanthera lactescens* Ducke 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.*, (2007) 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 susceptibilidade 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, 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).

## **CAPÍTULO I**

### **LIGNIFICAÇÃO EM CALOS E PLANTAS DE *Lophanthera lactescens* Ducke**

## RESUMO

Plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke foram cultivadas *in vitro* visando a determinação de protocolo de indução de calogênese, avaliação de ligninas produzidas em calos com fonte de explantes de órgão vegetativos, e avaliação do padrão de lignificação nas plantas cultivadas *in vitro*. Melhor indução de calogênese foi observada em protocolo MS + 9,06  $\mu$ M 2,4-D. A lignificação foi observada através de espectrometria no infravermelho, fluorescência, e teste de Wiesner em calos produzidas nas diferentes fontes de explante. Foi possível verificar, por teste histoquímico, acentuado desenvolvimento secundário e lignificação em plantas cultivadas *in vitro*. Presença de ligninas tipo siringílica/guaicólica e fibras gelatinosas foram observadas e confirmadas por microscopia de infravermelho *in loco*.

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



## ABSTRACT

Plants of *Lophanthera lactescens* Ducke were cultivated in vitro to determine the protocol of callus formation, evaluation of lignin produced in the callus from explant of vegetative organ and evaluation of the pattern of lignification in this plants. Best callus formation was observed in the MS protocol + 9.06 mM 2,4-D. The lignification was observed by infrared spectroscopy, fluorescence, and test of Wiesner in calli grown on different sources of explant. It was possible to verify, by histochemical test, enhanced lignifications and secondary growth in the plants cultivated in vitro. Presence of lignin syringyl/guaicyl type and gelatinous fibers were observed and confirmed in situ by infrared microscopy.

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.*(2007) 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°C + /- 2 °C, umidade relativa do ar 62%. A espécie foi identificada e registrada sob o n° (RBR 34066), no Herbário do Departamento de Botânica, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

### 2.2 Desinfestação e Germinação 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 bidesionizada estéril e imersas em peróxido de hidrogênio 1% por 30 minutos, sendo posteriormente inoculadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo 30 g.L<sup>-1</sup> 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 °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, cinco a sete, no total de 30 recipientes. Os recipientes foram mantidos em sala de germinação com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 °C +/- 1 °C, e umidade relativa do ar 62% por um período de 60 dias para a indução de calogênese e 9 a 20 meses para realização da caracterização anatômica e estudo de lignificação.

### 2.3 Indução de Calogênese

A indução da calogênese foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foi realizado teste de indução de calogênese em diferentes concentrações de reguladores de crescimento para definir o melhor protocolo de indução para a espécie. Na segunda etapa, após definição do melhor protocolo, foi induzida calogênese usando como fonte de explantes, órgãos vegetativos (raiz, caule, folha, ápice caulinar), para avaliação de lignificação nos calos formados. Em ambas as etapas, foram utilizadas como fonte de explantes, plantas micropropagadas com 2 meses de idade, oriundas de sementes germinadas *in vitro*.

### 2.4 Estabelecimento de Protocolo para Indução de Calogênese

Para o estabelecimento de um protocolo eficiente de indução de calogênese nessa espécie, ápices caulinares de plântulas com idade de 20 dias, cultivadas nas condições descritas anteriormente, foram inoculados em meio MS, contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 18,12 µM 2,4-D, 6 g de Agar (Vetec®), pH ajustado em 5,7 e esterilização em autoclave a 121 °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 cm<sup>2</sup>, foram transferidos para novos meios de cultura MS, modificados nas concentrações de 2,4-D: (P<sub>1</sub>: MS + 4,53 µM 2,4-D; P<sub>2</sub>: MS + 9,06 µM 2,4-D; P<sub>3</sub>: MS + 18,12 µM 2,4-D; P<sub>4</sub>: MS + 27,18 µM 2,4-D e P<sub>5</sub>: MS + 36,24 µM 2,4-D) e acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Os fragmentos foram inoculados nos meios de

cultura em placas de petri, quatro por recipiente, cinco recipientes por tratamento; totalizando 20 por tratamento. Permaneceram em BOD, em ausência de luz, temperatura de 25° C +/- 1° C e UR de +/- 62% e subculturas a cada duas semanas. Ao final de 120 dias após a primeira subcultura, os calos foram avaliados segundo metodologia de Flores *et al.* (2005) para determinação do protocolo mais eficiente de indução de calogênese para a espécie estudada.

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

Segmentos de raiz (0,5 cm), ápice (0,3 cm) folha (0,5 cm<sup>2</sup>) e caule (0,5 cm) de plantas micropropagadas 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, umidade do ar 62%, subculturas a cada duas semanas), cinco explantes por recipiente, cinco recipientes por tipo de explante. 120 dias após indução, os calos foram avaliados por espectrometria de infravermelho, teste de Wiesner (LIN & DENCE, 1992) e fluorescência.

Para a análise por espectrometria de infravermelho os calos passaram por duas metodologias: a) pré-extração segundo metodologia de Bruce & West (1989) e b) sem pré-extração. Em ambas as metodologias, os calos 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 100,0 mg de KBr (MORAIS *et al.* 2005), prensado em forma de pastilha e introduzida 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 o teste com 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).

## **2.6 Análise de Lignina de Caule e Raiz 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). Em seguida, as amostras foram novamente secas ao ar e posteriormente em estufa a 60 °C até peso constante.

## **2.7 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 1° ao 8° 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, têm cor branca, muito delgadas e em alguns trechos acima da região apical, ocorrem 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. O estudo foi realizado em amostras a partir dos nove meses de idade. Nesse estágio de desenvolvimento não é mais 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  $\mu\text{m}$  no micrótomo rotativo e corados com azul de toluidina 0,05% (O' BRIEN *et al.* 1964).

Testes histoquímicos foram realizados a mão livre com material fresco para detectar: amido, pelo uso de lugol (BERLYN & MIKSCH, 1976); lignina, pelo teste de Wiesner (LIN & DENCE, 1992); teste de Maüler para identificação de 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  $\text{NH}_4\text{OH}$  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); substâncias fenólicas, com uso de dicromato de potássio (GABE, 1968)

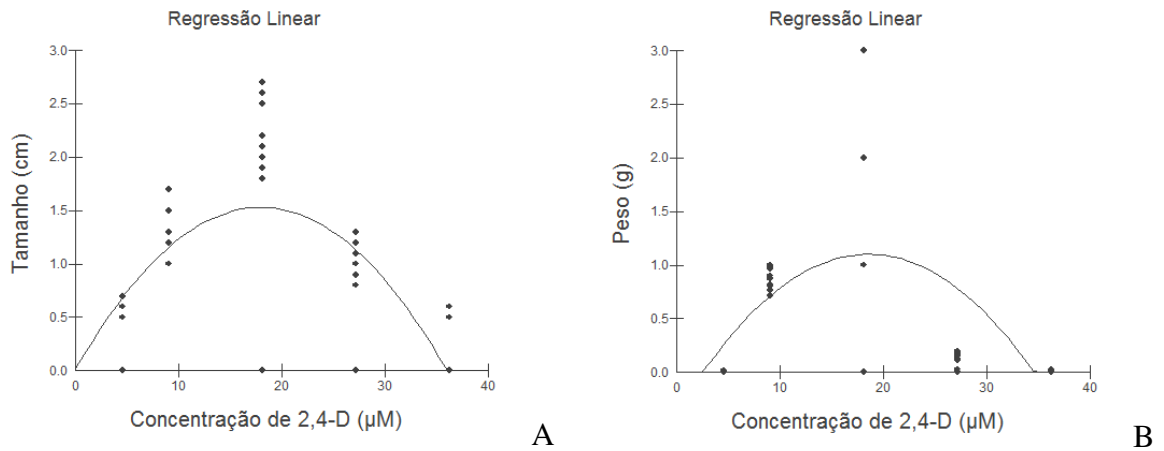
Para a microscopia de infravermelho os cortes foram colocados em recipientes de vidro (2 cm X 4 cm), congelados em nitrogênio líquido por 30 segundos e liofilizados por 12 horas entre lâminas de vidro. Após a liofilização, os cortes foram colocados sobre uma lâmina de KBr e os espectros registrado no modo reflectância no espectrômetro VARIAN 610-IRFT-IR acoplado a um microscópio.

### 3 RESULTADOS

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

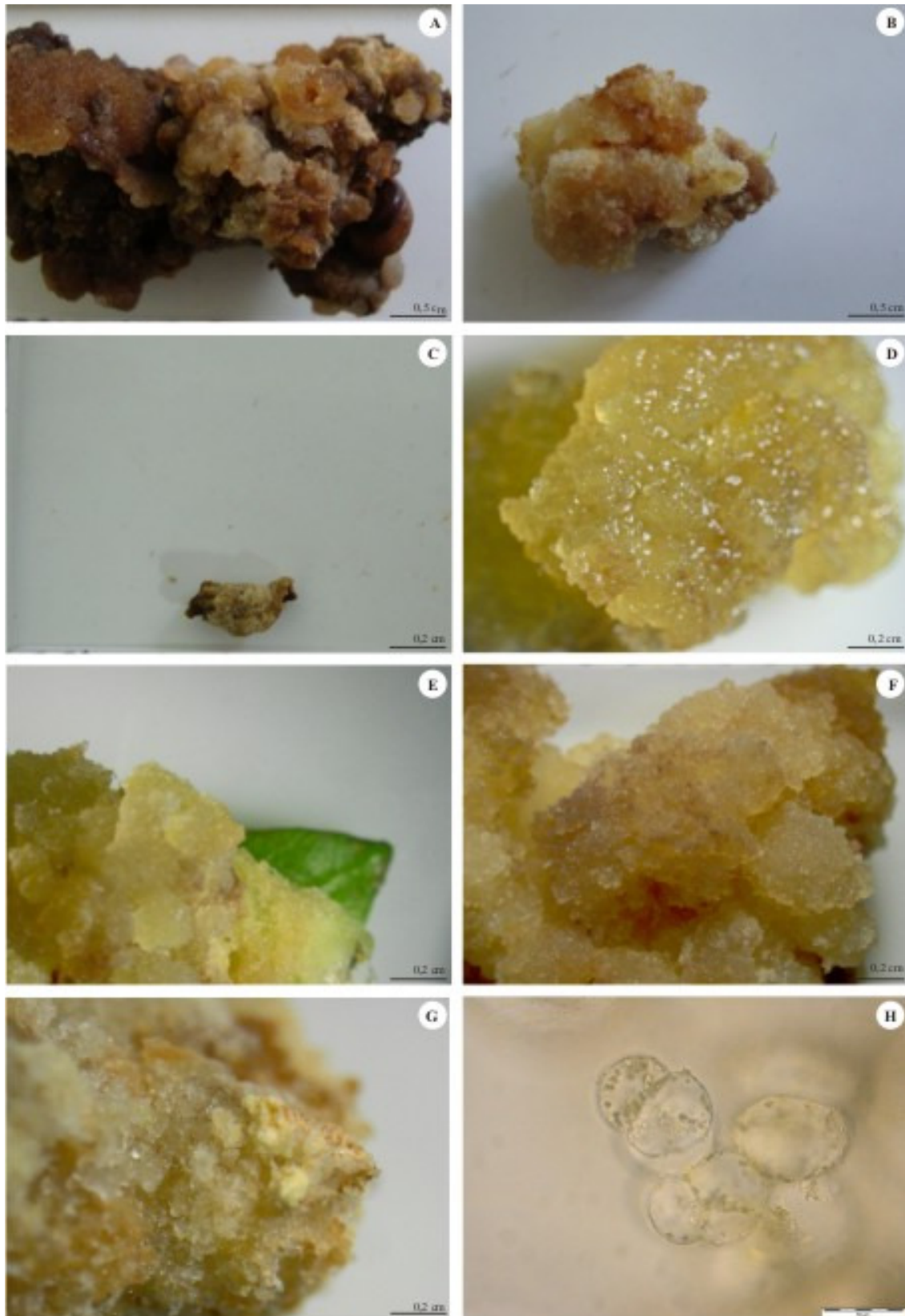
O protocolo que apresentou melhor resultado para calejamento de *L. lactescens* foi o protocolo 2 (9,06  $\mu\text{M}$  de 2,4-D), com calos formados mais friáveis e sem oxidação. O protocolo 3 (18, 12  $\mu\text{M}$  2,4-D), apresentou calos de maior tamanho e com maior peso fresco (Figura 1 A e B), porém, com este protocolo, os calos apresentaram-se menos friáveis, de coloração escura e maior resistência a manipulação. Protocolos com

concentrações superiores a 18,12  $\mu\text{M}$  2,4-D e inferiores a 9,06  $\mu\text{M}$  de 2,4-D apresentaram calos menores, oxidados e pouco friáveis (Figura 2 A - C).



)  
**Figura 1:** Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D no tamanho e matéria fresca de calos de explante apical de *L. lactescens* cultivada *in vitro*.  
 )

Na indução de calogênese realizada com fonte explantes de órgãos vegetativos, os explantes apicais e foliares apresentaram índice de calejamento de aproximadamente 80 %, enquanto calos oriundos de raiz apresentaram 30% e calos formados a partir de explantes caulinares apresentaram 70% de calejamento. Na avaliação da friabilidade os calos oriundos de folha e ápice apresentaram nível de friabilidade superior ao observado nos calos de origem caulinar e radicular (Figura 2 D-H). Estudos realizados com *Smilax japecanga* (SANTOS *et al.*, 1997) e *Coffea arabica* (FORNI, 1993) também reportam o efeito isolado desta auxina na indução de calos friáveis.



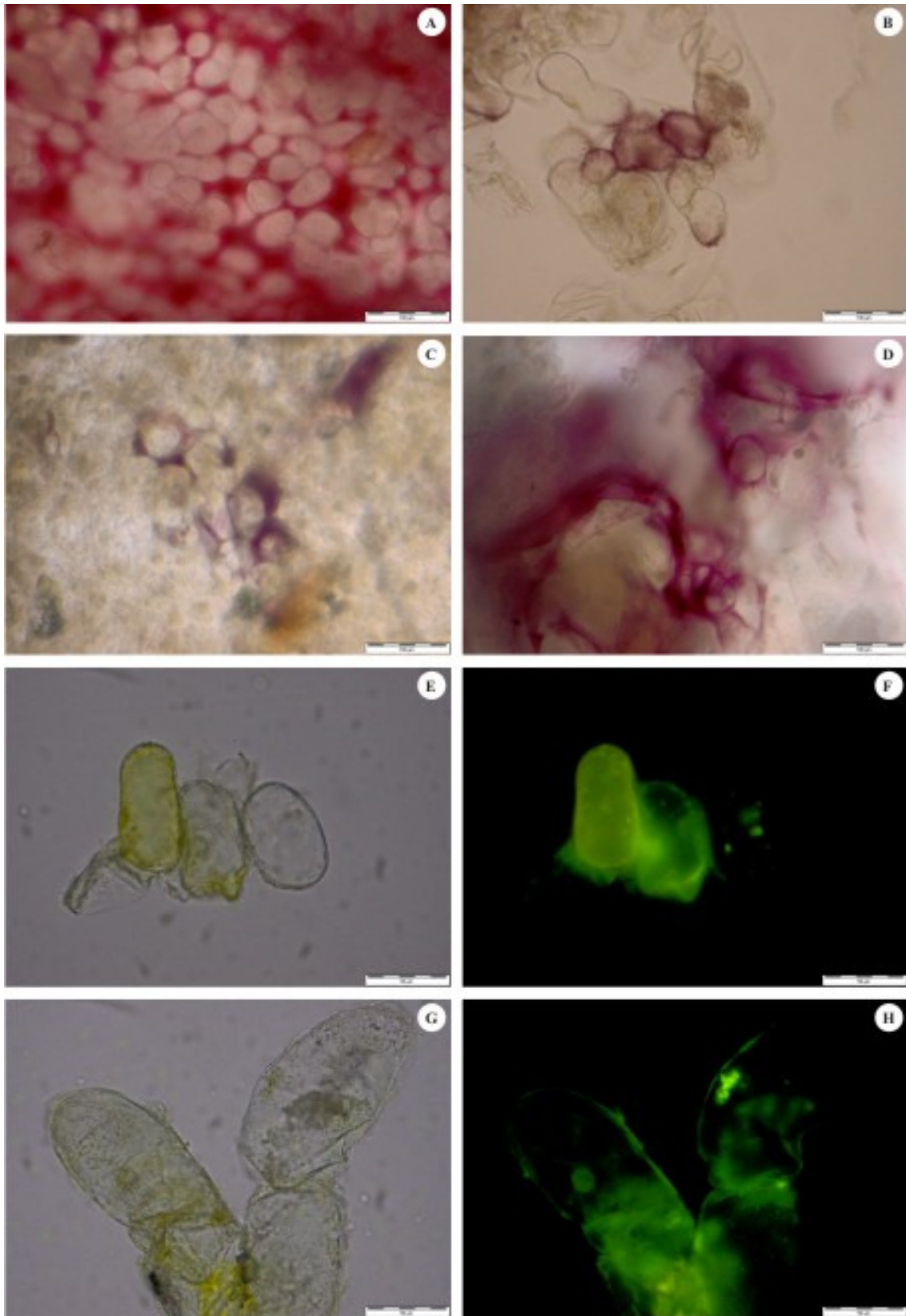
**Figura 2:** Calos de *Lophanthera lactescens*. A, B e C - calos de explante apical induzido com MS +18,12 μM 2,4-D (A), MS + 9, 06 μM 2,4-D (B) e MS + 4, 53 μM 2,4-D (C), respectivamente; D a G - calo de explante apical, foliar, caulinar e radicular, respectivamente, induzido com MS + 9, 06 μM 2,4-D. H - células de calo de explante foliar vistas em microscópio ótico.

### 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 cuja fonte de explante foi o ápice apresentaram uma coloração mais intensa em todas as células (Figura 3 A). Nos calos provenientes de raiz, folha e caule nem todas as células reagiram ao teste (Figura 3 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 3 E-H).

Os resultados dos testes histoquímicos corroboram com os resultados obtidos com a espectrometria de infravermelho. Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentaram sinais em  $1325-1330\text{ cm}^{-1}$ , característico de respiração (movimento) de anel sírigílico com contribuição do estiramento C=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 C=O. Os sinais em  $1030-1095\text{ cm}^{-1}$  indicam deformação de C-H de anel guaiacílico (ABREU, 1990). Sinais correspondentes ao estiramento de 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 3:** 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 de Caule e Raiz 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. 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). 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. Os espectros de amostras de raiz, em ambos os tratamentos (etanol e extração contínua), apresentam 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. Sinais característicos de lignina do tipo siriglica não foram evidenciados nas amostras de raiz avaliadas (anexo 2, espectros 6 e 8).

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

#### 3.4.1 Raiz Adventícia

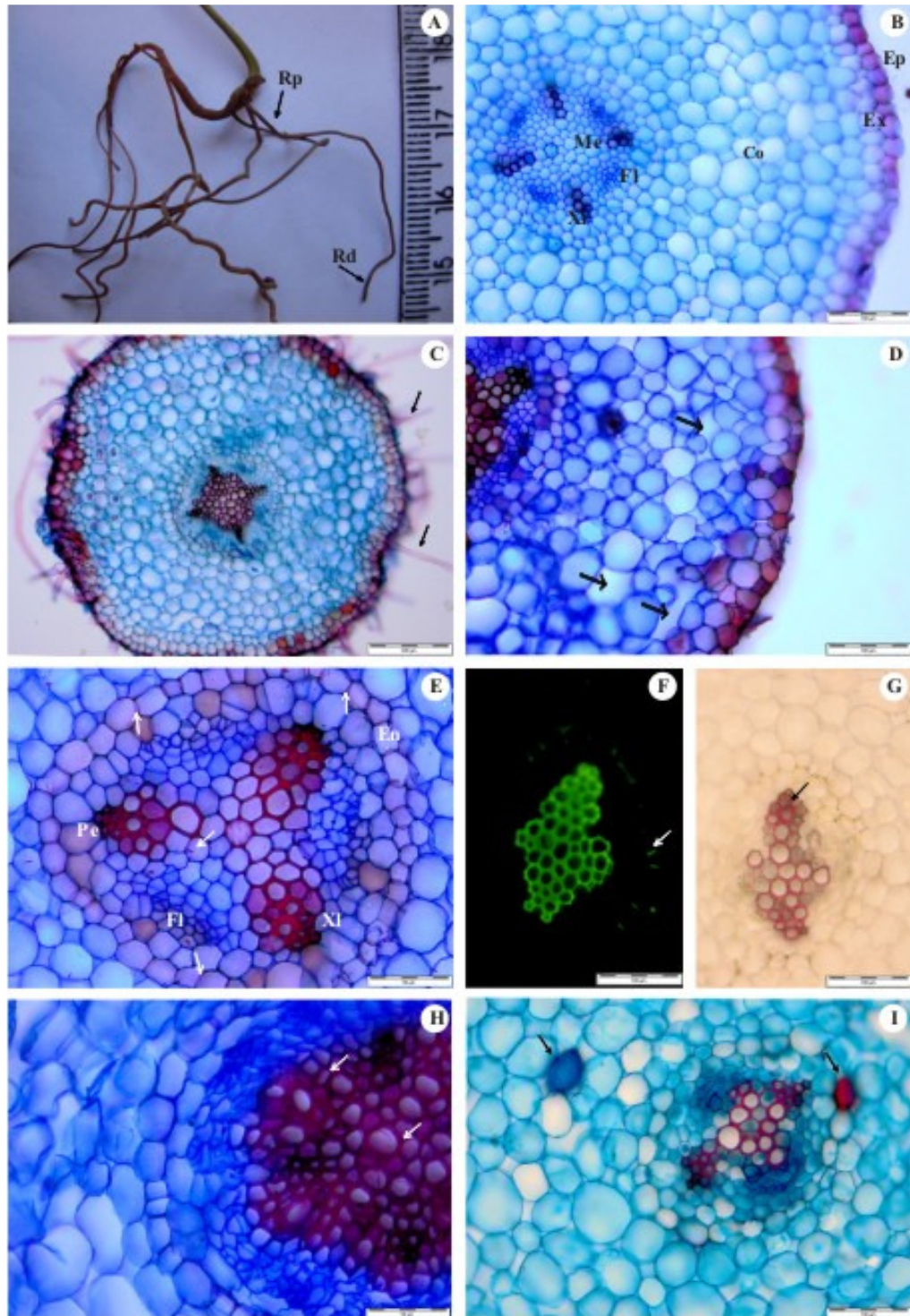
O estudo da raiz adventícia de *L. lactescens* foi realizado nas regiões distal e proximal (Figura 4 A).

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 expande, constituindo os pêlos absorventes (Figura 4 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 4 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 4 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 tetraarco (Figura 4 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 reguladores de crescimento difundindo 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 4 H).

Nas raízes tuberosas de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae) foram observadas abundância, no tecido parenquimático, de drusas e cristais prismáticos, bem como idioblasto com polifenóis (Marques *et al.* 2007). Metcalfe 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 4 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 4:** 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 microscopias 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= Córtecx; Fl= Floema; Xl= Xilema; Me= Medula; Em= 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 5 A.).

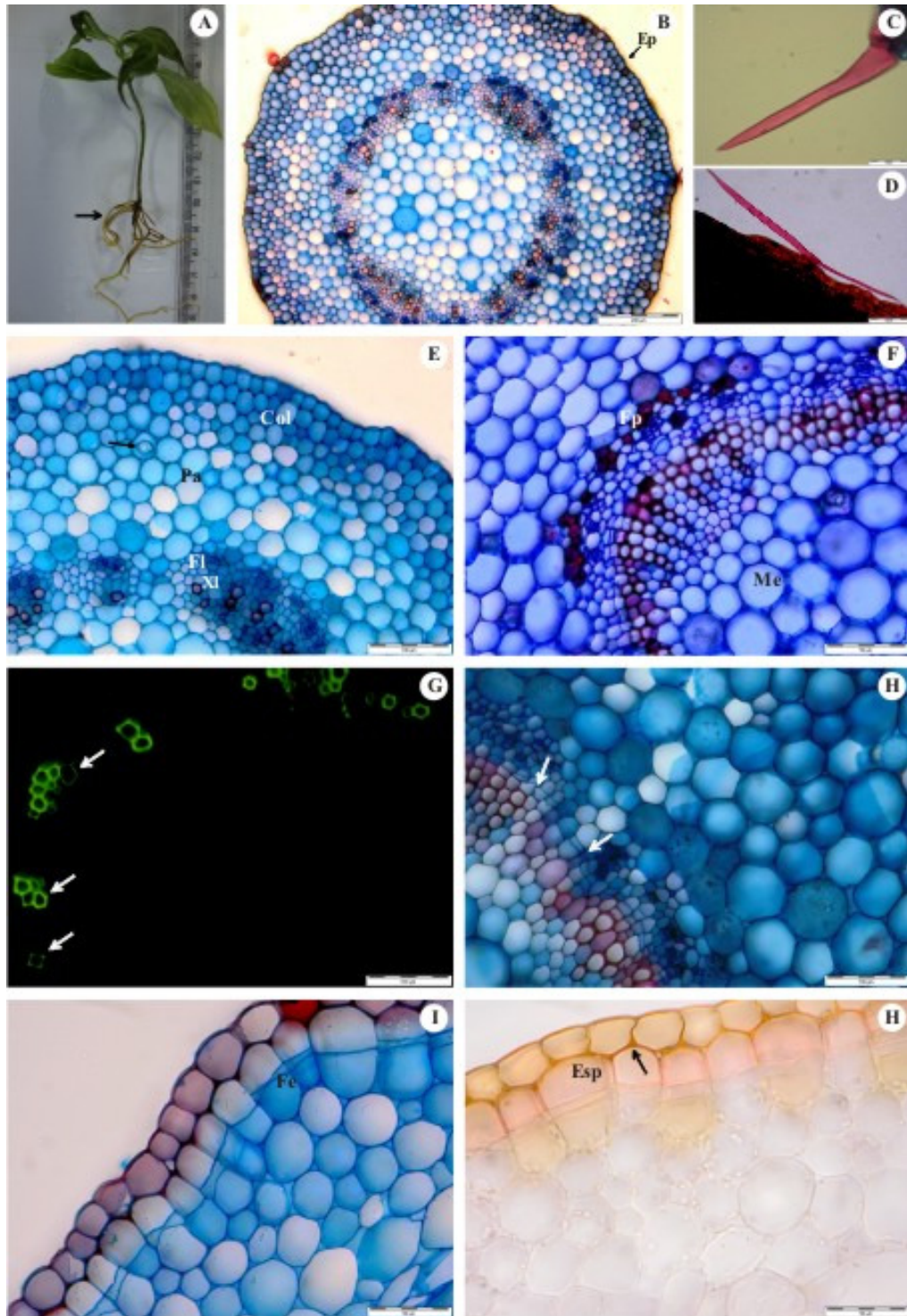
No caule, do primeiro ao terceiro entrenós, em seção transversal, observa-se uma epiderme uniestratificada, cujas células apresentam formas e tamanhos variados e paredes periclinais externas convexas, revestida por uma cutícula delgada (Figura 5 B). São observados tricomas tectores unicelulares e tricomas com dois braços horizontais (dibraqueados), suspensos por uma célula basal de parede espessa (Figura 5 A, D). Metcalfe & Chalk (1950), mencionaram a presença desses tricomas em *Malpighia urens*.

O córtex, nos primeiros entrenós, é constituído por 2-3 camadas de colênquima angular, 5-6 camadas de células parênquimáticas e uma bainha amilácea, geralmente conspicua até 5º entrenó. Em toda região cortical são observados inúmeros cloroplastos (Figura 5 E).

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 parênquimáticas, caracterizando um cilindro descontínuo (Figura 5 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 microscopias de fluorescência. Em *L. lactescens*, a deposição de lignina inicia-se nos ângulos das células, na lamela média, corroborando a descrição feita por Donaldson *et al.* 2001. O processo é finalizado com a impregnação ocorrendo por completo na parede secundária (Figura 5 G). A partir do 4º e 5º entrenós, observou-se a presença de uma a duas camadas de células cambiais no cilindro central (Figura 5 H). No mesmo estágio, na região cortical, entre os primeiros estratos subepidérmicos, ocorre a diferenciação do felogênio (Figura 5 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 5 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 espécie estudada.





**Figura 5:** *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 dibragueado. 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. H – Detalhe da suberificação. Ep= Epiderme; Co= 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.

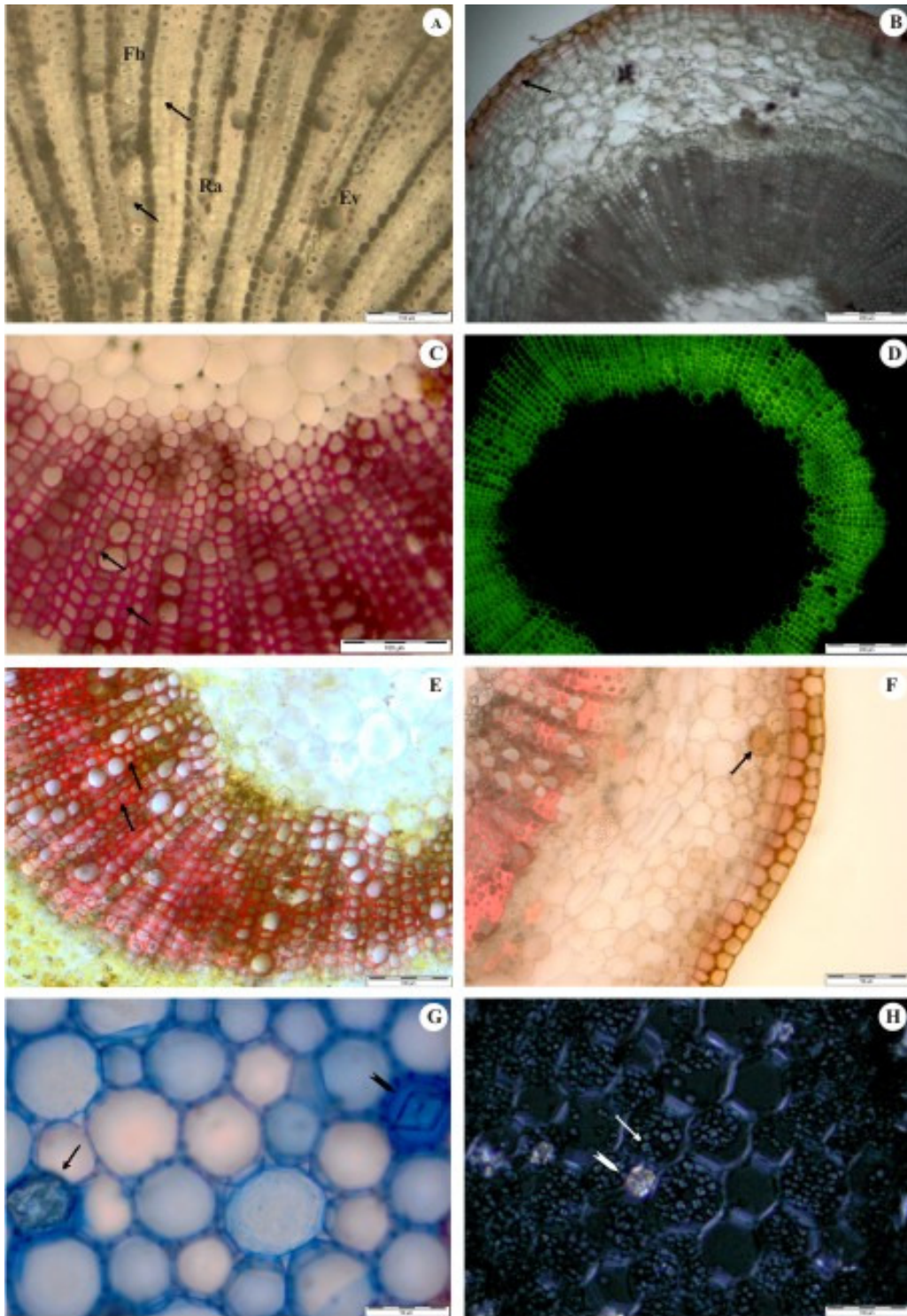
Nos 7º e 8º entrenós observa-se o xilema com seus elementos secundários bem expandidos, região cortical reduzida e periderme formada, porém, pouco desenvolvida. Em seção transversal, o xilema secundário de *L. lactescens* apresenta os elementos de vasos solitários e com contorno de circular a poligonal; fibras com paredes bem espessas e lúmen reduzido; raios parenquimáticos unisseriados (Figura 6 A e B). Os elementos celulares apresentam paredes lignificadas e espessas, confirmadas pelo teste de Wiesner e microscopia de fluorescência (Figura 6 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 6 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 6 F). Abreu *et al.* (1990) estudaram a madeira dessa espécie e identificaram eteróides 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, em um momento, a presença de cristal poliédrico (Figura 6 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 composto 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 (6 G e H).



**Figura 6:** 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 da pela microscopia de fluorescência e uso de auramina O. E – Lignina siringflica nas paredes dos elementos do xilema, evidenciada pelo teste de Mäuler (→). F – Presença de idioblastos com substâncias lipídicas (→), pelo sudan IV. G - Detalhe dos cristais de oxalato de cálcio na medula, tipo drusa (→) e prismático ( ). 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.

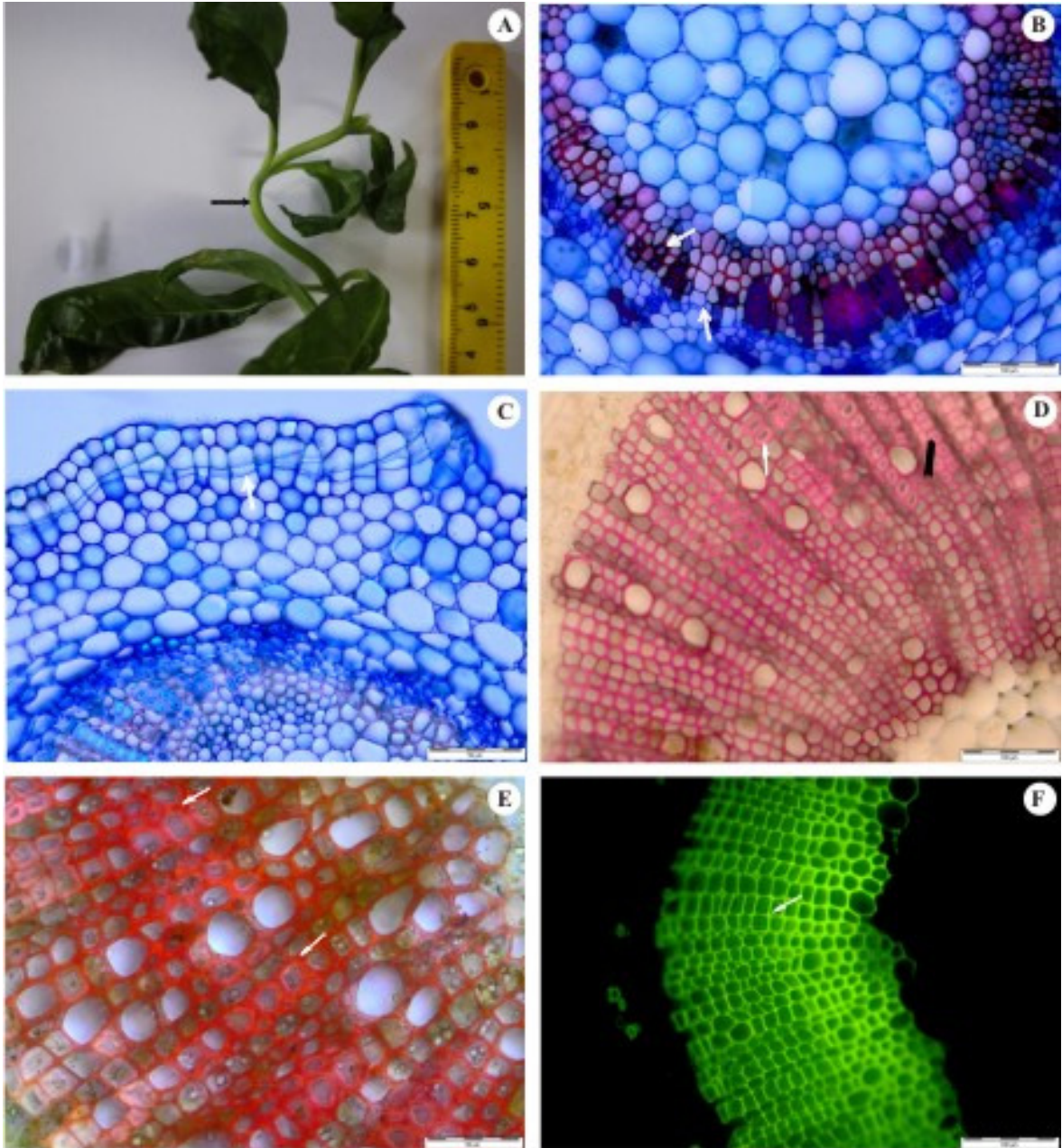


Alguns espécimes estudados, em decorrência do seu desenvolvimento acentuado, apresentaram entorse no caule em todos os níveis, que resultaram em modificações estruturais (Figura 7 A).

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 7 B e C).

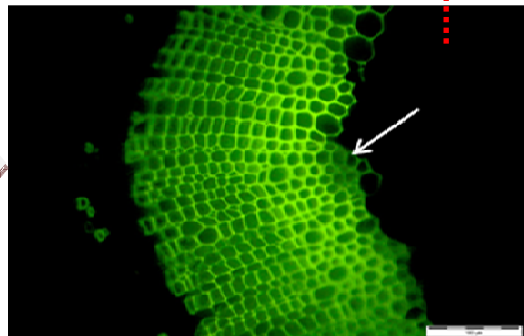
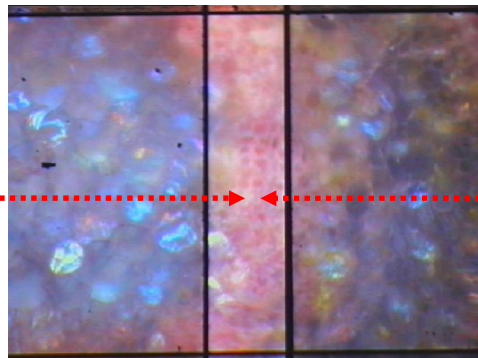
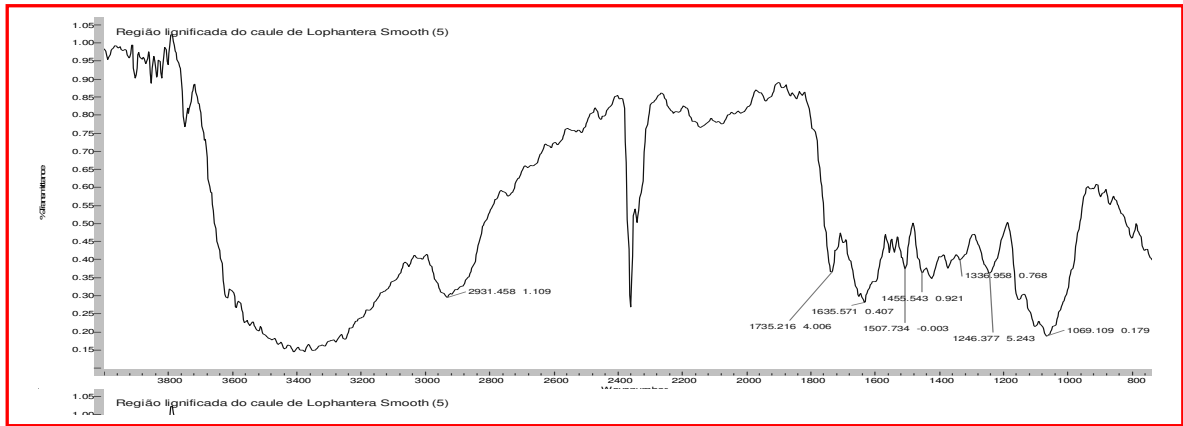
Espécies arbustiva-arbóreas que crescem algumas vezes em encostas ou em regiões instáveis geram galhos e troncos inclinados, que apresentam em sua estrutura interna, o chamado lenho de reação. Nas angiospermas, o seu desenvolvimento dá-se na porção superior, sendo denominado lenho de tração. A identificação dessa estrutura é facilmente realizada pela presença de fibras ou fibrotraqueídes gelatinosas. Essas células apresentam paredes com uma camada interna (camada G), espessa 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, 2007). Em *L. lactescens*, desde o 3º até o 7º entrenós, é possível observar essas características da parede através dos testes de Wiesner, Mauler e da auramina O na microscopia de fluorescência (Figura 7 D, E e F).

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) tenham citado a ocorrência de fibras gelatinosas no lenho de espécies da família Malpighiaceae. Enquanto que, Marques *et al.* (2007), observaram a ocorrência dessas nas raízes tuberosas de *Heteropteris aphrodisiaca*, espécie crescida no cerrado.



**Figura 7:** *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.

Através da análise das seções pelo infravermelho (Figura 8) foram obtidos espectros que mostraram sinais característicos de lignina em todas as regiões, desde os tecidos mais jovens (anexo 3, espectros 1-16); evidenciando a presença de lignificação desde os tecidos mais jovens. Os espectros de absorção no IV 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. 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, confirmando os resultados dos testes histoquímicos.



**Figura 8:** 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*.
- ✓ Foram identificados já nos estádios iniciais de desenvolvimento do caule, vários conteúdos celulares, diferindo da raiz, que apresenta somente de substâncias fenólicas.
- ✓ O processo de lignificação nas raízes adventícias de *L. lactescens in vitro* ocorre com mais intensidade na região proximal onde se observa espessamento das fibras xilemáticas e das células parenquimáticas da medula.
- ✓ A técnica de fluorescência e microscopia de infravermelho com observação de seções transversais mostrou-se eficiente para observação de ocorrência e composição da lignina *in loco*.
- ✓ Foi observado *in loco* que o processo de lignificação em *L. lactescens* inicia-se nos cantos celulares.
- ✓ Intensa atividade cambial ocorre no caule retorcido de planta *L. lactescens* cultivadas *in vitro*, que gera espessamento na parede celular e diferenciação de fibras gelatinosas.
- ✓ A observação de fibras gelatinosas em seções transversais de plantas de *L. lactescens* revelada pelo teste de Maïle e infravermelho coaduna com a hipótese de que tecidos especiais de tração possuem ligninas com alto teor de unidade siringílica.
- ✓ As amostras obtidas através de diferentes métodos de extração possibilitaram a identificação no infravermelho de lignina siringílica/guaiacílica no caule e lignina guaiacílica na raiz.
- ✓ Foi obtido protocolo eficiente, para indução de calos friáveis e sem oxidação em *L. lactescens*.
- ✓ Em *L. lactescens*, as células oriundas de calo de explante apical apresentaram reação mais intensa ao teste de Wiesner.
- ✓ As diferentes técnicas aplicadas, como a histoquímica, microscopia e espectrometria se mostraram ferramentas importantes na avaliação do processo de lignificação, pois possibilitaram a identificação de diferentes tipos de ligninas em calos e plantas de *L. lactescens* cultivadas *in vitro*.

## **CAPÍTULO II**

### **LIGNINA EM CALOS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Eucalyptus spp* UTILIZANDO CULTURA DE TECIDO**

## RESUMO

Diferentes concentrações de sacarose foram testadas em protocolo MS acrescido de 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, + 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina para produção eficiente de calogênese. Após definição do melhor protocolo, calos foram induzidos com fonte de explante de órgãos vegetais das espécies *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* e *E. urophylla* para avaliação de lignina nas espécies. Melhor indução de calogênese foi observada em protocolo com 20  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose. Foi observada maior eficiência de produção de calos friáveis na espécie *E. urophylla*, A espécie *E. urograndis* apresentou calos menores e menos friáveis. Sinais característicos de lignina tipo guaicólica e siringólica foram observados através de espectrometria de infravermelho.

Palavras- chave: Calogênese, *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. urograndis*.

## ABSTRACT

Different concentrations of sucrose were tested in MS protocol + 10 mM of 2,4-D + 2.5 mM kinetin were efficient for efficient production of callus. After defining the best protocol, calli were produce from source of different of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* and *E. urophylla* to observe lignification. The best induction of callus formation was observed in the protocol with 20 gL<sup>-1</sup> sucrose. Was observed a highest efficiency of production of friable callus from *E. urophylla*. The callus from *E. urograndis* showed smaller and less friable. Characteristic signals in the infrared spectroscopy allowed identify the *Eucalyptus* callus presence of syringyl/guaicyl lignin.

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



## 1 INTRODUÇÃO

Espécies de crescimento rápido como o eucalipto, apresentam determinados obstáculos quanto a sua utilização, 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 entender o processo de formação de lignina nessa espécie, o grupo do Laboratório de Biotecnologia da Madeira/ LBM vem realizando pesquisas na busca de ferramentas biotecnológicas para o estudo de espécies desse gênero *in vitro*.

Nesse capítulo são realizados experimentos biotecnológicos para determinar protocolo eficiente de produção de calogênese em *Eucalyptus* com modificação do teor de sacarose, utilizando como fonte de explante ápice de planta cultivada *in vitro* da espécie *E. grandis*; produzir calogênese a partir de explantes de órgãos vegetativos das espécies *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus urograndis*; e identificar a lignina nos calos produzidos.

## 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 Mudas, 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 de 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, plântula de *Eucalyptus grandis* com idade de 30 dias. Foi retirada a gema apical da plântula e inoculada em meio MS acrescidos de 0,001 g/L de AIA, 0,8 g/L de antioxidante PVP, reguladores de crescimento 2,4-D e cinetina na concentração de 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-agar (Vetec<sup>®</sup>) após regulação de pH para 5.7. A esterilização foi feita em autoclave (121 °C, 1 atm) por 20 minutos. Após quatro subculturas para meio de igual composição em intervalos de 21 dias, fragmentos de aproximadamente 0,3 mm 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).

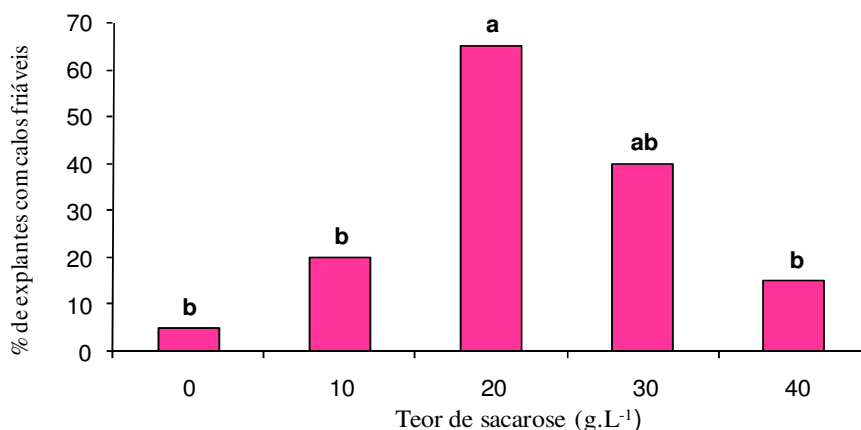
## **2.2 Lignificação de Calos de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e *E. urograndis* Produzidos in vitro**

Para a cultura de calos foram utilizados como fonte de explante, seguimentos 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 acima 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 subculturados em meio de cultura renovado. Após 90 dias, aproximadamente, os calos foram submetidos a mesma metodologia de análise de lignificação descrita para *L. lactescens* (teste de Wiesner, espectrometria no infravermelho e fluorescência).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Indução de Calogênese de *Eucalyptus grandis* em Diferentes Teores de Sacarose**

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 (Figuras 9 e 10 A e B). No meio suplementado com 10 g. L<sup>-1</sup> de sacarose foram formados calos oxidados e pouco friáveis. Concentrações de sacarose inferiores a 2% no meio podem resultar em clorose na cultura, concentrações acima de 4% podem elevar excessivamente o potencial osmótico do meio, dificultando o desenvolvimento do material (CHONG & PUA, 1985; FLORES *et al.*, 1999; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).



**Figura 9:** 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.

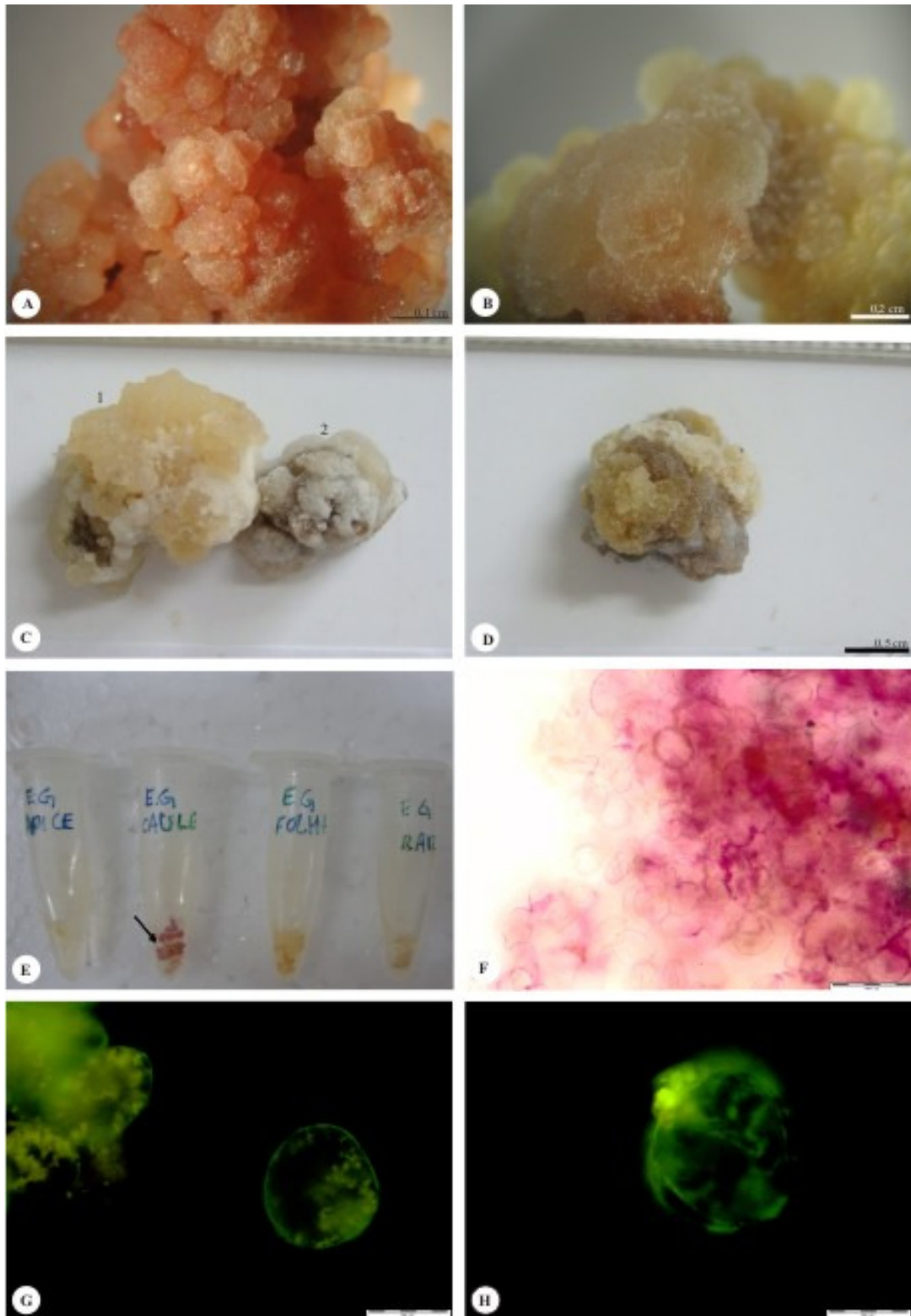
### 3.2 Lignificação de Calos de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e *E. urograndis* Produzidos *in vitro*

Calos da espécie *E. urophylla* apresentam maior crescimento e friabilidade em meio 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 saarose. Os explantes oriundos dos diferentes órgãos vegetativos das espécies *E. urophylla* e *E. grandis* apresentam em média 80% de calogênese, diferente de *E. urograndis* que tem um valor. Os calos dessa última espécie são menores e menos friáveis (Figura 10 C e D).

O teste histoquímico de Wiesner indica lignina em todos os calos, com reação mais intensa naqueles provenientes de explantes da região caulinar (Figura 10 E e F). Nesse teste, as células não reagiram de maneira homogênea. A análise com fluorescência utilizando o reagente auramina O, indica a presença de lignina em todos os calos (Figura 10 G e H).

A presença de lignina do tipo guaiacólica foi observada nos espectros de calos oriundos de explantes caulinar e apical nas três espécies de *Eucalyptus*. 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 siringólica nos calos oriundos de explante 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 2% de sacarose para as espécies de *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. urograndis*, no entanto, outros experimentos deverão ser realizados para o estudo de lignificação dessas espécie utilizando cultura de tecidos.



**Figura 10:** 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.
- ✓ A lignificação nos calos foi observada por espectrometria de infravermelho.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ 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.

## 6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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. **Acad. Bras. Ciênc.** Vol. 81. nº 1. 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. Fo, 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.

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.

ALBRECHET, K.A., WEDIN, W.F., BUXTON, D.R. Cell wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. **Crop Science**, v. 27, p. 735-741, 1987.

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

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

AMAN, P. **Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages**. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D. *et al.*, (Eds.) Forage cell wall structure and digestibility. Madison: Wisconsin: ASA/CSSA/SSSA, 1993. p.183-199.

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 n., p. 64-70, 2008.

ANDERSON, W. R. *Lophanthera*, A Genus Of Malpighiaceae New To Central America. Brittonla, **New York Botanical Garden** v. 35, p. 37-41. 1983



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. *Int. Rev. Cytol.* 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., MIKSCHE, J. P. 1976. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: Iowa State University, p. 121, 276.

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

BIZI, R.M.; JÚNIOR, A.G.; AUER, C.G. Seleção de Fungicidas para Controle de Oídio em Eucalipto. *Bol. Pesq. Fl.*, Colombo, n. 51, P. 165-170, 2005.

BOERJAN, WOUT. Biotechnology and the domestication of Forest trees. **Current opinion in biotechnology.** v.16,n.2,p.159-66,2005

BOUDET, A.M. A new view of lignification. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 67-71, 1998.

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 Illicifolia*. **Eclética química**, v.27, n. especial, p.403-416, 2002.

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

BUXTON, D.R., HORNSTEIN, J.S. Cell wall concentration and components in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot trefoil, and red clover. **Crop Science**, v. 26, p. 180-184, 1986.

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.

CAMPBELL, M.M.; SEDEROFF, R.R. Variation in lignin content and composition. **Plant Physiology**, v. 110, p. 3-13, 1996.

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

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. **J Mol Biol**, V.286, p.809-827, 1999.

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. 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.

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

DAVIN B.L., LEWIS G. N. **Lignin primary structures and dirigent sites**. **Curr Opin Biotechnol**, v.16, n. 4 p.407-15, 1992.

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

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.

DU, J.; XIZ, H. L.; ZHANG, D. Q.; HE, X. Q.; WANG, M. J.; LI, Y. Z.; CUI, K. H.; LU, Z. Z. Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach. **Rev. Proteomics**, v.6, p. 881-895. 2006.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. 15° ed. São Paulo, Edgard Blucher, p. 293, 2000.

FAHN, A. **Anatomia vegetal**. 3° ed. Madri, Ediciones Pirâmide, S. A, 600 p.1985.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultra structure, reactions**. New York : Waster & Grugter, 613p, 1984.

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. **Rev. 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. **Rev. Bras. de Agrociência**, v.4, no 1, 09-14, 1998.

FORNI, R.C. **Níveis de MS, BAP, número de gemas do explante e período de epicagem na produção de brotos, folhas e matéria seca e níveis de 2,4-D e cinetina para tamanho e fenótipo dos calos de Coffea arábica L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44**. 1993. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

FOSKET, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego, Academic Press, 580p, 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, 1968. 129p.

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.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cell Development Biology Plant**, Columbia, v. 32, p. 272-289, Oct./Dec. 1996.

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

GERRITS, P.O. & SMID, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** 132:81-85.

GONZÁLEZ, E.R.; ANDRADE, A BERTOLO, A.L.; CARNEIRO, R.T.; LACERDA, G.C.; DEFÁVARI, V.A.P.; LABATE, M.T.V.; LABATE, C.A. Transformação genética do eucalipto. **Biociência** **Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, nº. 26, p. 18-22, 2002.

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, 2001.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.A. de; GONÇALVES, A.N. **Nutrição e adubação em mini jardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Piracicaba, IPEF, 21p. 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, 14p. 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. I, p. 02. 1980.

HILLIS, W.E.; BROWN, A.G. **Eucalyptus for wood production**. Melbourne: CSIRO, 434 p. 1978.

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.

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

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Company, XI, 523p, 1940.

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.

KIERAN, P. M.; MACLOUGHLIN, P. F.; MALNE, D. M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 39-52, 1997.

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.

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.

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

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 Dispostas Perpendicularmente ao Solo Causada por Scolytidae (Coleoptera). *Neotropical Entomology*. jul-sep 2002 p.351-357.

MARQUES, L.C., *et al.*, Controle farmacognóstico das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malthighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**. Vol. 17, nº 4, 2007. P. 604-615.

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**. Califónia, The Benjamim/Cummings publishing company, Inc., 560 p., 1988.

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

MONTIES, B. Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation with possible self-organization of lignin network. **Annales des Siences 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. **Rev. 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 (8), p. 783-786. 1974.

PÊGOS, M.R.A.; **Resistência natural de nove espécies de madeiras ao ataque de *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) (Isoptera: Rhinotermitidae)**. Monografia, 24p. Instituto de Florestas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, agosto, 2007.

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

PETROVICK, P. R.; MARQUÊS, L. C. & DE PAULA, I. C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brasil. **Jornal of Ethnopharmacology**,66: 51-55, 1999. In: VICTÓRIO, C. P. **Estudos Integrados: Biofísica, Biotecnologia, Anatomia, e**

**Fitoquímica na Avaliação de Plantas de *Phyllanthus tenellus* Roxb.** Cultivadas In Vitro. Dissertação. 125p. Universidade Federal do Rio de Janeiro.2004.

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.

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

PLOMION, C.; LEPROVOST, C.; STOKES, A. Wood formation in trees. *Plant Physiology*, Lancaster, v.127.p.1513-1523, 2001. In: ANDRADE, A.; CELEDÓN, P.A.F.; LABATE, C.A. **O proteoma da madeira.** *Biociência* v.16, n.36, p. 10-17, 2006.

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.

SALES, C.G. **Growth stresses: main results obtained on the study of guayana 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.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; MORAIS, S.A.L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas - métodos de obtenção e caracterização química. **Cienc. Rural**, v.31, n 5, 2001.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G.B. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biociência 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.

SCHNEIDER, P.R.; FINGER, C.A.G.; KLEIN, J.E.M.; TOTTI, J.A.; BAZZO, J.L. Forma do tronco e sortimentos de madeira de *Eucalyptus grandis* maiden para o estado do rio grande do sul. **Ciência Florestal**, v.6, n. 1, p.79-88, 1996.

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. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 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. **Rev. Bras. Agrobiologia**, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.

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

SIMÕES, C.M.O. *et al.*, **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1102 p. 2004.

SIMOLA, L. K. & SANTANEN, A. **Improvement of nutrient medium for growth and embryogenesis of megametophyte and callus line of *Picea abies***, *Phytochemistry*, n. 80, p.27-35, 1990.

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

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. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2007.

TERASHIMA N, AWANO T, TAKABE K, YOSHIDA M. Formation of macromolecular lignin in ginko xylem cell walls as observed by field emission scanning electron microscopy. **C R Biol**, Japan, 327, 903-10.2004

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

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.

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



VICTÓRIO, C. P. **Estudos Integrados: Biofísica, Biotecnologia, Anatomia, e Fitoquímica na Avaliação de Plantas de Phyllanthus tenellus Roxb. Cultivadas** 2004. In Vitro. Dissertação. 125p. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

## 7. ANEXOS

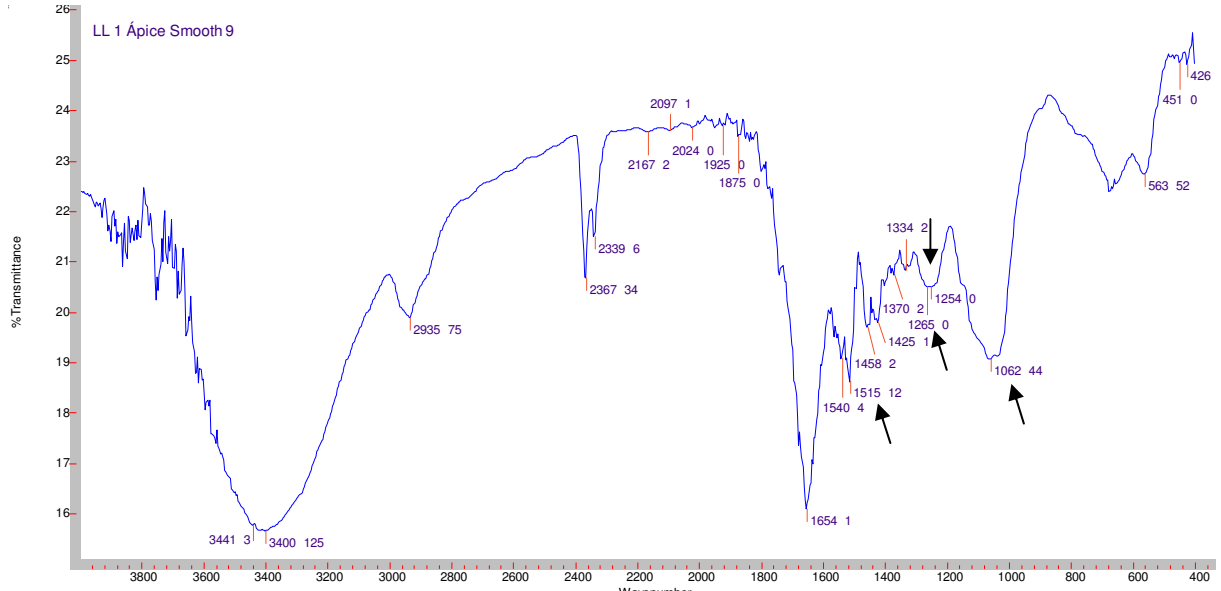
**Anexo I.** Espectros no Infravermelho de calos pré-extraídos em etanol (BRUCE & WEST, 1989) de explante apical, foliar, caulinar e radicular de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*. Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 ( $\text{cm}^{-1}$ ) / distância de corrida 4000 – 400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

**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 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

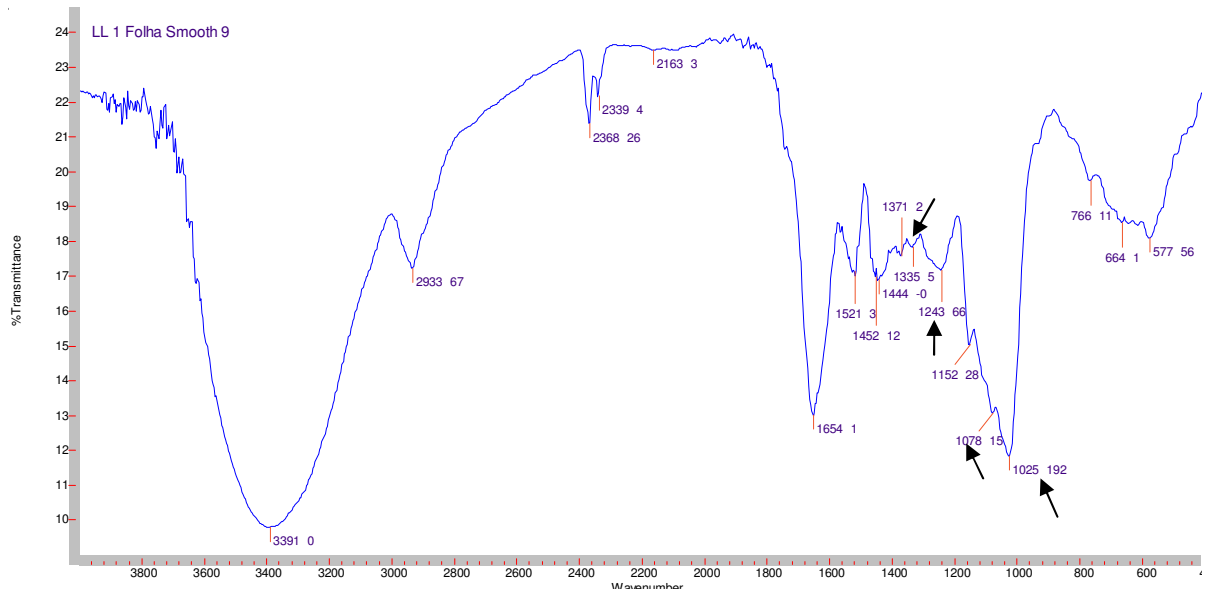
**Anexo III.** Espectros obtidos por Microscopia de Infravermelho de secções no plano transversal de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*. Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 ( $\text{cm}^{-1}$ ) / distância de corrida 4000 – 400 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

**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 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

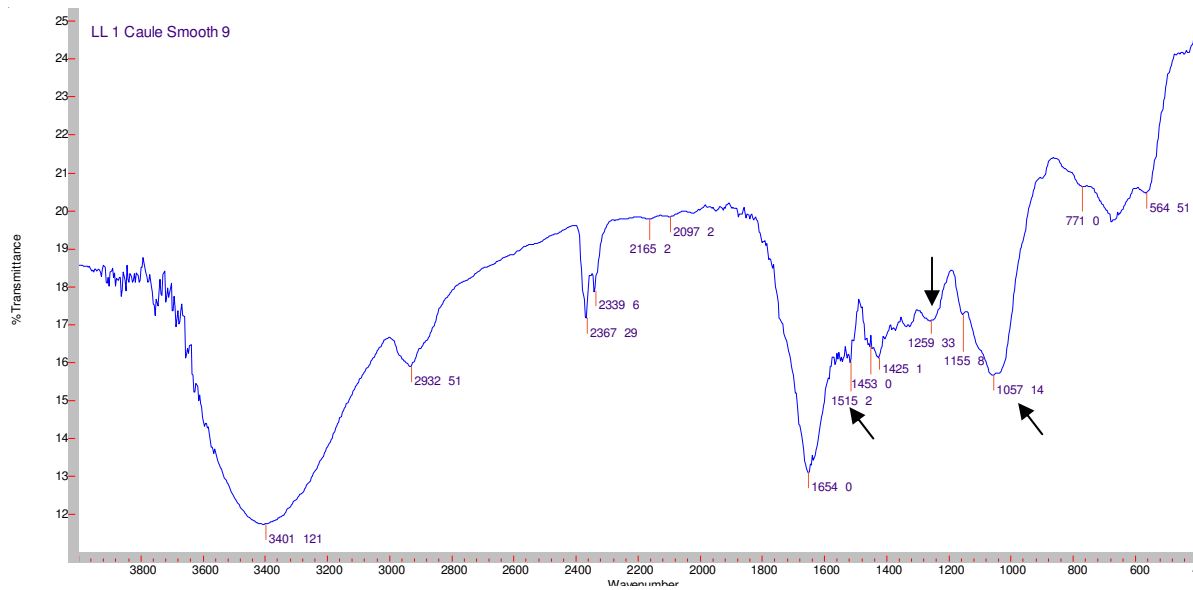
**Anexo 1:** Espectros no Infravermelho de calos pré-extraídos em etanol (BRUCE & WEST, 1989) de explante apical, foliar, caulinar e radicular de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*. Smooth (9) / 32 scans / resolução 4 (cm<sup>-1</sup>) / distância de corrida 4000 – 400 (cm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



**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 (→).

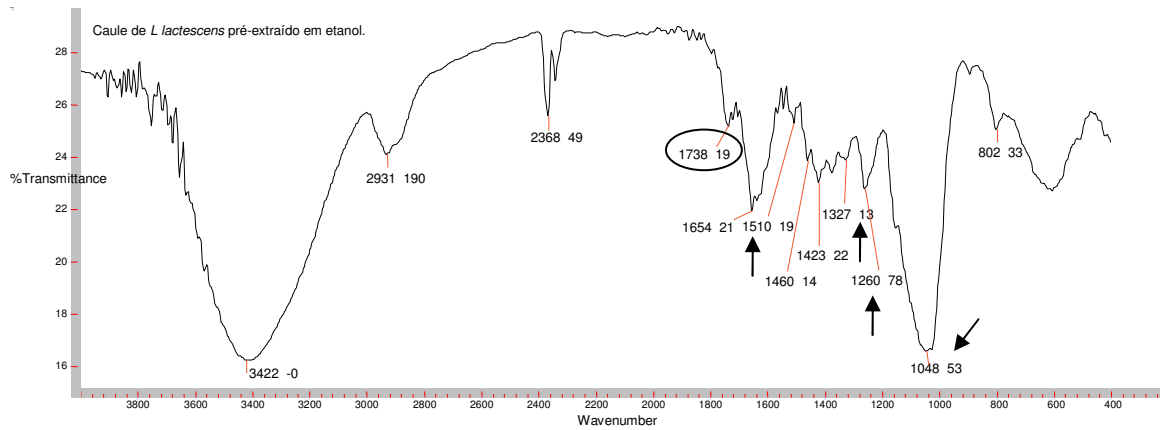


**Espectro 3:** Infravermelho de calo de explante caulinar de plantas de *L. lactescens*. Sinais indicativos de lignina (→).

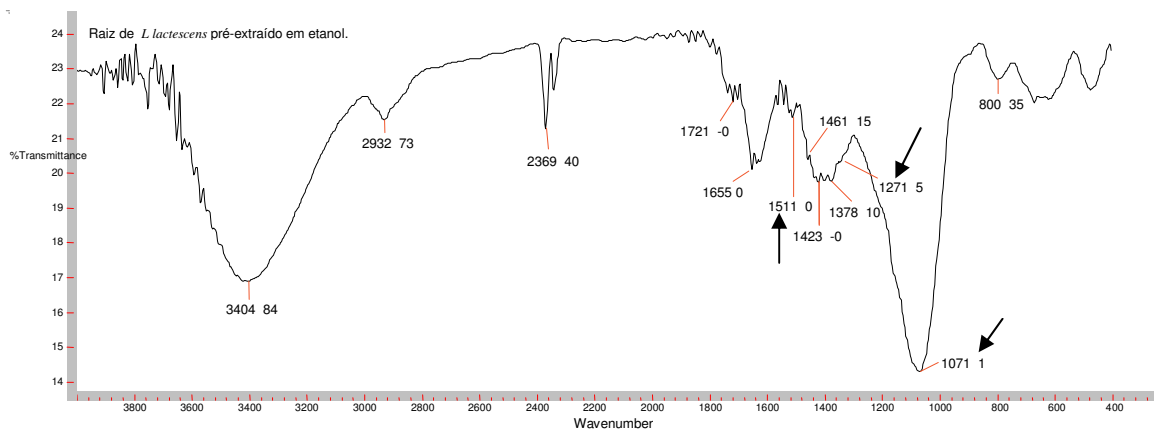


**Espectro 4:** Infravermelho de calo de explante radicular de plantas de *L. lactescens*. Sinais indicativos de lignina (→).

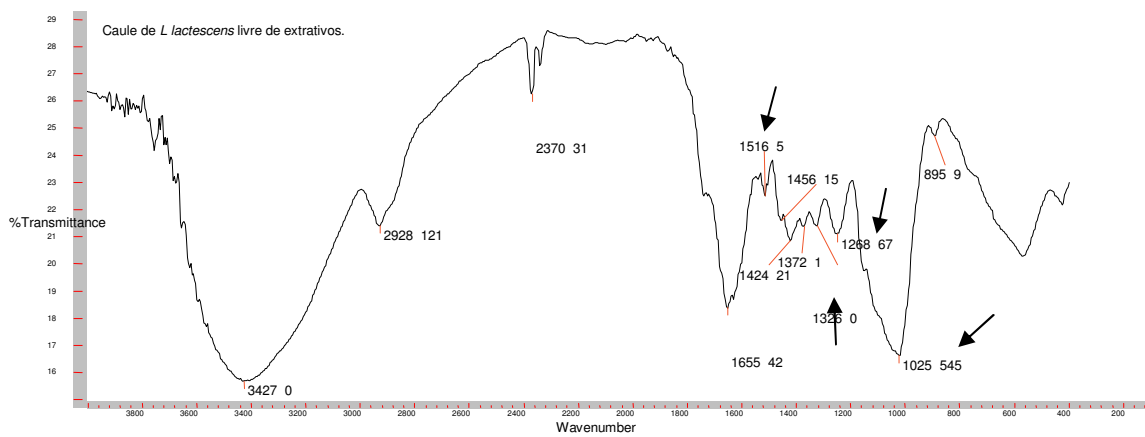
**Anexo 2:** Espectros no Infravermelho de caule e raiz de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*, pré-extraídas em etanol (BRUCE & WEST, 1989) e totalmente livre de extratos solúveis (BROWNING, 1967).



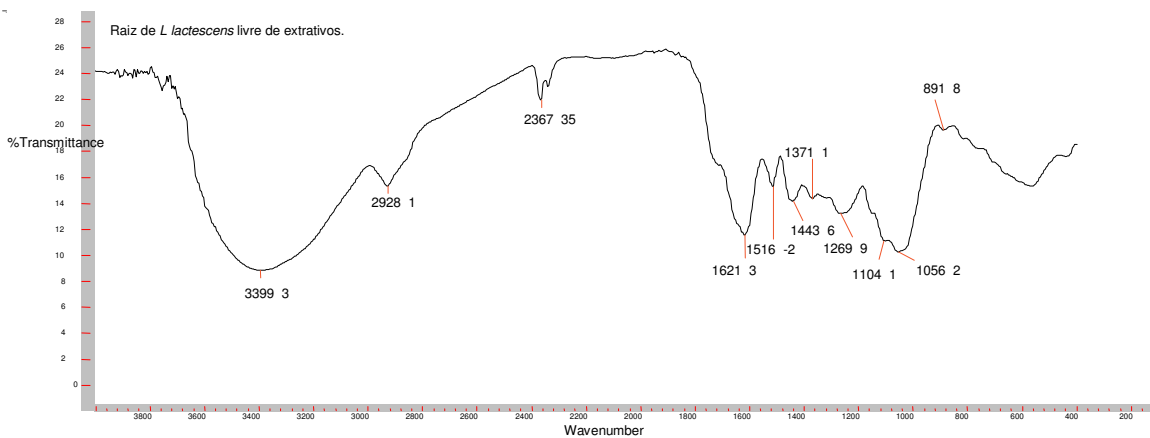
**Espectro 5:** Infravermelho do caule de planta de *L. lactescens*, pré extraído em etanol. Sinais indicativos de lignina (→). Sinal indicativo de celulose e/ou hemicelulose (○)



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

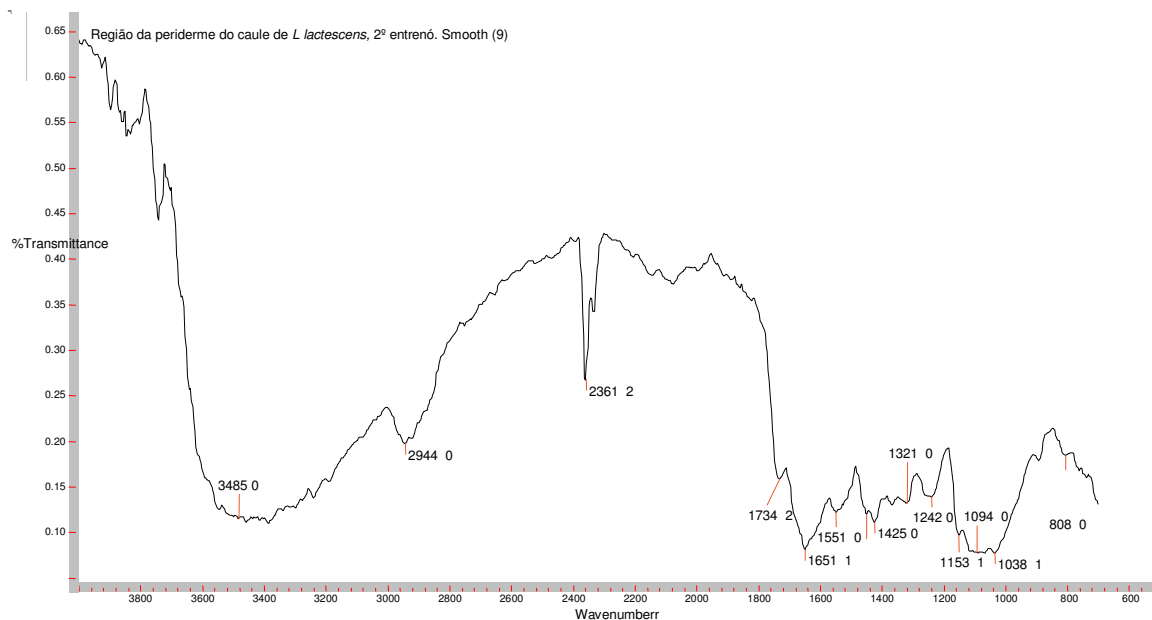


**Espectro 7:** Infravermelho do caule de planta de *L. lactescens*, livre de extratos solúveis. Sinais indicativos de lignina (→).

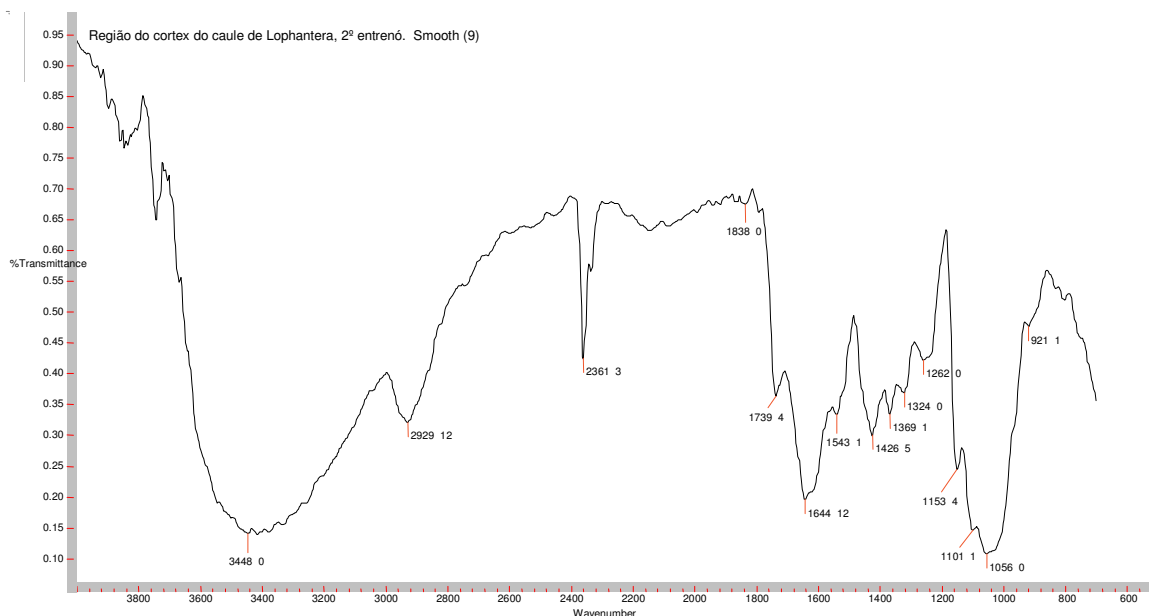


**Espectro 8:** Infravermelho da raiz de planta de *L. lactescens*, livre de extratos solúveis. Sinais indicativos de lignina (→).

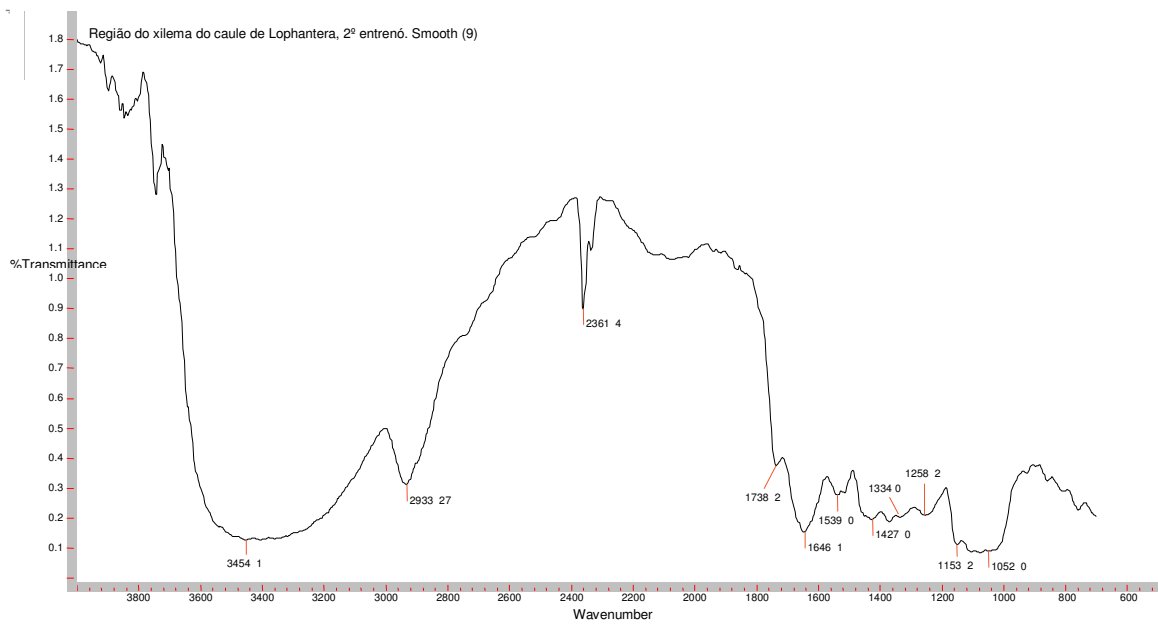
**Anexo 3 :** Espectros obtidos por Microscopia de Infravermelho de secções no plano transversal de plantas de *Lophanthera lactescens* Ducke cultivadas *in vitro*.



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

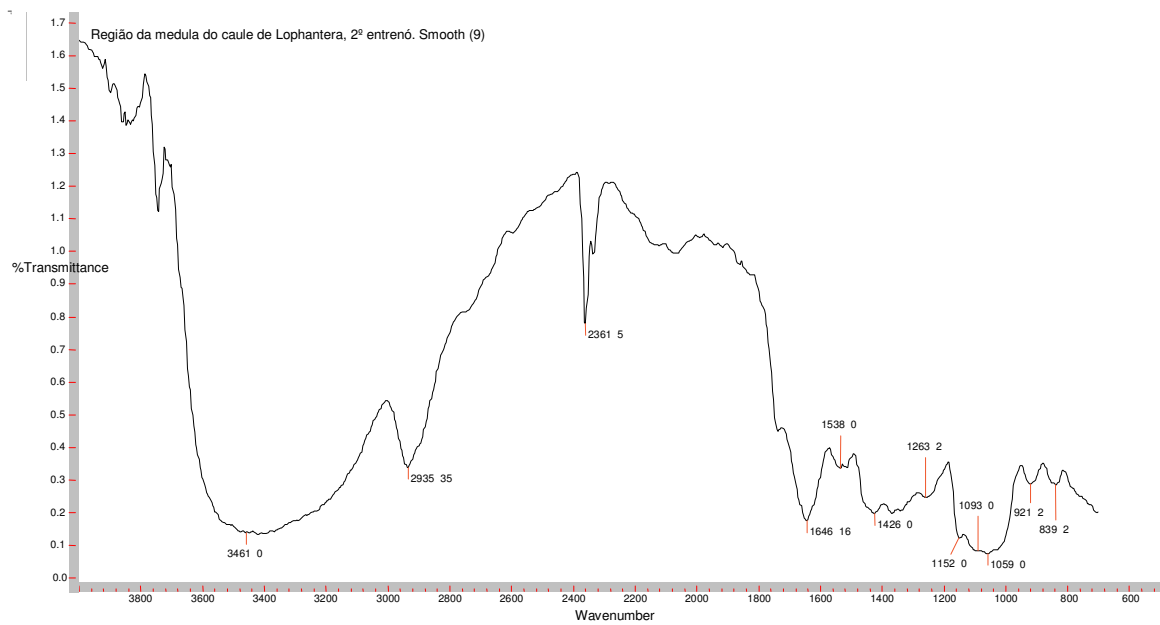


**Espectro 10:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 2º entrenó, região do cortex.

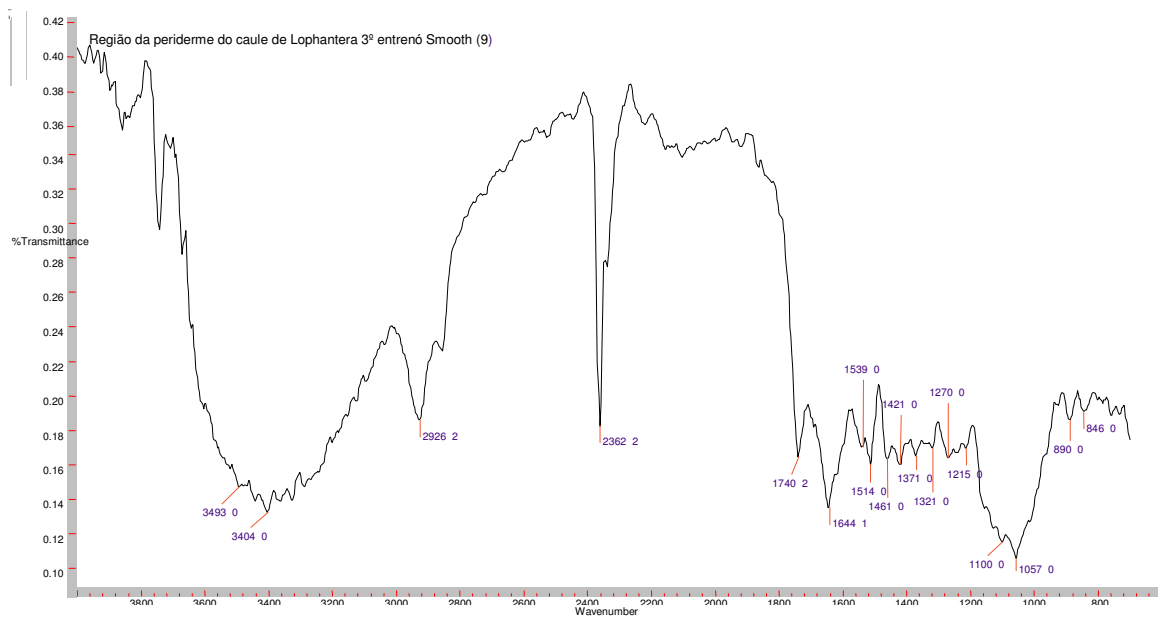


**Espectro 11:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 2º entrenó, região do xilema.

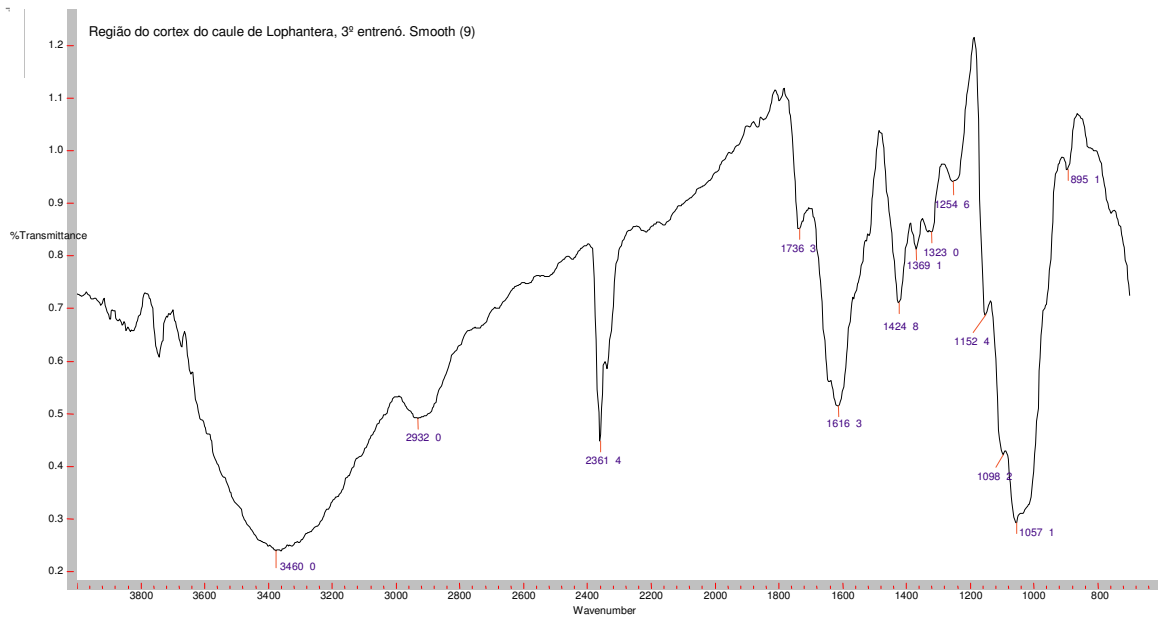




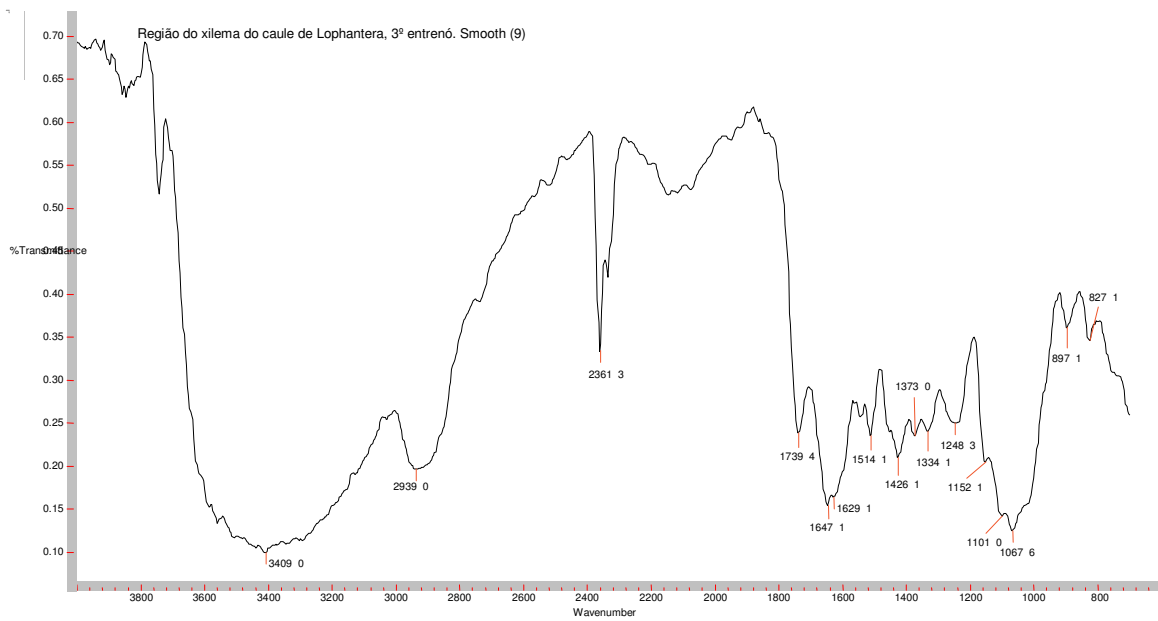
**Espectro 12:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 2º entrenó, região da medula.



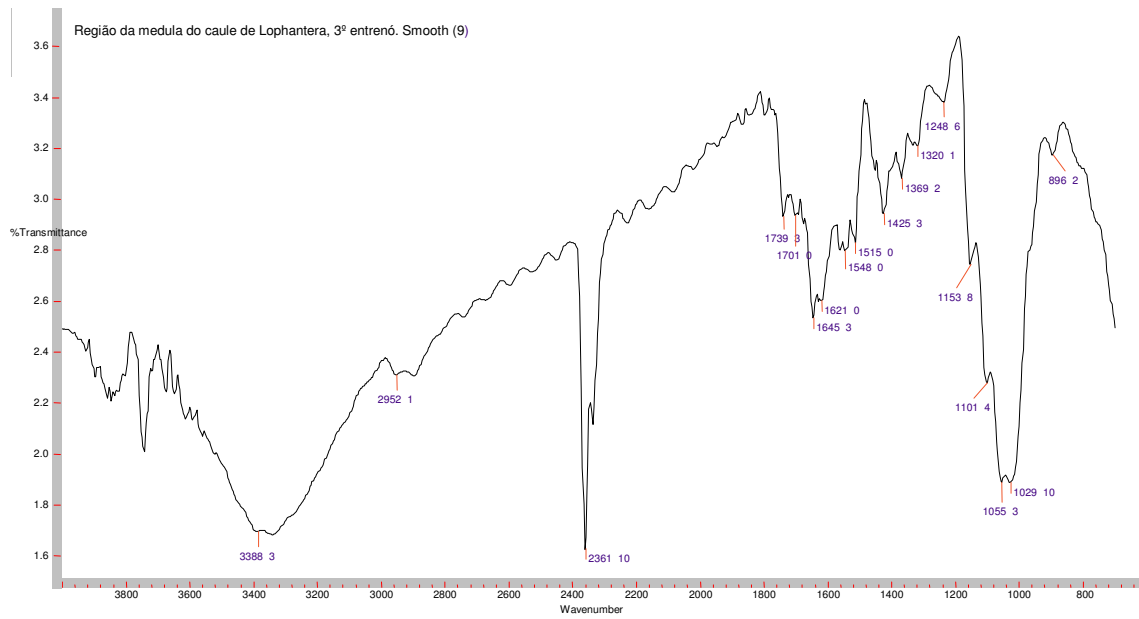
**Espectro 13:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 3º entrenó, região da periderme.



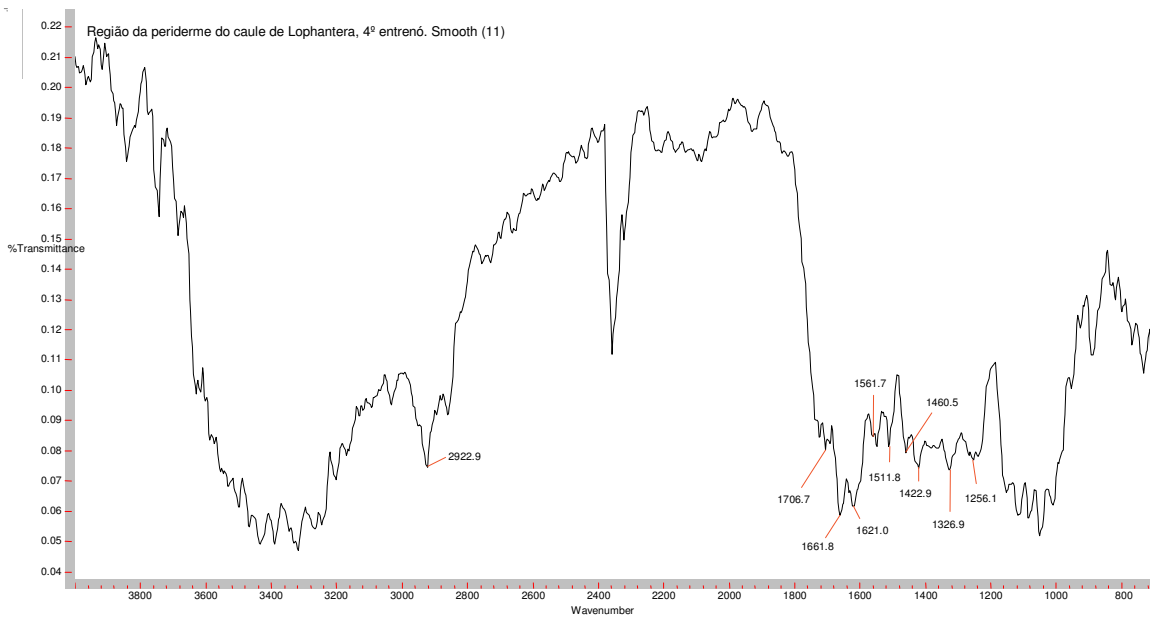
**Espectro 14:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 3º entrenó, região do cortex.



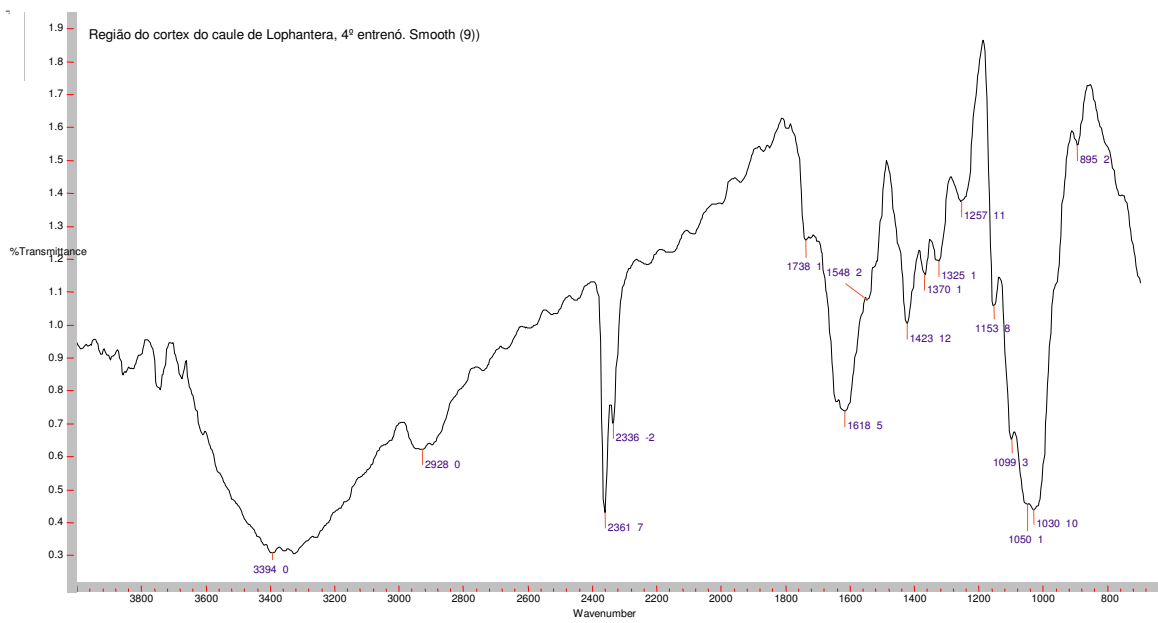
**Espectro 15:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 3º entrenó, região do xilema.



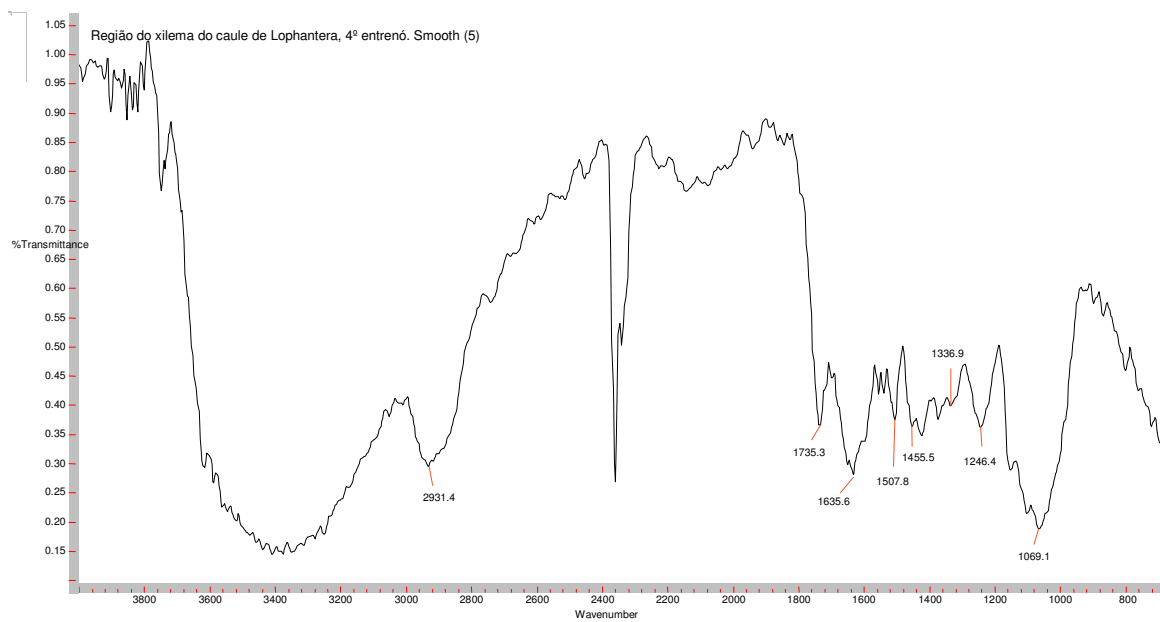
**Espectro 16:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 3º entrenó, região da medula.



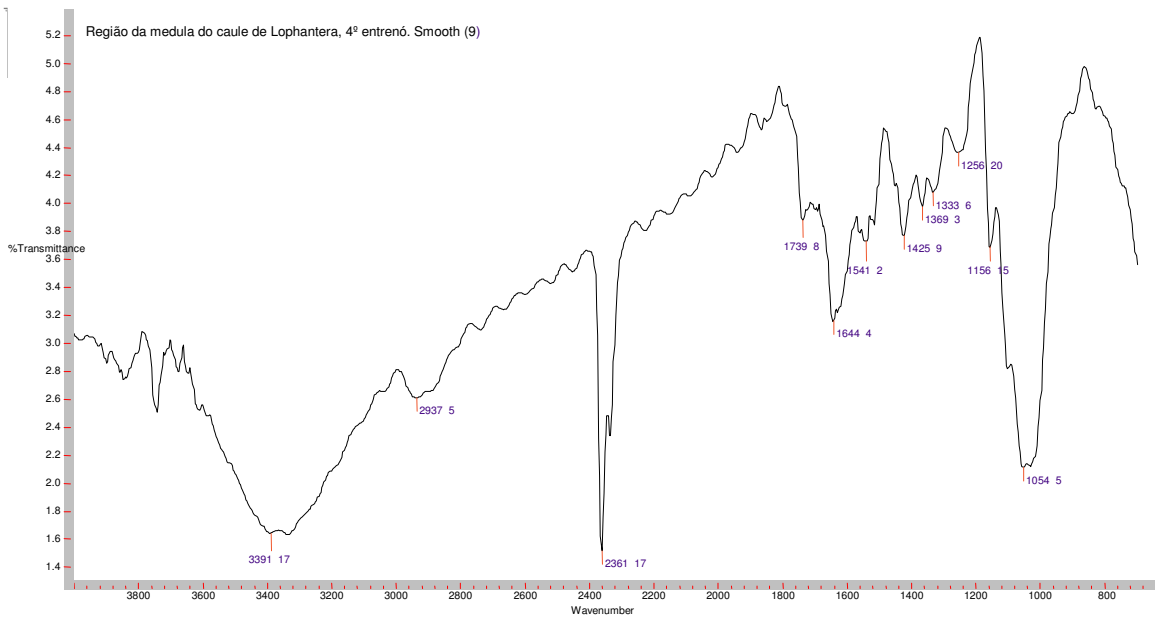
**Espectro 17:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 4º entrenó, região da periderme.



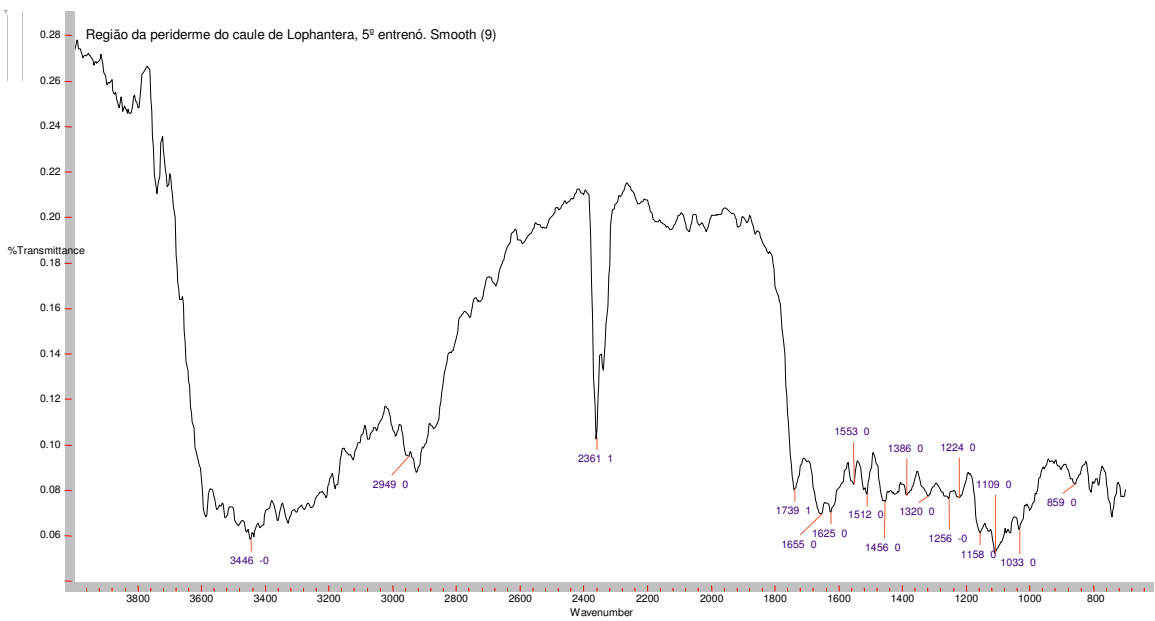
**Espectro 18:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 4º entrenó, região do cortex.



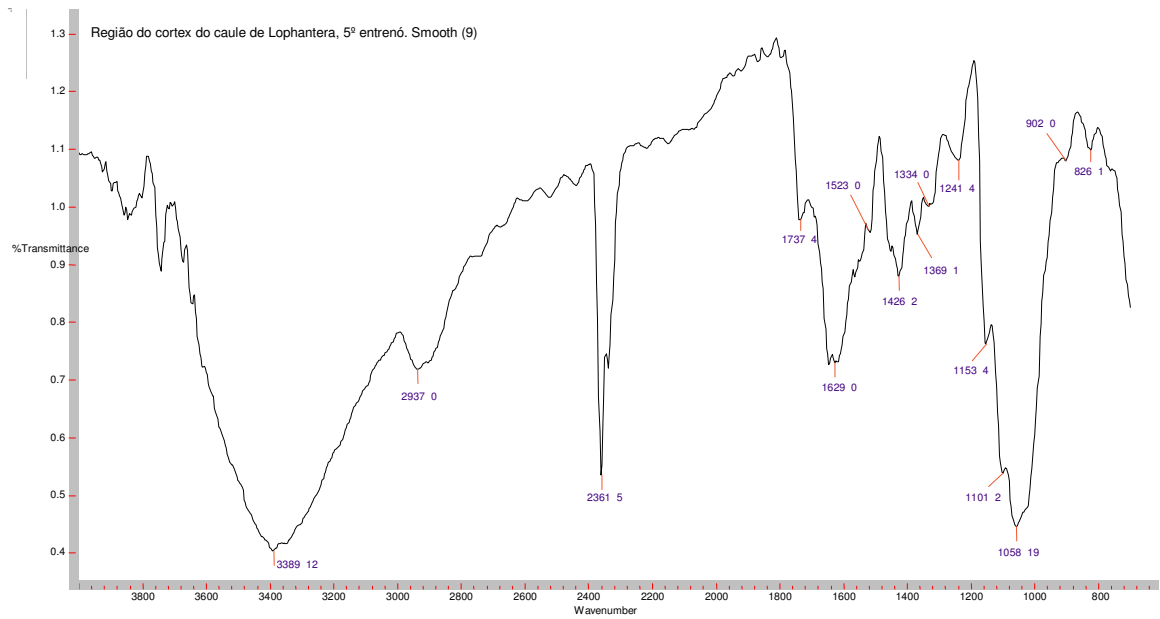
**Espectro 19:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 4º entrenó, região do xilema.



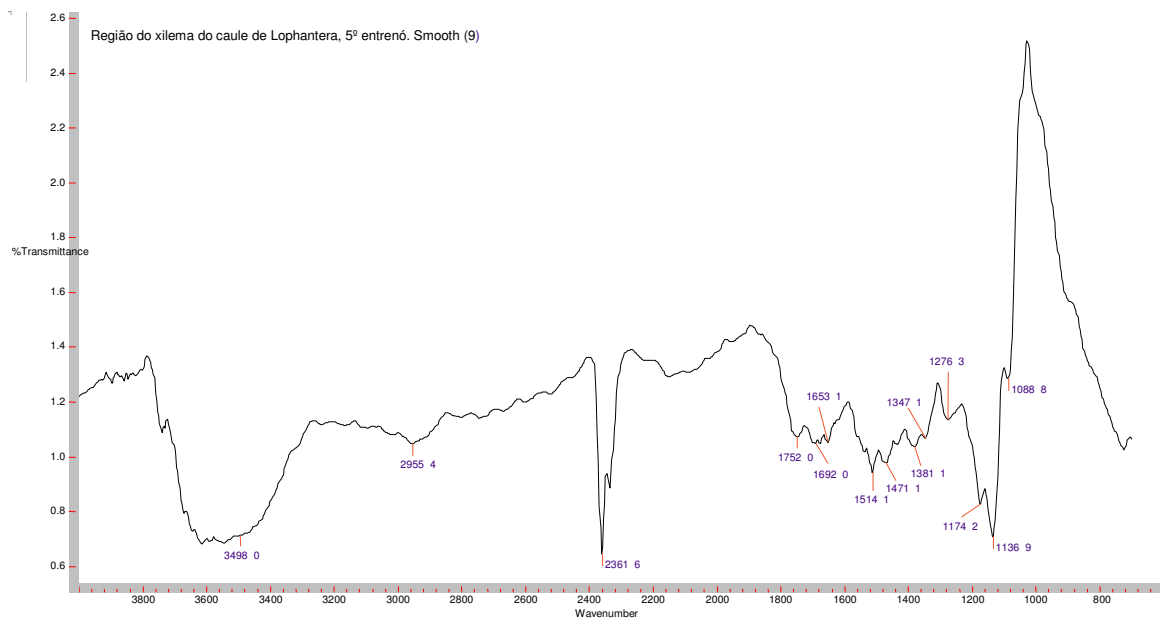
**Espectro 20:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 4º entrenó, região da medula.



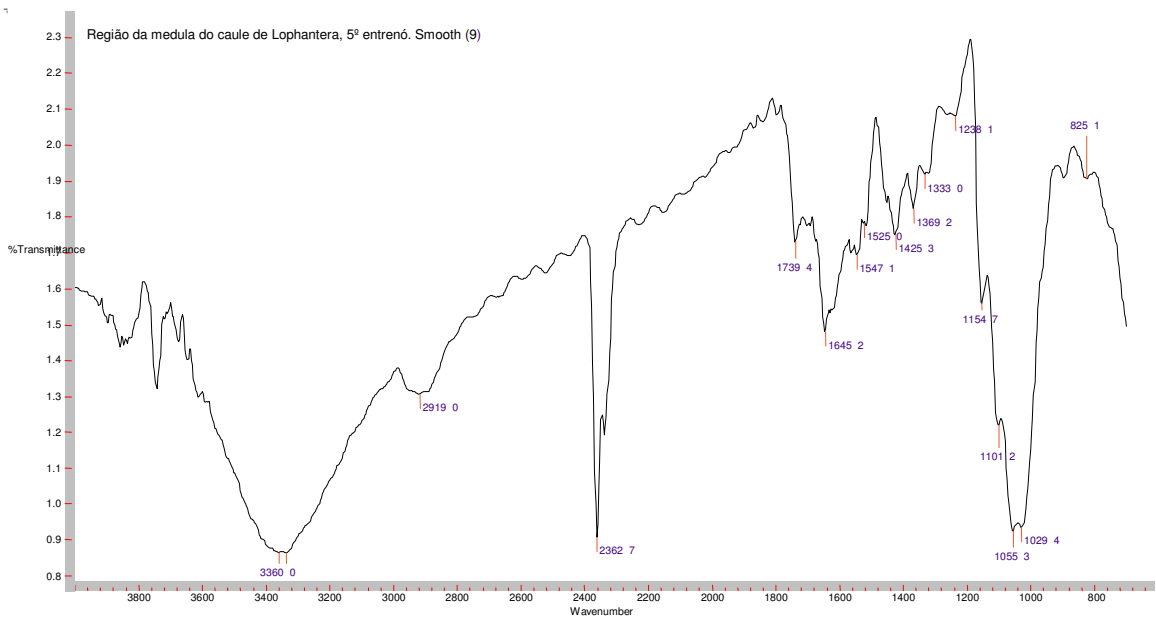
**Espectro 21:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 5º entrenó, região da periderme.



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

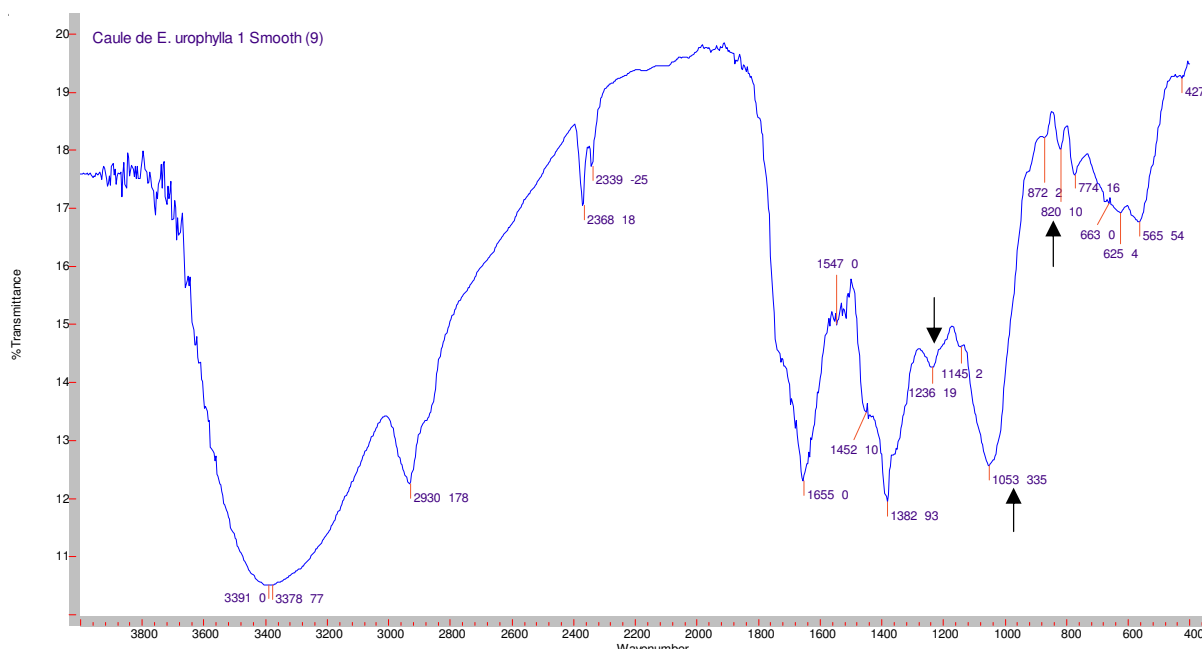


**Espectro 23:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 5<sup>o</sup> entrenó, região do xilema.



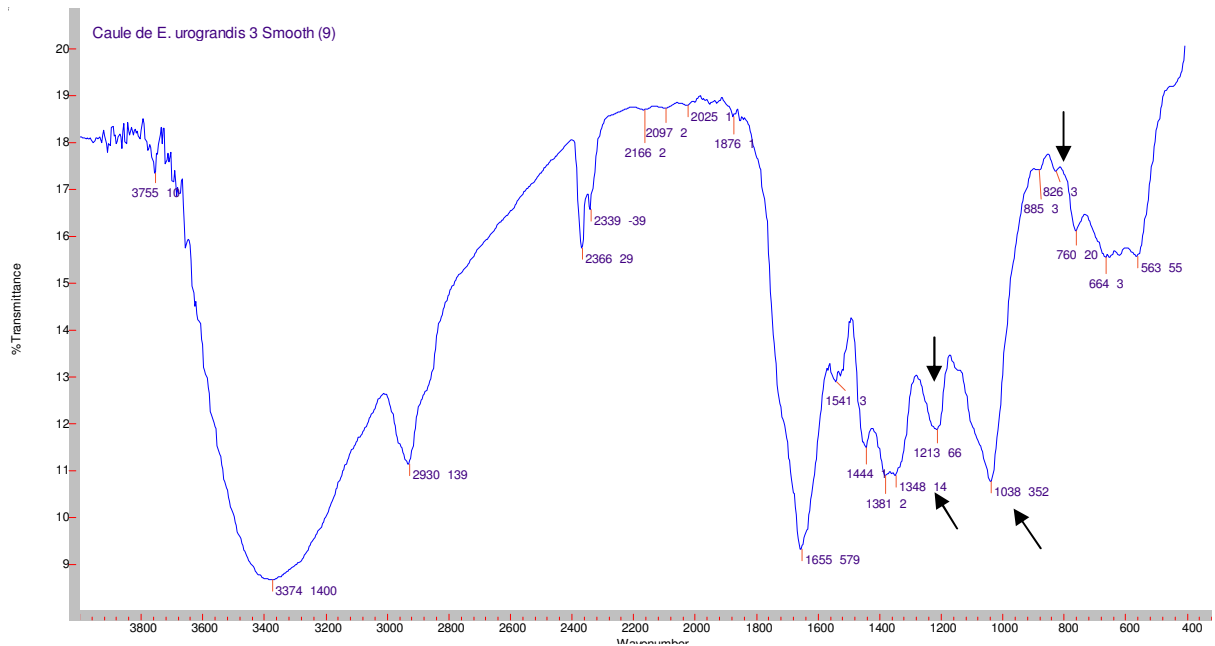
**Espectro 24:** Espectro de Infravermelho de seção transversal de caule de *L. lactescens*, 5º entrenó, região da medula.

**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 ( $\text{cm}^{-1}$ ) / distância de corrida 4000 – 400 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

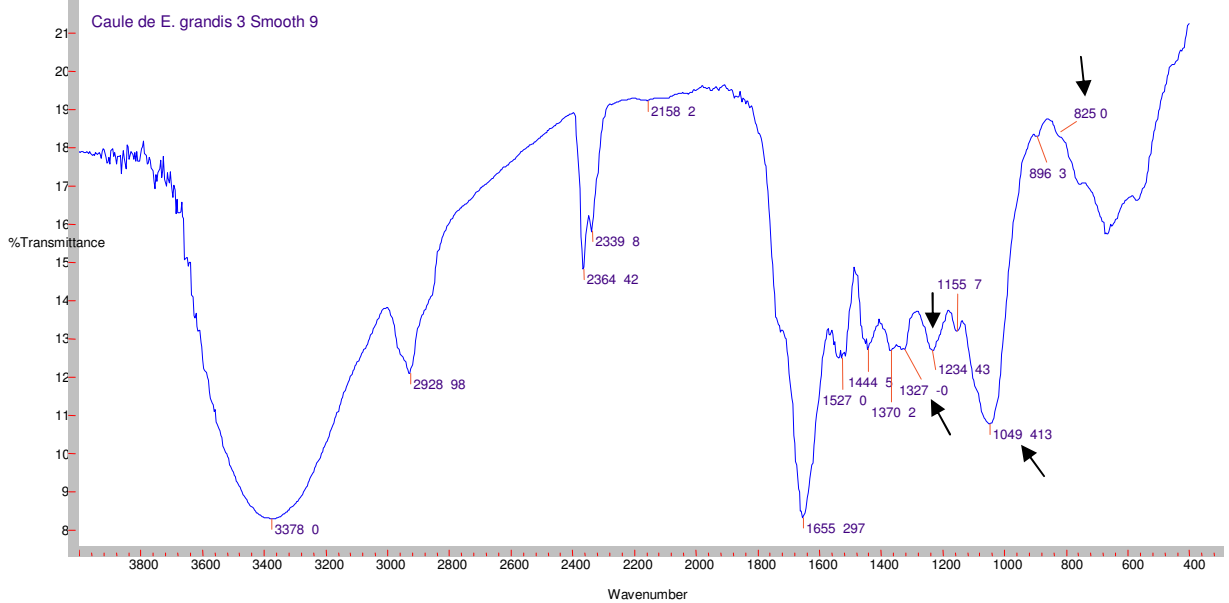


**Espectro 25:** Infravermelho de calo de explante caulinar de plantas de *E. urophylla*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).

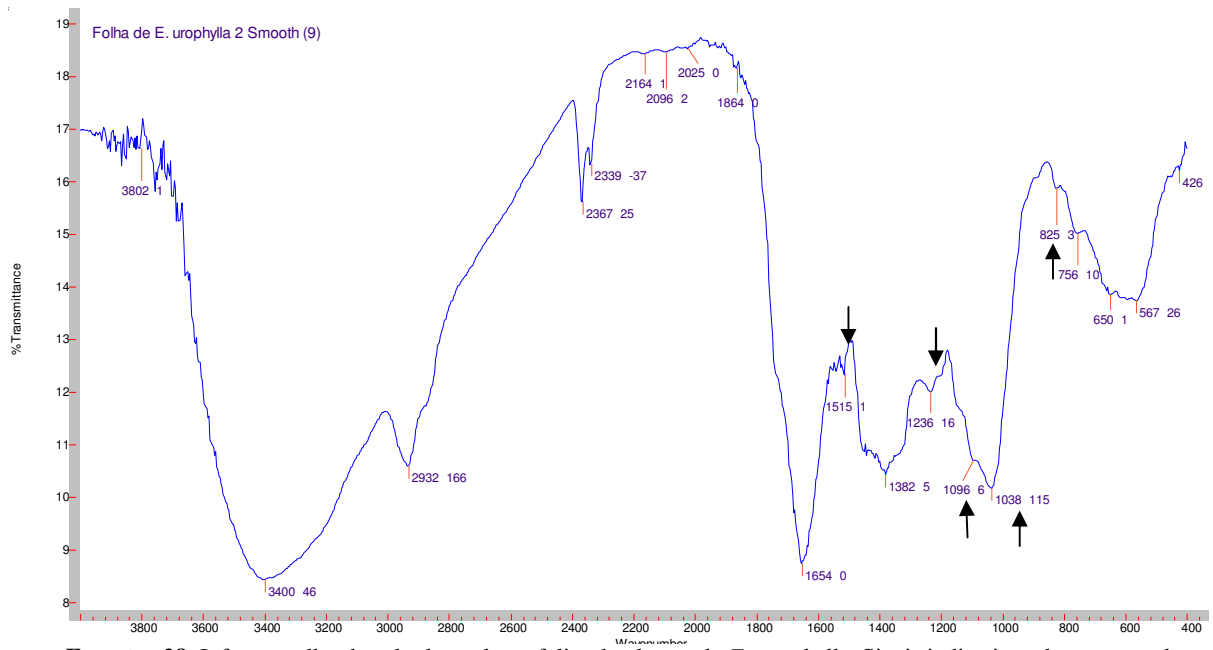




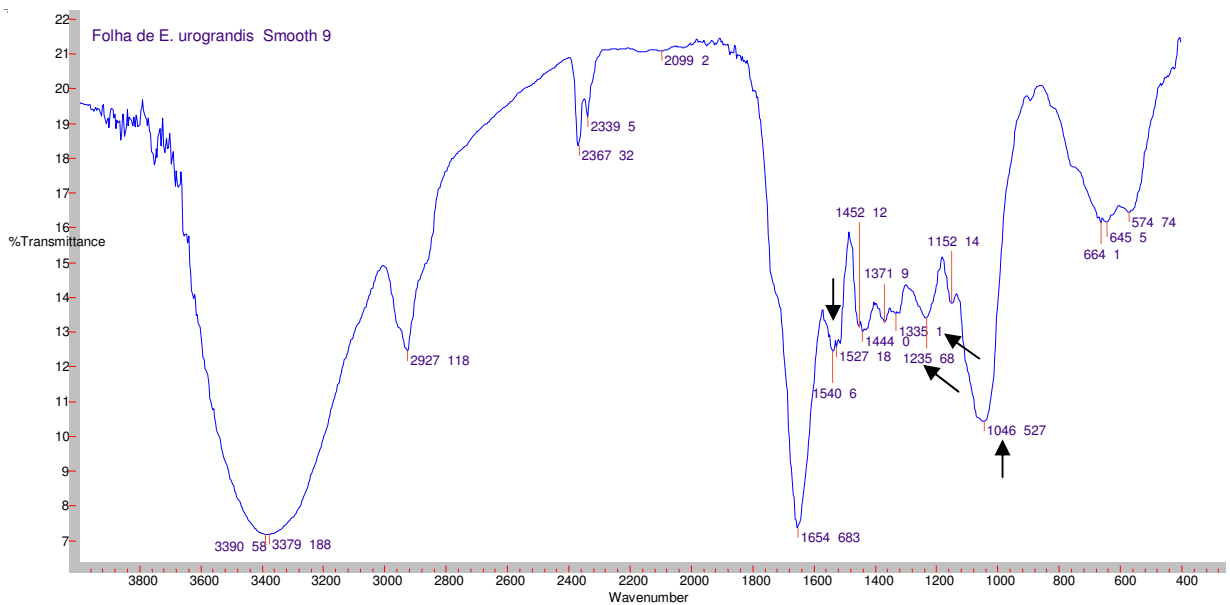
**Espectro 26:** Infravermelho de calo de explante caulinar de plantas de *E. urograndis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



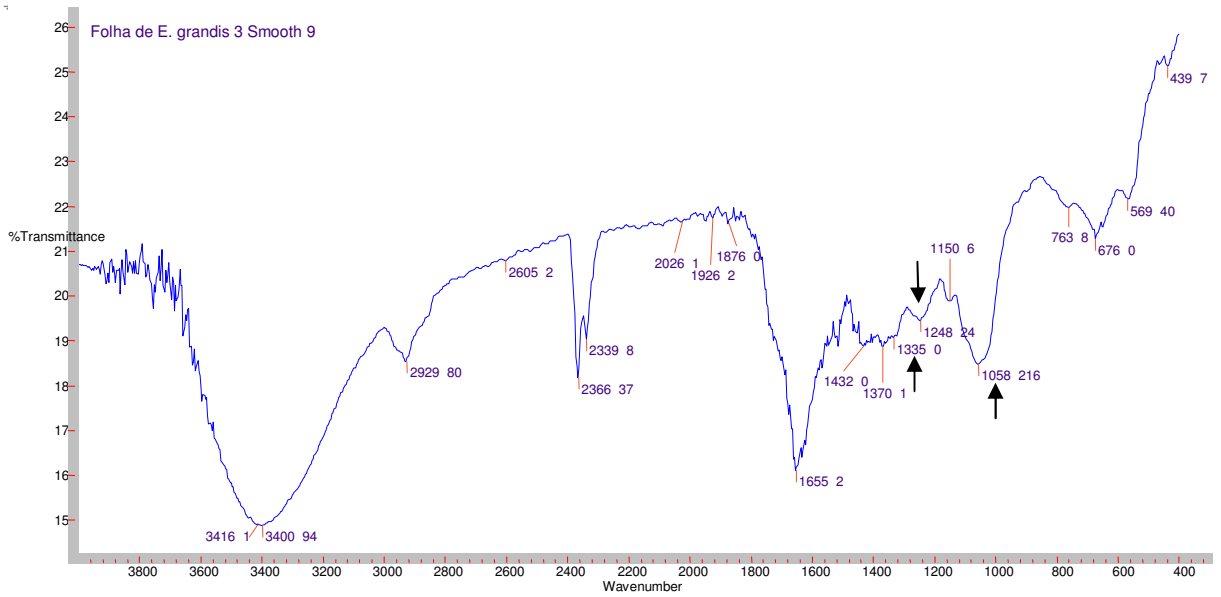
**Espectro 27:** Infravermelho de calo de explante caulinar de plantas de *E. grandis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



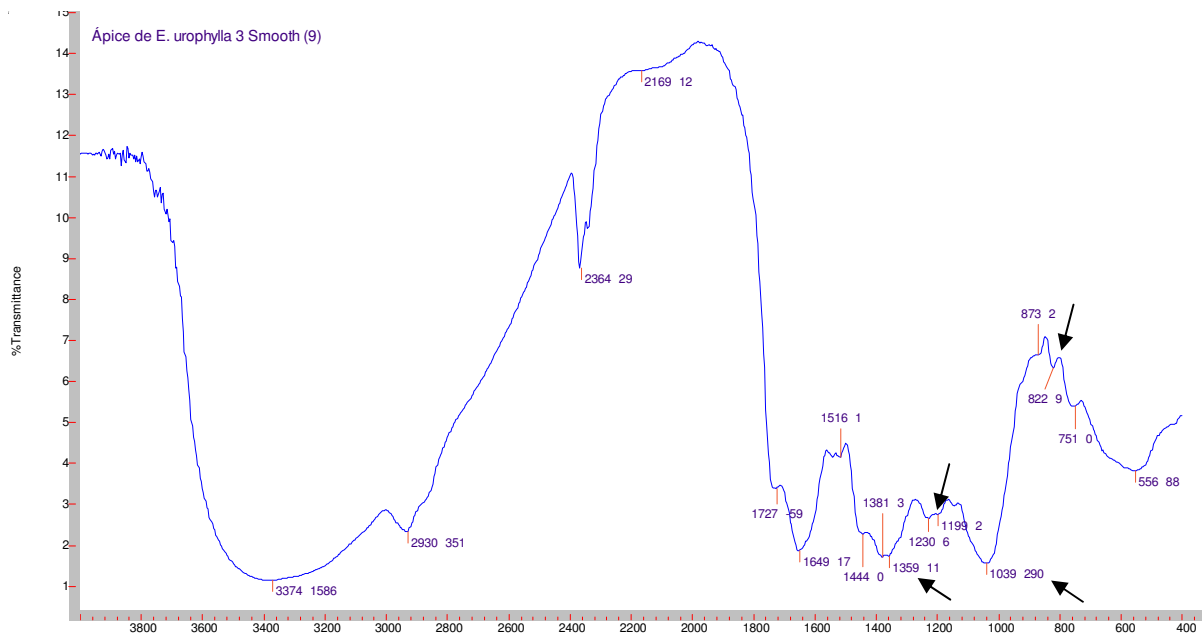
**Espectro 28:** Infravermelho de calo de explante foliar de plantas de *E. urophylla*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



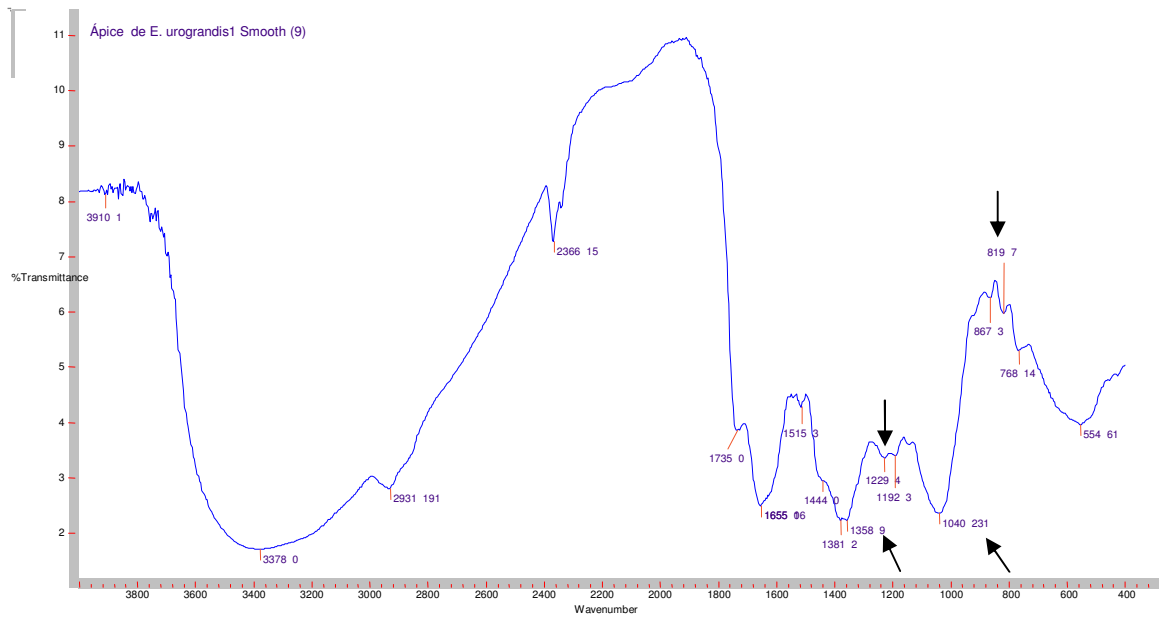
**Espectro 29:** Infravermelho de calo de explante foliar de plantas de *E. urograndis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



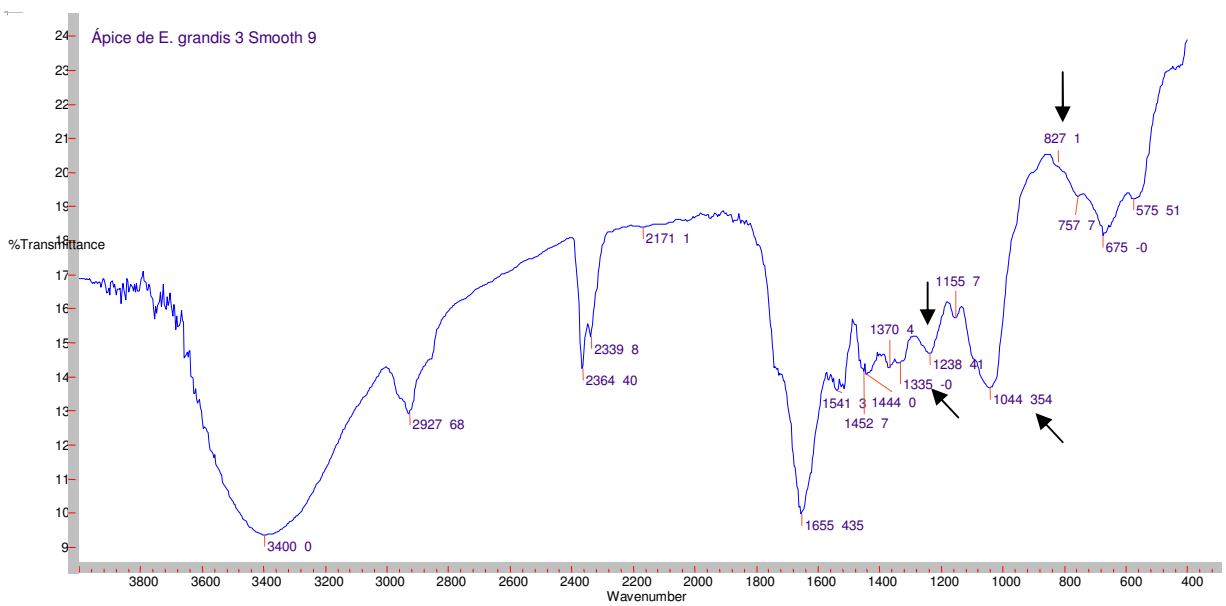
**Espectro 30:** Infravermelho de calo de explante foliar de plantas de *E. grandis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



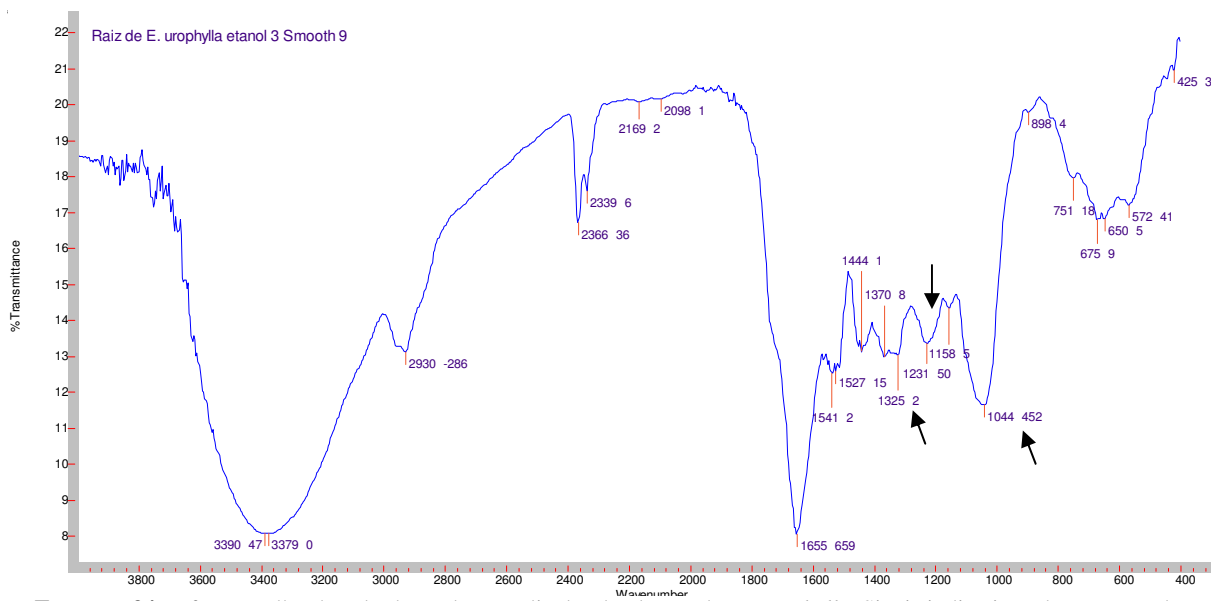
**Espectro 31:** Infravermelho de calo de explante apical de plantas de *E. urophylla*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



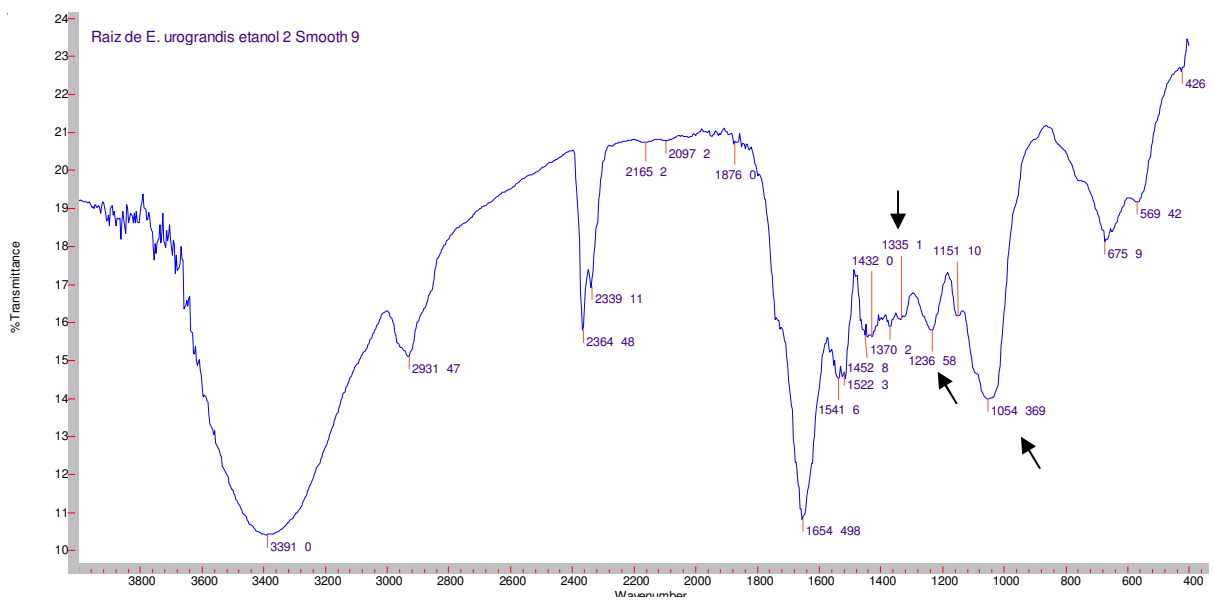
**Espectro 32:** Infravermelho de calo de explante apical de plantas de *E. urograndis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



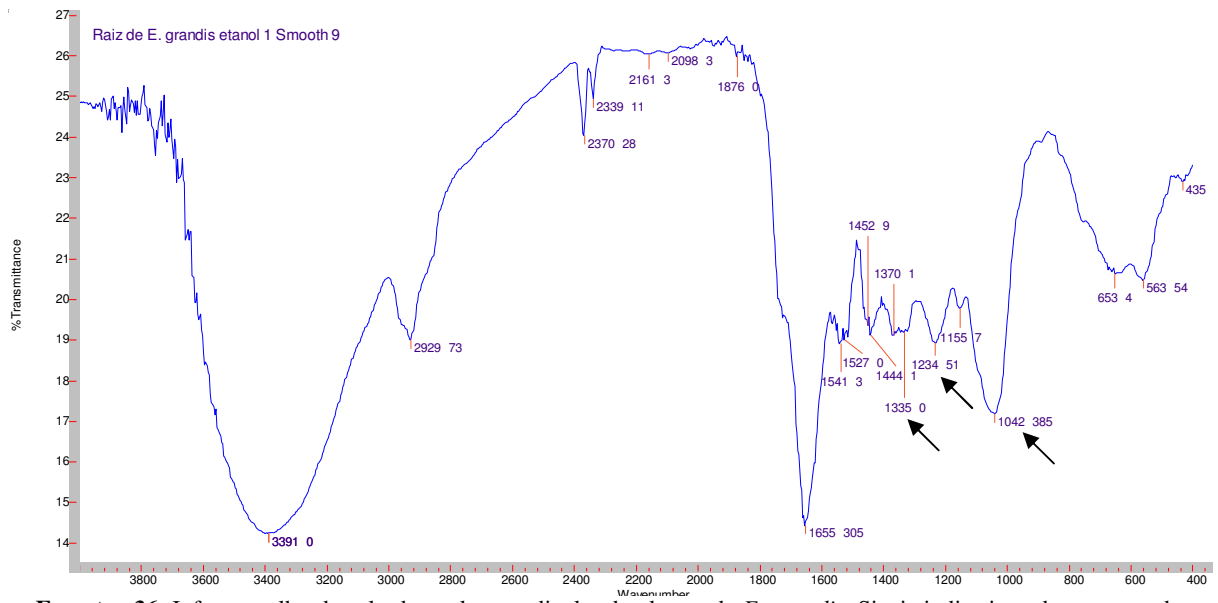
**Espectro 33:** Infravermelho de calo de explante apical de plantas de *E. grandis*. Sinais indicativos de presença de lignina (→).



**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 (→).

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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