

LIGNIFICAÇÃO EM CALO DE *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden

LIGNIFICATION IN CALLUS OF *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden

Hulda Rocha e Silva¹ Heber dos Santos Abreu² Desiane Amaral de Deus³

RESUMO

Este estudo objetivou verificar o processo de lignificação em calos de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, desenvolvidos em meio Murashige e Skoog (1962) (MS), com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento: ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) (4,53; 11,32; 22,65; 45,30; 90,60 µM) e cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina) (0; 2,32; 4,65; 11,62; 23,25 µM). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 (cinco) repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 5 (cinco) frascos, contendo cada um três segmentos clonais, perfazendo-se 25 tratamentos. Os resultados foram estatisticamente avaliados e indicaram que concentrações mais altas de lignina foram associadas a uma concentração maior de 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) em relação à cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina) e que o 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), quando usado na ausência de cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina), em concentrações mais baixas, pode estimular de forma mais intensa a lignificação, do que quando usado na ausência de cinetina em concentrações mais altas. Os resultados indicaram, ainda, que calos muito oxidados e menos friáveis, estão relacionados a tratamentos onde a concentração de lignina é de mediana a alta.

Palavras-chave: calo; cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina); ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); lignificação.

ABSTRACT

This study aimed to verify the process of lignification in callus of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden developed amid Murashige and Skoog, 1962 (MS) with different concentrations of growth regulators: 2.4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (4.53, 11.32, 22.65, 45, 30; 90.60 mM) and kinetin (KIN-6-furfurilaminopurina) (0, 2.32, 4.65, 11.62, 23.25 mM). The experimental design was completely randomized to five replicates, being each experimental unit consisted of five bottles, containing three segments clonal each one, adding up to 25 treatments. The results were statistically evaluated and indicated that higher concentrations of lignin were associated with a higher concentration of 2.4-D and kinetin on the 2.4-D, when used in the absence of kinetin, at lower concentrations, may stimulate a more intense lignification than when used in the absence of kinetin in higher concentrations. The results indicated also that the calli which are much less oxidized and friable, are related to treatments where the concentration of lignin is of medium to high.

Keywords: callus; kinetin (KIN-6-furfurilaminopurina); 2.4-dichlorophenoxyacetic acid(2.4-D); lignification.

1 Engenheira Florestal, Mestre em Ciências Ambientais e Florestais, Instituto de Florestas, Departamento de Produtos Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 07, CEP 23890-000, Seropédica (RJ). h.hulda@hotmail.com.

2 Engenheiro Florestal, Dr., Professor do Curso de Engenharia Florestal, Instituto de Florestas, Departamento de Produtos Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 07, CEP 23890-000, Seropédica (RJ). Abreu@ufrj.br.

3 Engenheira Florestal, Doutoranda em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais, Universidade Federal do Paraná, Av. Pref. Lothário Meissner, 900, Campus III, Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba (PR). deisefflora@hotmail.com.

Recebido para publicação em 6/04/2009 e aceito em 21/01/2012

INTRODUÇÃO

O processo de formação da madeira é bastante complexo e envolve muitos eventos biológicos, que são coordenados por uma série de fatores endógenos (fito-hormônios), exógenos (fotoperíodo e temperatura) e pela interação de ambos (ANDRADE et al., 2006) passando por vários eventos bioquímicos, entre os quais se destaca a lignificação (HIGUCHI, 1980). O processo de lignificação compreende estágios diferentes, abrangendo a formação, o transporte e a polimerização de monolignóis. Inicialmente, este processo é altamente mediado por enzimas nos compartimentos citoplasmáticos (MONTEIRO et al., 2004).

A lignina é detectada em maior quantidade na parede secundária das células, sobretudo das fibras, vasos e traqueídeos do xilema, assim como também, em menor quantidade, no periderma, associado à suberina onde age como uma barreira contra patógenos (GUIMARÃES et al., 2001).

A cultura de células e tecidos surge como uma ferramenta importante para contribuir no entendimento da influência dos fatores endógenos e exógenos no processo de formação da madeira. Entre os meios de cultura utilizados, o meio MS (MURASHIGE e 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 (COSTA, 2006).

Além da composição dos meios de cultura, as condições físicas de incubação, como a temperatura, a umidade, a qualidade, a duração do período de luz e o próprio genótipo do material vegetal cultivado, influem sobre a morfogênese dos tecidos vegetais (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). Os reguladores de crescimento como indutores exógenos da lignificação podem ser testados durante a formação de calos *in vitro*. Em cultura de células, 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). O meio nutritivo deve estar de acordo com a exigência da planta, porém, o principal fator da multiplicação é a presença dos reguladores de crescimento vegetal, particularmente citocininas e auxinas, em doses ideais (CORDEIRO et al., 2004 apud GASPARET

al., 1996).

A escolha do fitorregulador a ser utilizado na cultura *in vitro*, dependerá do tipo de morfogênese desejada, de seu nível endógeno no explante no momento da excisão, da capacidade do tecido sintetizar o regulador durante o período de cultura e da possível interação entre os hormônios vegetais endógenos e aqueles adicionados ao meio (SANTOS, 2003). Estas substâncias são facilmente transportadas para células responsivas, aquelas que possuem sensibilidade, ou seja, possuem competência para responder a um sinal específico (TREWAVAS, 1981), onde estão diretamente envolvidas com o controle da atividade gênica em nível de transcrição e de tradução, em um grande número de processos (GUERRA et al., 1999).

As citocininas são uma das classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos (CALDAS et al., 1990), por possuírem grande capacidade de promover divisão celular atuando no ciclo celular, participando no processo de diferenciação celular e alongamento, principalmente quando interagem com as auxinas (KLAHOLD et al., 2006).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar, em ambiente controlado, a influência dos reguladores vegetais cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina) e 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) na intensidade de lignificação de células de calos de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden), e desenvolver protocolos para cultura de calos desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Madeira do Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As sementes para a produção dos explantes foram adquiridas junto ao IPEF/ESALQ/USP, coletadas no Talhão A11, A21 do IPEF na cidade de Anhembi, SP. As sementes de *E. grandis* foram desinfestadas e inoculadas no meio MS em capela de fluxo laminar. Após 21 dias da inoculação das sementes, em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, segmentos apicais foram isolados e inoculados em meio MS, adicionado de $5,71 \mu\text{M}$ de ácido naftalenoacético (ANA). Foram utilizados 10 recipientes com três explantes cada. Os explantes foram mantidos em ausência de luz à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por 60 dias, sendo subcultivados a cada duas semanas. Após esse período o

calo mais desenvolvido foi repicado em fragmentos de 0,3 cm, para multiplicação dos explantes (clones), sendo então redistribuídos em meio de cultura renovado; um fragmento por recipiente, permanecendo no escuro. Foram efetuadas mais três subculturas, espaçadas a cada duas semanas. A quarta subcultura consistiu da inoculação de três fragmentos clonais por recipiente contendo meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (4,53; 11,32; 22,65; 45,30; 90,60 μM) e cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina) (0; 2,32; 4,65; 11,62; 23,25 μM), perfazendo-se 25 tratamentos. Os fragmentos clonais permaneceram em ausência de luz, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo subculturados periodicamente a cada duas semanas, em novo meio de cultura renovado. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 (cinco) repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 5 (cinco) frascos próprios para indução de calos em meio de cultura, contendo três segmentos clonais cada. As avaliações de concentração de lignina foram realizadas após 60 dias de cultivo. Para análise dos dados, fez-se uso das equações de regressão utilizando o programa estatístico SAEG (2007).

A determinação de lignina foi realizada de acordo com o método de Bruce e West (1989). Assim, 1g de calo fresco de cada amostra foi pesado e triturado em 25 ml de etanol 80% com moflariz, depois o material foi centrifugado a 20.000 rpm, por 20 minutos a 25°C em uma centrífuga (*high speed*) de marca Sigma, transferido para placas de petri e seco à temperatura ambiente. Depois do material seco, pesou-se 50 mg de cada amostra e transferiu-se para recipientes de vidro, com tampa e tamanho adequado para serem levados à centrífuga, onde foram adicionados 5 ml de ácido clorídrico (HCL) 2N e 0,5 ml de ácido tioglicólico. Os recipientes foram fechados e aquecidos em uma estufa a 100°C por quatro horas. Em seguida o material foi esfriado e depois centrifugado a 30.000 rpm por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o material depositado no fundo dos tubos foi lavado uma vez com 5 ml de água biodesionizada. Este material foi suspenso em 5 ml de NaOH 0,5 N e agitado lentamente a 25°C por 18 horas em um *shaker* para eliminação do tioglicolato de lignina. Após as 18 horas, as amostras foram novamente centrifugadas a 30.000 rpm por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio teste plásticos com tampa, onde foi adicio-

nado 1 ml de ácido clorídrico (HCL) 2N. O material ficou em repouso por 4 horas a 4°C , e depois foi centrifugado a 30.000 rpm por 20 minutos. O material sólido foi dissolvido em 10 ml de NaOH 0,5N. A determinação dos teores de lignina foi realizada utilizando um espectrômetro de ultra violeta em comprimento de ondas de 280 nm. O aparelho utilizado para realizar as análises no ultravioleta foi o UV mini 1240 –UV-Vis *spectrophotometer* – Shimadzu.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o número de calos desenvolvidos por recipiente, os resultados demonstraram que não houve diferença significativa a 5% de probabilidade, para as diferentes concentrações de reguladores de crescimento testadas nos protocolos. Todos os tratamentos desenvolveram três calos por recipiente. Durante a etapa de determinação dos teores de lignina, foram perdidos 7 tratamentos em decorrência de pressão e posterior rachadura nos tubos de ensaio teste plásticos com tampa durante o processo de centrifugação. Os tratamentos perdidos foram: T3, T6, T21, T22, T23, T24, T25.

Uma curva de calibração foi elaborada com amostra padrão de lignina de Bjorkman, e por meio da curva de calibração obteve-se a equação: $\text{ABS} = \text{K1} \cdot \text{C} + \text{K0}$, onde: **ABS**= absorvância **1**= 0, 005094, **K0**=0, 023669, **C**= Concentração de lignina, que possibilitou o cálculo da quantidade de lignina a partir da absorvância de cada amostra (Tabela 1) em mg/L.

A análise de variância demonstrou que os resultados foram significativos a 1% (Tabela 2).

TABELA 1: Absorvância média por tratamento.

TABLE 1: Mean absorbance per treatment.

Tratamento	Absorvância média	Tratamento	Absorvância média
1	0,7478	12	0,4902
2	0,6888	13	0,3932
4	0,632	14	0,4954
5	0,6452	15	0,385
7	0,7388	16	0,513
8	0,8046	17	0,6034
9	0,3788	18	0,4222
10	0,741	19	0,6314
11	0,478	20	0,6322

TABELA 2: Resumo da análise da variância dos dados obtidos em função da concentração de lignina por tratamento.

TABLE 2: Summary of analysis of data variance obtained according to lignin concentration per treatment.

Análise da variância		
F.V.	G.L.	Quadrado Médio
bTratamento	17	0.5771168E-01**
Resíduo	72	0.1806302E-02
C.V. ^{exp} = 2,097		

Em que: ** significativo a 1%

A Tabela 3 compara os resultados para teores de lignina pelo teste de médias Duncan a 5% de probabilidade, ordenados os resultados da maior média para a menor, com a finalidade de facilitar a visualização da influência de cada tratamento no teor de lignificação.

O tratamento que apresentou maior concentração média de lignina em mg/L foi o T8, diferindo dos outros tratamentos a 5% de probabilidade. Esse tratamento possui um balanço favorável ao regulador de crescimento 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), numa proporção de 11,35 µM de 2,4-D/4,65 µM de cinetina, enquanto que o tratamento que apresentou menor concentração média de lignina por tratamento em mg/L foi o T9, que possui um balanço equilibrado entre o 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) e a cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina). Sousa (2007), testando a influência do 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), na lignificação de células em suspensão de

Eucalyptus urophylla, encontrou seus níveis mais altos de lignificação quando usou 0 µM de 2,4-D/46,5 µM de cinetina, já os níveis mais baixos de lignificação foram encontrados com 9,06 µM de 2,4-D/46,5 µM de cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina). Os dois resultados são antagônicos aos encontrados neste estudo, pois as concentrações mais altas de lignina estão associadas a uma quantidade maior de 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) em relação à cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina), e as mais baixas ao invés de um balanço favorável a cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina), caracterizam-se por um balanço equilibrado. Karkonen (2001), também sugere balanços favoráveis a cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina) (0,05-0,5 µM de 2,4-D/2,5 µM de cinetina) na indução de lignina extracelular em cultura de células em suspensão.

A situação contrária ao T8 ocorre no T4, onde a proporção de 2,4-D/cinetina é inversa, e a concentração média de lignina para este tratamento foi intermediária. A proporção dos hormônios no T8 indica um favorecimento da lignificação de forma mais intensa na espécie *E. grandis* dentre os tratamentos testados. Pereira (2005), também estudando influência de reguladores vegetais na lignificação de *E. grandis*, porém, em aplicações realizadas direto na planta, e não a nível celular, como é o caso deste trabalho, observou que tanto o ácido giberélico e a 6 - benzilaminopurina isolados, quanto combinados entre si, apresentaram diminuição nos níveis de lignificação em relação à testemunha. Simola et al. (1992) encontraram um resultado semelhante ao usarem baixas quantidades de 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) em células de

TABELA 3: Teste de comparação de médias Duncan a 5% de probabilidade para concentração de lignina, ordenado da maior para a menor média.

TABLE 3: Comparison test of Duncan's averages at 5% of probability to lignin concentration, ordered from the highest to the lowest average.

Tratamentos	Repetições	Média/Tratamento	Tratamentos	Repetições	Média/Tratamento
8	5	153,672 ^a	17	5	113,832 ^c
1	5	142,152 ^{ab}	16	5	96,0774 ^d
7	5	140,928 ^{ab}	18	5	95,922 ^d
10	5	140,858 ^{ab}	14	5	92,6504 ^d
2	5	130,2282 ^{bc}	12	5	91,5682 ^d
5	5	122,01 ^c	11	5	90,4458 ^d
19	5	119,9144 ^c	13	5	72,3752 ^e
20	5	119,479 ^c	15	5	71,3384 ^e
4	5	114,672 ^c	9	5	69,7154 ^e

Nota: Tratamentos com letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Picea abies, quando a concentração desse hormônio variou de 0-0,5 μM , houve um incremento significativo no teor de lignina das células. Entretanto, os mesmos autores acharam resultados ainda melhores quanto à lignificação em *Picea abies*, quando usaram a proporção 0,05 μM de 2,4-D / 2,5 μM de cinetina.

Quando o balanço hormonal foi favorável a cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina) (T10, T5 e T4), a concentração de lignina por média de tratamento foi maior. Nos tratamentos onde as proporções de 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) foram as maiores entre todos os tratamentos (T17, T18 e T12), as concentrações de lignina em mg/L por média de tratamento podem ser consideradas de intermediárias a baixas. Um resultado diferente foi encontrado por Monteiro (2005), que também testou a influência do 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), combinado com ácido jasmônico na lignificação, estudando a espécie *Eucalyptus urophylla*. Em combinações com concentrações de 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) superiores ao ácido jasmônico houve um incremento alto na percentagem de lignina em relação à testemunha. Isto mostra que reguladores vegetais agem de forma diversa, dependendo da espécie em estudo, da concentração e do tipo do outro regulador com o qual esteja interagindo.

Nos tratamentos onde está presente apenas o regulador de crescimento 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) (T1, T16 e T11), observa-se uma concentração muito maior de lignina, enquanto no T16 e no T11, apesar de a concentração do 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) dobrar de um tratamento para o outro, o resultado da concentração de lignina por média de tratamento não difere estatisticamente um do outro. Este resultado indica que o 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), quando usado na ausência de cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina), em concentrações mais baixas, pode estimular de forma mais intensa a lignificação, do que quando usado na ausência de cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina) em concentrações mais altas. Monteiro (2005), também testou 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) de forma isolada em *E. urophylla*, e os resultados encontrados foram, mais uma vez, diferentes dos encontrados neste estudo. Quando testada uma quantidade relativamente mais baixa de 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), a quantidade de lignina ficou bem abaixo da testemunha (0 μM de ácido jasmônico/0 μM de 2,4-D) e quando a quantidade de 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) dobrou, a percentagem de lignina aumentou

significativamente.

Com os resultados obtidos foi possível verificar, uma relação entre a friabilidade dos calos nos diversos tratamentos e o teor de lignina por tratamento. Foi observado que os calos mais friáveis, claros e de fácil desagregação, pertencem aos tratamentos onde as concentrações de lignina por média de tratamento foram as mais baixas. Esses tratamentos possuem uma relação 2,4-D/cinetina equilibrada, quando comparadas aos outros tratamentos. Calos muito oxidados e menos friáveis estão relacionados a tratamentos onde a concentração média de lignina é de mediana a alta. Nestes tratamentos, a relação 2,4-D/cinetina é favorável ao 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), e em alguns casos em concentrações muito mais altas. Quando a relação entre os hormônios está favorável a cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina), as concentrações de lignina também são altas e os calos oxidados e endurecidos. Ao que tudo indica, as concentrações de lignina por média de tratamento são diretamente proporcionais ao nível de oxidação dos calos e vice-versa.

Sato et al. (2004) apud George e Sherrington (1984), sugerem que entre as substâncias fenólicas, responsáveis pela oxidação dos tecidos estão os precursores da lignina, indicando que de fato a maior intensidade de oxidação fenólica implica em maiores concentrações de lignina por média de tratamento em mg/L. Andrade et al. (2000) relatam que em plantas lenhosas acumulam-se polifenóis e produtos de oxidação, dentre os quais se encontra a lignina.

Os resultados mostram que células em níveis de calo hospedam um potencial bioquímico capaz de estabilizar o efeito oxidativo do tecido através da formação da lignina e que as variações dos tipos e concentrações dos reguladores de crescimento desencadeiam alterações no processo metabólico que levam ao processo de lignificação.

CONCLUSÕES

A cultura de tecido constitui-se como mecanismo essencial para o estudo de *E. grandis in vitro*. O Diclorofenoxiacético (2,4-D) e a cinetina (KIN-6-furfurilaminopurina) apresentam-se de forma determinante no processo de lignificação de células para a espécie estudada. Os protocolos desenvolvidos neste estudo podem ser muito úteis para a área de biotecnologia vegetal, em especial para temas desenvolvidos com espécies lenhosas; pois, este estudo abre caminho para um maior aprofunda-

mento sobre a influência de reguladores vegetais no processo de lignificação em *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao Departamento de Produtos Florestais do curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo apoio prestado durante todo o desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A.; CELEDÓN, P. A. F.; LABATE, C. A. O Proteoma da Madeira. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.9, n. 36, jan./jun. 2006.
- ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urendeuva* Fr. All). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan./mar. 2000.
- 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.
- CALDAS, L. S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. ed. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTB/ EMBRAPA-CNPQ, 1990. 433 p.
- CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Efeito de bap sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *schizolobium amazonicum* huber ex ducke (paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 01, p.118-124, 2004.
- COSTA, A. S. **Sustentabilidade da produção de Alecrimpimenta (*Lippia sidoides* Cham.): micropropagação visando à conservação *in vitro***. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)- Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.
- GASPAR, T. et al. Plant hormones and plant growth regulator in plant tissue culture In Vitro Cellular Development Biology – **Plant**, v. 32, p. 272-289, 1996.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.
- GUERRA, M P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. 1999, v.2. p. 533-568.
- GUIMARÃES, C. S.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2001.
- HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. In: KIRK, T. K; HIGUCHI, T.; CHANG, H. (Ed). **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications**. Boca Raton, 1980. v. I, p. 02.
- KÄRKÖNEN, A. **Plant tissue cultures as models for tree physiology:somatic embryogenesis of *Tilia cordata* and lignin biosynthesis in *Picea abies* suspension cultures as case studies**. 2001. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- University of Helsinki, Helsinki, 2001.
- KLAHOLD, C.A. et al. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Ciência Agronômica.**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 179-185, Apr./June, 2006.
- MONTEIRO, M. B. O. **Modulação do processo de lignificação por aplicação de ácido jasmônico e ácido 2,4 diclofenociacético em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia vegetal)- Departamento de Produtos Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S. Bioquímica da lignificação. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 11, n. 2, p. 48 - 57 ago./dez. 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PEREIRA, R.P.W. **Atenuação do processo de lignificação em *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) por GA3 e BAP**. 2005. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)- Departamento de Produtos Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.
- SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**. Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.
- SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Ed UFRGS, 2003. p. 415-444.
- SATO, A.Y. et al. Controle de contaminação e

- oxidação na micropropagação do pau d'alho (*Gallesia gorazema* moq.). **Agropecuária Técnica**, v. 25, n. 2, p. 65-70, 2004.
- SILVA, L.C. et al. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 405-408, out/dez, 2006.
- SIMOLA, L.K.; LEMMETYINEN, J.; SANTANEN, A. Lignin release and photomixotrophism in suspension cultures of *Picea abies*. **Physiol. Plant**, Copenhagen, v. 84, p. 374-379, 1992.
- SOUSA, K.C.A. **Atenuação do processo de lignificação por 2,4- D em células de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake em suspensão**. 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)- Departamento de Produtos Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.
- TREWAVAS, A. How do plant growth substances work? **Pl. Cell and Env.**, v. 4, p. 203-228, 1981.