

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

DISSERTAÇÃO

**Morfologia e lignificação de calos de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden)
sob efeito de cinetina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético**

Hulda Rocha e Silva

2007



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

**MORFOLOGIA E LIGNIFICAÇÃO DE CALOS DE *EUCALYPTUS*
GRANDIS (HILL EX MAIDEN) SOB EFEITO DE CINETINA E
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO**

HULDA ROCHA E SILVA

Sob a Orientação do Professor
Heber dos Santos Abreu

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

Seropédica, RJ
Setembro de 2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e ao Mestre Jesus, pela apoio e amor incondicional, sempre me fortalecendo nos momentos de desânimo e angústia.

Aos meus pais e família, pelo carinho e incentivo de sempre, em todas as etapas da minha vida.

Ao meu namorado e grande amigo Bruno Carvalho e sua família, pelo amor e ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Heber dos Santos Abreu, por todos estes anos de orientação, e pela chance de subir mais este degrau.

Aos meus grandes amigos Julia, Henrique, Etiene, Sâmara e Alda pelo incentivo e palavras de conforto, sempre mostrando novas possibilidades, quando as coisas parecem não ter solução.

Aos meus grandes amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia da Madeira Deise, Kelly, Beatriz, Regina, Daniel e Bruno, pela ajuda e amizade que me dedicaram neste anos de convívio. Agradeço em especial, a amiga e bolsista do laboratório Deise, que acompanhou este trabalho do início ao fim, pessoa incrível, sem a qual não finalizaria este trabalho.

Ao professor Maeda, pela disposição e boa vontade em ajudar nas análises estatísticas e interpretação das mesmas.

Ao Professor Lelis, pela compreensão e paciência diante das circunstâncias em que se desenvolveu este trabalho.

Aos meus grandes amigos Itamar, Marília, Conceição e Leonardo pelo apoio e incentivo constantes para que eu finalizasse este trabalho.

Aos meus grandes amigos e colegas de trabalho Anida, Lucélia, Levi e Marcelo pelo apoio e compreensão nos momentos em que tive que me ausentar do trabalho para que fosse possível a conclusão deste curso de mestrado.

A CAPES pela bolsa que me foi concedida e FAPERJ pelo financiamento desta pesquisa.

E por fim, porém, não com menor importância, agradeço imensamente a esta Universidade maravilhosa que me recebeu e acolheu com tanto amor durante tantos anos. Me ensinou a ser e viver melhor, lugar sem o qual jamais teria aprendido tão bem a amar e respeitar meus semelhantes. MUITO OBRIGADA RURAL!!!!!!MINHA ETERNA RURAL!!!!!!

RESUMO

SILVA, Hulda Rocha. **Morfologia e lignificação de calos de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) sob efeito de cinetina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético.** 2007. 62f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Nesta pesquisa foi testada a influência dos reguladores de crescimento vegetal 2,4-D e cinetina na morfologia, desenvolvimento e intensidade de lignificação em células de calos de *Eucalyptus grandis*. A partir de explantes de plântulas de *E. grandis* germinadas *in vitro*, foram desenvolvidos calos. Estes calos foram submetidos a tratamentos contendo concentrações distintas de 2,4-D e cinetina, num total de 25 tratamentos com 5 repetições. Após 60 dias de cultivo, os calos foram analisados sob os seguintes aspectos: tamanho, nível da oxidação, número de calos desenvolvidos, número de calos rizogênicos e intensidade de lignificação. A oxidação foi mais intensa em balanços favoráveis tanto para a cinetina, quanto para o ácido 2,4-D, quando os balanços foram equilibrados surgiram calos friáveis. A formação de calos rizogênicos ocorreu de forma intensa na presença somente da 2,4-D (11.325 µM) e em concentrações altas ou em balanços favoráveis ao 2,4-D (11.325 µM 2,4-D /4.65 µM de cinetina). A lignificação das células dos calos ocorreu de forma mais intensa no tratamento com balanço 11.35 µM de 2,4-D/4,65 µM de cinetina. Um espectrofotômetro ultravioleta foi usado para determinação de lignina a 280 nm. Os espectros foram registrados em amostras tratadas previamente em ácido tioglicólico. Os resultados mostraram que calos tratados em 11,325 µM e 4,65 µM de cinetina tiveram os mais altos níveis de lignificação.

Palavras-chave: Ultravioleta, oxidação, lignina.

ABSTRACT

SILVA, Hulda Rocha. **Morphology and lignification in calli of *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) under effect of Kinetin e 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.** 2007. 62f. Dissertation (Master in Environment and Forest Science). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

The influence of the growth regulators (kinetin and 2,4-dichlorophenoxyacetic) was tested in relation to the morphology, development and intensity of lignification of *Eucalyptus grandis* calli. The calli were obtained from explants originated of the plants produced *in vitro*. Those calli were transferred to an experiment with 25 treatments in distinct combinations between kinetin and 2,4-D, with 5 repetitions for each treatment. After 60 days of calli culture all material were analyzed under the following aspects: size, level of oxidation, number of calli, number of rooted calli and lignification. The oxidation level was inversely proportional in agreement with the balances for kinetin and 2,4-D. On equals balanced conditions none oxidation was verified. Rooted calli occurred intensively in presence of 2,4-D (11.325 μM) only, and in high concentrations as well as in favorable balances to 2,4-D (11.325 μM /4.65 μM kinetin). Calli lignification was more intense in the treatment with 11.35 μM of 2,4-D/4.65 μM of kinetin. Ultraviolet spectrophotometer was used for lignin determination at 280 nm. The spectra were registered from samples treated previously with thioglycolic acid. The results showed that calli treated with balanced concentrations between 2,4-D and Kinetin (11.325 μM /4.65 μM), have the highest lignification levels.

Key words: Ultraviolet, oxidation, lignin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio MS modificado para germinação e desenvolvimento de plântulas de <i>E. grandis</i> (WATT et al., 1991).	17
Tabela 2. Meio MS modificado para formação de calos de <i>E. grandis</i> (WATT et al., 1991).	19
Tabela 3. Tratamentos obtidos pelas combinações de 2,4-D e cinetina testadas nos meios de cultura.	20
Tabela 4. Absorbância média por tratamento.	22
Tabela 5. Tratamentos que apresentaram calos de <i>E. grandis</i> com maior crescimento.	23
Tabela 6. Tratamentos que apresentaram calos de <i>E. grandis</i> com menor crescimento.	24
Tabela 7. Tratamentos que induziram formação de calos rizogênicos em <i>E. grandis</i> .	29
Tabela 8. Tratamentos testados evidenciando os tratamentos perdidos.	30
Tabela 9. Resumo da análise da variância dos dados obtidos em função da concentração de lignina por tratamento.	30
Tabela 10. Teste de comparação de médias Duncan a 5% de probabilidade para concentração de lignina, ordenado da maior para a menor média.	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Médias dos tamanhos dos calos nos diferentes tratamentos. Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%. 23
- Figura 2.** Análise da variável crescimento de calo nos diferentes tratamentos. (A) calos desenvolvidos nas concentrações dos tratamentos: T 21, T 19 e T 5, respectivamente. (B) calo formados em presença de T15, e (C) calos formados em presença de T16. (D) calos desenvolvidos em presença de T 21 e T 5; verificam-se ambos os tratamentos com três calos desenvolvidos. (E) calo formado em condição de T 24 e (F) comparação dos tamanhos de calos formados em condição de T 5 e T 15. 24
- Figura 3.** Análise da variável oxidação e friabilidade . (A) calo formado em presença de T 5. A coloração mais escura indica maior oxidação e menor friabilidade. (B) calo formado em presença de T4. (C) calo formado em presença de T19. (D) calo formado em presença de T15. Nota-se que, entre os tratamentos, este foi o que apresentou melhores resultados, com calos mais claros e mais friáveis. 27
- Figura 4.** Análise do nível de oxidação dos calos de *E. grandis*. Nível de oxidação variando de 1 a 5, (1) calo não oxidado, (3) calo parcialmente oxidado e (5) calo totalmente oxidado. 28
- Figura 5.** . Relação entre os tratamentos que induziram calos rizogênicos e número de calos rizogênicos por tratamento. 28
- Figura 6.** Característica dos calos (formação de raízes). (A) calo formado em condição de T6; (B) calo formado em condição de T8; e (C) calo formado em condição de T 16. As setas indicam a presença de raiz formada em cada tratamento. 29
- Figura 7.** Teste de comparação de médias Duncan a 5% de probabilidade para significação. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si. 31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 O eucalipto	2
2.2 Lignina	4
2.3 Cultura de Tecidos Vegetais	7
2.4 Hormônios Vegetais	10
2.4.1 Cinetina	12
2.4.2 2,4-D (Ácido diclofenociacético)	13
2.4.3 Interação Cinetina/2,4-D	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Delineamento experimental	16
3.2 Preparo do meio de cultura para germinação e desenvolvimento de plântulas de <i>E. grandis</i>	16
3.3 Desinfestação e inoculação das sementes	18
3.4 Preparo do meio de cultura para formação de calos	18
3.5 Cultura e sub-cultura de calos	19
3.6 Transferência dos calos para os diversos tratamentos	20
3.7 Determinação do teor de lignina	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Crescimento do calo para os diferentes tratamentos	22
4.2 Quantidade de calos formados para os diferentes tratamentos	25
4.3 Friabilidade e oxidação para os diferentes tratamentos	26
4.4 Quantidade de calos rizogênicos x tratamentos	28
4.5 Teor de lignina para os diferentes tratamentos	29
4.6 Tamanho dos calos e Lignificação	33
4.7 Friabilidade e oxidação para Lignificação	34

5 CONCLUSÕES	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	36
8 ANEXOS	46
Anexo I- Análises estatísticas para concentração de lignina por tratamento	47
Anexo II- Análises estatísticas para tamanho dos calos nos diferentes tratamentos	54

1 INTRODUÇÃO

Espécies vegetais têm sido cada vez mais estudadas, numa busca constante por cadeias produtivas eficientes com produtos de alta qualidade, além da necessidade de trazerem o rótulo da sustentabilidade ambiental. É neste contexto que entra a biotecnologia vegetal, pois se trata de um conjunto de técnicas que visam também otimizar processos produtivos e promover, simultaneamente, situações menos agressivas ambientalmente.

Desta forma, biotecnologias apropriadas seriam aquelas que contribuem com o desenvolvimento sustentável por: a) serem tecnicamente factíveis no atual contexto de desenvolvimento técnico-científico do país; b) proporcionarem benefícios mensuráveis aos destinatários; c) serem ambientalmente seguras, sócio-economicamente e culturalmente aceitáveis no atual estágio de desenvolvimento do país (GUERRA & NODARI, 2006).

As espécies florestais como as do gênero *Eucalyptus*, e mais especificamente o *Eucalyptus grandis*, por ser a mais plantada no Brasil atualmente (SOUZA, 2004), são muito estudadas no âmbito da biotecnologia florestal, o que se deve especialmente à rapidez de crescimento e qualidade da madeira que produzem.

A madeira é um dos produtos florestais mais requeridos no mercado. A expectativa de aumento de consumo da madeira para a próxima década é de aproximadamente 20%, e para suprir esta demanda, reduzindo simultaneamente a pressão sobre a vegetação nativa, faz-se necessária a obtenção de árvores mais produtivas, resistentes a fatores bióticos e abióticos e com madeira de alta qualidade, de acordo com a finalidade do uso (ANDRADE et al., 2006).

O processo de formação da madeira é bastante complexo e envolve muitos eventos biológicos, que são coordenados por uma série de fatores endógenos (fitohormônios) e exógenos (fotoperíodo e temperatura) e pela interação de ambos (ANDRADE et al., 2006), o que requer uma maior compreensão.

Assim, a cultura *in vitro* de células e tecidos surge como uma ferramenta importante para contribuir no entendimento da influência destes fatores no processo de formação da madeira.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral analisar, em ambiente controlado, a influência dos reguladores vegetais cinetina e 2,4-D (ácido

diclorofenoxiacético) na morfologia, desenvolvimento e intensidade de lignificação de calos de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden). De forma específica, este trabalho objetiva analisar os tamanhos dos calos nos tratamentos, os níveis de oxidação dos calos nos tratamentos, a presença e ausência de raiz nos calos nos tratamentos, a textura dos calos nos tratamentos e o teor de lignina dos calos nos tratamentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Eucalipto

As espécies florestais são de grande importância para a economia, pois oferecem uma ampla gama de produtos, como madeira para construção, biomassa para a produção de polpa de celulose e papel, assim como uma série de subprodutos para a indústria de cosméticos, farmacêutica, alimentícia, etc. (GUIMARÃES et al., 2001). Uma das características mais desejadas em espécies florestais é uma alta produtividade relacionada com o crescimento acentuado do tronco, produto mais importante para as indústrias madeireira e de celulose e papel (GUIMARÃES et al., 2001).

Além da madeira e da celulose, os plantios florestais podem oferecer outros produtos, como resinas, óleos essenciais e substâncias que servem como base para medicamentos, além de colaborarem para a captura de carbono e contribuírem para a conservação das florestas naturais (SOARES et al., 2003).

Por tais razões, espécies florestais vêm sendo selecionadas ao longo do tempo pelos programas de melhoramento, para a obtenção de genótipos mais produtivos, com melhores características florestais, mais adequadas para diferentes condições edafoclimáticas e com resistência aos estresses bióticos e abióticos (GUIMARÃES et al., 2001).

No Brasil, as plantações florestais são compostas, principalmente por espécies de híbridos e clones de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e de pinheiro (*Pinus* spp.), cuja área plantada é de 4,8 milhões de hectares, em especial nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (MORA & GARCIA, 2000).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae (ANDRADE, 2006), que é um dos gêneros predominantes da flora australiana, estendendo-se das áreas subalpinas às florestas úmidas costeiras, às florestas temperadas e à zona mais árida da Austrália (JÚNIOR, 2004).

O gênero *Eucalyptus* cobre a maior área dos reflorestamentos no mundo. Desde que a madeira de eucalipto passou a ser usada para a produção de celulose e papel, fato ocorrido na Europa, por volta de 1919, muitas espécies vêm ganhando crescente importância e tornando-se mundialmente expressivas (JÚNIOR, 2004).

Existem mais de 700 espécies de eucalipto, incluindo variações, em sua área de ocorrência natural, porém, somente um pequeno número tem sido utilizado pela indústria. A diversidade de espécies, que é fator importantíssimo sob a ótica do melhoramento florestal e da seleção de materiais, permite considerar o eucalipto como potencial fornecedor de uma madeira bem definida para a produção de múltiplos produtos (TRUGILHO et al., 2007). Essas diversas 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 químicos pode levar à obtenção de vários outros produtos, tais como as resinas (SANTOS & CURVELO, 1999 citado por TRUGILHO et al., 2007).

O grande número de espécies deste gênero, a grande plasticidade ecológica e a sua excelente produtividade, tornou-o matéria-prima de inúmeras indústrias florestais, o que permitiu um rápido avanço no conhecimento silvicultural e tecnológico de muitas de suas espécies (FINGER et al., 1993). Além do aproveitamento da madeira como fonte energética, é usado também para a fabricação de celulose, aglomerado, construção civil e outros (SCHNEIDER et al, 1996).

A utilização do eucalipto na produção de celulose e papel, a partir dos anos 40, transformou essa árvore na principal matéria-prima das indústrias do setor (GONZÁLEZ et al., 2002). A indústria brasileira de papel e celulose tem crescido rapidamente nas últimas décadas, tornando-se, na década de 90, a sétima maior produtora de celulose, e décima primeira em produção de papel (ANDRADE, 2006).

Nos países onde o eucalipto é plantado comercialmente, sua produtividade é altamente variável, em função das condições ambientais, da espécie utilizada, da origem ou

procedência do propágulo vegetal e seu grau de melhoramento, do tipo de manejo e controle dos fatores do meio (JÚNIOR, 2004).

O eucalipto apresenta-se como grande alternativa para produção de madeira nos próximos anos, e a indústria já aposta na sua disponibilidade para os futuros suprimentos de matéria-prima (SOARES et al., 2003). No Brasil, a madeira de espécies do gênero *Eucalyptus* vem se constituindo em uma das principais fontes de matéria-prima para as indústrias de base florestal devido, mais uma vez, a sua alta capacidade de adaptação em diferentes ambientes (TRUGILHO et al., 2007).

Entretanto, espécies de crescimento rápido como o eucalipto, apresentam determinadas restrições quanto as suas utilizações, o que justifica investimentos em busca de soluções capazes de otimizar tecnologicamente a sua utilização no mais amplo espectro do mercado consumidor (ABREU et al., 2003).

O Eucalyptus grandis ocorre naturalmente em solos aluviais ou de origem vulcânica, nos vales e planícies ao longo da costa leste australiana, estendendo-se até o limite de Queensland-Nova Gales do Sul (JÚNIOR, 2004), entre as latitudes 17° S a 33° S (ELDRIGE, 1976). Essa distribuição se dá de forma quase contínua entre Rockhampton em Queensland e Newcastle em New South Wales, entre as latitudes de 23° S e 32° 52 S e de forma descontínua nas regiões de Carnarvon, Mackay e Atherton em Queensland (BURGESS, 1983).

O *E. grandis* é encontrado desta forma, principalmente no litoral, quase ao nível do mar, porém, chegando até 1.100m de altitude em Atherton, em clima subtropical na maioria das regiões e com alta umidade relativa do ar em todos os locais durante todo o ano e com verão chuvoso, numa média de 1500mm por ano (BURGESS, 1983).

Suas principais utilizações são: produção de celulose e papel, painéis de fibra e aglomerado, combustível industrial e doméstico e produtos de serraria (SOARES et al., 2003).

No Brasil, o *Eucalyptus grandis* é a espécie florestal mais plantada (SOUZA, 2004), pois possui excelente resposta silvicultural, como boa forma e rápido crescimento, além de propriedades desejáveis para uso múltiplo da madeira (TOMASELLI, 2000). Sem falar nas condições favoráveis de clima, solo e a grande oferta de áreas para o plantio, que fazem do Brasil um dos mais promissores mercados mundiais desta espécie (BIZI et al., 2005).

A cultura de tecidos apresenta-se como um método alternativo na propagação de *Eucalyptus grandis* e outras espécies do gênero *Eucalyptus*, por ser uma técnica mais segura, graças ao maior controle dos fatores envolvidos (HIGASHI et al., 2002). Entretanto, na propagação *in vitro* das diversas espécies do gênero *Eucalyptus*, a grande variação genotípica em resposta aos meios de cultura constitui importante fator. Isto requer maiores estudos sobre cultura de tecidos do gênero. Para tanto, torna-se necessário, dentre outros fatores, conhecer os hormônios vegetais e seu modo de ação (GUIMARÃES et al., 2001).

2.2 Lignina

A formação da madeira é um processo biológico fundamental com interesse econômico significativo, visto que a madeira é o quinto maior produto do mercado mundial (PLOMION et al., 2001 citado por ANDRADE et al., 2006). Sua constituição baseia-se fundamentalmente em componentes macromoleculares: celulose, hemicelulose e lignina, presentes em porcentuais variáveis (MORAIS et al., 2005).

Depois da celulose, a lignina é o polímero orgânico mais abundante no reino vegetal (BACHA, 2006). Apesar disto, sua via biossintética e muitos pontos relativos principalmente à sua estrutura, permanecem em dúvida (DAVIN & LEWIS, 2005; SALIBA et al., 2001), o que não tira o mérito da compreensão relativamente boa que se tem até o momento.

Atualmente, o paradigma aceito para a estrutura da lignina é que a macromolécula está presente na madeira na forma de uma rede polimérica tridimensional não cristalina (SANTOS, 2001). As ligninas são substâncias muito complexas de difícil caracterização (CARBALLO, 1990), o que se deve à complexidade de sua formação, baseada em unidades fenilpropanoídicas interligadas por diferentes tipos de ligações, e também porque sofrem modificações estruturais durante seu isolamento das paredes celulares (MORAIS, 1992).

Pesquisadores dividem a lignina em três grupos: ligninas de gimnosperma, formadas pela desidrogenação enzimática do álcool coniferil; ligninas de angiospermas formadas pela combinação dos álcoois coniferil e sinapil, e lignina de gramíneas, formadas pela desidrogenação dos álcoois coniferil, sinapil e p-cumaril (GLASSER, 1980).

Ao processo de deposição da lignina nos tecidos vegetais dá-se o nome de lignificação. A lignificação é um processo bioquímico que abrange a biossíntese de monolignóis, seu transporte e a polimerização na parede celular. Inicialmente é altamente mediada por enzimas relacionadas à formação dos precursores nos compartimentos citoplasmáticos (MONTEIRO et al., 2004).

As propriedades aglutinantes da lignina dão consistência fibrosa às madeiras, revestindo as células do xilema, onde realizam função mecânica de sustentação (BROWNING, 1967). Além disso, são muito resistentes a hidrólise (HIGUCHI, 1980).

A lignina é detectada basicamente na parede secundária de células, sobretudo das fibras, vasos e traqueídeos do xilema, dotando-os de rigidez, suporte mecânico e impermeabilidade, permitindo o transporte de água e solutos (GUIMARÃES et al., 2001). Ocorre também, em menor quantidade, na periderme associada à suberina onde age como uma barreira contra patógenos (GUIMARÃES et al., 2001).

Uma rápida deposição de substâncias fenólicas ou de lignina nos sítios de infecção é considerado um mecanismo de defesa contra o ataque de patógenos (MENZIES et al., 1991). Desta forma, a lignina resiste ao ataque da maioria dos microrganismos, até mesmo o processo anaeróbico de degradação da madeira por microrganismos, é incapaz de atacar todo o anel aromático (LACERDA, 2001). Tudo isso, faz da presença da lignina um fator limitante para a degradação da parede celular (JUNG & VOGEL, 1986).

Segundo MARSCHNER (1986), a resistência pode, particularmente, ser aumentada por mudanças nas respostas das plantas aos ataques de organismos, aumentando a lignificação e a síntese de substâncias tóxicas. Tais barreiras físicas, ou mecânicas, incluem mudanças na anatomia, como células epidérmicas mais espessas e um grau maior de lignificação (FIORI, 2006).

A lignina também é essencial em diversos processos biológicos, como assegurar a existência de vias rápidas de circulação de água e minerais, além de propiciar a resistência necessária para manter a verticalidade do caule principal (ABREU et al., 1999).

A lignificação na parede de células do xilema se dá pela polimerização de monolignóis sobre uma matriz de substâncias pécticas, microfibrilas de celulose e hemicelulose formadas anteriormente à deposição da lignina (TERASHIMA et al, 2004).

À medida que a planta cresce se intensifica o processo de lignificação (ALBRECHT et al., 1987), seguindo uma concentração decrescente da base ao topo (BUXTON & HORNSTEIN, 1986).

A composição da lignina varia significativamente entre espécies, dentro da espécie e até mesmo numa única planta, pois há variações de célula para célula de acordo com a localização da parede celular, conforme o estágio de desenvolvimento da célula e do tecido, e ainda com a influência de estresses ambientais (CAMPBELL & SEDEROFF, 1996; SALIBA, et al., 2001). Observou-se em eucalipto cultivado na Europa e no Brasil diferenças na constituição de suas ligninas, devidas, principalmente, às diferentes condições de solo e de clima (SALIBA et al., 2001).

Tal diversidade também é observada ao se comparar, por exemplo, gramíneas e leguminosas, quando se observa os efeitos do envelhecimento dos tecidos vegetais (AMAN, 1993). As gramíneas apresentam um menor teor de lignina que as leguminosas, no entanto, a lignina de gramíneas inibe de forma mais intensa a digestão animal (JUNG, 1989).

A pesquisa de DAY et al. (2005), com linhaça (*Linum usitatissimum*), sugere que num mesmo indivíduo os teores e a composição de lignina mudam em suas diferentes partes. Assim, provavelmente a lignina presente no caule é diferente da existente na folha (SAVIOLI & FUKUSHIMA, 2000).

Nutrientes como o boro, interferem na síntese de lignina pela formação de complexos de boratos com certos fenóis, regulando a taxa de fenóis livres e aumentando os fenóis precursores da síntese de lignina. Portanto, a deficiência de boro nas plantas tem acarretado menores teores de lignificação (LEWIS, 1980).

Em estudos realizados com *Picea abies* e com *Solanum gilo*, observou-se que deficiência de Ca^{2+} desacelera o processo de formação da parede celular, o que se deve principalmente a diminuição da deposição da lignina e de outros polissacarídeos não celulósicos (MARSCHNER 1986 citado por KÄRKÖNEN, 2001; FIRMINO et al., 2006).

LEE et al. (2007), estudando a relação entre teor de lignificação e estresse hídrico induzido em trevo branco (*Trifolium repens*), constataram que tal estresse levou a um aumento das enzimas envolvidas na lignificação. Tal resultado pode explicar por que CHRISTIERNIN (2006) observou uma variação no teor de lignina na espécie *Populus*

balsamifer de acordo com as estações do ano, já que na estação mais seca a deposição de lignina no tecido cambial ocorreu de forma mais intensa.

Algumas características da madeira podem ser influenciadas pela lignificação, por exemplo, a tensão (PILATE et al., 2004) e compressão (FOSKET, 1994). O surgimento das tensões de crescimento está ligado diretamente à lignificação das paredes celulares (BOYD, 1972).

O entendimento da formação da lignina e de sua estrutura química parte da premissa que sua formação deve ser entendida ainda na fase celular, procurando identificar, através de várias técnicas os fatores que levam a este fenômeno de imensa importância para as plantas superiores. Uma série de ferramentas tem sido testadas, entre elas a utilização de cultura de tecidos, observando a influência de uma variada classe de substâncias (fitorreguladores) e condições ambientais no processo de lignificação.

2.3 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 seu cultivo sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (PASQUAL, 1997 citado por COSTA, 2006).

O sistema de cultura de tecidos vegetais é geralmente utilizado como base no estudo dos vários processos fisiológicos, bioquímicos, genéticos e estruturais relacionados às plantas (PASQUAL et al., 1998). Este sistema oferece muitas vantagens, dentre as quais destacam-se: obtenção de tecidos assépticos, oportunidade de inocular qualquer substância de forma uniforme em todas as células ao mesmo tempo e produção de material em quantidade suficiente para análises bioquímicas (KÄRKÖNEN, 2001). Entretanto, nenhuma destas vantagens se sobrepõe à possibilidade de investigar efeitos fisiológicos de nutrientes, hormônios vegetais e outros constituintes químicos em células produzidas em meio de cultura definido e condições ambientais controladas (KÄRKÖNEN, 2001).

Além de tudo, técnicas de cultura de tecidos possibilitam uma multiplicação mais rápida quando comparadas a outras técnicas de propagação assexuada e também são

consideradas como um pré-requisito para futuros estudos de engenharia genética (LACORTE, 1991).

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 fator chave da multiplicação é a presença dos reguladores de crescimento vegetal, particularmente citocininas e auxinas (GASPAR et al., 1996 citado por CORDEIRO et al., 2004). As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (CALDAS et al., 1990).

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

Além da composição dos meios de cultura, as condições físicas de incubação, como a temperatura, umidade, 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).

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., 2000). Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham

maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Em geral, induz-se a formação de calos, a partir de explantes cultivados em meio de cultura contendo auxina, ou com alta relação auxina/citocinina (RIOS, 2004).

A cultura de calo é uma ferramenta biotecnológica extremamente importante. Na embriogênese somática indireta, a calogênese é uma etapa essencial (FRANCO et al., 2006). A calogênese se divide em três etapas: indução, divisão celular e diferenciação (STAFFORD & WARREN, 1991). A terceira fase, a diferenciação celular, é onde ocorre a formação dos produtos do metabolismo secundário (AITCHISON, 1977).

Na cultura de tecidos, mais especificamente na indução de calos, são enfrentados diversos problemas, dentre os quais se destacam a oxidação fenólica e a contaminação.

A oxidação ocorre devido à formação de substâncias fenólicas *in vitro*. Dentre as quais encontra-se os precursores da lignina, pelo tecido injuriado ou senescente de essências nativas, especialmente as tropicais, pois possuem alta concentração desses componentes fenólicos (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Nas plantas lenhosas, acumulam-se polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000).

Por tais motivos, na cultura *in vitro*, a oxidação constitui um dos principais problemas enfrentados no início do estabelecimento e durante o cultivo de explantes de espécies lenhosas (COSTA, 2006). Assim, explantes vegetativos da maioria das espécies arbóreas, são de difícil crescimento e diferenciação *in vitro* (ANDRADE, 2006). Segundo ANDRADE et al. (2000), a ocorrência de fenóis, pode estar ligada a processos de regulação de crescimento, especialmente com as auxinas que, dependendo da concentração endógena no tecido, resulta na indução dessas substâncias. Além das auxinas, foi observado que em segmentos nodais de aroeira a presença da citocinina BAP (6-benzilaminopurina), favoreceu o processo de oxidação fenólica (ANDRADE et al., 2000).

Para inibir ou diminuir a oxidação fenólica, deve-se ter maiores cuidados na manipulação do explante para evitar danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação. A adição de substâncias antioxidantes, como cisteína e ácido ascórbico, além

de adsorventes, como carvão ativado e PVP (Polivinil Pirrolidona), também pode ser decisiva na prevenção à oxidação, a qual é mais acentuada nas fases iniciais de cultivo.

FRANCO et al (2006), estudando a espécie florestal caixeta (*Didymopanax morototoni*), observou que ao utilizar a combinação dos reguladores cinetina (0,1 e 1,0 mg/L) e 2,4-D (1,0 e 5,0 mg/L) obteve calos claros e friáveis depois de 20 dias de cultura, fato que o autor atribui também ao cultivo em ambiente livre de luz.

A contaminação por microrganismos é considerada um problema grave, podendo chegar, inclusive, a ser um fator limitante para o estabelecimento de cultivo *in vitro* de certos explantes (RIBAS et al., 2003). Os microorganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000).

2.4 Hormônios Vegetais

Hormônios vegetais constituem um grupo de ocorrência natural. São substâncias orgânicas que influenciam em processos fisiológicos a baixas concentrações (MONTANS, 2007). As biomoléculas são responsáveis por uma infinidade de importantes eventos nas plantas, desde a divisão celular, no interior de um tecido, até os fenômenos mais externos e tangíveis, como o alongamento do caule, floração, frutificação, produção de borracha, entre outros (VALOIS, 2000).

Estas substâncias controlam o metabolismo, o crescimento e a morfogênese de plantas superiores por meio de sinais transmitidos de uma parte a outra da planta (TAIZ & ZEIGER, 2004). Tais sinais funcionam como "mensageiros químicos", influenciando em muitas partes do desenvolvimento da planta (HARTMANN et al., 1988).

Assim como nos animais, o desenvolvimento das plantas é fundamentalmente controlado por substâncias reguladoras de crescimento (PERES, 2002). Contudo, raramente os hormônios vegetais agem sozinhos, mesmo quando uma resposta no vegetal é atribuída à aplicação de um único regulador, o tecido vegetal que recebeu a aplicação possui hormônios endógenos que influenciam nas respostas obtidas (CATO, 2006).

O primeiro grupo de hormônios vegetais descoberto pelo homem foi o das auxinas, que são responsáveis pelo crescimento das plantas, e influenciam diretamente nos mecanismos de expansão celular (ECHER et al., 2006).

No cultivo de tecidos os compostos orgânicos podem ser naturais ou sintéticos, e em quantidades muito pequenas, impedem ou modificam de alguma forma processos morfológicos e fisiológicos da planta (CASTRO & VIEIRA, 2001). Uma única molécula de hormônio pode disparar um aumento na concentração de muitas outras moléculas, as quais por sua vez produzem mudanças de desenvolvimento dentro da célula (RAVEN et al., 2001). Um mesmo hormônio pode produzir respostas diversas em tipos diferentes de tecidos ou em diferentes fases do desenvolvimento em um mesmo tecido (SALISBURY & ROSS, 1969).

São chamados de reguladores ou biorreguladores vegetais, os hormônios (sejam eles naturais ou sintéticos) que quando aplicados exogenamente possuem ações similares aos grupos de hormônios vegetais conhecidos (citocininas, giberelinas, ácido indolil acético, etileno e outros) (VIEIRA & CASTRO, 2002). Já a mistura de dois ou mais reguladores com outras substâncias (aminoácidos, nutrientes, vitaminas) é chamada de estimulante vegetal ou bioestimulante (MONTANS, 2007). Entretanto, é mais adequado considerar os hormônios como reguladores químicos, e não apenas estimulantes (RAVEN et al., 2001). É importante ressaltar que mesmo os reguladores artificiais apresentam propriedades químicas semelhantes a dos hormônios vegetais naturais (TOMBOLATO & COSTA, 1998).

O uso de reguladores é uma prática já difundida principalmente em países com pequena extensão territorial, onde se faz necessário o uso de tecnologia para a obtenção de maiores produtividades e de produtos de melhor qualidade (GARCIA, 2006).

O emprego de fitorreguladores como técnica agrônoma para otimizar produções em diversas culturas, tem crescido nos últimos anos (NETO et al., 2004). Para tanto, são inúmeras as pesquisas realizadas sobre a interferência de reguladores vegetais na agricultura, destacando-se as áreas de floricultura, de olericultura e de fruticultura (KLAHOLD et al., 2006).

Os biorreguladores atuam de forma ativa nos processos endógenos da planta, como complemento ou antagonicamente a tais processos, induzindo respostas, que podem ser

economicamente interessantes (GARCIA, 2006). Desempenham papéis importantes no desenvolvimento das culturas comerciais, como uniformização da germinação, controle do desenvolvimento vegetativo, aumento da fixação de flores e frutos e antecipação ou atraso da maturação (CATO, 2006). Os efeitos destas substâncias sobre as plantas cultivadas, têm sido pesquisados com a intenção de melhorar qualitativa e quantitativamente a produtividade das culturas (ALLEONI *et al*, 2000). Por exemplo, a imersão de sementes em soluções com reguladores vegetais pode induzir a quebra de dormência, uniformidade na emergência e modificações morfológicas e fisiológicas das plântulas (CASTRO *et al.*, 1985).

Os fitorreguladores também são extremamente importantes na cultura de tecidos, já que o tipo e a concentração destas substâncias no meio de cultura, são fatores determinantes no crescimento e padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998), uma vez que são considerados como os componentes mais críticos adicionados ao meio de cultura (PERES, 2002).

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, onde estão diretamente envolvidos com o controle da atividade gênica em nível de transcrição e de tradução, em um grande número de processos (GUERRA *et al.*, 1999). Células responsivas são aquelas que possuem sensibilidade, ou seja, possuem competência para responder a um sinal específico (TREWAVAS, 1981). Os fitohormônios exercem sua ação através do reconhecimento de receptores específicos presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (GUERRA *et al.*, 1999). Entretanto, se o tecido não está em um estágio responsivo, este não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores são utilizados (ALVES *et al.*, 2004).

O processo de formação da madeira está amplamente ligado aos sinais bioquímicos dos hormônios controlados por uma biblioteca de genes. Como por exemplo, a participação

dos hormônios vegetais no controle do processo da xilogênese (ZIMMERMANN & BROWN, 1971).

Na maioria dos casos, os efeitos desejáveis da aplicação dos reguladores vegetais ocorrem na utilização prática, porém, com entendimento ainda insuficiente do amplo modo de ação ou processos fisiológicos envolvidos (MONSELISE, 1979).

2.4.1 Cinetina

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).

Elas podem estimular ou inibir uma variedade de processos metabólicos, fisiológicos e bioquímicos em plantas superiores (CATO, 2006). Em experimentos com cultura de tecido, a citocinina estimulou a divisão celular controlando a diferenciação dos elementos xilemáticos (DALESSANDRO & ROBERTS, 1971).

As citocininas são uma das classes de reguladores de crescimento mais utilizados 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). As citocininas estimulam o crescimento pela expansão mais do que pelo alongamento (STOYNOVA et al., 2004).

O efeito das citocininas em cultura de tecidos ou órgãos pode variar de acordo com a substância utilizada, o tipo de cultura, a variedade da planta e da idade do tecido que deu origem ao explante (ANDRADE, 2006).

Cinetina (KIN), benziladenina (BA) e 6-benzilaminopurina (BAP) são as citocininas ocasionalmente utilizadas (KRIKORIAN et al., 1990).

Esta pequena molécula denominada cinetina, é derivada da adenina (ou aminopurina) (TAIZ & ZEIGER, 2004). A cinetina está envolvida na regulação do crescimento e diferenciação, incluindo a divisão celular, dominância apical, formação de órgãos, retardamento da quebra de clorofila, desenvolvimento dos cloroplastos, senescência

das folhas, abertura e fechamento dos estômatos, desenvolvimento das gemas e brotações, metabolismo dos nutrientes e como reguladores da expressão dos genes (VIEIRA & MONTEIRO, 2002). Aplicações de cinetina podem desencadear a formação de gemas laterais a partir da dominância apical (TEIXEIRA & MARBACH, 2000).

Em suspensão celular de soja (*Glycine max*) foi mostrado que a zeatina não foi efetiva, que a benziladenina foi adequada e que a cinetina teve ótimo efeito na formação de embriões somáticos (PHILLIPS & COLLIN, 1981).

Em plantas de manjerição (*Ocimum basilicum*), tratadas com cinetina, houve maior taxa de crescimento durante todo o desenvolvimento, enquanto nos tratamentos com outros reguladores, os resultados foram semelhantes à testemunha (BARREIRA et al., 2006).

2.4.2 2,4-D (Ácido Diclorofenoxiacético)

As auxinas são sintetizadas nos ápices caulinares, ramos e raízes e transportadas para outras regiões da planta, sendo caracterizadas, principalmente, pela capacidade de estimular o alongamento celular, mas também como responsável pela formação inicial das raízes, diferenciação vascular, tropismo, desenvolvimento de gemas axilares, flores e frutos (CATO 2006). A primeira aplicação prática da auxina envolve seu efeito promotor na iniciação de raízes adventícias (RAVEN et al., 2001).

As auxinas desempenham importante papel na junção dos traços vasculares de folhas em desenvolvimento (RAVEN et al., 2001). Entre os hormônios, a auxina é certamente a principal classe de hormônio na diferenciação do floema e do xilema (WARREN & WARREN, 1984).

Em testes com as auxinas ANA (ácido naftaleno acético), AIB (ácido indol-butírico), AIA (ácido indol acético) e 2,4 -D (ácido diclorofenoxiacético), observou-se a inibição da formação de embriões (AYUB & GEBIELUCA, 2003). Entretanto, GUERRA et al. (1999) afirmam que as auxinas estão envolvidas com a indução e a iniciação de embriões somáticos, e que em muitas espécies, o processo de iniciação se verifica quando se cultiva o explante em meio com concentração relativamente alta de 2,4-D.

Como auxina, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos mais freqüentemente utilizados (KRIKORIAN et al., 1990), principalmente em cultura de

tecidos, para indução do calo, e em culturas em suspensão (GASPAR et al., 1996). A indução da calogênese ocorre em meio com altas concentrações de auxinas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990), e o 2,4-D é um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos (AMMIRATO, 1983).

Na verdade, alguns pesquisadores citam que elevados níveis de auxina no meio promovem desdiferenciação das células e diminui a formação de metabólitos secundários em algumas culturas, efeito especialmente demonstrado pelo 2,4-D (RAMACHANDRA & RAVISHANKAR, 2002). Em *Ipomoea batatas*, culturas submetidas a 2,4-D por longos períodos retiram a capacidade dos embriões se converterem em plantas (GUERRA et al., 1999).

Os efeitos do 2,4 D também têm sido observados na redução da queda pré-colheita de frutos (BARROS & RODRIGUES, 1993).

2.4.3 Interação Cinetina e 2,4 D

Dentre os fatores que regulam o processo germinativo, a presença de hormônios e o equilíbrio entre eles, promotores e inibidores, exercem um papel fundamental (CATO, 2006).

Auxinas, citocininas e interações auxinas/citocininas são consideradas, geralmente, como sendo as mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento organizado em culturas de células, tecidos e órgãos de plantas, e essas duas classes de hormônios são geralmente requeridas (GASPAR et al., 1996). Segundo DAVIES (1987), as citocininas apresentam grande habilidade na indução da divisão celular em culturas de tecido, juntamente com as auxinas. Para o estabelecimento de um efetivo controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*, é preciso um balanço ideal entre auxinas e citocininas (ANDRADE, 2006).

Além da relação auxina/citocinina, o tipo e a concentração de auxina ou citocinina também afetam dramaticamente tanto o crescimento como a produção de metabólitos em cultivo *in vitro* de plantas (RAMACHANDRA & RAVISHANKAR, 2002). As concentrações mais utilizadas destes hormônios, normalmente, giram em torno de 0,5 e 5,0 mg/L (AYUB & GEBIELUCA, 2003).

Por meio do uso da razão entre citocinina e auxina pode-se obter calos, raízes ou ramos. Essa possibilidade de regeneração de plantas a partir de calos é uma ferramenta biotecnológica comumente utilizada nos dias de hoje para a seleção de plantas com resistência à seca, estresse por sais, patógenos, herbicidas, etc. (SALISBURY & ROSS, 1992).

Na presença de certas concentrações de citocininas e auxinas as células mantêm-se indiferenciadas (SALISBURY & ROSS, 1969). TAKAHASHI (2002), observou que em meios com razões intermediárias de auxina/citocinina ocorre proliferação celular desorganizada, como calos.

Auxinas e citocininas atuam sinergicamente para regular divisão celular e antagonicamente para controlar a formação de gemas e raízes laterais, sugerindo múltiplos mecanismos de interação (COENEN & LOMAX, 1997 citado por CATO, 2006).

Em cultura de tecidos de *Tabebuia caraiba*, a formação de calos foi favorecida quando explantes foliares foram encubados em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,2 mg/L de cinetina (LIMA & CAETANO, 2002).

Em segmentos de caule excisado de ervilha (*Pisum sativum*) também foi observado um efeito sinérgico de cinetina e auxina na xilogênese (SOROKIN et al., 1962).

Estes dados confirmam a Teoria do Balanço Hormonal, segundo a qual a formação de calos é favorecida pela combinação de pelo menos uma auxina e uma citocinina (CALDAS et al., 1990).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes usadas para o desenvolvimento das plântulas, que serviram como fonte de explantes, foram adquiridas no IPEF (Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais) da Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz (ESALQ) 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.

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

3.1 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 (cinco) repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 5 (cinco) frascos próprios para indução de calos em meio de cultura, contendo três segmentos clonais cada. Utilizou-se um esquema fatorial 5x5, sendo considerados como fatores, as concentrações do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (4,53; 11,32; 22,65; 45,30; 90,60 μ M) e cinetina (0; 2,32; 4,65; 11,62; 23,25 μ M), perfazendo-se 25 tratamentos. As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo, considerando-se as seguintes variáveis: número de calos desenvolvidos por recipiente, crescimento dos calos (cm), usando-se como parâmetro a maior distância longitudinal, intensidade de oxidação, presença de raiz e concentração de lignina. Para a variável intensidade de oxidação, uma escala de 1 a 5 foi utilizada, sendo: 1= ausência de oxidação; 3= calos parcialmente oxidados e 5= calos totalmente oxidados (FLORES et al., 2000). Para a variável presença de raiz fez-se uma correlação entre os tratamentos que apresentaram raiz e as respectivas concentrações de cinetina e ácido 2,4-D. Para análise dos dados, fez-se uso das equações de regressão utilizando o programa estatístico SAEG (Anexos I e II).

3.2 Preparo do meio de cultura para germinação e desenvolvimento de plântulas de *E. grandis*

Para o desenvolvimento de mudas de *E. grandis*, foi utilizado meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado para a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de *E. grandis* (Tabela 1) (WATT *et al.*, 1991).

Tabela 1. Composição do meio MS modificado para germinação e desenvolvimento de plântulas de *E. grandis* (WATT *et al.*, 1991).

Macronutrientes	mg/L	Micronutrientes	mg/l	Vitaminas	mg/L	hormônios	μM
(NH ₄)NO ₃ (Nitrato de Amônia)	1.650	MnSO ₄ . 4H ₂ O (sulfato de Manganês)	22,3	myo-inositol	100	AIA (Ácido indol Acético)	5,71
KNO ₃ (Nitrato de Potássio)	1.900	ZnSO ₄ . 7H ₂ O (Sulfato de Zinco)	8,6	ácido nicotínico	5	KIN (Cinetina)	0,2325
CaCl ₂ (Cloreto de Cálcio)	440	H ₃ BO ₃ (Ácido Bórico)	6,2	piridoxina. hcl	5	BAP (6-Benzilamino purina)	0,4884
KH ₂ PO ₄ (Dihidrogenofosfato de potássico)	170	KI (Iodeto de Potássio)	0,83	tiamina. hcl	10	ANA (Ácido naftaleno Acético)	21,48
MgSO ₄ (sulfato de magnésio)	370	NaMoO ₄ . 2H ₂ O (Molibdato de Sódio)	0,25	biotina	0,1		
Ferro		CuSO ₄ . 5H ₂ O (Sulfato de Cobre)	0,025	pantotenato de cálcio	0,1	Outros	mg/L
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Sulfato de Ferro)	27,8	CoCl ₂ . 6H ₂ O (Cloreto de Cobalto)	0,025	glicina	2,0	sacarose	30.000
Na ₂ EDTA (Sódio EDTA)	33,6					Benlate	100
						Ágar	7.000

Os componentes do meio de cultura foram pesados em balança de precisão e colocados em Becker de 1000mL contendo aproximadamente 200mL de água bidesionizada. O meio foi mantido em agitação contínua para a dissolução dos componentes e sua completa homogeneização. Depois de colocados todos os componentes do protocolo, o volume de água foi completado até atingir 1000 mL. A solução foi mantida em agitação por aproximadamente 10 minutos, e, após esse período, foi realizada a aferição do pH, que foi ajustado para 5,7. Em seguida, foi acrescentado ao meio o agar-agar, que foi aquecido até atingir fervura. Após a fervura o meio de cultura foi distribuído em 30 frascos de vidro transparente, próprios para germinação (30 mL por recipiente com tampa

transparente). Os recipientes contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave por 30 minutos.

Após a esterilização, os frascos foram levados para a capela de fluxo laminar e ficaram em presença de radiação ultravioleta por 30 minutos. Após esse período seguiu-se a inoculação das sementes.

3.3 Desinfestação e inoculação das sementes

As sementes de *E. grandis* foram inicialmente submetidas a desinfestação em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 10 minutos em presença de 0,2 ml/L de tween 20. Em seguida as sementes foram escorridas em peneira inox forradas com papel filtro e lavadas 5 vezes em água bidesionizada estéril, para garantir a total retirada do hipoclorito de sódio. Em seguida, as sementes foram imersas em peróxido de hidrogênio 1% por 30 minutos. Decorrido esse período as sementes foram lavadas e seguiram-se as práticas de inoculação das semente em meio de cultura para germinação e desenvolvimento de plântulas de *E. grandis*.

Em capela de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas no meio de cultura preparado como descrito na Tabela 1. Foram colocadas de cinco a dez sementes por recipiente. Após 21 dias da inoculação das sementes em fotoperíodo de 16 horas a 25 °C, as plântulas geradas no meio asséptico, foram usadas como fonte de explantes.

3.4 Preparo do meio de cultura para formação de calos

Para a formação de calos de *Eucalyptus grandis* foi utilizado meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado (Tabela 2) (WATT *et al.*, 1991). Os procedimentos para preparação deste meio são idênticos aos procedimentos de preparação do meio para germinação e desenvolvimento de plântulas de *E. grandis*.

Tabela 2. Meio MS modificado para formação de calos de *E. grandis* (WATT *et al.*, 1991).

Macronutrientes	mg/L	Micronutrientes	mg/l	Vitaminas	mg/L	hormônios	µM
(NH ₄)NO ₃ (Nitrato de Amônia)	1.650	MnSO ₄ . 4H ₂ O (sulfato de Manganês)	22,3	myo-inositol	100	AIA (Ácido indol Acético)	5,71
KNO ₃ (Nitrato de Potássio)	1.900	ZnSO ₄ . 7H ₂ O (Sulfato de Zinco)	8,6	ácido nicotínico	5	KIN (Cinetina)	46,5
CaCl ₂ (Cloreto de Cálcio)	440	H ₃ BO ₃ (Ácido Bórico)	6,2	piridoxina. hcl	5	2,4-D (Ácido dicloro Fenoxiácetico)	4,53
KH ₂ PO ₄ (Dihidrogenofosfato de potássio)	170	KI (Iodeto de Potássio)	0,83	tiamina. hcl	10		
MgSO ₄ (sulfato de magnésio)	370	NaMoO ₄ . 2H ₂ O (Molibdato de Sódio)	0,25	biotina	0,1	Outros	mg/L
Ferro		CuSO ₄ . 5H ₂ O (Sulfato de Cobre)	0,02 5	pantotenato de cálcio	0,1	PVP anti-oxidante	800
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Sulfato de Ferro)	27,8	CoCl ₂ . 6H ₂ O (Cloreto de Cobalto)	0,02 5	glicina	2,0	sacarose	30.000
Na ₂ EDTA (Sódio EDTA)	33,6					Benlate	100
						Ágar	8.000

3.5 Cultura e sub-cultura de calos

Em capela de fluxo laminar os explantes foram inoculados em meio MS para indução de calos. Com o auxílio de pinça e bisturi esterilizados em estufa e autoclave, foram retiradas as gemas apicais de cada plântula germinada. Essas gemas apicais foram usadas como explantes para formação de calos.

Em cada recipiente foram inoculados três explantes. Os recipientes foram mantidos em ausência de luz à temperatura de 25°C. Para garantir a ausência de luz os recipientes foram enrolados em folha de alumínio. Após o período de três semanas o calo que apresentou menor nível de oxidação, maior friabilidade (capacidades de soltar células com facilidade) e maior tamanho foi dividido em fragmentos menores (0,3 cm aproximadamente). Esses fragmentos foram repicados e distribuídos em dez recipientes, contendo meio de cultura renovado e em ausência de luz. A cada duas semanas o meio de cultura foi renovado, no total de duas sub-culturas. O procedimento de repicar um único material genético foi realizado para garantir que materiais genéticos diferentes não iriam interferir nos tratamentos aplicados posteriormente. Experimentos com fotoperíodo foram descartados, tendo melhores resultados, quanto à oxidação, em ausência total de luz.

3.6 Transferência dos calos para os diversos tratamentos

Em capela de fluxo laminar, calos obtidos do mesmo material genético, foram novamente repicados e distribuídos (três fragmentos de calos por recipiente) nos meios de cultura suplementados com diferentes combinações de concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-diclorofenoxiacético e cinetina (Tabela 3). Para efeito de testemunha foram usadas as concentrações de 0 µM de ácido 2,4 – D e cinetina 0 µM.

Tabela 3. Tratamentos obtidos pelas combinações de 2,4-D e cinetina testadas nos meios de cultura.

2,4D/CINETINA (µM)	0	2,325	4,65	11,625	23,25
4,53	T1	T2	T3	T4	T5
11,325	T6	T7	T8	T9	T10

22,65	T11	T12	T13	T14	T15
45,30	T16	T17	T18	T19	T20
90,60	T21	T22	T23	T24	T25

Os recipientes permaneceram em ausência de luz à temperatura de 25°C. Após duas semanas, os calos foram sub-culturados em meio de cultura renovado. Foram realizadas três sub-culturas, totalizando 60 dias. Decorrido esse período, os calos foram retirados do meio de cultura e passados para placas de petri para serem mensurados. Com auxílio de régua milimétrica, os calos foram medidos para avaliações comparativas. Em seguida, foi avaliada a variável intensidade de oxidação, onde uma escala de 1 a 5 foi utilizada, onde: 1= ausência de oxidação; 3= calos parcialmente oxidados e 5= calos totalmente oxidados (FLORES et al., 1998), além de avaliação de presença e ausência de raiz nos calos em cada tratamento. Por último, o material foi avaliado quanto ao teor de lignina.

3.7 Determinação do teor de lignina

A determinação de lignina foi realizada de acordo com o método de BRUCE & WEST (1989). Assim, 1g de calo fresco de cada amostra foi pesado e triturado em 25 ml de etanol 80% com molfariz; 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 tubos de vidro, onde foram adicionados 5 ml de HCL 2N e 0,5 ml de ácido tioglicólico. Os tubos 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 testes, onde 1 ml de HCl foi adicionado. 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 foi realizada utilizando um espectrofotômetro de ultra violeta, em comprimento de onda de 280 nm.

O aparelho utilizado para realizar as análises no ultravioleta foi o UV mini 1240 – UV-Vis spectrophotometer – Shimadzu. Uma curva de calibração foi elaborada com amostra padrão de lignina de Bjorkman e esta curva teve um coeficiente de determinação com um valor aceitável ($R^2=0,8412$), o que indica um erro bem próximo de zero. Por meio da curva de calibração obteve-se a equação abaixo, que possibilitou o calculo da quantidade de lignina a partir da absorbância de cada amostra (Tabela 4) em mg/L:

$$ABS=K1.C+K0$$

onde:

ABS=absorbância

K1=0,005094

K0=0,023669

C=Concentração de lignina

Tabela 4. Absorbância média por tratamento.

Tratamento	Absorbância média	Tratamento	Absorbância 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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância para os diferentes tratamentos, mostrou diferenças significativas para algumas características analisadas. Os resultados demonstraram uma diferença significativa para a variável crescimento, no aspecto de friabilidade, oxidação e concentração de lignina. Vale ressaltar, que além das concentrações dos reguladores 2,4-D e cinetina em cada tratamento, estava presente em todos os tratamentos o regulador de crescimento Ácido Indolacético (AIA), na concentração de 5,71 μ M.

4.1 Crescimento do calo para os diferentes tratamentos

Nos tratamentos em que as concentrações de ácido 2,4-D foram superiores às concentrações de cinetina, observou-se um maior crescimento dos calos. O tratamento 21, onde se obteve calos maiores, estava presente apenas o 2,4-D. A Figura 1 relaciona os tratamentos com as médias dos tamanhos dos calos de cada tratamento e separa as médias em grupos representados pelas letras a, b e c de acordo com teste de Kruskal-Wallis a 5%.

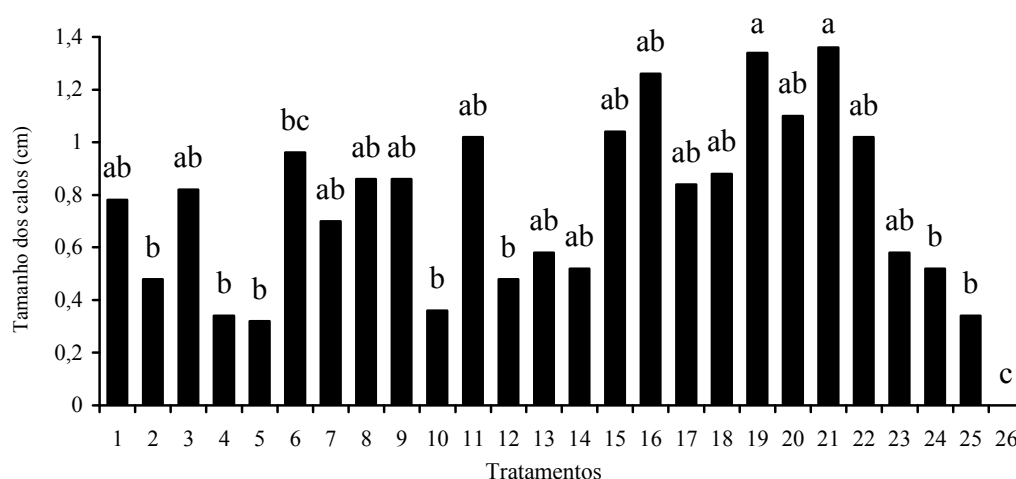


Figura1. Médias dos tamanhos dos calos nos diferentes tratamentos. Médias com letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%.

Os melhores resultados para a variável crescimento de calos tiveram crescimento médio de calos superior a 1,0 cm e foram obtidos com os protocolos, cujas concentrações são observadas na Tabela 5.

Tabela 5. Tratamentos que apresentaram calos de *E. grandis* com maior crescimento

Nº Tratamento	2,4-D μM	Cinetina μM
T(21) ^a	90,6	0
T(19) ^a	45,3	11,625
T(16) ^{ab}	45,3	0
T(20) ^{ab}	45,3	23,25
T(15) ^{ab}	22,65	23,25
T(11) ^{ab}	22,65	0
T(22) ^{ab}	90,6	2,325

Nota: Letras distintas significam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Os resultados menos expressivos para a variável crescimento de calos, podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6. Tratamentos que apresentaram calos de *E. grandis* com menor crescimento

Nº Tratamento	2,4-D μM	Cinetina μM
T(05) ^b	4,53	23,25
T(25) ^b	90,6	23,25
T(04) ^b	4,53	11,625
T(10) ^b	11,325	23,25
T(02) ^b	22,65	2,325
T(12) ^b	4,53	2,325
T(24) ^b	90,6	11,625

Nota: Letras distintas significam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

A Figura 2 compara o tamanho entre os calos obtidos em alguns dos tratamentos testados.

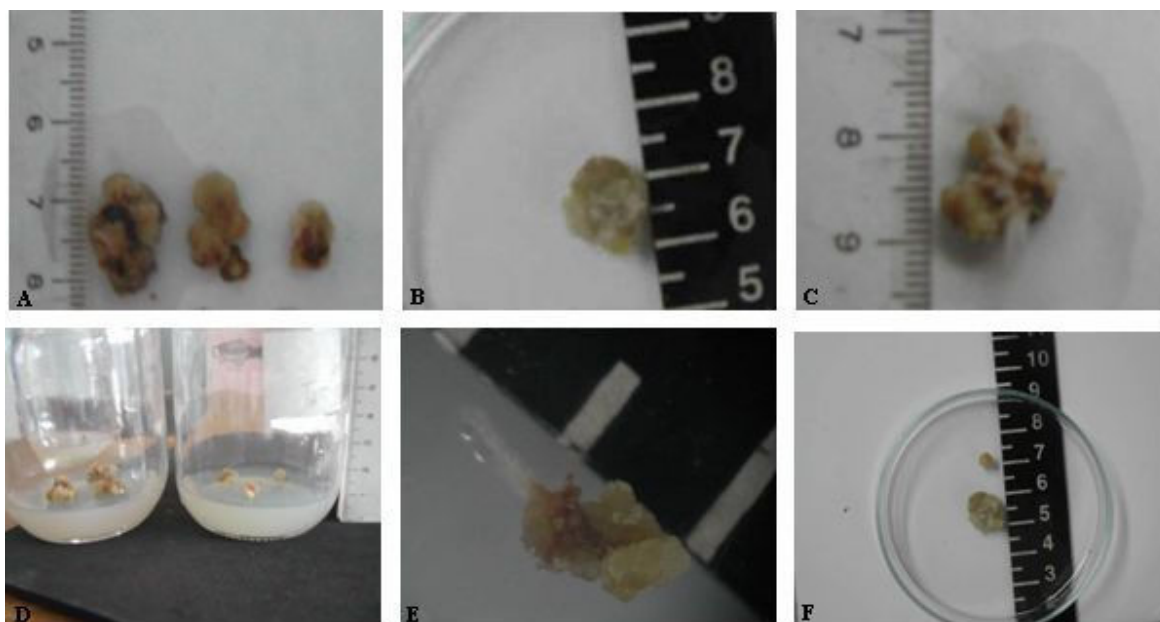


Figura 2. Análise da variável crescimento de calo nos diferentes tratamentos. (A) calos desenvolvidos nas concentrações dos tratamentos: T21 (90,6 μ M de 2,4-D + 0 μ M de cinetina), T19 (45,53 μ M de 2,4-D + 11,62 de cinetina) e T5 (4,53 μ M de 2,4-D + 23,25 de cinetina), respectivamente. (B) calo formados em presença de T15 (22,65 μ M de 2,4-D + 23,25 μ M de cinetina), e (C) calos formados em presença de T16 (45,53 μ M de 2,4-D + 0 μ M de cinetina). (D) calos desenvolvidos em presença de T21 (90,6 μ M de 2,4-D + 0 μ M de cinetina) e T5 (4,53 μ M de 2,4-D + 23,25 de cinetina); verificam-se ambos os tratamentos com três calos desenvolvidos. (E) calo formado em condição de T24 (90,6 μ M de 2,4-D + 11,62 μ M de cinetina) e (F) comparação dos tamanhos de calos formados em condição de T5 (4,53 μ M de 2,4-D + 23,25 de cinetina) e T 15 (22,65 μ M de 2,4-D + 23,25 μ M de cinetina).

Fica ainda mais claro o efeito do 2,4-D na indução de calos maiores e o efeito da cinetina na indução de calos menores, quando observamos os tratamentos de 21 a 25. Nestes tratamentos, a concentração de 2,4-D mantém-se em 90,6 μ M, porém, a concentração de cinetina aumenta gradualmente do tratamento 21 para o 25, num efeito inversamente proporcional o tamanho dos calos diminui a medida que a concentração de cinetina aumenta. LIMA & CAETANO (2002), encontraram resultados semelhantes a este trabalho, em cultura de tecidos de *Tabebuia caraíba*, onde a formação de calos foi favorecida quando explantes foliares foram inoculados em meio MS suplementado com

4,53 μM . de ácido 2,4-D e 0,93 μM de cinetina, indicando que há uma resposta favorável ao crescimento e desenvolvimentos de calo em balanços hormonais onde as concentrações de auxina são superiores às de citocinina. SOUZA (2007) também encontrou resultado favorável no desenvolvimento de calo de *Eucalyptus urophylla* quando o balanço 2,4-D/Cinetina foi favorável ao 2,4-D. Até mesmo em cultura de calos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), obteve-se bons resultados na formação de calos numa relação auxina/citocinina (LIMA et al., 2002).

4.2 Quantidade de calos formados para os diferentes tratamentos

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, em média, três calos por recipiente. No tratamento testemunha, em que a concentração de cinetina e ácido 2,4-D era 0 μM ., não houve formação de calos, indicando que apenas a presença do regulador de crescimento Ácido Indol-acético (AIA) na concentração de 5,71 μM não é o suficiente para o desenvolvimento de calo de *Eucalyptus grandis* nas condições experimentadas. CALDAS et al., (1998), reforçam a eficiência do 2,4-D e ressaltam a ineficácia do AIA na indução de calos. Mesmo nos tratamentos onde estava presente apenas o regulador 2,4-D em concentrações mais baixas (4,53 μM), houve indução de calogênese, evidenciando que a presença, deste regulador vegetal, ainda que em pequenas quantidades é essencial para que haja calogênese em *E. grandis*.

Entretanto, LIMA et al. (2002) estudando o efeito dos reguladores vegetais BAP E ANA em cultivo *in vitro* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), observou o crescimento de calos partindo de explantes de segmentos caulinares a partir dos 14 dias de cultivo, mesmo na ausência de reguladores vegetais.

Os resultados encontrados neste trabalho discordam, em parte, de GRATTAPAGLIA & MACHADO, (1990) e AMMIRATO (1983), que descrevem que a indução da calogênese ocorre em meio com altas concentrações de auxinas; uma vez que os resultados demonstraram que mesmo em concentrações baixas (4,53 $\mu\text{M/L}$), a auxina foi capaz de induzir a formação de calos. Segundo PONCHIA & GARDIMAN (1993), o uso associado de uma citocinina e uma auxina pode levar a bons resultados de multiplicação.

4.3 Friabilidade e oxidação para os diferentes tratamentos

Para as variáveis friabilidade e oxidação, apesar do material ter sido cultivado totalmente em ausência de luminosidade, níveis variados de oxidação foram observados nos calos provenientes de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento. Foi observado que os calos formados utilizando os protocolos em que as concentrações de ácido 2,4-D e cinetina eram praticamente iguais, os calos apresentaram-se friáveis e com coloração predominante branca. Concentrações altas de ácido 2,4-D induziram a formação de calos maiores, porém, apresentando-se parcialmente ou totalmente oxidados e menos friáveis, concordando com RAMACHANDRA & RAVISHANKAR (2002), que observaram que elevados níveis de auxina ácido 2,4-D no meio promovem formação de metabólitos secundários em algumas culturas. No trabalho desenvolvido por PATNAIK *et al.* (1997) níveis elevados de 2,4-D aumentaram consideravelmente a friabilidade de calos embriogênicos de *Cymbopogon martinii*. GIRI, *et al.* (1993), no entanto, afirmam que a presença de ácido 2,4-D no meio de cultura está associado a uma maior oxidação do tecido.

Concentrações mais elevadas de cinetina em relação ao ácido 2,4-D também induziram a formação de calos oxidados e de difícil desagregação. Neste experimento, os calos que apresentaram resultados menos favoráveis para estas características, foram os calos cujos meios de cultura foram suplementados com balanços favoráveis tanto para a cinetina, quanto para o ácido 2,4-D, enquanto balanços mais equilibrados favoreceram a formação de calos friáveis e menos oxidados (Figura 3). PALÚ *et al.* (2004), estudando Acaiá Cerrado (*Coffea arabica* L.), também conseguiram calos de boa qualidade pela interação entre 2,4-D (9,06 µM) e cinetina (8,835 µM) em proporções muito próximas entre os hormônios.



Figura 3. Análise da variável oxidação e friabilidade . (A) calo formado em presença de T 5 (4,53 μ M de 2,4-D + 23,25 de cinetina). A coloração mais escura indica maior oxidação e menor friabilidade. (B) calo formado em presença de T4 (4,53 μ M de 2,4-D + 11,62 μ M de cinetina) . (C) calo formado em presença de T19 (45,53 μ M de 2,4-D + 11,62 de cinetina). (D) calo formado em presença de T15 (22,65 μ M de 2,4-D + 23,25 μ M de cinetina) . Nota-se que, entre os tratamentos, este foi o que apresentou melhores resultados, com calos mais claros e mais friáveis.

Os níveis de oxidação de 1 a 5 baseados na metodologia de FLORES et al. (2000) são relacionados a cada tratamento na Figura 4.

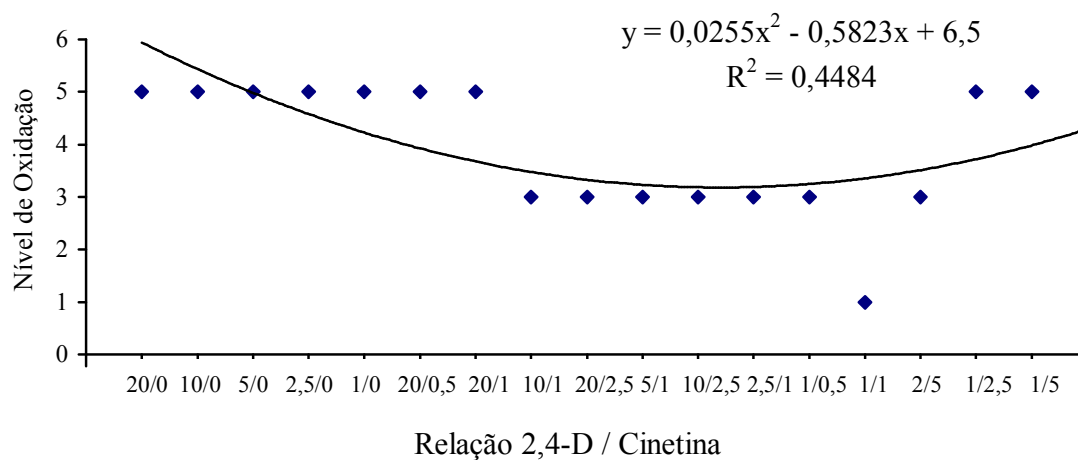


Figura 4. Análise do nível de oxidação dos calos de *E. grandis*. Nível de oxidação variando de 1 a 5, (1) calo não oxidado, (3) calo parcialmente oxidado e (5) calo totalmente oxidado.

4.4 Quantidade de calos rizogênicos para os diferentes tratamentos

Pelos resultados analisados foi possível observar que nos meios de cultura suplementados com elevadas concentrações de 2,4-D, alguns calos rizogênicos de *E. grandis* foram formados (Figura 5 e 6).

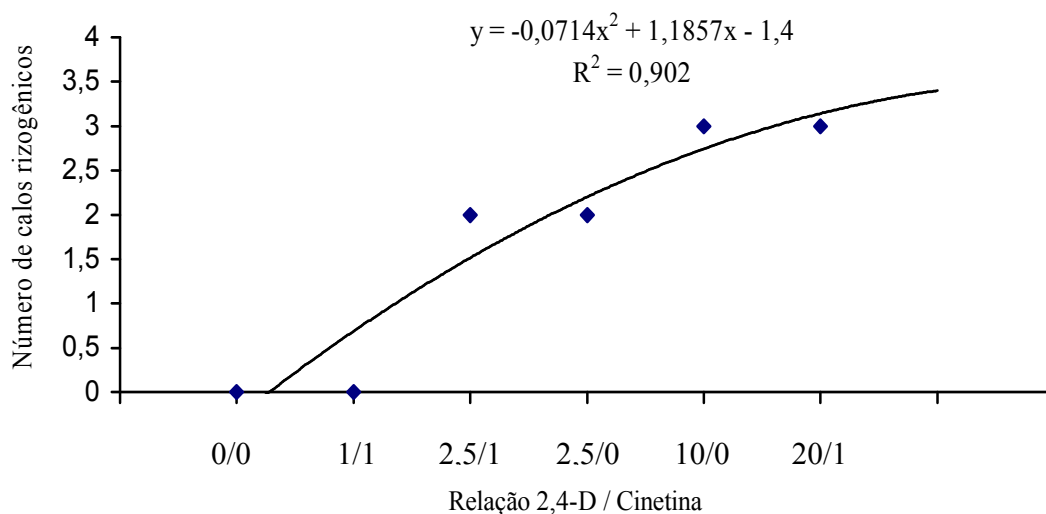


Figura 5. Relação entre os tratamentos que induziram calos rizogênicos e número de calos rizogênicos por tratamento.



Figura 6. Característica dos calos (formação de raízes). (A) calo formado em condição de T6 (45,53 µM de 2,4-D + 0 µM de cinetina); (B) calo formado em condição de T8 (11,32 µM de 2,4-D + 4,65 µM de cinetina); e (C) calo formado em condição de T16 (45,53 µM de 2,4-D + 0 µM de cinetina) . As setas indicam a presença de raiz formada em cada tratamento.

Estes resultados coadunam com a afirmação de KRIKORIAN (1990), que verificou que quando o nível de citocinina em relação ao de auxina é alto, ocorre à formação de brotos e na situação oposta, pode ocorrer a formação de raízes. Quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida.

Os Tratamentos que desenvolveram calos com raízes estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Tratamentos que induziram formação de calos rizogênicos em *E. grandis*

Nº Tratamento	2,4-D μM.	Cinetina μM.
T(06)	11,325	0
T(08)	11,325	4,65
T(16)	45,3	0
T(23)	90,6	4,65

4.5 Teor de lignina para os diferentes tratamentos

Durante a etapa de determinação da lignina, foram perdidos 7 tratamentos em decorrência de pressão e posterior rachadura nos tubos durante a centrifugação. Os tratamentos perdidos foram: T(3), T(6), T(21), T(22), T(23), T(24), T(25) (Tabela 8). Dessa forma para manter o trabalho em andamento todos os pontos discutidos que envolvam a lignificação foram baseados apenas em dezoito tratamentos, e não em vinte e cinco como nos itens anteriores.

Tabela 8. Tratamentos testados evidenciando os tratamentos perdidos.

2,4D/CINETINA (μM. L ⁻¹)	0	2,325	4,65	11,625	23,25
4,53	T1 4,53/0	T2 4,53/2,325	*	T4 4,53/11,625	T5 4,53/23,25
11,325	*	T7 11,35/2,325	T8 11,35/4,65	T9 11,35/11,625	T10 11,35/23,25
22,65	T11 22,65/0	T12 22,65/2,325	T13 22,65/4,65	T14 22,65/11,625	T15 22,65/23,25
45,3	T16 45,3/0	T17 45,3/2,325	T18 45,3/4,65	T19 45,3/11,625	T20 45,3/23,25
90,6	*	*	*	*	*

*representam os tratamentos perdidos durante a extração da lignina.

Durante as análises estatísticas, os dados foram submetidos ao teste de Teste de Lilliefors, onde inicialmente não apresentaram normalidade. Os dados foram transformados e novamente submetidos ao teste, desta vez apresentando normalidade. Em seguida foi realizada a análise de variância, onde os resultados foram significativos a 1% (Tabela 9). Por último os dados foram submetidos ao teste de médias Duncan a 5% de probabilidade, devido a variabilidade dos dados (Figura 7).

Tabela 9. Resumo da análise da variância dos dados obtidos em função da concentração de lignina por tratamento.

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

** significativo a 1%

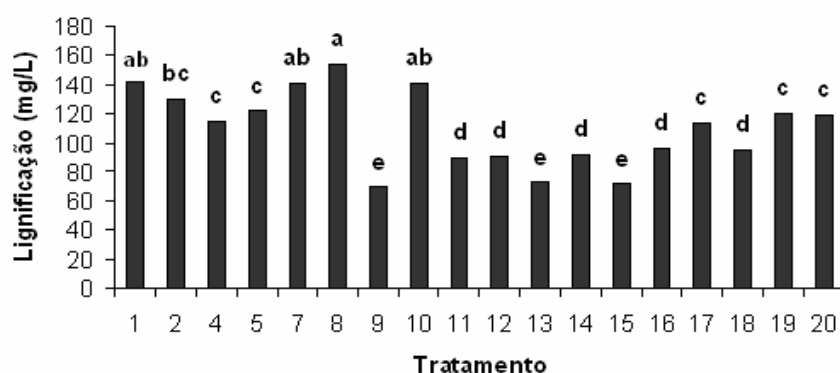


Figura 7. Teste de comparação de médias Duncan a 5% de probabilidade para lignificação. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si.

A Tabela 10 compara os resultados para teor de lignina pelo teste de médias Duncan a 5 % de probabilidade, ordenadas da maior média para a menor, com a finalidade de facilitar a visualização da influência de cada tratamento no teor de lignificação.

Tabela 10. Teste de comparação de médias Duncan a 5% de probabilidade para concentração de lignina, ordenado da maior para a menor média.

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.

O tratamento que apresentou maior concentração média de lignina em mg/L foi o T(8), o resultado foi bem superior aos outros tratamentos, tanto que difere dos outros tratamentos a 5% de probabilidade (representado pela letra **a**). Esse tratamento possui um balanço favorável ao regulador de crescimento 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 T9, possui um balanço equilibrado entre o 2,4-D e a cinetina. Cabe ressaltar, que o T9, ao contrário do T8, não é a única média do seu grupo estatístico (representado pela letra **e**), ele não difere estatisticamente de outras duas médias, porém é a média mais baixa do grupo. Souza (2007), testando a influência do 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. Os dois resultados são antagônicos aos deste trabalho, pois as concentrações mais altas de lignina estão associadas a uma quantidade maior de 2,4-D em relação a cinetina, e as mais baixas ao invés de um balanço favorável a cinetina, caracterizam-se por um balanço equilibrado. Karkonen (2001), também sugere balanços favoráveis a cinetina (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 pode ser a que favoreça a 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), ao usar baixas quantidades de 2,4-D em células de *Picea abies*, quando a concentração de 2,4-D variou de 0-0,5 μM , houve um incremento significativo no teor de lignina das células. Entretanto, o mesmo autor achou resultados ainda melhores quanto à lignificação em *Picea abies*, quando usou 0,05 μM de 2,4-D combinado com 2,5 μM de cinetina.

Quando o balanço hormonal foi favorável a cinetina (T10, T5 e T4), ao que parece, no T10, onde a relação 2,4-D/cinetina foi maior que em T5 e T4, a concentração de lignina por média de tratamento foi maior. Já nos tratamentos onde as proporções de 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-D combinado com ácido jasmônico na lignificação estudando a espécie *Eucalyptus urophylla*. Em combinações onde as concentrações de 2,4-D foram bem 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 estão presentes apenas o regulador de crescimento 2,4-D (T1, T16 e T11), observa-se onde a concentração de 2,4-D foi a mais baixa dos três tratamentos (T1), houve uma concentração muito maior de lignina, enquanto no T16 e T11, apesar de a concentração do 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-D, quando usado na ausência de cinetina, em concentrações mais baixas, pode estimular de forma mais intensa a lignificação, do que quando usado na ausência de cinetina em concentrações mais altas. Monteiro (2005), também testou 2,4-D de forma isolada em *E. urophylla*, e os resultados encontrados foram, mais uma vez, diferentes dos encontrados neste trabalho. Quando testou uma quantidade relativamente mais baixa de 2,4-D a quantidade de lignina ficou bem abaixo da testemunha (0 μ M de ácido jasmônico/0 μ M de 2,4-D) e quando a quantidade de 2,4-D dobrou, a percentagem de lignina aumentou significativamente.

4.6 Tamanho dos calos e Lignificação

Os dois tratamentos com as mais altas concentrações de lignina (T1 e T8), apresentaram calos com tamanho mediano em relação aos demais. Entretanto, nos tratamentos T9 e T15, que possuem as mais baixas concentrações de lignina, os calos também apresentaram tamanho mediano.

Os calos que apresentaram maiores tamanhos em cm, foram submetidos aos tratamentos T11, T16 e T19. Mas, aparentemente não estão relacionados a uma maior ou menor quantidade média de lignina por tratamento, já que o T11 e o T16 foram submetidos a tratamentos que apresentaram concentrações mais baixas de lignina por média de tratamento, enquanto o T19 apresentou concentração média de lignina por tratamento mais alta.

Foi encontrada uma correlação pelo método Pearson que indica que em menores teores de lignificação os calos se desenvolveram mais. Entretanto este valor foi muito baixo ($r = -0,2085$), parecendo praticamente não existir correlação entre as duas variáveis.

4.7 Friabilidade e oxidação para Lignificação

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 são de medianas a altas. Nestes tratamentos a relação 2,4-D/Cinetina é favorável ao 2,4-D, e em alguns casos em concentrações muito mais altas.

Quando a relação entre os hormônios está favorável a cinetina, 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. Como Sato et al, 2004 **apud** George e Sherrington (1984), sugere que entre as substâncias fenólicas, responsáveis pela oxidação dos tecidos estão os precursores da lignina, pode-se entender, que de fato a maior intensidade de oxidação fenólica implica em maiores concentrações de lignina por média de tratamento em mg/L. Além disto, Andrade *et al*, (2000) relata que em plantas lenhosas, acumulam-se polifenóis e produtos de oxidação, dentre os quais encontra-se a lignina.

5 CONCLUSÕES

- A formação de calos de *E. grandis* ocorre com facilidade em presença do 2,4-D ou em combinação com a cinetina nas concentrações testadas neste estudo;
- Os tratamentos testados podem influenciar em algumas características dos calos, como níveis de oxidação, tamanho, presença de raiz e lignificação;
- Os tratamentos testados neste trabalho, podem servir como base na elaboração de protocolos para cultura de calos de *E. grandis*;
- O teor de lignina nos calos de *E. Grandis* parece apresentar uma relação com os níveis de oxidação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Células em nível de calo podem hospedar um potencial bioquímico capaz de estabilizar o efeito oxidativo do tecido através da formação da lignina e as variações dos tipos e concentrações dos reguladores de crescimento desencadeiam alterações no processo metabólico que pode leva ao processo de lignificação.

A possibilidade de desenvolver protocolos neste trabalho pode ser muito útil para estudos na área de biotecnologia vegetal, em especial para trabalhos desenvolvidos com espécies lenhosas. Além disto, este trabalho abre caminho para estudos mais aprofundados sobre a influência de reguladores vegetais no processo de lignificação em *E. grandis*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABREU, H.; MAÊDA, J.; LATORRACA, J.; PEREIRA, R.; MONTEIRO, M.B.; ABREU, F.; CARMO, J. Proposta de Modificação da Biossíntese da Lignina como Estratégia para Correção de Defeitos em Madeiras. **Silva Lusitana**, Lisboa, 11(2): 217 - 225, 2003.

AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.J.; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.J.; YEOMAN, M.M. **Plant tissue and cell culture**. 2 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications ed.H. E. Street, 1977, p.267-306.

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.

ALLEONI, B.; BOSQUEIRO, M.; ROSSI, M. Efeito dos reguladores vegetais de estimulante no desenvolvimento e produtividade do feijoeiro. **Publicatio UEPG**, São Paulo, v.6. n.1, p. 23-25, 2000.

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, maio 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.

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

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P.R.A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, jan./mar., 2000.

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

AYUB; R.A.; GEBIELUCA, A.N. Embriogênese somática em genótipos de café (*coffea arabica*) é citocinina dependente. **Ci. Agr. Eng.**, Ponta Grossa, 9 (2): 25-30, ago. 2003.

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.

BARREIRO, A.P.; ZUCARELI, V.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Análise de crescimento de plantas de manjerição tratadas com reguladores vegetais. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.4, p.563-567, 2006.

BARROS, S.A.; RODRIGUES, J.D. Efeito da aplicação pré-colheita do GA+2,4-D na maturação de frutos de tangerina poncã. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n. 2, p. 611-622, 1993.

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.

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, London, 1967. v.2. 800p.

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.

BURGESS, I.P. A ocorrência natural de *Eucalyptus grandis*, seu padrão de distribuição nas florestas naturais, suas características e conservação. 1983. In: Simpósio IUFRO. Águas de São Pedro. Silvicultura. São Paulo, 35:397-399.

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.

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

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

CARBALLO, L.R., “**The influence of chemical composition and age of caribea pine wood (*Pinus caribea*) on the physical e mechanical properties as well as on the yield of sulfite pulp**”. 1990. Dissertação (Mestrado) – Universidade Escola de Floresta e Tecnologia da Madeira, Eslovaca.

CASTRO, P.R.C; VIEIRA, E.L. **Aplicação de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 132p.

CASTRO, P.R.C.; GONÇALVES, M.B.; DEMÉTRIO, C.G.B.; Efeito de reguladores vegetais na germinação de sementes. **Anais da Esalq**, v.2, p. 449-468, 1985.

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

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

CHRISTIERNIN, M. Lignin composition in cambial tissues of poplar. **Plant Physiol Biochem.**, Stockholm, p.11-12, Nov.2006.

CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.F. Efeito de bap sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *schizolobium amazonicum* huber ex ducke (paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 01, p.118-124, 2004.

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

DALESSANDRO, G. & ROBERTS, L. W. Induction of xylogenesis in pith parenchyma explants of *Lactuca. Am. J. Bot.* 58, 378-385, 1971.

DAVIES, P.J. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. New York, Martin Nijhoff Publ.:1987.

DAVIN B.L., LEWIS G. N. Lignin primary structures and dirigent sites. **Curr Opin Biotechnol**, v.16 (4):407-15, Aug 2005.

DAY A., RUEL K., NEUTELINGS G., CRONIER D., DAVID H., HAWKINS S., CHABBERT B. Lignification in the flax stem:evidence for an unusual lignin in bast fibers. **Planta**, France, 222(2):234-45, 21 Jun.2005.

ECHER, M.M.; GUIMARÃES, V.F.; KRIESER, C.R.; ABUCARMA, V.M.; KLEIN, J.; SANTOS, L.; DALLABRIDA, W.R. Uso de bioestimulante na formação de mudas de maracujazeiro amarelo. **Ciências Agrícolas**, Londrina, v.27, n.3, p. 351-370, 2006.

ELDRIDGE, K.G. Breeding systems, variation and genetic improvement of tropical eucalyptis. In: BURLEY, J.; STYLES, B. T. Tropical trees. London, Academic Press, 1976. p. 101-108.

FINGER, C.A.G.; SCHNEIDER, P.R.; KLEIN, J.E.M. Produção de florestas de *eucalyptus grandis* hill ex maiden em segunda rotação, conduzidas com um broto por touça e submetidas a interplântio. **Ci. Flor.**, Santa Maria, v.3, n.1, p. 185-201, 1993.

FIORI, M. P. **Comportamento de cultivares de tomateiro quanto à utilização de escórias siderúrgicas em ambiente protegido**. 2006. 54 F. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília, São Paulo.

FIRMINO, A.; ABREU, H.S.; PORTUGAL, A. C. P.; NASCIMENTO, A.M.; SOUZA, E.L.; PEREIRA, R. P.W.; MONTEIRO, M. B. O.; MAÊDA, J.M. Alterações ligno-anatômicas em *Solanum gilo* Raddi. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 394-401, maio/jun., 2006.

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, p. 09-14, 2000.

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

FOSKET, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic Press, 1994. 580p.

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

GARCIA, R.R. **Efeito de reguladores vegetais no desenvolvimento de Plantas de alfafa (*medicago sativa* L.) Cv. “crioula”**. 2006. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Faculdade de Marília, São Paulo.

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

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

GIRI, A.; AHUJA, P.S. & AJAYKUMAR, P.V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.32, p.213-218, 1993;

GLASSER, W.G. Lignin. In: CASEY, J.P. (ed). **Pulp and Paper-Chemistry and Chemical Technology**. John Wiley & Sons, Inc. 3^a ed., 1980, p. 39-111.

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. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, nº. 26, p. 18-22, maio/junho 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, 1998. v. 1, p. 183-260.

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.

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.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de biotecnologia**. Edição da steinmacher/CCA/UFSC, 2006, 41 p.

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.

HARTMANN, H.T.; KOFRANEK, A.M.; RUBATZKY, V.E. & FLOCKER, W.J. **Plant Science: growth, development and utilization of cultivated plants**. 2.ed. New Jersey: Regents/Prentice Hall, 1988, 674p.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.A. de; GONÇALVES, A.N. **Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Piracicaba: IPEF (Circular técnica, 194), 2002. 21p.

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 (Circular Técnica), n. 192, 2000, 14p.

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.

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

JUNG, H. G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 59, p. 169-176, 1989.

JUNG, H. G.; VOGEL K.P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **J. Anim. Sci.**, v. 62, p. 1703, 1986.

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.

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. Tese (Mestrado em Fisiologia vegetal)- University of Helsinki, Helsinki.

KLAHOLD, C.A.; GUIMARÃES, V.F.; ECHER, M.M.; KLAHOLD, A.; CONTIERO, R.L.; BECKER, A. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Sci. Agron.**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 179-185, April/June, 2006.

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

LACERDA, R. S. **Teores de lignina estimados através do método espectrofotométrico “Lignina Solúvel em Brometo de Acetila” de alguns cultivares de aveia**. 2001.93 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal)- Universidade de São Paulo, Pirassununga.

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

LEE, B.R.; Kim, K.Y; Jung, W.J.; Avice, J.C., Ourry, A; Kim, T.H. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). **J Exp Bot**, Korea, p. 58, 13 fev, 2007.

LEWIS, D. H. Boron and lignification and the origin of vascular plants- a unified hypothesis. **New Phytologist**, v. 84, p. 209-229, 1980.

LIMA, G. P. P. ; BARSALOBRES, C. ; PIZA, I.M. T. ; CEREDA, M. P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv MCOL 22) cultivada in vitro. **R. bras. Agrociência**, v. 8, n. 2, p. 107-110, mai-ago, 2002.

LIMA, A.S.B.; CAETANO, L.C. Produção de Naftoquinonas em culturas de calos de *Tabebuia caraiba* (MART) – Bignoniaceae. CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53, Recife-PE, **Resumos**. n. 61, p. 25, 2002.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. New York: Academic Press, 1986. 674 p.

MENZIES, J.G. Effects of soluble silicon on the parasitic fitness of *Sphaerotheca fugilinea* on *Cucumis sativus*. **Phytopathology**. v.81, p.84-88, 1991.

MONSELISE, S. P. The use of growth regulators in citriculture: a review. **Science Horticulture**. Canterbury, v.11, p.151-162, 1979.

MONTANS, F.M. **Inoculação e aplicação de regulador vegetal na cultura do amendoim cultivado em dois solos de diferentes texturas**. 2007. 55 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade de Marília, São Paulo.

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

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.

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.

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

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**, Viçosa, v.29, n.3, maio/jun. 2005.

MORAIS, S. A. L. **Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*: isolamento, quantificação e análise estrutural**. 1992. 175 f. Doutorado (Doutor em Ciências - Química Orgânica). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

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.

NETO, D.D.; DARIO, G.J.A.; JÚNIOR, P.A.V.; MANFRON, P.A.; MARTIN, T.N.; BONNECARRÉRE, R.A.G.; CRESPO, P.E.N. Aplicação e influência do fitoregulador no crescimento das plantas de milho. **Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro.** Uruguiana, v.11, n.1, p. 93-102, 2004.

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.

PALÚ, E.G.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência agrotécnica**, v. 28, n. 4, p. 736-742, 2004.

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

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.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, nº. 25, p. 44-48, 2002.

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

PHILLIPS, G. C. & COLLINS, G. B. Induction and development of somatic embryos from cell suspensions of soybean. **Pl. Cell Tis. Org. Cult.** p.123-129, 1981.

PONCHIA, G.; GARDIMAN, M. The micropropagation and post-acclimation growth of *Prunus laurocerasus* L. cv. Otto Luyken: additional findings. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v.7, n.1, p. 11-14, 1993.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites, **Biotechnology Advances**, v.20, p. 101-153, 2002.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2001, 906p.

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

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.

SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: **Fundação Arthur Bernardes** - UFV - Viçosa, 2007.

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

SALISBURY, F.B.; ROSS, C. **Plant Physiology**. Wadsworth Publishing Company, Inc., Belmont, California, 1969, 747p.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Phisiology**. 4 ed. Wadsworth publishing Company: EUA, 1992, 682p.

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. 415-444p.

SANTOS, H. F. Análise conformacional de modelos de lignina. **Quím. Nova**, São Paulo, v.24, n.4, jul./ago. 2001.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; SOUZA, V.C.; DORNELAS, G.V. Controle de contaminação e oxidação na micropropagação do pau d'alho (*Galliesia gorazema* moq.). **Agropecuária Técnica**, v.25, n.2, p.65-70, 2004.

SAVIOLI, N. M. F.; FUKUSHIMA R.S. Extração da lignina com o reagente brometo de acetila: influência da espécie forrageira, estágio de maturidade e parte da planta. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1320-1332, 2000.

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, 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. 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.

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

SOROKIN, H.P.; MATHUS, S.N.; THIMANN, K.V. The effects of auxins and kinetin on xylem differentiation in the pea epicotyl. **Am J Bot**, v. 49, p. 444-454, 1962.

SOUZA, 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.

SOUZA, C.R. .Comportamento da *Acacia mangium* e de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em plantios experimentais na Amazônia Central. **Scientia Forestalis**, n.65, p.95-101, 2004.

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

STOYNOVA, B.E.; KARANOV, E.; PETROV, P. & HALL, M.A. Cell division and cell expansion in cotyledons of Arabidopsis seedlings. **New Physiologist**, v.162, p.471, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAKAHASHI, E.K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) –Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

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(9-10):903-10, out.2004.

TOMASELLI, I. Processing young Eucalyptus. In: **THE FUTURE OF EUCALYPTS FOR WOOD PRODUCTS**. Launceston, Tasmania. Proceeding. Launceston: IUFRO, 2000. p. 167-174.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, n. 174, p. 58-62, 1998.

TREWAVAS, A. How do plant growth substances work? **Pl. Cell and Env.**, v.4:203-228, 1981.

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

VALOIS, A.C.C. Cultura de tecidos vegetais. In: CID, L.P.B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p.7.

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

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

ZIMMERMANN, M.H. & BROWN, C.L. **Trees Structure and function**. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1971, p. 336.

WARREN WILSON, J. & WARREN WILSON P.M. Control of tissue patterns in normal development and in regeneration. In: BARLOW, P M, CARR D J (Eds.) **Positional controls in plant development**. Cambridge University Press, Cambridge, 1984. p. 225-280.

WEAVER, R. J. **Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura**. 5. ed. Mexico: Trillas, 1987. 622 p.

WATT, M.P.; BLAKEWAY, F.; CRESSWELL, C.F. HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Journal**, n.157, p.59-65, 1991.

8 ANEXOS

Anexo I- Análises estatísticas para concentração de lignina por tratamento

Anexo II- Análises estatísticas para tamanho dos calos nos diferentes tratamentos

Anexo I- Análises estatísticas para concentração de lignina por tratamento

D E S C R I Ç Ã O D O A R Q U I V O

Tipo de Leitura - Microsoft Excel

Variáveis	Mínimos	Máximos	Perdidos	Válidos
TRAT	1.000000	18.00000	0	90
REP	1.000000	5.000000	0	90
ABS	0.3590000	0.8570000	0	90
LABS	0.6701918E-01	0.4449055	0	90
CONC	65.83000	163.6300	0	90
LCONC	1.818424	2.213863	0	90

Observações Gravadas...	90
Variáveis Totais.....	6
Valores Perdidos.....	0

Procedimento = Estatísticas simples parte - 1

Objetivo = Estatísticas para variáveis contínuas

Variáveis = ABS LABS CONC LCONC

Estatísticas Descritivas

ABS -

Número de Observações	90
Média Geral	0.583133
Desvio Padrão	0.139392

Erro Padrão	0.014693
Coeficiente de Variação	23.904001
Valor Máximo	0.857000
Valor Mínimo	0.359000
Amplitude	0.498000
Teste de t	39.687219
Probabilidade da Média = 0	0.000200
Assimetria	0.086880
Probabilidade da Assimetria = 0	0.491206
Curtose	1.826348
Probabilidade da Curtose = 3	0.277511
Intervalo de Confiança P(0.05)	0.029240
Amostra Ideal (10%)	22.628061

LABS -

Número de Observações	90
Média Geral	0.246999
Desvio Padrão	0.107140
Erro Padrão	0.011294
Coeficiente de Variação	43.376723
Valor Máximo	0.444906
Valor Mínimo	0.067019
Amplitude	0.377886
Teste de t	21.870792

Probabilidade da Média = 0
 0.000200
 Assimetria
 0.214268
 Probabilidade da Assimetria = 0
 0.478306
 Curtose
 1.834557
 Probabilidade da Curtose = 3
 0.278897
 Intervalo de Confiança P(0.05)
 0.022474
 Amostra Ideal (10%)
 74.510872

CONC -

Número de Observações
 90
 Média Geral
 109.882689
 Desvio Padrão
 27.341808
 Erro Padrão
 2.882080
 Coeficiente de Variação
 24.882726
 Valor Máximo
 163.630000
 Valor Mínimo
 65.830000
 Amplitude
 97.800000
 Teste de t
 38.126181
 Probabilidade da Média = 0
 0.000200
 Assimetria
 0.099681
 Probabilidade da Assimetria = 0
 0.489910
 Curtose
 1.836764
 Probabilidade da Curtose = 3
 0.279270
 Intervalo de Confiança P(0.05)
 5.735338

Amostra Ideal (10%)
24.518961

LCONC -

Número de Observações
90
Média Geral
2.027065
Desvio Padrão
0.111736
Erro Padrão
0.011778
Coeficiente de Variação
5.512189
Valor Máximo
2.213863
Valor Mínimo
1.818424
Amplitude
0.395439
Teste de t
172.106438
Probabilidade da Média = 0
0.000200
Assimetria -
0.218986
Probabilidade da Assimetria = 0
0.477829
Curtose
1.852479
Probabilidade da Curtose = 3
0.281933
Intervalo de Confiança P(0.05)
0.023438
Amostra Ideal (10%)
1.203246

Procedimento = Teste de Lilliefors

Objetivo = Teste para verificação de normalidade

Parâmetro (01) = ABS

Parâmetro (02) = LABS

Parâmetro (03) = CONC

Parâmetro (04) = LCONC

T e s t e d e L i l l i e f o r s

Variáveis (P=0.01)	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor
ABS 0.109	0.1235	0.093	
LABS 0.109	0.1013	0.093	
CONC 0.109	0.1241	0.093	
LCONC 0.109	0.0963	0.093	

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = LABS LCONC

Independentes= TRAT

Estatísticas Simples

Observações Perdidas = 0
Observações Válidas = 90

Distribuição dos Dados

Efeito	Código	Observações	
TRAT	1	5	-----
TRAT	2	5	-----
TRAT	3	5	-----
TRAT	4	5	-----
TRAT	5	5	-----
TRAT	6	5	-----
TRAT	7	5	-----
TRAT	8	5	-----
TRAT	9	5	-----
TRAT	10	5	-----
TRAT	11	5	-----
TRAT	12	5	-----
TRAT	13	5	-----
TRAT	14	5	-----
TRAT	15	5	-----
TRAT	16	5	-----
TRAT	17	5	-----
TRAT	18	5	-----

Nome	Média	Desvio	
LABS	0.24700	0.10714	□
LCONC	2.02706	0.11174	□

Determinante = 0.1373291E-03

Análise de Variância

LABS

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
TRAT	17	0.9026504	0.5309708E-01	32.130
Resíduo	72	0.1189833	0.1652546E-02	

Coeficiente de Variação = 16.458

D U N C A N

Variável = LABS (0.1652546E-02)

TRAT	Descrição	Dados	Médias	Comparações
------	-----------	-------	--------	-------------

5%

7		5	0.4218	A
13		5	0.4146	A
11		5	0.4060	A
9		5	0.3208	B
10		5	0.3098	B
12		5	0.3051	B
16		5	0.2942	B
14		5	0.2900	B
3		5	0.2164	C
15		5	0.2156	C
17		5	0.2117	C
18		5	0.2031	C
4		5	0.1903	C
2		5	0.1619	CD
8		5	0.1316	DE
5		5	0.1315	DE
1		5	0.1266	DE
6		5	0.0951	E

LCONC

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
--------------------	------	------------------	----------------	---

Signif.

TRAT	17	0.9810985	0.5771168E-01	31.950
Resíduo	72	0.1300538	0.1806302E-02	

Coeficiente de Variação = 2.097

D U N C A N

Variável = LCONC (0.1806302E-02)

TRAT	Descrição	Dados	Médias	Comparações
------	-----------	-------	--------	-------------

5%

--	--	--	--	--

6	5	2.1859	A
1	5	2.1524	AB
5	5	2.1489	AB
8	5	2.1471	AB
2	5	2.1147	BC
4	5	2.0864	C
18	5	2.0731	C
17	5	2.0636	C
3	5	2.0592	C
15	5	2.0554	C
14	5	1.9825	D
16	5	1.9777	D
12	5	1.9668	D
10	5	1.9616	D
9	5	1.9563	D
11	5	1.8589	E
13	5	1.8536	E
7	5	1.8431	E

Anexo II- Análises estatísticas para tamanho dos calos nos diferentes tratamentos

D E S C R I Ç Ã O D O A R Q U I V O

Tipo de Leitura - Microsoft Excel

Variáveis	Mínimos	Máximos	Perdidos	Válidos
TRAT	1.000000	26.00000	0	130
REP	1.000000	5.000000	0	130
TAM	0.3000000	1.500000	0	130
Observações Gravadas...		130		
Variáveis Totais.....		3		
Valores Perdidos.....		0		

Procedimento = Teste de Lilliefors

Objetivo = Teste para verificação de normalidade

Parâmetro (01) = TAM

T e s t e d e L i l l i e f o r s

Variáveis (P=0.01)	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor
TAM 0.090	0.1240	0.078	

Procedimento = Estatísticas simples parte - 1

Objetivo = Estatísticas para variáveis contínuas

Variáveis = TAM

Estatísticas Descritivas

TAM -

Número de Observações	
130	
Média Geral	
0.786154	
Desvio Padrão	
0.317391	

Erro Padrão
 0.027837
 Coeficiente de Variação
 40.372629
 Valor Máximo
 1.500000
 Valor Mínimo
 0.300000
 Amplitude
 1.200000
 Teste de t
 28.241298
 Probabilidade da Média = 0
 0.000200
 Assimetria
 0.170370
 Probabilidade da Assimetria = 0
 0.485576
 Curtose
 2.068222
 Probabilidade da Curtose = 3
 0.347172
 Intervalo de Confiança P(0.05)
 0.054561
 Amostra Ideal (10%)
 62.616129

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = TAM

Independentes = TRAT

T e s t e d e K r u s k a l - W a l l i s

Variável = TAM

TRAT	Descrição	Média dos	Média das
Dados		Dados	Ordens
1	-----	0.78000	63.1000

5

5	2	-----	0.48000	29.2000
5	3	-----	0.82000	68.2000
5	4	-----	0.34000	11.1000
5	5	-----	0.32000	8.8000
5	6	-----	0.96000	90.6000
5	7	-----	0.70000	54.3000
5	8	-----	0.86000	73.3000
5	9	-----	0.86000	73.3000
5	10	-----	0.36000	13.4000
5	11	-----	1.02000	*****
5	12	-----	0.48000	29.2000
5	13	-----	0.58000	42.8000
5	14	-----	0.52000	34.7000
5	15	-----	1.04000	*****
5	16	-----	1.26000	*****
5	17	-----	0.84000	70.2000
5	18	-----	0.88000	76.4000
5	19	-----	1.34000	*****
5	20	-----	1.10000	*****
5	21	-----	1.36000	*****
5	22	-----	1.02000	97.5000
5	23	-----	0.58000	41.7000
5	24	-----	0.52000	34.7000
5	25	-----	0.34000	11.1000
5	26	-----	1.08000	*****

Valor do Teste = 123.005 (P=0.05) = 37.650 (P=0.01) = 44.310

C o m p a r a ç õ e s M ú l t i p l a s

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
1	2	33.90000	87.62309	98.01790
1	3	5.10000	87.62309	98.01790
1	4	52.00000	87.62309	98.01790
1	5	54.30000	87.62309	98.01790
1	6	27.50000	87.62309	98.01790
1	7	8.80000	87.62309	98.01790
1	8	10.20000	87.62309	98.01790
1	9	10.20000	87.62309	98.01790
1	10	49.70000	87.62309	98.01790
1	11	37.00000	87.62309	98.01790
1	12	33.90000	87.62309	98.01790
1	13	20.30000	87.62309	98.01790
1	14	28.40000	87.62309	98.01790
1	15	38.10000	87.62309	98.01790
1	16	56.00000	87.62309	98.01790
1	17	7.10000	87.62309	98.01790
1	18	13.30000	87.62309	98.01790
1	19	61.40000	87.62309	98.01790
1	20	43.40000	87.62309	98.01790
1	21	60.50000	87.62309	98.01790
1	22	34.40000	87.62309	98.01790
1	23	21.40000	87.62309	98.01790
1	24	28.40000	87.62309	98.01790
1	25	52.00000	87.62309	98.01790
1	26	41.30000	87.62309	98.01790
2	3	39.00000	87.62309	98.01790
2	4	18.10000	87.62309	98.01790
2	5	20.40000	87.62309	98.01790
2	6	61.40000	87.62309	98.01790
2	7	25.10000	87.62309	98.01790
2	8	44.10000	87.62309	98.01790
2	9	44.10000	87.62309	98.01790
2	10	15.80000	87.62309	98.01790
2	11	70.89999	87.62309	98.01790
2	12	0.00000	87.62309	98.01790
2	13	13.60000	87.62309	98.01790
2	14	5.50000	87.62309	98.01790
2	15	72.00000	87.62309	98.01790
2	16	89.89999	87.62309	98.01790
2	17	41.00000	87.62309	98.01790
2	18	47.20000	87.62309	98.01790
2	19	95.30000	87.62309	98.01790
2	20	77.30000	87.62309	98.01790
2	21	94.39999	87.62309	98.01790
2	22	68.30000	87.62309	98.01790
2	23	12.50000	87.62309	98.01790
2	24	5.50000	87.62309	98.01790
2	25	18.10000	87.62309	98.01790
2	26	75.20000	87.62309	98.01790
3	4	57.10000	87.62309	98.01790
3	5	59.40000	87.62309	98.01790

3	6	22.40000	87.62309	98.01790
3	7	13.90000	87.62309	98.01790
3	8	5.10001	87.62309	98.01790
3	9	5.10001	87.62309	98.01790
3	10	54.80000	87.62309	98.01790
3	11	31.90000	87.62309	98.01790
3	12	39.00000	87.62309	98.01790
3	13	25.40000	87.62309	98.01790
3	14	33.50000	87.62309	98.01790
3	15	33.00000	87.62309	98.01790
3	16	50.90000	87.62309	98.01790
3	17	2.00000	87.62309	98.01790
3	18	8.20000	87.62309	98.01790
3	19	56.30000	87.62309	98.01790
3	20	38.30000	87.62309	98.01790
3	21	55.40000	87.62309	98.01790
3	22	29.30000	87.62309	98.01790
3	23	26.50000	87.62309	98.01790
3	24	33.50000	87.62309	98.01790
3	25	57.10000	87.62309	98.01790
3	26	36.20000	87.62309	98.01790
4	5	2.30000	87.62309	98.01790
4	6	79.50000	87.62309	98.01790
4	7	43.20000	87.62309	98.01790
4	8	62.20000	87.62309	98.01790
4	9	62.20000	87.62309	98.01790
4	10	2.30000	87.62309	98.01790
4	11	89.00000	87.62309	98.01790
4	12	18.10000	87.62309	98.01790
4	13	31.70000	87.62309	98.01790
4	14	23.60000	87.62309	98.01790
4	15	90.10000	87.62309	98.01790
4	16	108.00000	87.62309	98.01790
4	17	59.10000	87.62309	98.01790
4	18	65.30000	87.62309	98.01790
4	19	113.40000	87.62309	98.01790
4	20	95.40000	87.62309	98.01790
4	21	112.50000	87.62309	98.01790
4	22	86.40000	87.62309	98.01790
4	23	30.60000	87.62309	98.01790
4	24	23.60000	87.62309	98.01790
4	25	0.00000	87.62309	98.01790
4	26	93.30000	87.62309	98.01790
5	6	81.80000	87.62309	98.01790
5	7	45.50000	87.62309	98.01790
5	8	64.50000	87.62309	98.01790
5	9	64.50000	87.62309	98.01790
5	10	4.60000	87.62309	98.01790
5	11	91.30000	87.62309	98.01790
5	12	20.40000	87.62309	98.01790
5	13	34.00000	87.62309	98.01790
5	14	25.90000	87.62309	98.01790
5	15	92.39999	87.62309	98.01790
5	16	110.30000	87.62309	98.01790
5	17	61.40000	87.62309	98.01790
5	18	67.60000	87.62309	98.01790
5	19	115.70000	87.62309	98.01790

5	20	97.70000	87.62309	98.01790
5	21	114.80000	87.62309	98.01790
5	22	88.70000	87.62309	98.01790
5	23	32.90000	87.62309	98.01790
5	24	25.90000	87.62309	98.01790
5	25	2.30000	87.62309	98.01790
5	26	95.60000	87.62309	98.01790
6	7	36.30000	87.62309	98.01790
6	8	17.30000	87.62309	98.01790
6	9	17.30000	87.62309	98.01790
6	10	77.20000	87.62309	98.01790
6	11	9.50000	87.62309	98.01790
6	12	61.40000	87.62309	98.01790
6	13	47.80000	87.62309	98.01790
6	14	55.90000	87.62309	98.01790
6	15	10.60000	87.62309	98.01790
6	16	28.50000	87.62309	98.01790
6	17	20.40000	87.62309	98.01790
6	18	14.20000	87.62309	98.01790
6	19	33.90000	87.62309	98.01790
6	20	15.90000	87.62309	98.01790
6	21	33.00000	87.62309	98.01790
6	22	6.90000	87.62309	98.01790
6	23	48.90000	87.62309	98.01790
6	24	55.90000	87.62309	98.01790
6	25	79.50000	87.62309	98.01790
6	26	13.80000	87.62309	98.01790
7	8	19.00000	87.62309	98.01790
7	9	19.00000	87.62309	98.01790
7	10	40.90000	87.62309	98.01790
7	11	45.80000	87.62309	98.01790
7	12	25.10000	87.62309	98.01790
7	13	11.50000	87.62309	98.01790
7	14	19.60000	87.62309	98.01790
7	15	46.90000	87.62309	98.01790
7	16	64.80000	87.62309	98.01790
7	17	15.90000	87.62309	98.01790
7	18	22.10000	87.62309	98.01790
7	19	70.20000	87.62309	98.01790
7	20	52.20000	87.62309	98.01790
7	21	69.30000	87.62309	98.01790
7	22	43.20000	87.62309	98.01790
7	23	12.60000	87.62309	98.01790
7	24	19.60000	87.62309	98.01790
7	25	43.20000	87.62309	98.01790
7	26	50.10000	87.62309	98.01790
8	9	0.00000	87.62309	98.01790
8	10	59.90000	87.62309	98.01790
8	11	26.80000	87.62309	98.01790
8	12	44.10000	87.62309	98.01790
8	13	30.50000	87.62309	98.01790
8	14	38.60000	87.62309	98.01790
8	15	27.89999	87.62309	98.01790
8	16	45.80000	87.62309	98.01790
8	17	3.10001	87.62309	98.01790
8	18	3.10000	87.62309	98.01790
8	19	51.20000	87.62309	98.01790

8	20	33.20000	87.62309	98.01790
8	21	50.30000	87.62309	98.01790
8	22	24.20000	87.62309	98.01790
8	23	31.60000	87.62309	98.01790
8	24	38.60000	87.62309	98.01790
8	25	62.20000	87.62309	98.01790
8	26	31.10000	87.62309	98.01790
9	10	59.90000	87.62309	98.01790
9	11	26.80000	87.62309	98.01790
9	12	44.10000	87.62309	98.01790
9	13	30.50000	87.62309	98.01790
9	14	38.60000	87.62309	98.01790
9	15	27.89999	87.62309	98.01790
9	16	45.80000	87.62309	98.01790
9	17	3.10001	87.62309	98.01790
9	18	3.10000	87.62309	98.01790
9	19	51.20000	87.62309	98.01790
9	20	33.20000	87.62309	98.01790
9	21	50.30000	87.62309	98.01790
9	22	24.20000	87.62309	98.01790
9	23	31.60000	87.62309	98.01790
9	24	38.60000	87.62309	98.01790
9	25	62.20000	87.62309	98.01790
9	26	31.10000	87.62309	98.01790
10	11	86.70000	87.62309	98.01790
10	12	15.80000	87.62309	98.01790
10	13	29.40000	87.62309	98.01790
10	14	21.30000	87.62309	98.01790
10	15	87.80000	87.62309	98.01790
10	16	105.70000	87.62309	98.01790
10	17	56.80000	87.62309	98.01790
10	18	63.00000	87.62309	98.01790
10	19	111.10000	87.62309	98.01790
10	20	93.10000	87.62309	98.01790
10	21	110.20000	87.62309	98.01790
10	22	84.10000	87.62309	98.01790
10	23	28.30000	87.62309	98.01790
10	24	21.30000	87.62309	98.01790
10	25	2.30000	87.62309	98.01790
10	26	91.00000	87.62309	98.01790
11	12	70.89999	87.62309	98.01790
11	13	57.30000	87.62309	98.01790
11	14	65.39999	87.62309	98.01790
11	15	1.10000	87.62309	98.01790
11	16	19.00000	87.62309	98.01790
11	17	29.90000	87.62309	98.01790
11	18	23.70000	87.62309	98.01790
11	19	24.40000	87.62309	98.01790
11	20	6.40000	87.62309	98.01790
11	21	23.50000	87.62309	98.01790
11	22	2.60000	87.62309	98.01790
11	23	58.40000	87.62309	98.01790
11	24	65.39999	87.62309	98.01790
11	25	89.00000	87.62309	98.01790
11	26	4.30000	87.62309	98.01790
12	13	13.60000	87.62309	98.01790
12	14	5.50000	87.62309	98.01790

12	15	72.00000	87.62309	98.01790
12	16	89.89999	87.62309	98.01790
12	17	41.00000	87.62309	98.01790
12	18	47.20000	87.62309	98.01790
12	19	95.30000	87.62309	98.01790
12	20	77.30000	87.62309	98.01790
12	21	94.39999	87.62309	98.01790
12	22	68.30000	87.62309	98.01790
12	23	12.50000	87.62309	98.01790
12	24	5.50000	87.62309	98.01790
12	25	18.10000	87.62309	98.01790
12	26	75.20000	87.62309	98.01790
13	14	8.10000	87.62309	98.01790
13	15	58.40000	87.62309	98.01790
13	16	76.30000	87.62309	98.01790
13	17	27.40000	87.62309	98.01790
13	18	33.60000	87.62309	98.01790
13	19	81.70000	87.62309	98.01790
13	20	63.70000	87.62309	98.01790
13	21	80.80000	87.62309	98.01790
13	22	54.70000	87.62309	98.01790
13	23	1.10000	87.62309	98.01790
13	24	8.10000	87.62309	98.01790
13	25	31.70000	87.62309	98.01790
13	26	61.60000	87.62309	98.01790
14	15	66.50000	87.62309	98.01790
14	16	84.39999	87.62309	98.01790
14	17	35.50000	87.62309	98.01790
14	18	41.70000	87.62309	98.01790
14	19	89.80000	87.62309	98.01790
14	20	71.80000	87.62309	98.01790
14	21	88.89999	87.62309	98.01790
14	22	62.80000	87.62309	98.01790
14	23	7.00000	87.62309	98.01790
14	24	0.00000	87.62309	98.01790
14	25	23.60000	87.62309	98.01790
14	26	69.70000	87.62309	98.01790
15	16	17.90000	87.62309	98.01790
15	17	31.00000	87.62309	98.01790
15	18	24.80000	87.62309	98.01790
15	19	23.30000	87.62309	98.01790
15	20	5.30000	87.62309	98.01790
15	21	22.40000	87.62309	98.01790
15	22	3.70000	87.62309	98.01790
15	23	59.50000	87.62309	98.01790
15	24	66.50000	87.62309	98.01790
15	25	90.10000	87.62309	98.01790
15	26	3.20000	87.62309	98.01790
16	17	48.90000	87.62309	98.01790
16	18	42.70000	87.62309	98.01790
16	19	5.40000	87.62309	98.01790
16	20	12.60000	87.62309	98.01790
16	21	4.50000	87.62309	98.01790
16	22	21.60000	87.62309	98.01790
16	23	77.39999	87.62309	98.01790
16	24	84.39999	87.62309	98.01790
16	25	108.00000	87.62309	98.01790

16	26	14.70000	87.62309	98.01790
17	18	6.20000	87.62309	98.01790
17	19	54.30000	87.62309	98.01790
17	20	36.30000	87.62309	98.01790
17	21	53.40000	87.62309	98.01790
17	22	27.30000	87.62309	98.01790
17	23	28.50000	87.62309	98.01790
17	24	35.50000	87.62309	98.01790
17	25	59.10000	87.62309	98.01790
17	26	34.20000	87.62309	98.01790
18	19	48.10000	87.62309	98.01790
18	20	30.10000	87.62309	98.01790
18	21	47.20000	87.62309	98.01790
18	22	21.10000	87.62309	98.01790
18	23	34.70000	87.62309	98.01790
18	24	41.70000	87.62309	98.01790
18	25	65.30000	87.62309	98.01790
18	26	28.00000	87.62309	98.01790
19	20	18.00000	87.62309	98.01790
19	21	0.90000	87.62309	98.01790
19	22	27.00000	87.62309	98.01790
19	23	82.80000	87.62309	98.01790
19	24	89.80000	87.62309	98.01790
19	25	113.40000	87.62309	98.01790
19	26	20.10000	87.62309	98.01790
20	21	17.10000	87.62309	98.01790
20	22	9.00000	87.62309	98.01790
20	23	64.80000	87.62309	98.01790
20	24	71.80000	87.62309	98.01790
20	25	95.40000	87.62309	98.01790
20	26	2.10000	87.62309	98.01790
21	22	26.10000	87.62309	98.01790
21	23	81.89999	87.62309	98.01790
21	24	88.89999	87.62309	98.01790
21	25	112.50000	87.62309	98.01790
21	26	19.20000	87.62309	98.01790
22	23	55.80000	87.62309	98.01790
22	24	62.80000	87.62309	98.01790
22	25	86.40000	87.62309	98.01790
22	26	6.90000	87.62309	98.01790
23	24	7.00000	87.62309	98.01790
23	25	30.60000	87.62309	98.01790
23	26	62.70000	87.62309	98.01790
24	25	23.60000	87.62309	98.01790
24	26	69.70000	87.62309	98.01790
25	26	93.30000	87.62309	98.01790

Trat	Média
21	1.36 ^a
19	1.34 ^a
16	1.26 ^a b
20	1.1 ^a b
26	1.08 ^a b

15	1.04 ^a b
11	1.02 ^a b
22	1.02 ^a b
6	0.96 ^a b
18	0.88 ^a b
8	0.86 ^a b
9	0.86 ^a b
17	0.84 ^a b
3	0.82 ^a b
1	0.78 ^a b
7	0.7 ^a b
13	0.58 ^a b
23	0.58 ^a b
14	0.52 ^a b
24	0.52 ^a b
2	0.48 ^a b
12	0.48 ^a b
10	0.36 ^a b
4	0.34 ^a b
25	0.34 ^a b
5	0.32 ^a b