

Atenuação do processo de lignificação por 2,4-D em células em suspensão de *Eucalyptus urophylla*

Kelly Carla Almeida de Souza Borges¹, Heber dos Santos Abreu¹, Jorge Mitiyo Maeda², Deisiane Amaral de Deus¹, Bruno Henrique Crespo Porto¹, Daniel Bastos Chalita¹

¹Departamento de Produtos Florestais/UFRRJ, ²Departamento de Silvicultura-IF/UFRRJ

Recebido em 12 de Junho de 2007

Resumo

O processo de atenuação de lignificação por 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) mostrou-se eficiente atenuando o metabolismo da formação da lignina. As células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* foram produzidas em meio MS líquido suplementado com cinco diferentes tratamentos de 2,4-D (T1: 1 mg/L; T2: 2 mg/L; T3: 4 mg/L; T4: 5 mg/L; T5: 0 mg/L) sem agentes antioxidantes. Através da espectrometria de infravermelho e de ultravioleta foi verificado que as células acumularam diferentes quantidades de lignina. O tratamento 2 com 2 mg/L de 2,4-D promoveu o menor acúmulo de lignina (7 mg/L), ao contrário do tratamento 5 sem 2,4-D, que apresentou o mais alto teor dessa substância (220 mg/L).

Palavras-chaves: lignina, *Eucalyptus urophylla*, suspensão celular.

Attenuation of the lignification process by 2,4-D in *Eucalyptus urophylla* cell suspension

Abstract

The lignification attenuation process by 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) showed efficient to attenuated the lignin metabolism formation. The suspension cells from *Eucalyptus urophylla* were produced in MS liquid middle supplemented with five different treatments with 2,4-D: (T1: 1 mg/L; T2: 2 mg/L; T3: 4 mg/L; T4: 5 mg/L; T5: 0 mg/L) without antioxidants agent. The infrared and ultraviolet spectrometry were used to determinate of lignin content with cell free of extractive and protein. The treatment 2 with 2 mg/L of 2,4-D provided lowest lignin accumulation (7 mg/L), while in the 5 treatment without 2,4-D was verified the highest lignin content (220 mg/L).

Key words: lignin, *Eucalyptus urophylla*, cell suspension.

Introdução

A lignina tem sido definida como uma classe de substâncias de origem fenilpropanoídica que confere resistência às plantas, defesa química e física contra fatores bióticos e abióticos. Em condições normais a lignificação inicia na parede primária e na lamela média estendendo-se através da parede secundária em direção ao lúmen (Donaldson, 2001). Em condições adversas o processo de lignificação pode ser uma resposta ativa das plantas a invasão por patógenos, por exemplo, (Hammerschmidt & Kuc, 1982; Busam et al., 1997b; Sticher et al., 1997) constituindo em importante mecanismo de defesa (Vance et al., 1980; Hammerschmidt & Kuc, 1982; Agrios, 1997; Busam et al., 1997a; Sticher et al., 1997).

Na área da biotecnologia para desenvolvimento de estudos sobre o metabolismo que leva a formação da lignina (fenilpropanoíde) tem-se utilizado a cultura de células em suspensão, um exemplo clássico é a *Glicine max* L., que tem sido utilizada em estudo com aplicando de modos de concentração diferentes de reguladores de crescimento no meio nutricional (Hahlbrock et al. 1980; Hosel et al. 1982). Um outro exemplo no que diz respeito à lignificação foi a utilização de células em suspensão de *Pinus taeda*, utilizando o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como regulador de crescimento (Eberhardt et al., 1993). Outros trabalhos sobre indução de lignificação em células de *Pinus radiata* também tem sido descrito na literatura (Moller et al., 2006). Em *Arabidopsis* L., por exemplo, a técnica de suspensão celular foi eficiente para o estudo da biossíntese de vários metabólitos secundários (Davey et al., 1999).

A dificuldade de estudar o processo de lignificação tem levado pesquisadores a desenvolverem métodos que facilitem o entendimento desse processo. Moller et al., (2006), por exemplo, utilizaram a técnica de suspensão celular para observar os aspectos enzimáticos e topoquímicos da lignificação, enquanto Karkönen et al. (2002), tem usado a cultura de células em suspensão para mensurar a atividade de um número de enzimas envolvidas no processo de formação da lignina.

A utilização de alguns reguladores de crescimento associada ao estudo da lignificação, como é o caso do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e do 6-benziladenina (BA) no meio de cultura em suspensão permitiu verificar a influencia desses reguladores de crescimento na

formação da lignina (Kuboi & Yamada, 1978). Outros estudos com ácido α -naftalenoacético (ANA) e com o benzilaminopurina (BA) também permitiram verificar a relação entre as atividades enzimáticas e a lignificação. A utilização de cultura de células de salsa (*Petroselinum hortense*) e de trigo (*Triticum aestivum*), também permitiu observar a presença de enzimas em todas as culturas de células lignificadas (Hosel et al., 1982).

A dificuldade encontrada para estudar a lignina, na maioria dos casos envolve o desenvolvimento de métodos de isolamento alternativos para manutenção da integridade molecular das ligninas isoladas. A cultura de células surgiu como uma ferramenta importante nesse contexto, podendo utilizar meios que facilite o estudo *in vivo* das enzimas envolvidas na formação da lignina e dos aspectos de cunho estrutural/molecular (Ralph et al., 2005).

A importância atual e futura da madeira de eucalipto motivou-nos a procurar a entender o processo de lignificação dessa importante árvore. Benefícios significativos sobre a qualidade da madeira dessa essência florestal trarão significativas melhorias à indústria de celulose e papel, a indústria de moveleira e ao meio ambiente. Várias espécies de *Eucalyptus* têm sido plantadas no Brasil, entre as quais figura o *Eucalyptus urophylla*, hoje representando uma das mais utilizada na indústria de base florestal e de reconhecida importância nos estudos de melhoramento genético para a produção do híbrido conhecido como Urograndis.

Os objetivo dessa pesquisa foi desenvolver um protocolo para o entendimento do processo de lignificação em células de *Eucalyptus urophylla* em suspensão verificando a concentração de 2,4-D que atenua o processo de lignificação.

Materiais e Métodos

Aspectos botânicos

O *Eucalyptus urophylla* é uma espécie tropical originária da Indonésia, onde ocorre naturalmente. Apresenta porte elevado, forte dominância apical. A casca pode ser parcialmente rugosa a espessa fibrosa, de coloração marrom quando seca e quase negra quando úmida. As folhas das plantas adultas são alongadas, estreitas e pecioladas, sendo introduzida no Brasil por Edmundo Navarro de Andrade (Pigato & Lopes, 2001).

Os frutos podem apresentar dois tipos de formas: campanulada ou hemisférica em altitudes superiores a 1000 m; cônico em altitudes inferiores a 1000 m (Martin & Cossalter, 1976). É uma espécie que apresenta reprodução cruzada.

Assepsia das sementes

Esta etapa consistiu na desinfestação das sementes para a obtenção de um tecido descontaminado sem levá-lo à morte. Várias substâncias com ação germicida foram utilizadas. Algumas gotas de Tween 20 (0,01 a 0,05% (v/v)) foram adicionadas à solução a base de cloro para melhorar o contato destas com os tecidos. Neste caso as sementes de *Eucalyptus urophylla* foram submetidas às seguintes condições de assepsia: desinfestação em hipoclorito de sódio 1% + 0,2 mL/L de tween 20 por 20 minutos; lavagem com água bidesionizada 3 a 5 vezes; colocação das sementes em peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Após este procedimento as sementes foram inoculadas no meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) para germinação suplementada com 100 mg/L de benlate (fungicida), sendo colocadas de 20 a 25 sementes por recipiente. Após 30 dias seguidos de germinação em fotoperíodo de 16/8 horas, as plântulas geradas foram utilizadas como fonte de explantes.

Cultura de calos e Células em suspensão

Os explantes caulinares foram retirados das plântulas que apresentaram maior vigor após 30 dias em meio MS para germinação. Estes explantes foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado para formação de calos de *Eucalyptus urophylla*, suplementado com 800 mg/L de PVP (antioxidante polivinilpirrolidona). Os calos foram obtidos a partir de um regime de total ausência de luz, para isso utilizou-se uma BOD (câmara climatizada a 25°C) para garantir que não houvesse entrada de luz.

No momento em que os calos se apresentaram com um tamanho adequados, livres de contaminação e de oxidação, foram transferidos para o meio MS modificado, para dar início a cultura de células em suspensão na ausência de agentes antioxidantes.

O experimento em meio MS para células em suspensão foi realizado com diferentes concentrações de auxina

sintética 2,4-D da seguinte forma: T1=1mg/L; T2= 2mg/L; T3= 4mg/L; T4=5mg/L ; T5= 0mg/L.

Para cada tratamento foram realizadas 3 repetições e cada vidro de cultura continha 50 mL de meio líquido. Para efeito comparativo foi considerado que no protocolo para células em suspensão do meio MS existe uma concentração de cinetina de 10 mg/L, o que foi adicionado em todos os tratamentos. As células foram submetidas à agitação em torno de 125 rpm na ausência total de luz. No final do experimento as células se encontraram soltas umas das outras e o líquido da suspensão se apresentou com uma certa viscosidade.

Determinação da lignina por infravermelho

A determinação da lignina nas amostras foi realizada através dos espectros no infravermelho, usando um espectrômetro FT-IR de marca Perkin-Elmer, por refletância difusa. Foi utilizado 2 mg de cada amostra e 200 mg de KBr.

Determinação quantitativa de lignina por ultravioleta

As células retiradas do meio em suspensão foram transferidas para placas de Petri e a etapa de quantificação da lignina foi realizada pelo método de Bruce & West, (1989). As células foram maceradas em 20 mL de etanol 80% com mofariz por alguns minutos, em seguida filtradas e secas a temperatura ambiente em uma placa de Petri. Desse material seco foi retirado 50 mg que foi colocado em um tubo onde foi adicionado 4 mL de HCl 2N e 0,4 mL de ácido tioglicólico, sendo selado e aquecido em uma estufa a 100°C por 4h. Após esse tempo esse material foi resfriado e centrifugado a 30.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o material depositado no fundo onde foi lavado uma vez com 4mL de água bidesionizada. Este material foi ressuspenso em 4mL de NaOH 0,5N e agitado lentamente a 25°C por 18h para extrair o trigocolato de lignina. A amostra foi novamente centrifugada a 30.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo teste onde 0,8 mL de HCl foi adicionado e deixado em repouso por 4h a 4°C. Após 4h essa solução foi centrifugada a 30.000 rpm por 20 minutos. O material sólido foi dissolvido em 8 mL de NaOH 0,5N e a leitura

da absorvância no UV do material foi feita a 280 nm. Uma curva de calibração foi elaborada com amostra padrão lignina de *Gallesia gorazema* (lignina padrão). O branco foi feito com 10 mL de NaOH 0,5N. O aparelho utilizado foi um espectrômetro de ultravioleta, UV mini 1240 – UV-Vis spectrophotometer – Shimadzu.

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se do sistema para análise estatística (SAEG) de acordo com os tratamentos com diferentes concentrações de 2,4-D e suas respectivas concentrações de lignina obtidas após a análise no ultravioleta. As comparações de médias foram feitas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

A germinação no meio MS visando a utilização dos explantes para formação de calos foi considerada eficiente. Este meio propiciou o desenvolvimento das plântulas vigorosas permitindo a sobrevivência na etapa posterior de indução a calogênese.

Após a germinação das sementes e inoculação dos explantes no meio MS modificado para indução de calos de *Eucalyptus urophylla*, os calos foram formados, alguns com certa friabilidade, outros, não.

A ausência de luz foi um fator importante para a formação dos calos de *Eucalyptus urophylla*, permitindo o aparecimento e crescimento dos calos durante o período de inoculação no meio de cultura. Porém não foi só a luz o fator que interferiu na indução de calos, os fitorreguladores desempenharam função tão ou mais importante que a luz.

O balanço hormonal entre auxina e citocinina no meio de cultura, 2,4-D (1 mg/L) e cinetina (0,1 mg/L), respectivamente, forneceu bons resultados para a formação de calos de *Eucalyptus urophylla*, mostrando a eficiência do 2,4-D para esta atividade, embora também existam outros fitorreguladores que desempenham esta atividade de forma bem considerada.

O *Eucalyptus urophylla* pela sua capacidade de crescimento *in vitro*, apresentou plântulas com um bom desenvolvimento. Com isso, não foi preciso esperar muito tempo para retirar os explantes. O período de 30 dias após a inoculação das sementes no meio de cultura foi suficiente.

A utilização do 2,4-D se deu pela sua aparente habilidade de diminuir alguns aspectos do metabolismo

dos fenilpropanoídes (Zenk et al., 1975; Ozeki et al., 1990). A eficiência do 2,4-D no estudo da lignificação pode estar relacionada ao fato de que, segundo Eberhardt et al., (1993) observaram que meios de culturas suplementados com 2,4-D favoreceram inicialmente somente a formação de parede primária, que não é lignificada.

As culturas de suspensão das células de calos realizada a partir do meio MS modificado com 10 mg/L de cinetina e submetida a 5 concentrações diferentes de 2,4-D (T1=1mg/L; T2= 2mg/L; T3= 4mg/L; T4=5mg/L ; T5= 0mg/L) foram analisadas pela técnica do infravermelho.

Análise no infravermelho

Os espectros no infravermelho das células desprovidas de substâncias solúveis e proteínas permitiram determinar a presença de lignina nas células após suspensão. Foi possível verificar pelos sinais que se tratava de lignina. Os sinais mais característicos em cada tratamento estão descritos na tabela a seguir (Tabela 1).

Os sinais em 1500 cm⁻¹, 1451 cm⁻¹, 1380 cm⁻¹ e 1280 cm⁻¹ presente em todos os tratamentos, confirmaram a presença de lignina em todas as amostras, pois são sinais encontrados na lignina padrão de Björkman de *Gallesia gorazema* – método de Björkman (Lin & Dence, 1992). Por motivos de perda de tratamento não foi possível obter o espectro do tratamento 3.

A análise no infravermelho, portanto, confirmou a ocorrência do processo de lignificação nas células de *Eucalyptus urophylla* em suspensão (Figuras 1, 2, 3 e 4), porém não foi suficiente para a verificação da atuação do 2,4-D.

Os sinais em 1500 cm⁻¹, 1451 cm⁻¹, 1380 cm⁻¹ e 1280 cm⁻¹ presente em todos os tratamentos, confirmaram a presença de lignina em todas as amostras, pois são sinais encontrados na lignina padrão de Björkman de *Gallesia gorazema* – método de Björkman (Lin & Dence, 1992). Por motivos de perda de tratamento não foi possível obter o espectro do tratamento 3.

A análise no infravermelho, portanto, confirmou a ocorrência do processo de lignificação nas células de *Eucalyptus urophylla* em suspensão (Figuras 1, 2, 3 e 4), porém não foi suficiente para a verificação da atuação do 2,4-D.

Tabela 1. Sinais característicos de lignina em cada tratamento

Table 1. Characteristic signals of lignin in each treatment

Tratamento	Concentração de 2,4-D	Sinais característicos de lignina no infravermelho
T1	1 mg/L	1500, 1451, 1380, 1258
T2	2 mg/L	1500, 1450, 1378, 1241
T3	4 mg/L	
T4	5 mg/L	1500, 1450, 1380, 1236
T5	0 mg/L	1500, 1518, 1422, 1320, 1241

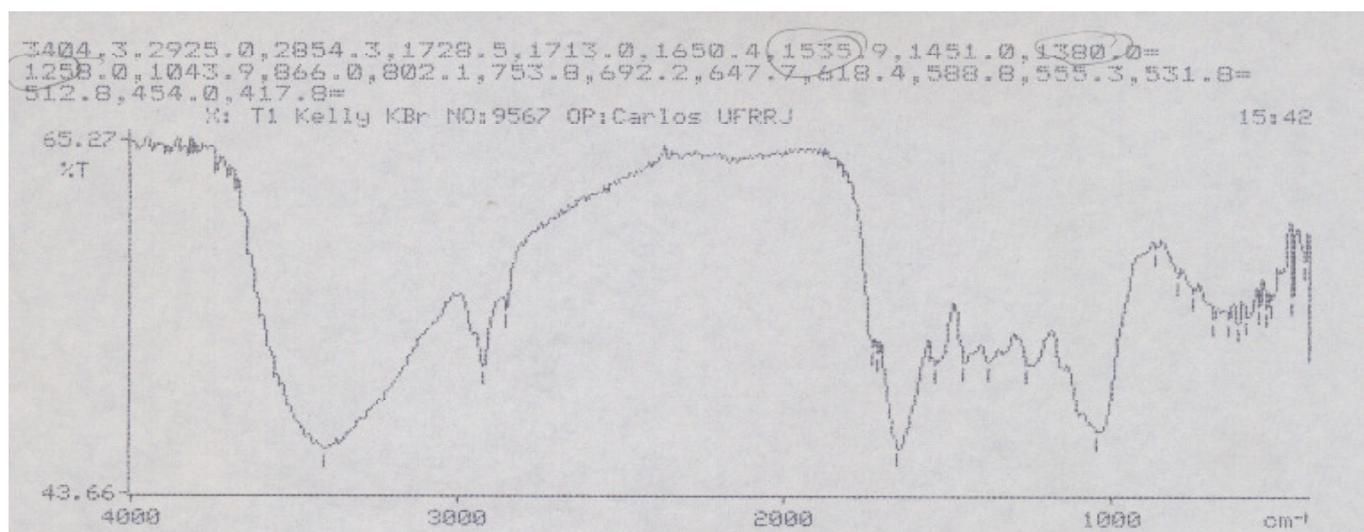


Figura 1. Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 1 da suspensão (1 mg/L de 2,4-D).

Figure 1. Spectro in the infrared of derived callus from the treatment 1 of the suspension (1 mg/L of 2,4-D).

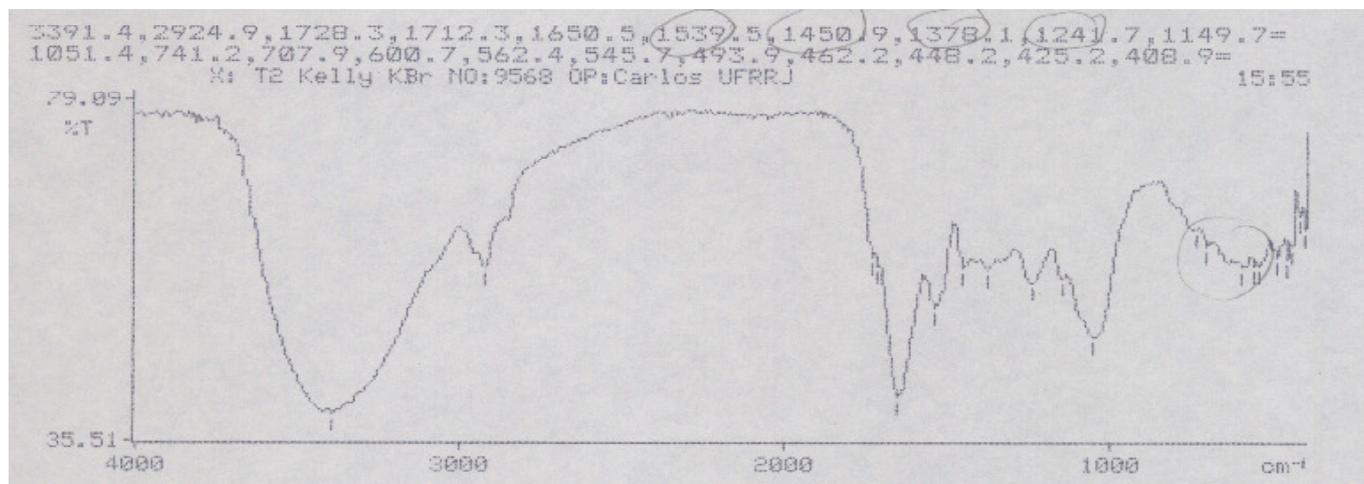


Figura 2. Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 2 da suspensão (2 mg/L de 2,4-D).

Figure 2. Spectro in the infrared of derived callus from the treatment 2 of the suspension (2 mg/L of 2,4-D).

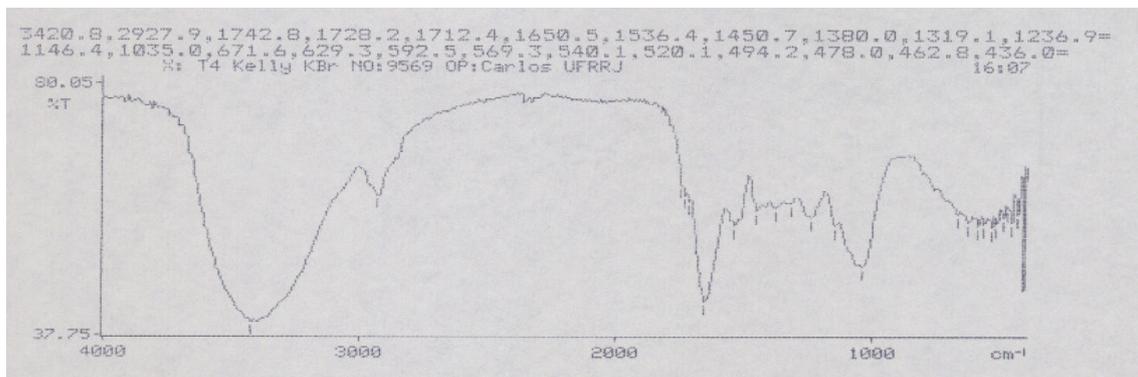


Figura 3. Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 4 da suspensão (5 mg/L de 2,4-D).

Figure 3. Spectro in the infrared of derived callus from the treatment 4 for the suspension (5 mg/L of 2,4-D).

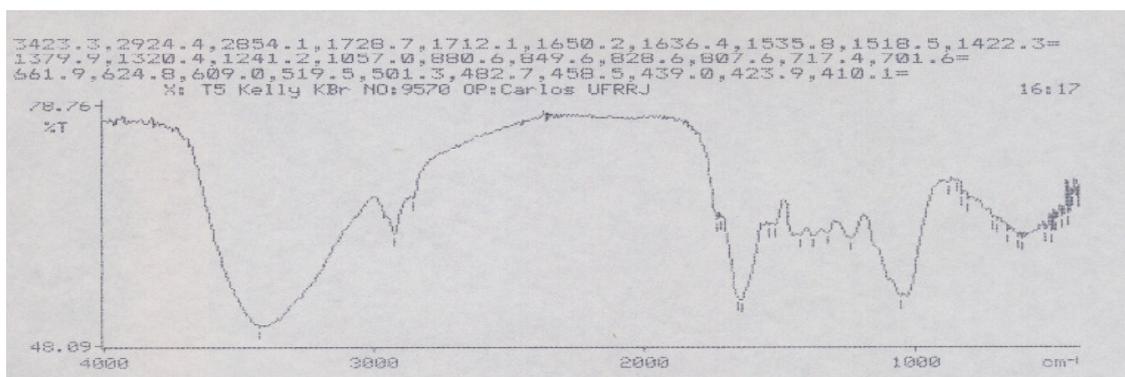


Figura 4. Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 5 da suspensão (0 mg/L de 2,4-D).

Figure 4. Spectro in the infrared of derived callus from the treatment 5 for the suspension (0 mg/L of 2,4-D)..

Análise no ultravioleta

A análise no ultravioleta permitiu não só a confirmação da presença de lignina como a estimativa da concentração da mesma em cada tratamento, fazendo com que fosse possível observar qual a concentração de 2,4-D foi mais eficiente para atenuar o processo de lignificação das células, levando em consideração que todos os tratamentos possuíam a quantidade de cinetina do meio MS de 10 mg/L. A determinação da concentração teve como base a absorbância em 280nm. Os valores da absorbância estão descritos na Tabela 2.

Os espectros de cada tratamento foram obtidos e comparados com o espectro da lignina padrão. Embora a suspensão celular tenha sido feita na presença de diferentes tratamentos, o comportamento dos espectros foi praticamente o mesmo nas cinco diferentes concentrações de 2,4-D (Tabela 3).

A análise de variância (Tabela 4) mostrou que o F calculado foi maior que o F tabelado a 5% de

probabilidade, com isso a hipótese das médias dos tratamentos serem iguais foi rejeitada. Houve diferença estatística entre as médias dos tratamentos a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (Tabela 5) mostrando que o tratamento 5 com 0 mg/L de 2,4-D teve a maior concentração de lignina sendo discrepante em relação aos outros tratamentos. O contrário ocorreu com o tratamento 2, com 2 mg/L de 2,4-D, apresentando a menor concentração de lignina (Figura 5).

O 2,4-D apresentou forte influência na lignificação, inviabilizando a ocorrência desse processo em algumas células. Isso permitiu a observação de que esta auxina inibiu a formação dos fenilpropanóides na concentração de 2 mg/L (T2), uma concentração intermediária levando em consideração que os tratamentos variaram de 0 a 5 mg/L e que na ausência de 2,4-D houve a maior concentração de lignina.

O acúmulo de metabólitos secundários por culturas de células requer uma via biossintética funcional assim como a presença de precursores em níveis apropriados.

Também é necessário que os processos catabólicos do final do produto não sejam maiores que os processos anabólicos que envolvem as sínteses da substância de interesse. Por outro lado, a diversidade de precursores

e intermediários para a biossíntese de uma grande quantidade de metabólitos envolve rotas regulatórias complexas que podem ser o fator chave responsável para o baixo nível acumulado de alguns metabólitos.

Tabela 2. Absorção de cada tratamento a 280 nm

Table 2. Absorption of each treatment at 280 nm

Tratamento	Concentração de 2,4-D	Repetição	ABS = 280 nm
1	1 mg/L	1	0,5989
1	1 mg/L	2	-
1	1 mg/L	3	0,3832
2	2 mg/L	1	0,1191
2	2 mg/L	2	-
2	2 mg/L	3	-
3	4 mg/L	1	1,8716
3	4 mg/L	2	-
3	4 mg/L	3	0,8135
4	5 mg/L	1	0,3652
4	5 mg/L	2	1,2252
4	5 mg/L	3	-
5	0 mg/L	1	2,3284
5	0 mg/L	2	2,6079
5	0 mg/L	3	2,2292

Tabela 3. Concentração de lignina em cada tratamento.

Table 3. Lignin concentration in each treatment.

Tratamento	Concentração de 2,4-D	Concentração de lignina (mg/L)
1	1 mg/L	47,3445
1	1 mg/L	38,2815
1	1 mg/L	29,2184
2	2 mg/L	7,0252
2	2 mg/L	7,0252
2	2 mg/L	7,0252
3	4 mg/L	154,2941
3	4 mg/L	109,8361
3	4 mg/L	65,3781
4	5 mg/L	27,7058
4	5 mg/L	99,9747
4	5 mg/L	63,8403
5	0 mg/L	192,6806
5	0 mg/L	220,0504
5	0 mg/L	184,3445

Tabela 4. Quadro da Análise de Variância
Table 4. Table with the analysis of variance

FV	GL	SQ	QM	Fc	Ftab
Trat.	4	66957.66	16739.41	22.540	0.00005
Resid.	10	7426.538	742.6538		

FV: Fator de Variação;GL: Grau de Liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado médio; Fc: Calculado; Ftab: Tabelado

Tabela 5. Teste de médias (Tukey) a 5% de probabilidade para concentrações de lignina para cada tratamento
Table 5. Averages test (Tukey) at 5% of probability for lignina concentrations in each treatment

Tratamento	Concentração de 2,4-D	Dados	Médias
5	0 mg/L	3	199,025 a
3	4 mg/L	3	109,836 b
4	5 mg/L	3	63,840 bc
1	1 mg/L	3	38,281 bc
2	2 mg/L	3	7,025 c

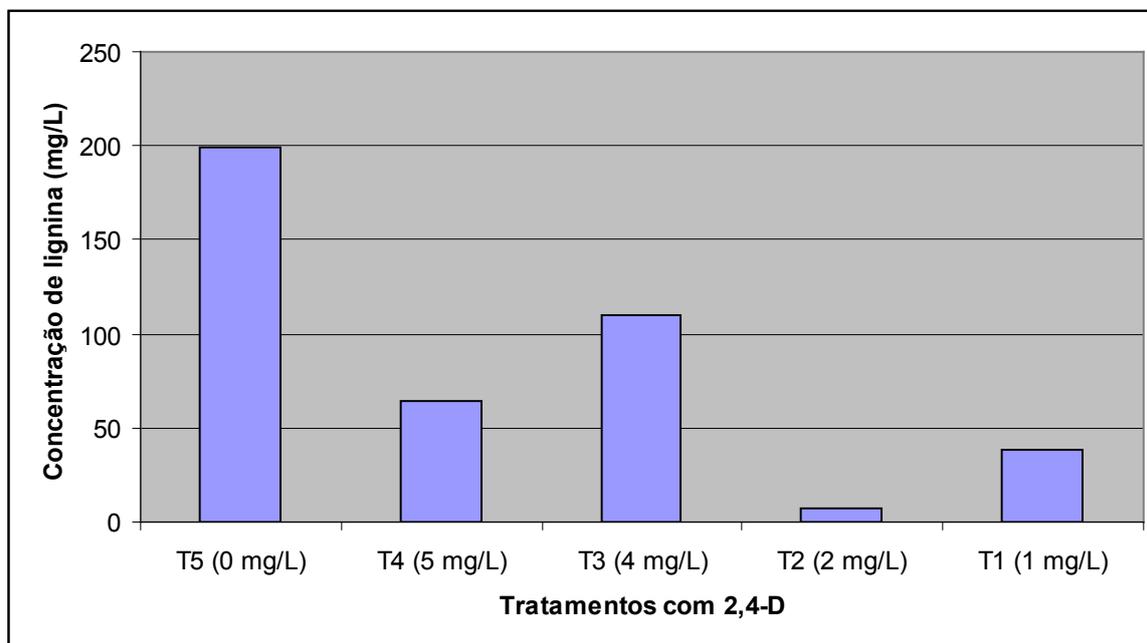


Figura 5. Concentrações de lignina em função dos diferentes tratamentos de 2,4-D em células.

Figure 5. Lignin concentrations at different treatments with of 2,4-D in cells.

Conclusões

1- Os espectros de infravermelho confirmaram a existência de lignina nas células em suspensão de *Eucalyptus urophylla*, que quantificada por ultravioleta revelaram que o 2,4 D atenua a formação de lignina.

2- O experimento proporcionou um desenvolvimento de protocolo para cultura em suspensão com baixo desenvolvimento de processo de lignificação, servindo como base para estudos de lignificação com técnica para produção de lignina extracelular.

3- Neste caso a concentração mais adequada de 2,4-D para atenuar o processo de lignificação em cultura de células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* foi de 2,0 mg/L.

Agradecimentos

Agradeço a CAPES e a FAPERJ pelo apoio dado para a realização desta pesquisa.

Referências bibliográficas

AGRIOS, G.N.; **Plant Pathology**, Academic Press, San Diego, 635p., 1997.

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.

BUSAM, G.; JUNGHANNS, K.T.; KNEUSEL, R.E.; KASSEMAYER, H.H., MATERN, U. Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme a 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. **Plant Physiology**, V.115, p.1039-1048, 1997a.

BUSAM, G.; KASSEMAYER, H.H.; MATERN, U. Differential expression of chitinases of *Vitis vinifera* L responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge **Plant Physiology**, V.115, p.1029-1038, 1997-b.

DAVEY, M.W.; GILOT, C.; PERSIAU, G.; OSTERGAARD, J.; HAN, Y.; BAUW, G.C.; VAN

MONTAGU, M.C. Ascorbate Biosynthesis in Arabidopsis Cell Suspension Culture. **Plant Physiology**, V. 121, p. 535-543, 1999.

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

EBERHARDT, T.L.; BERNARDS, M.A.; HE, L.; DAVIN, L.B.; WOOTEN, J.B.; LEWIS, N.G. Lignification in cell suspension cultures of *Pinus taeda* – in situ characterization of a gymnosperm lignin. **The Journal of Biological Chemistry**, V. 268,(28), p. 21088-21096, 1993.

HAHLBROCK, K. J.; SCHRODER, J.; VIEREGGE. Enzyme regulation in parsley and soybean cell cultures. **Advances in Biochemical Engineering**, V. 18, p. 39-60, 1980.

HAMMERSCHMIDT, R. & KUC, J. **Induced resistance to disease in plants** (Developments in Plant Pathology, V.4) Kluwer Academic Pub., Dordrech, 182p., 1982.

HOSEL, W.; FIEDELER-PREISS, A.; BORGMANN, E. Relationship of coniferin -glucosidase to lignification in various plant cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, V. 1, p. 137-148, 1982.

KARKÖNEN, A.; KOUTANIEMI, S.; MUSTONEN, M.; SYRJÄNEN, K.; BRUNOW, G.; KILPELÄINEN, I.; TEERI, T.; SIMOLA, K. Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. **Physiologia Plantarum**, V. 114,(3), p. 343-353, 2002.

KUBOI, T.; YAMADA, Y. Changing cell aggregations and lignification in tobacco suspension cultures. **Plant and Cell Physiology**, V.19(3), p.437-443, 1978.

LIN, S. Y. & DENCE, C.W. **Methods in lignin chemistry**, Berlin: Springer-Verlag, p. 578. 1992.

MARTIN, B.; COSSALTER, C. Les *Eucalyptus* des Iles de la Sonde. **Bois et forêts des tropiques**, n.164, p.3–25, 1976.

MOLLER, R.; KOCH, G.; NANAYAKKARA, B.;

SCHMITT, U. Lignification in cell cultures of *Pinus radiata*: activities of enzymes and lignin topochemistry. **Tree Physiology**, 26 (2), p. 201-210, 2006.

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

OZEKI, Y.; KOMAMINE, A.; TANAK, Y. **Physiology Plantarum**, V. 78, p. 400-408, 1990.

PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênes de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Scientia Forestalis**, n. 60, p. 135-148, 2001.

RALPH, J.; HATFIELD, R.; MARTIN, N. **Identify Cell Wall Factors Limiting Digestibility and forage utilization in sustainable dairy farming**. U.S. Dairy Forage Research Center. 2005. http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=405134&fy=2005. 11/01/2007 11: 33 a.m.

STICHER, L.; MAUCHI MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, V35, p. 235-270, 1997.

VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Phytopathol.**, V.18, p.259-288, 1980.

ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; SCHULTE, U. **Planta Medica (Suppl.)**, p. 79-101, 1975.

<http://plato.if.usp.br/1-2004/fap0181d/Lei%20de%20Beer.htm> 21/02/2007 13h50min (LEI de LAMBERT & BEER)